



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117321418 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 29

(21) 申请号 202280035699.8

(22) 申请日 2022.03.18

(30) 优先权数据

63/162,964 2021.03.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2022/052489 2022.03.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/195551 EN 2022.09.22

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·布拉斯 B·付 J·加勒特

G·戈尔甘 D·古森莱特纳

R·拉梅什 A·萨夫琴科

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 黄革生 隋晓平

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

权利要求书19页 说明书97页

序列表58页 附图60页

(54) 发明名称

癌症生物标志物及其使用方法

(57) 摘要

本公开涉及生物标志物用于预测对癌症(例如,黑素瘤)治疗的响应、用于选择用于癌症患者的治疗(例如,使用靶向疗法,例如,使用靶向BRAD的药剂和/或靶向MEK的药剂,与免疫肿瘤学疗法(例如,抗PD-1疗法)组合)、用于将癌症患者分层成不同治疗组、用于治疗癌症患者和用于预测癌症临床结局的用途。

1. 一种鉴定患有癌症的受试者可能受益于疗法的方法,包括:  
获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,  
其中大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者,并且  
其中所述疗法包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合。
2. 权利要求1的方法,其中与包括靶向疗法而没有免疫肿瘤学疗法的疗法相比,受试者可能从所述疗法具有增加的益处。
3. 一种为患有癌症的受试者选择疗法的方法,所述方法包括:  
获取受试者中(例如,来自所述受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,和  
如果所述值大于或等于参考值,则为受试者选择包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。
4. 权利要求1-3任一项的方法,进一步包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法。
5. 权利要求1-3任一项的方法,进一步包括向受试者施用改变的所述疗法的给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。
6. 权利要求1-3任一项的方法,进一步包括中断向受试者施用不同的疗法。
7. 权利要求1-3任一项的方法,进一步包括向受试者施用另外的疗法。
8. 权利要求7的方法,进一步包括向受试者施用预治疗,其中所述预治疗增加受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。
9. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:  
响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,  
向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的疗法,  
从而治疗患有癌症的受试者。
10. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:  
获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,  
如果所述值大于或等于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,  
从而治疗患有癌症的受试者。
11. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:  
向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法;  
响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的免疫肿瘤学疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

12. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

从而治疗患有癌症的受试者。

13. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

其中所述受试者表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

从而治疗患有癌症的受试者。

14. 权利要求1-13任一项的方法,其中所述CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包括CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的量的比率,例如,如通过本文公开的测定所测量的,例如流式细胞术免疫表型分析。

15. 权利要求14的方法,其中值大于或等于2(例如,2.01)。

16. 权利要求15的方法,其中值大于或等于2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。

17. 权利要求14的方法,其中值大于或等于3.3(例如,3.34)。

18. 权利要求17的方法,其中值大于或等于3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。

19. 权利要求1-18任一项的方法,其中所述获取值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。

20. 权利要求19的方法,其中来自受试者的样品包括血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。

21. 权利要求19或20的方法,其中在开始施用所述疗法前获取所述值(例如,是基线值)。

22. 权利要求19或20的方法,其中在开始施用所述疗法后获取所述值。

23. 权利要求22的方法,其中在开始施用疗法后1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、20、30、40周或更长时间或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获取所述值。

24. 权利要求1-23任一项的方法,进一步包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD8+肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的水平或活性的值,例如具有CD8+TIL炎症性表型的肿瘤。

25. 权利要求24的方法,其中与参考值相比,CD8+TIL的水平或活性的值的增加进一步

将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

26. 权利要求1-25任一项的方法,还包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)肿瘤突变负荷(TMB)的值。

27. 权利要求26的方法,其中与参考值相比增加的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

28. 权利要求27的方法,其中TMB的值大于或等于10mut/Mb,例如,大于或等于11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mut/Mb或更大。

29. 权利要求1-28任一项的方法,还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)PD-L1的水平和/或活性的值。

30. 权利要求29的方法,其中与参考值相比降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如,连同与参考值相比升高的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

31. 权利要求30的方法,其中癌症具有低的PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

32. 权利要求1-31任一项的方法,进一步包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)循环肿瘤DNA(ctDNA)的值。

33. 权利要求32的方法,其中与参考值相比,增加的ctDNA值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

34. 权利要求1-33任一项的方法,其中与不太可能受益于疗法或不太可能从疗法具有增加的受益的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法具有增加的受益的受试者具有改善的无进展生存(PFS)、客观反应持续时间(DOR)和/或总体生存(OS)。

35. 权利要求1-33任一项的方法,其中与未接受疗法或仅接受靶向疗法但未接受免疫肿瘤学疗法的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法具有增加的受益的受试者具有改善的PFS、DOR和/或OS。

36. 权利要求34或35的方法,其中PFS、DOR和/或OS改善1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、42、48、54、60个月或更长时间。

37. 权利要求34或35的方法,其中PFS、DOR和/或OS改善10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍。

38. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者已经用或正在用靶向疗法治疗。

39. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者尚未用或未正在用靶向疗法治疗。

40. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法。

41. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者尚未接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

42. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

43. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者尚未接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

44. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。

45. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。

46. 权利要求1-37任一项的方法,其中受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。

47. 权利要求1-46任一项的方法,其中所述靶向疗法包括靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂。

48. 权利要求47的方法,其中所述靶向疗法包括靶向BRAF的药剂或靶向MEK的药剂。

49. 权利要求47或48的方法,其中靶向BRAF的药剂是BRAF抑制剂。

50. 权利要求47-49任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂抑制野生型BRAF和/或具有V600突变(例如,V600E突变或V600K突变)的BRAF。

51. 权利要求47-50任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼、维罗菲尼、康奈非尼、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054,或其药学上可接受的盐。

52. 权利要求51的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼。

53. 权利要求51的方法,其中靶向BRAF的药剂是维罗菲尼。

54. 权利要求47-52任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以25mg至300mg之间(例如50mg至250mg之间或100mg至200mg之间,例如150mg)的剂量施用(例如口服),例如每天两次。

55. 权利要求47-54任一项的方法,其中靶向MEK的药剂是MEK抑制剂。

56. 权利要求47-55的方法,其中靶向MEK的药剂是曲美替尼、考比替尼、比尼美替尼、米达美替尼、匹马赛替、瑞法替尼、司美替尼、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CL-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554,或其药学上可接受的盐。

57. 权利要求56的方法,其中靶向MEK的药剂是曲美替尼。

58. 权利要求56的方法,其中靶向MEK的药剂是考比替尼。

59. 权利要求47-57任一项的方法,其中靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.1mg至5mg之间(例如0.5mg至4mg之间或1mg至3mg之间,例如2mg的剂量)的剂量施用(例如口服),例如每天一次。

60. 权利要求47、49-52、54-57或59任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼,并且靶向MEK的药剂是曲美替尼。

61. 权利要求47、49-51、53-56、58或59的方法,其中靶向BRAF的药剂是维罗菲尼且靶向MEK的药剂是考比替尼。

62. 权利要求1-61任一项的方法,其中所述免疫肿瘤学疗法包括PD-1或PD-L1结合拮抗剂。

63. 权利要求1-62任一项的方法,其中所述免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂。

64. 权利要求1-63任一项的方法,其中所述免疫肿瘤学疗法包括抗PD-1抗体分子。

65. 权利要求64的方法,其中所述抗PD-1抗体分子包含:

重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列;和

轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列,各自在表1中公开。

66. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VH,其包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:506至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

67. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:520至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

68. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:516至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

69. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。

70. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。

71. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链,其包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:508至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

72. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:522至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

73. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:518至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

74. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:522的氨基酸序列的轻链。

75. 权利要求65的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:518的氨基酸序列的轻链。

76. 权利要求64-75任一项的方法,其中抗PD-1抗体分子以约300mg-400mg的剂量施用于受试者,每三周一次或每四周一次(例如,约400mg,每四周一次)。

77. 权利要求1-76任一项的方法,其中免疫-肿瘤学疗法包括第二免疫-肿瘤学治疗剂(例如,本文所描述的免疫-肿瘤学治疗剂)。

78. 权利要求1-77任一项的方法,其中所述癌症是实体肿瘤、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤),或其转移性病变。

79. 权利要求78的方法,其中癌症是黑素瘤或其转移性病变。

80. 权利要求79的方法,其中黑素瘤是I期黑素瘤、II期黑素瘤、III期黑素瘤或IV期黑素瘤。

81. 权利要求78的方法,其中癌症是除黑素瘤以外的癌症。

82. 权利要求81的方法,其中癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌或结肠直肠癌,或其转移性病变。

83. 权利要求78-82任一项的方法,其中癌症是对于靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂难治的。

84. 权利要求78-83任一项的方法,其中癌症(例如黑素瘤)包含BRAF突变。

85. 权利要求84的方法,其中BRAF突变是V600突变。

86. 权利要求85的方法,其中V600突变是V600E或V600K突变。

87. 权利要求1-86任一项的方法,其中所述方法还包括向受试者施用另外的疗法(例如,对受试者的预治疗(例如,以增加受试者中CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值))。

88. 权利要求87的方法,其中所述疗法是一线、二线、三线或四线或之外的治疗。

89. 权利要求87或88的方法,其中所述疗法是辅助治疗。
90. 权利要求87-89任一项的方法,其中所述疗法是新辅助治疗。
91. 权利要求1-79任一项的方法,其包括获取例如如本文所描述的免疫激活的水平和/或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN  $\gamma$ 、或T细胞炎症性基因表达特征。
92. 一种鉴定可能受益于疗法的患有癌症的受试者的方法,其包括:  
获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,  
其中小于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者,和  
其中疗法包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)。
93. 权利要求92的方法,其中受试者不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法具有实质上增加的益处。
94. 一种为患有癌症的受试者选择疗法的方法,所述方法包括:  
获取受试者中(例如,来自所述受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,和  
如果所述值小于参考值,则为受试者选择包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法。
95. 权利要求92-94任一项的方法,进一步包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法。
96. 权利要求92-94任一项的方法,进一步包括向受试者施用改变的所述疗法的给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。
97. 权利要求92-94任一项的方法,进一步包括中断向受试者施用不同的疗法。
98. 权利要求92-94任一项的方法,进一步包括向受试者施用另外的疗法。
99. 权利要求92-98任一项的方法,进一步包括向受试者施用预治疗,其中所述预治疗增加受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。
100. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:  
响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,  
向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,  
从而治疗患有癌症的受试者。
101. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:  
获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,  
如果所述值小于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,  
从而治疗患有癌症的受试者。
102. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:  
向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法

组合的疗法；

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),

从而治疗患有癌症的受试者。

103. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,

其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,

从而治疗患有癌症的受试者。

104. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,

其中所述受试者表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,

从而治疗患有癌症的受试者。

105. 权利要求92-104任一项所述的方法,其中所述CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包括CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的量的比率,例如,如通过本文公开的测定所测量的,例如流式细胞术免疫表型分析。

106. 权利要求105的方法,其中值小于约3.3(例如,小于3.34)。

107. 权利要求106的方法,其中值小于约3、2.5、2、1.5、1或0.5。

108. 权利要求105的方法,其中值小于约2(例如,小于2.01)。

109. 权利要求108的方法,其中值小于约1.5、1或0.5。

110. 权利要求92-109任一项的方法,其中所述获取值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。

111. 权利要求110的方法,其中来自受试者的样品包括血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。

112. 权利要求110或111的方法,其中在开始施用所述疗法前获取所述值(例如,是基线值)。

113. 权利要求110或111的方法,其中在开始施用所述疗法后获取所述值。

114. 权利要求113的方法,其中在开始施用疗法后1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、20、30、40周或更长时间或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获取所述值。

115. 权利要求92-114任一项的方法,进一步包括获取受试者中(例如,在来自受试者的

样品中)的TMB值。

116. 权利要求115的方法,其中与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。

117. 权利要求115的方法,其中与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。

118. 权利要求116或117的方法,其中TMB的值小于10mut/Mb,例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1mut/Mb,或更小。

119. 权利要求92-118任一项的方法,其还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的PD-L1水平和/或活性的值。

120. 权利要求119的方法,其中降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如连同降低的TMB值一起,进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。

121. 权利要求119的方法,其中降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如连同降低的TMB值,进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。

122. 权利要求119-121任一项的方法,其中癌症具有低的PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

123. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者已经用或正在用靶向疗法治疗。

124. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者尚未用或未正在用靶向疗法治疗。

125. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法。

126. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者尚未接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

127. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

128. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者尚未接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

129. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。

130. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。

131. 权利要求92-122任一项的方法,其中受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。

132. 权利要求92-131任一项的方法,其中所述靶向疗法包括靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂。

133. 权利要求132的方法,其中靶向疗法包括靶向BRAF的药剂或靶向MEK的药剂。

134. 权利要求132或133的方法,其中靶向BRAF的药剂是BRAF抑制剂。

135. 权利要求132-134任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂抑制野生型BRAF和/或具有V600突变(例如,V600E突变或V600K突变)的BRAF。

136. 权利要求132-135任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼、维罗菲尼、康奈非尼、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054,或其药学上可接受的盐。

137. 权利要求136的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼。

138. 权利要求136的方法,其中靶向BRAF的药剂是维罗菲尼。

139. 权利要求132-138任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以25mg至300mg之间(例如50mg至250mg之间或100mg至200mg之间,例如150mg)的剂量施用(例如口服),例如每天两次。

140. 权利要求132-139任一项的方法,其中靶向MEK的药剂是MEK抑制剂。

141. 权利要求132-140任一项的方法,其中靶向MEK的药剂是曲美替尼、考比替尼、比尼美替尼、米达美替尼、匹马赛替、瑞法替尼、司美替尼、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CL-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554,或其药学上可接受的盐。

142. 权利要求141的方法,其中靶向MEK的药剂是曲美替尼。

143. 权利要求141的方法,其中靶向MEK的药剂是考比替尼。

144. 权利要求132-143任一项的方法,其中靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.1mg至5mg之间(例如0.5mg至4mg之间或1mg至3mg之间,例如2mg的剂量)的剂量施用(例如口服),例如每天一次。

145. 权利要求132-137、139-142和144任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼,并且靶向MEK的药剂是曲美替尼。

146. 权利要求132-136、138-141、143和144任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是维罗菲尼且靶向MEK的药剂是考比替尼。

147. 权利要求92-146任一项的方法,其中免疫肿瘤学疗法包括PD-1或PD-L1结合拮抗剂。

148. 权利要求92-147任一项的方法,其中免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂。

149. 权利要求92-148任一项的方法,其中免疫肿瘤学疗法包含抗PD-1抗体分子。

150. 权利要求149的方法,其中抗PD-1抗体分子包含:

重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列;和

轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列,各自在表1中公开。

151. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VH,其包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:506至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

152. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:520至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

153. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:516至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

154. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。

155. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。

156. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链,其包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:508至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

157. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:522至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

158. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:518至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

159. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列。

160. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列。

161. 权利要求150的方法,其中抗PD-1抗体分子以约300mg-400mg的剂量施用于受试者,每三周一次或每四周一次(例如,约400mg,每四周一次)。

162. 权利要求92-161任一项的方法,其中免疫-肿瘤学疗法包括第二免疫-肿瘤学治疗剂(例如,本文所描述的免疫-肿瘤学治疗剂)。

163. 权利要求92-162任一项的方法,其中所述癌症是实体肿瘤、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤),或其转移性病变。

164. 权利要求163的方法,其中癌症是黑素瘤或其转移性病变。

165. 权利要求164的方法,其中黑素瘤是I期黑素瘤、II期黑素瘤、III期黑素瘤或IV期黑素瘤。

166. 权利要求163的方法,其中癌症是除黑素瘤以外的癌症。

167. 权利要求166的方法,其中癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌或结肠直肠癌,或其转移性病变。

168. 权利要求92-167任一项的方法,其中癌症是对于靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂难治的。

169. 权利要求92-168任一项的方法,其中癌症(例如黑素瘤)包含BRAF突变。

170. 权利要求169的方法,其中BRAF突变是V600突变。

171. 权利要求170的方法,其中V600突变是V600E或V600K突变。

172. 权利要求92-171任一项的方法,其中所述方法还包括向受试者施用另外的疗法(例如,对受试者的预治疗(例如,以增加受试者中CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值))。

173. 权利要求172的方法,其中疗法是一线、二线、三线或四线或之外的治疗。

174. 权利要求172或173的方法,其中疗法是辅助治疗。

175. 权利要求172-174任一项的方法,其中疗法是新辅助治疗。

176. 权利要求92-175任一项的方法,其包括获取例如如本文所描述的免疫激活的水平或/或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN  $\gamma$ 、或T细胞炎症性基因表达特征。

177. 一种将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组的方法,包括:

获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的

水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

将具有小于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法的第一组,和

将具有大于或等于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法的第二组。

178.一种将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组以选择疗法的方法,包括:

获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

其中小于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包含靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的第一组成员,和

其中大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法与免疫疗法组合的疗法的第二组成员。

179.权利要求177或178的方法,还包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法。

180.权利要求177或178的方法,进一步包括向受试者施用疗法的改变的给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。

181.权利要求177或178的方法,还包括中断向受试者施用不同的疗法。

182.权利要求177或178的方法,还包括向受试者施用另外的疗法。

183.权利要求177-182任一项的方法,还包括向受试者施用预治疗,其中预治疗增加了受试者中(例如,在来自所述受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。

184.一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括:

响应于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包含靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或

向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

从而治疗患有癌症的受试者。

185.一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括:

获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;和

向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或

向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

从而治疗患有癌症的受试者。

186.一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿

瘤学疗法)的疗法;

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,或

向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

从而治疗患有癌症的受试者。

187.一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的疗法,所述疗法包括:

(a) 靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;或

(b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,其中在使用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

从而治疗患有癌症的受试者。

188.一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括向受试者施用有效量的疗法,所述疗法包括:

(a) 对受试者的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,在来自所述受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于所述CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;或

(b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

从而治疗患有癌症的受试者。

189.权利要求177-188任一项的方法,其中所述CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包括CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的量的比率,例如,如通过本文公开的测定所测量的,例如流式细胞术免疫表型分析。

190.权利要求189的方法,其中值大于或等于2(例如,2.01)。

191.权利要求190的方法,其中值大于或等于2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。

192.权利要求189的方法,其中值大于或等于3.3(例如,3.34)。

193.权利要求192的方法,其中值大于或等于3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。

194.权利要求189的方法,其中值小于约3.3(例如,小于约3.34)。

195.权利要求194的方法,其中值小于约3、2.5、2、1.5、1或0.5。

196. 权利要求189的方法,其中值小于约2(例如,小于约2.01)。

197. 权利要求196的方法,其中值小于约1.5、1或0.5。

198. 权利要求177-197任一项的方法,其中所述获取值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。

199. 权利要求198的方法,其中来自受试者的样品包括血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。

200. 权利要求198或199的方法,其中在开始施用所述疗法前获取所述值(例如,是基线值)。

201. 权利要求198或199的方法,其中在开始施用所述疗法后获取所述值。

202. 权利要求201的方法,其中在开始施用疗法后1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、20、30、40周或更长时间或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获取所述值。

203. 权利要求177-202任一项的方法,进一步包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD8+肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的水平或活性的值,例如具有CD8+TIL炎症性表型的肿瘤。

204. 权利要求203的方法,其中与参考值相比,CD8+TIL的水平或活性的值的增加进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

205. 权利要求177-204任一项的方法,还包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)肿瘤突变负荷(TMB)的值。

206. 权利要求205的方法,其中与参考值相比增加的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

207. 权利要求206的方法,其中TMB的值大于或等于10mut/Mb,例如,大于或等于11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mut/Mb或更大。

208. 权利要求177-207任一项的方法,还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)PD-L1的水平和/或活性的值。

209. 权利要求208的方法,其中与参考值相比降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如,连同与参考值相比升高的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

210. 权利要求209的方法,其中癌症具有低的PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

211. 权利要求177-210任一项的方法,进一步包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)循环肿瘤DNA(ctDNA)的值。

212. 权利要求211的方法,其中与参考值相比,增加的ctDNA值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。

213. 权利要求205的方法,其中与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。

214. 权利要求205的方法,其中与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。

215. 权利要求213或214的方法,其中TMB的值小于10mut/Mb,例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1mut/Mb或更小。

216. 权利要求213-215任一项的方法,还包括获取受试者中(例如,来自所述受试者的

样品中)PD-L1的水平和/或活性的值。

217. 权利要求216的方法,其中降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如连同降低的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。

218. 权利要求216的方法,其中降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如连同降低的TMB值,进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。

219. 权利要求213-218任一项的方法,其中癌症具有低的PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

220. 权利要求177-219任一项的方法,其中与不太可能受益于疗法或不太可能从疗法具有增加的受益的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法具有增加的受益的受试者具有改善的无进展生存(PFS)、客观反应持续时间(DOR)和/或总体生存(OS)。

221. 权利要求177-219任一项的方法,其中与未接受疗法或仅接受靶向疗法但未接受免疫肿瘤学疗法的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法具有增加的受益的受试者具有改善的PFS、DOR和/或OS。

222. 权利要求220或221的方法,其中PFS、DOR和/或OS改善1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、42、48、54、60个月或更长时间。

223. 权利要求220或221的方法,其中PFS、DOR和/或OS改善10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多倍。

224. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者已经或正在用靶向疗法治疗。

225. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者尚未用或未正在用靶向疗法治疗。

226. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法。

227. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者尚未接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

228. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

229. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者尚未接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

230. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。

231. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。

232. 权利要求177-223任一项的方法,其中受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。

233. 权利要求177-232任一项的方法,其中靶向疗法包括靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂。

234. 权利要求233的方法,其中靶向疗法包括靶向BRAF的药剂或靶向MEK的药剂。

235. 权利要求233或234的方法,其中靶向BRAF的药剂是BRAF抑制剂。

236. 权利要求233-235任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂抑制野生型BRAF和/或具有

V600突变(例如,V600E突变或V600K突变)的BRAF。

237. 权利要求233-236任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼、维罗菲尼、康奈非尼、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054,或其药学上可接受的盐。

238. 权利要求237的方法,其中靶向BRAF的试剂是达拉非尼。

239. 权利要求237的方法,其中靶向BRAF的试剂是维罗菲尼。

240. 权利要求232-239任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以25mg至300mg之间(例如50mg至250mg之间或100mg至200mg之间,例如150mg)的剂量施用(例如口服),例如每天两次。

241. 权利要求232-240任一项的方法,其中靶向MEK的药剂是MEK抑制剂。

242. 权利要求232-241任一项的方法,其中靶向MEK的药剂是曲美替尼、考比替尼、比尼美替尼、米达美替尼、匹马赛替、瑞法替尼、司美替尼、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CL-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554,或其药学上可接受的盐。

243. 权利要求242的方法,其中靶向MEK的药剂是曲美替尼。

244. 权利要求242的方法,其中靶向MEK的药剂是考比替尼。

245. 权利要求232-244任一项的方法,其中靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.1mg至5mg之间(例如0.5mg至4mg之间或1mg至3mg之间,例如2mg的剂量)的剂量施用(例如口服),例如每天一次。

246. 权利要求232-238、240-243或245任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是达拉非尼,并且靶向MEK的药剂是曲美替尼。

247. 权利要求232-237、239-242、244或245任一项的方法,其中靶向BRAF的药剂是维罗菲尼且靶向MEK的药剂是考比替尼。

248. 权利要求177-247任一项的方法,其中免疫肿瘤学疗法包括PD-1或PD-L1结合拮抗剂。

249. 权利要求177-248任一项的方法,其中免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂。

250. 权利要求177-249任一项的方法,其中免疫肿瘤学疗法包含抗PD-1抗体分子。

251. 权利要求250的方法,其中所述抗PD-1抗体分子包含:

重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列;和

轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列,各自在表1中公开。

252. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VH,其包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:506至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

253. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:520至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

254. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:516至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

255. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列

的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。

256. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。

257. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链,其包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:508至少85%、90%、95%或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

258. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:522至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

259. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含轻链,所述轻链包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:518至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。

260. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列。

261. 权利要求251的方法,其中抗PD-1抗体分子包含重链和轻链,所述重链包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,所述轻链包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列。

262. 权利要求250-261任一项的方法,其中抗PD-1抗体分子以约300mg-400mg的剂量施用于受试者,每三周一次或每四周一次(例如,约400mg,每四周一次)。

263. 权利要求177-262任一项的方法,其中免疫-肿瘤学疗法包括第二免疫-肿瘤学治疗剂(例如,本文所述的免疫-肿瘤学治疗剂)。

264. 权利要求177-263任一项的方法,其中癌症是实体瘤、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤)或其转移性病变。

265. 权利要求264的方法,其中癌症是黑素瘤或其转移性病变。

266. 权利要求265的方法,其中黑素瘤是I期黑素瘤、II期黑素瘤、III期黑素瘤或IV期黑素瘤。

267. 权利要求264的方法,其中癌症是除黑素瘤以外的癌症。

268. 权利要求267的方法,其中癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌或结肠直肠癌或其转移性病变。

269. 权利要求177-268任一项的方法,其中癌症是靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂难治的。

270. 权利要求177-269任一项的方法,其中癌症(例如黑素瘤)包含BRAF突变。

271. 权利要求270的方法,其中BRAF突变是V600突变。

272. 权利要求271的方法,其中V600突变是V600E或V600K突变。

273. 权利要求177-272任一项的方法,其中所述方法还包括向受试者施用另外的疗法(例如,对受试者的预处理(例如,以增加受试者中CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值))。

274. 权利要求273的方法,其中疗法是一线、二线、三线或四线或之外的治疗。

275. 权利要求273或274所述的方法,其中疗法是辅助治疗。

276. 权利要求273-275任一项的方法,其中疗法是新辅助治疗。

277. 权利要求177-276任一项的方法,其包括获取例如如本文所描述的免疫激活的水

平和/或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN  $\gamma$ 、或T细胞炎症性基因表达特征。

278. 一种包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫-肿瘤学疗法组合的疗法。

279. 一种包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;

如果值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

280. 一种包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法;

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的免疫肿瘤学疗法。

281. 一种包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,所述疗法包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

其中在施用前,已经确定了受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

282. 一种包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,

其中受试者表征为受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

283. 一种包括靶向疗法的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)。

284. 一种包括靶向疗法的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

如果所述值小于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)。

285. 一种包括靶向疗法的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法;

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)。

286. 一种用于治疗患有癌症的受试者的方法中的包括靶向疗法的疗法,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中在施用前,已经确定了受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值。

287. 一种包括靶向疗法的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),

其中受试者表征为CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值。

288. 一种包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

响应于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,CD8+T细胞)的疗法;或

向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

289. 一种包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;和

向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或

向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包

括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

290. 一种包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,其包括:

向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法);

响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,或

向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

291. 一种包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,包括向受试者施用有效量的疗法,其包括:

(a) 靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中在施用前,已经确定了受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;或

(b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合,其中在施用之前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

292. 一种包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法用于治疗患有癌症的受试者的方法中,包括向受试者施用有效量的疗法,其包括:

(a) 对受试者的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;或

(b) 靶向疗法与免疫-肿瘤学疗法组合,其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

## 癌症生物标志物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2021年3月18日提交的美国临时申请No. 63/162,964的权益,其内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并且通过引用整体并入本文。所述ASCII拷贝创建于2022年3月4日,命名为C2160-7032W0\_SL.txt,大小为51,904字节。

[0005] 背景

[0006] 癌症是世界范围内死亡的主要原因,每年导致超过8百万人死亡。黑色素瘤是由色素产生细胞的不受控制的增殖导致的恶性肿瘤。黑色素瘤是最常见的癌症之一,其流行率正在上升,并且大部分皮肤癌死亡由黑色素瘤造成。

[0007] 除了传统的癌症疗法如化疗和放射之外,已经开发了新的策略来治疗癌症。其中包括靶向疗法和免疫肿瘤学疗法。寻找用于癌症患者的正确疗法是重要的,因为癌症可以快速生长和转移,并且由于存在未检测到的播散性肿瘤细胞,单独的手术切除可能不足以治愈。尽管癌症疗法取得了进展,但仍需要鉴定免疫肿瘤学和靶向疗法的响应者,因为两种治疗策略都是早期和晚期癌症(如黑素瘤)中的有价值的治疗选择。

[0008] 概述

[0009] 本公开提供了用于预测对癌症治疗(例如,对黑素瘤治疗)的响应、用于为癌症患者(例如,黑素瘤患者)选择治疗、用于将癌症患者(例如,黑素瘤患者)分层到不同的治疗组、用于治疗癌症患者(例如,黑素瘤患者)以及用于预测患有癌症(例如,黑素瘤)的患者的临床结局的生物标志物。

[0010] 因此,在一个方面中,本公开的特征在于鉴定可能受益于一种疗法的患有癌症的受试者的方法。所述方法包括获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,其中大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者,并且其中所述疗法包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合。

[0011] 在一些实施方案中,与包含靶向疗法而没有免疫肿瘤学疗法的疗法相比,受试者可能具有增加的来自所述疗法的益处。

[0012] 在另一个方面中,本公开的特征在于为患有癌症的受试者选择疗法的方法。所述方法包括获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值大于或等于参考值,则为受试者选择包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0013] 在任何上述方面的一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法。在任何上述方面的一些实施方案中,所述方法进一步包括向受试者施用改变的疗法给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。

[0014] 在任何上述方面的一些实施方案中,所述方法还包括中断向所述受试者施用不同的疗法。

[0015] 在任何上述方面的一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用另外的疗法。

[0016] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括向受试者施用预治疗,其中,预治疗增加受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。

[0017] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0018] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括获得受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,如果所述值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0019] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法;响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的免疫肿瘤学疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0020] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0021] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,其中所述受试者的特征在于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0022] 在一些实施方案中,CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包含CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的总量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的总量的比率,例如,如通过本文公开的测定法(例如,流式细胞术免疫表型分析)测量的。在某些实施方案中,所述值大于或等于2(例如,2.01)。在某些实施方案中,所述值大于或等于2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。在某些实施方案中,所述值大于或等于3.3(例如,3.34)。在某些实施方案中,所述值大于或等于3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。

[0023] 在一些实施方案中,获取该值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性)相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。在某些实施方案中,所述来自受试者的样品包括血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。在某些实施方案中,在开始施用疗法前获取该值(例如,是基线值)。在某些实施方案中,在开始施用疗法后获得该值。在某些实施方案中,在开始施用疗法后1、2、3、4、8、10、12、20、30、40周或更长时间或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获得该值。

[0024] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD8+肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)(例如,具有CD8+TIL炎症性表型的肿瘤)的水平或活性的值。在某些实施方案中,与参考值相比,CD8+TIL的水平或活性值的增加进一步将受试者鉴定为可能受益于所述治疗的受试者。

[0025] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)的肿瘤突变负荷(TMB)的值。在某些实施方案中,与参考值相比,增加的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。

[0026] 在一些实施方案中,TMB的值大于或等于10mut/Mb,例如,大于或等于11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mut/Mb或更大。

[0027] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的PD-L1的水平和/或活性的值。在某些实施方案中,PD-L1的水平和/或活性的值与参考值相比降低,例如,连同TMB的值与参考值相比升高,进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。在某些实施方案中,癌症具有低PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

[0028] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的循环肿瘤DNA(ctDNA)的值。在某些实施方案中,与参考值相比,增加的ctDNA值进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。

[0029] 在一些实施方案中,与不太可能受益于所述疗法或不太可能具有增加的受益于所述疗法的受试者相比,可能受益于所述疗法或可能具有增加的受益于所述疗法的受试者具有改善的无进展生存(PFS)、客观响应持续时间(DOR)和/或总体生存(OS)。在某些实施方案中,与未接受该疗法或仅接受靶向疗法但未接受免疫肿瘤学疗法的受试者相比,可能受益于所述疗法或可能具有增加的受益于所述疗法的受试者具有改善的PFS、DOR和/或OS。在某些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、42、48、54、60个月或更长时间。在某些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多。

[0030] 在一些实施方案中,受试者已经或正在用靶向疗法治疗。

[0031] 在一些实施方案中,受试者尚未用靶向疗法治疗或未正在用靶向疗法治疗。

[0032] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0033] 在一些实施方案中,其中受试者未曾接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0034] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0035] 在一些实施方案中,受试者未接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

- [0036] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。
- [0037] 在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。
- [0038] 在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。
- [0039] 在一些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂。在某些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂或靶向MEK的药剂。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是BRAF抑制剂。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂抑制野生型BRAF和/或具有V600突变(例如,V600E突变或V600K突变)的BRAF。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼(dabrafenib)、维罗菲尼(vemurafenib)、康奈非尼(encorafenib)、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是维罗菲尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以25mg至300mg(例如50mg至250mg或100mg至200mg,例如150mg)的剂量施用(例如口服),例如每天两次。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是MEK抑制剂。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是曲美替尼(trametinib)、考比替尼(cobimetinib)、比尼美替尼(binimetinib)、米达美替尼(mirdametinib)、匹马赛替(pimasertib)、瑞法替尼(refametinib)、司美替尼(selumetinib)、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CI-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是曲美替尼。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是考比替尼。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.1mg至5mg(例如0.5mg至4mg或1mg至3mg,例如2mg的剂量)的剂量施用(例如口服),例如每天一次。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼,并且靶向MEK的药剂是曲美替尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是维罗菲尼,并且靶向MEK的药剂是考比替尼。
- [0040] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括PD-1或PD-L1结合拮抗剂。
- [0041] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂。
- [0042] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括抗PD-1抗体分子。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:
- [0043] 包含SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列的重链可变区(VH);和包含SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列的轻链可变区(VL),各自在表1中公开。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VH,其包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:506至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:520至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:516至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含重链,

其包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:508至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:522至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:518至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:522的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:518的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子以约300mg至400mg的剂量施用于受试者,每三周一次或每四周一次(例如,每四周一次约400mg)。

[0044] 在一些实施方案中,免疫-肿瘤学疗法包括第二免疫-肿瘤学治疗剂(例如,本文所述的免疫-肿瘤学治疗剂)。

[0045] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤)或其转移性病变。在某些实施方案中,癌症是黑素瘤或其转移性病变。在某些实施方案中,黑素瘤是I期黑素瘤、II期黑素瘤、III期黑素瘤或IV期黑素瘤。在某些实施方案中,癌症是除黑素瘤以外的癌症。在某些实施方案中,癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌或结肠直肠癌,或其转移性病变。在某些实施方案中,癌症是对于靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂难治的。在某些实施方案中,癌症(例如,黑素瘤)包含BRAF突变。在某些实施方案中,BRAF突变是V600突变。在某些实施方案中,V600突变是V600E或V600K突变。

[0046] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用另外的疗法(例如,对受试者的预处理(例如,增加受试者中CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值))。在某些实施方案中,所述疗法是一线、二线、三线或四线或之外的(beyond)治疗。在某些实施方案中,所述疗法是辅助治疗。在某些实施方案中,所述疗法是新辅助治疗。

[0047] 在一些实施方案中,该方法包括获取免疫激活的水平和/或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN $\cdot$ 或T细胞炎症性基因表达标签,例如,如本文所描述的。

[0048] 在另一个方面中,本公开的特征在于鉴定可能受益于一种疗法的患有癌症的受试者的方法。所述方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,其中小于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者,并且其中所述疗法包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)。在一些实施方案中,受试者不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有实质上增加的益处。

[0049] 在另一个方面中,本公开的特征在于为患有癌症的受试者选择疗法的方法。在一些实施方案中,该方法包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值小于参考值,则为受试者选择包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法。

[0050] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法。

[0051] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用改变的疗法给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。

[0052] 在一些实施方案中,该方法还包括中断向受试者施用不同的疗法。

[0053] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用另外的疗法。

[0054] 在一些实施方案中,该方法进一步包括向受试者施用预处理,其中所述预处理增加受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。

[0055] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0056] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。这一方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,如果该值小于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0057] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法;响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),从而治疗患有癌症的受试者。

[0058] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0059] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,其中受试者的特征在于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0060] 在一些实施方案中,CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包含CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的总量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的总量的比率,例如,如通过本文公开的测定法(例如,流式细胞术免疫表型分析)测量的。在某些实施方案中,该值小于约3.3(例如,小于3.34)。在某些实施方案中,该值小于约3、2.5、2、1.5、1或0.5。在某些实施方案中,该值小于约2(例如,小于2.01)。在某些实施方案中,该值小于约1.5、1或0.5。

[0061] 在一些实施方案中,获取该值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。在某些实施方案中,来自受试者的样品包含血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。在某些实施方案中,在开始施用疗法前获取该值(例如,是基线值)。在某些实施方案中,在开始施用疗法后1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、20、30、40周或更长时间或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获取该值。

[0062] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的TMB值。在某些实施方案中,与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。在某些实施方案中,与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。在某些实施方案中,TMB的值小于10mut/Mb,例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1mut/Mb或更小。

[0063] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)PD-L1的水平和/或活性的值。在某些实施方案中,降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如,连同降低的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。在某些实施方案中,降低的PD-L1水平和/或活性的值(例如,连同降低的TMB值)进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。在某些实施方案中,癌症具有低PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

[0064] 在一些实施方案中,受试者已经或正在用靶向疗法治疗。

[0065] 在一些实施方案中,受试者尚未用靶向疗法治疗或未正在用靶向疗法治疗。

[0066] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0067] 在一些实施方案中,受试者未曾接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0068] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0069] 在一些实施方案中,受试者未曾接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0070] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。

[0071] 在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。

[0072] 在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。

[0073] 在一些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂。在某些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂或靶向MEK的药剂。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是BRAF抑制剂。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂抑制野生型BRAF和/或具有V600突变(例如,V600E突变或V600K突变)的BRAF。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼(dabrafenib)、维罗菲尼(vemurafenib)、康奈非尼(encorafenib)、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是维罗菲尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以25mg至300mg(例如50mg至250mg或100mg至200mg,例如150mg)的剂量施用(例如

口服),例如每天两次。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是MEK抑制剂。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是曲美替尼(trametinib)、考比替尼(cobimetinib)、比尼美替尼(binimetinib)、米达美替尼(mirdametinib)、匹马赛替(pimasertib)、瑞法替尼(refametinib)、司美替尼(selumetinib)、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CI-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是曲美替尼。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是考比替尼。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.1mg至5mg(例如0.5mg至4mg或1mg至3mg,例如2mg的剂量)的剂量施用(例如口服),例如每天一次。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼,并且靶向MEK的药剂是曲美替尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是维罗菲尼,并且靶向MEK的药剂是考比替尼。

[0074] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括PD-1或PD-L1结合拮抗剂。

[0075] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂。

[0076] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括抗PD-1抗体分子。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:包含SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列的重链可变区(VH);和包含SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列的轻链可变区(VL),各自在表1中公开。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VH,其包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:506至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:520的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:520至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VL,其包含SEQ ID NO:516的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:516至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含重链,其包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:508至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:522至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:518至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:522的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:518的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子以约300mg至400mg的剂量施用于受试者,每三周一次或每四周一次(例如,每四周一次约400mg)。

[0077] 在一些实施方案中,免疫-肿瘤学疗法包括第二免疫-肿瘤学治疗剂(例如,本文所述的免疫-肿瘤学治疗剂)。

[0078] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤)或其

转移性病变。在某些实施方案中,癌症是黑素瘤或其转移性病变。在某些实施方案中,黑素瘤是I期黑素瘤、II期黑素瘤、III期黑素瘤或IV期黑素瘤。在某些实施方案中,癌症是除黑素瘤以外的癌症。在某些实施方案中,癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌或结肠直肠癌,或其转移性病变。

[0079] 在一些实施方案中,癌症是对于靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂难治的。

[0080] 在一些实施方案中,癌症(例如,黑素瘤)包含BRAF突变。在某些实施方案中,BRAF突变是V600突变。在某些实施方案中,V600突变是V600E或V600K突变。

[0081] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用另外的疗法(例如,对受试者的预处理(例如,增加受试者中CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值))。在某些实施方案中,疗法是一线、二线、三线或四线或之外的治疗。在某些实施方案中,疗法是辅助疗法。在某些实施方案中,疗法是新辅助疗法。

[0082] 在一些实施方案中,该方法包括获取免疫激活的水平或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN $\cdot$ 或T细胞炎症基因表达标签,例如如本文所述的。

[0083] 在另一个方面中,本公开的特征在于将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组的方法。该方法包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,将具有小于参考值的值的受试者分配给可能受益于包含靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的第一组,以及将具有大于或等于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法第二组。

[0084] 在另一个方面中,本公开的特征在于将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组以用于选择疗法的方法。该方法包括获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,其中小于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包含靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法的第一组成员,并且其中大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法与免疫疗法组合的疗法的第二组成员。

[0085] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法。

[0086] 在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用改变的疗法给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。

[0087] 在一些实施方案中,所述方法还包括中断向受试者施用不同的疗法。

[0088] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用另外的疗法。

[0089] 在一些实施方案中,该方法进一步包括向受试者施用预处理,其中预处理增加受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。

[0090] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,

没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0091] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;并且向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0092] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0093] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的疗法,该疗法包括(a)靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中在施用前,已经确定受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;或(b)靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0094] 在另一个方面中,本公开的特征在于治疗患有癌症的受试者的方法。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用有效量的疗法,该疗法包括:(a)向受试者施用靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;或(b)靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0095] 在一些实施方案中,CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包括CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的总量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的总量的比率,例如,如通过本文公开的测定法(例如,流式细胞术免疫表型分析)所测量的。在某些实施方案中,该值大于或等于2(例如,2.01)。在某些实施方案中,该值大于或等于2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。在某些实施方案中,该值大于或等于3.3(例如,3.34)。在某些实施

方案中,该值大于或等于3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10。在某些实施方案中,该值小于约3.3(例如,小于约3.34)。在某些实施方案中,该值小于约3、2.5、2、1.5、1或0.5。在某些实施方案中,该值小于约2(例如,小于约2.01)。在某些实施方案中,该值小于约1.5、1或0.5。

[0096] 在一些实施方案中,获取该值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。在某些实施方案中,来自受试者的样品包含血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。在某些实施方案中,在开始施用疗法前获取该值(例如,是基线值)。在某些实施方案中,该值是在开始施用疗法后获取的。在某些实施方案中,在开始施用疗法后1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、20、30、40周或更长时间或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获取该值。

[0097] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD8+肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)(例如,具有CD8+TIL炎症性表型的肿瘤)的水平或活性的值。在某些实施方案中,与参考值相比,CD8+TIL的水平或活性值的增加进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。

[0098] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)的肿瘤突变负荷(TMB)值。在某些实施方案中,与参考值相比,增加的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。在某些实施方案中,TMB的值大于或等于10mut/Mb,例如,大于或等于11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mut/Mb或更大。

[0099] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的PD-L1水平和/或活性的值。在某些实施方案中,PD-L1的水平或活性的值与参考值相比降低,例如,连同与参考值相比增加的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。在某些实施方案中,癌症具有低的或不可检测的PD-L1表达。

[0100] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的循环肿瘤DNA(ctDNA)值。在某些实施方案中,与参考值相比,增加的ctDNA值进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法的受试者。在某些实施方案中,与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。在某些实施方案中,与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。在某些实施方案中,TMB的值小于10mut/Mb,例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1mut/Mb或更小。

[0101] 在一些实施方案中,该方法还包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)的PD-L1水平和/或活性的值。在某些实施方案中,降低的PD-L1的水平或活性的值,例如,连同降低的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于所述疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。在某些实施方案中,降低的PD-L1的水平或活性的值(例如,连同降低的TMB值)进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的收益的受试者。在某些实施方案中,癌症具有低的或不可检测的PD-L1表达。

[0102] 在一些实施方案中,与不太可能受益于疗法或不太可能从疗法中具有增加的益处的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法中具有增加的受益的受试者具有改善的无进

展生存 (PFS)、客观响应持续时间 (DOR) 和/或总体生存 (OS)。

[0103] 在一些实施方案中,与未接受疗法或仅接受靶向疗法但未接受免疫肿瘤学疗法的受试者相比,能受益于疗法或可能从疗法中具有增加的受益的受试者具有改善的PFS、DOR和/或OS。在某些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、42、48、54、60个月或更长时间。在某些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多。

[0104] 在一些实施方案中,受试者已经或正在用靶向疗法治疗。

[0105] 在一些实施方案中,受试者尚未用靶向疗法治疗或未正在用靶向疗法治疗。

[0106] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0107] 在一些实施方案中,受试者未接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0108] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0109] 在一些实施方案中,受试者未接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0110] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。

[0111] 在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。

[0112] 在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。

[0113] 在一些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂。在某些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂或靶向MEK的药剂。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是BRAF抑制剂。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂抑制野生型BRAF和/或具有V600突变(例如,V600E突变或V600K突变)的BRAF。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼(dabrafenib)、维罗菲尼(vemurafenib)、康奈非尼(encorafenib)、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是维罗菲尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以25mg至300mg(例如50mg至250mg或100mg至200mg,例如150mg)的剂量施用(例如口服),例如每天两次。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是MEK抑制剂。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是曲美替尼(trametinib)、考比替尼(cobimetinib)、比尼美替尼(binimetinib)、米达美替尼(mirdametinib)、匹马赛替(pimasertib)、瑞法替尼(refametinib)、司美替尼(selumetinib)、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CI-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554或其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是曲美替尼。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂是考比替尼。在某些实施方案中,靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.1mg至5mg(例如0.5mg至4mg或1mg至3mg,例如2mg的剂量)的剂量施用(例如口服),例如每天一次。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是达拉非尼,并且靶向MEK的药剂是曲美替尼。在某些实施方案中,靶向BRAF的药剂是维罗菲尼,并且靶向MEK的药剂是考比替尼。

[0114] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括PD-1或PD-L1结合拮抗剂。

[0115] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂。

[0116] 在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括抗PD-1抗体分子。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列的重链可变区(VH);和含有SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列的轻链可变区(VL),各自在表1中公开。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VH,其包含SEQ ID NO:506的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:506至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VL,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:520,或与SEQ ID NO:520至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含VL,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:516,或与SEQ ID NO:516至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含重链,其包含SEQ ID NO:508的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:508至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:522的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:522至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含轻链,其包含SEQ ID NO:518的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:518至少85%、90%、95%、或99%相同或更高相同的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:522的氨基酸序列的轻链。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子包含含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:518的氨基酸序列的轻链。

[0117] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体分子以约300mg至400mg的剂量,每三周一次或每四周一次(例如,约400mg,每四周一次)施用于受试者。

[0118] 在一些实施方案中,免疫-肿瘤学疗法包括第二免疫-肿瘤学治疗剂(例如,本文所述的免疫-肿瘤学治疗剂)。

[0119] 在一些实施方案中,癌症是实体瘤、血液癌症(例如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤)或其转移性病变。在某些实施方案中,癌症是黑素瘤或其转移性病变。在某些实施方案中,黑素瘤是I期黑素瘤、II期黑素瘤、III期黑素瘤或IV期黑素瘤。在某些实施方案中,癌症是除黑素瘤以外的癌症。在某些实施方案中,癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胰腺癌或结肠直肠癌,或其转移性病变。

[0120] 在一些实施方案中,癌症是靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂难治的。

[0121] 在一些实施方案中,癌症(例如,黑素瘤)包含BRAF突变。在某些实施方案中,BRAF突变是V600突变。在某些实施方案中,V600突变是V600E或V600K突变。

[0122] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用另外的疗法(例如,对所述受试者的预处理(例如,增加受试者中CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值))。在某些实施方案中,所述疗法是一线、二线、三线或四线或之外的疗法。在某些实施方案中,所述疗法是辅助疗法。在某些实施方案中,所述疗法是新辅助疗法。

[0123] 在一些实施方案中,该方法包括获取免疫激活的水平和/或活性的值,所述免疫激

活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN $\cdot$ 或T细胞炎症性基因表达标签,例如如本文所述的。

[0124] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0125] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括获取受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,如果该值大于或等于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0126] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法;响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的免疫肿瘤学疗法。

[0127] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

[0128] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,其中受试者的特征在于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

[0129] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法。

[0130] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,如果该值小于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用

或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法。

[0131] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合的疗法;响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)。

[0132] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值。

[0133] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,其中受试者的特征在于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值。

[0134] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0135] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;并且向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0136] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法的疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法);响应于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,对具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,或对具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0137] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中,包括向受试者施用有效量的疗法,所述疗法包括:(a) 靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中在施用前,已经确定受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值低于参考值;或(b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

[0138] 在另一个方面中,本公开的特征在于一种疗法,其包括靶向疗法或包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,用于治疗患有癌症的受试者的方法中,包括向受试者施用有效量的疗法,所述疗法包括(a) 向受试者施用靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值低于参考值,或(b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的组合,其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

[0139] 附图简述

[0140] 图1是试验配置图。BID,每天两次;Q4W,每四周;QD,每天一次。

[0141] 图2A-2C是显示在基线和治疗4周后血浆和外周血单个核细胞的流式细胞术和细胞因子分析的一系列图。使用T细胞激活和增殖的标志物(N=323)对外周血单个核细胞进行免疫表型分析,并对在基线和治疗4周后采集的血浆样品进行细胞因子谱分析(N=468)。显示了增殖的CD8+/PD-1+T细胞(2A)、激活的细胞毒性CD8+T细胞(2B)和血浆IFN- $\gamma$ (2C)。CD=分化簇;HLA-DR=人白细胞抗原,DR亚型;IFN=干扰素;PD-1=程序性死亡受体1;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼。

[0142] 图3A-3C是显示在基线和治疗4周后外周血单个核细胞的免疫表型分析的另外结果的一系列图。在基线和治疗4周后采集的血浆样品(N=323)中使用T细胞激活和增殖的标志物对外周血单个核细胞进行免疫表型分析。显示了增殖的CD8+T细胞(图3A)、激活的CD4+T细胞(图3B)和增殖的PD-1+/CD4+T细胞(图3C)的水平。CD=分化簇;HLA-DR=人白细胞抗原,DR亚型;PD-1=程序性死亡1;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼。

[0143] 图4A-4E是显示基线和治疗4周后细胞因子谱分析的另外结果的一系列图。显示了在基线和治疗4周后采集的血浆样品中CXCL10(N=474)(图4A)、IL-15(N=473)(图4B)、IL-18(N=467)(图4C)、IL-17A(N=473)(图4D)和IL-12p40(N=473)(图4E)的水平。CXCL=C-X-C基序趋化因子配体;IL=白介素;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼。

[0144] 图5A和5B是显示基于基线外周CD4+/CD8+比例和治疗分支的无进展生存的一对图。显示了基于来自随机分配到安慰剂-DabTram分支(N=208)(图5A)或sparta-DabTram分

支 (N=200) (图5B) 的患者的外周血单个核细胞样品中基线时的外周血CD4+/CD8+比例的无进展生存的Kaplan-Meier估计。HR=风险比;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼。

[0145] 图6A和6B是显示基于基线外周CD4+/CD8+T细胞比例的无进展生存的一对图。显示了随机分配到sparta-DabTram或安慰剂-DabTram分支的患者的无进展生存的Kaplan-Meier估计,其中外周血单个核细胞样品反映基线CD4+/CD8+T细胞比例 $\geq$ 中值(N=204) (图6A) 或 $<$ 中值(N=204) (图6B) 的在基线为2.9的值。图6C显示了用于患者选择的选定切点与治疗分支的风险比之间的关系。风险比以黑色显示,95%置信区间以红色显示。两个蓝点指示2.02与3.34之间的优化截止值的范围。CD=分化簇;HR=风险比;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼。

[0146] 图7A-7B是显示基于组合的PD-L1状态和TMB的无进展生存和总体生存的一系列图。显示了基于PD-L1状态( $<1\%$  [阴性]或 $\geq 1\%$  [阳性])和TMB( $<10\text{mut}/\text{MB}$  [低]或 $\geq 10\text{mut}/\text{MB}$  [高])的无进展生存(图7A)和总体生存(图7B)的Kaplan-Meier估计。PD-L1阴性/TMB高,N=62;PD-L1阴性/TMB低,N=109;PD-L1阳性TMB高,N=110;PD-L1阳性TMB低,N=119。HR=风险比;mut=突变;NE=不可估计;PD-L1=程序性死亡配体1;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼;TMB=肿瘤突变负荷。

[0147] 图8A-8D是显示基于PD-L1/TMB亚组的下一线疗法后的无进展生存的一系列图。显示了在肿瘤为PD-L1阴性/TMB高(N=62) (图8A)、PD-L1阴性/TMB低(N=109) (图8B)、PD-L1阳性/TMB高(N=110) (图8C)或PD-L1阳性TMB低(N=119) (图8D)肿瘤的患者中在下一线疗法后的无进展生存(PFS2)的Kaplan-Meier估计。HR=风险比;NE=不可估计;PD-L1=程序性死亡配体1;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼;TMB=肿瘤突变负荷。

[0148] 图9A-9E是显示组合的PD-L1/TMB定义的亚组中肿瘤微环境的分析的一系列图和图像。在来自PD-L1/TMB定义的亚组的肿瘤样品中,基于HLA-DR(N=320) (图9B)和CD11b(N=320) (图9C)的表达,比较T细胞炎症性特征水平(N=362) (图9A)和抗原呈递细胞计数。使用多重荧光免疫组织化学分析抗原呈递细胞;显示了高(图9D)和低(图9E)表达子的实例。CD=分化簇;CPM=每百万计数;DAPI=4',6-二脒基-2-苯基吲哚;GES=基因表达特征(signature);HLA-DR=人白细胞抗原,DR亚型;PD-L1=程序性死亡配体1;TMB=肿瘤突变负荷。

[0149] 图10A和10B是显示基于BRAF V600K vs V600E突变状态的肿瘤突变负荷(N=384) (图10A)和年龄(N=455) (图10B)的分析的一对图。mut/Mb=每兆碱基的突变;TMB=肿瘤突变负荷。

[0150] 图11A和11B是显示基于BRAF V600E/K突变状态的无进展生存的一对图。显示了基于中心评估的具有确认的BRAF V600E-突变(N=402) (图11A)或V600K-突变(N=53) (图11B)疾病的患者中的无进展生存的Kaplan-Meier估计。HR=风险比;NE=不可估计;安慰剂-DabTram=安慰剂加达拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼。

[0151] 图12A和12B是显示基于BRAF V600E/K突变状态的总体生存的一对图。显示了基于

中心评估的具有确认的BRAF V600E-突变(N=402)(图12A)或V600K-突变(N=53)(图12B)疾病的患者中总体生存的Kaplan-Meier估计。HR=风险比;NE=不可估计;安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。

[0152] 图13是显示患有BRAF V600K-突变型疾病的患者中SPRY信号通路下调的图。肿瘤样品(N=369)中SPRY信号通路基因表达特征的评估包括MAPK3、SPRY2、HRAS、MAP2K1、RAF1、SPRY4、SPRY3、EGF、MAPK1、SHC1、PTPRB、SPRY1、GRB2、EGFR、CBL、RASA1和SOS1基因的分析。GES=基因表达特征。

[0153] 图14A和14B包括显示基于基因表达特征水平的无进展生存益处的文氏图和一对图。在每个分支中的顶端100个基因表达特征中,在来自sparta-DabTram和安慰剂-DabTram治疗的患者的肿瘤样品中高度表达的49个特征(列于表E中)存在重叠(图14A)。通过基于T细胞炎症性特征表达(低表达,N=110;高表达,N=323)的无进展生存的Kaplan-Meier估计说明的这些标签的预后性和预测值的实例显示在图14B中。GES=基因表达特征;HR=风险比;NE=不可估计;安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。

[0154] 图15A和15B包括显示T细胞表型的表征(15A)和预后影响(15B)的一系列图像和图。源自肿瘤浸润性淋巴细胞和基质浸润性淋巴细胞的数字病理学免疫组织化学的inflamed、excluded和desert T细胞表型的代表性样品显示在图15A中。图15B显示了安慰剂-DabTram(上图;inflamed,n=73;excluded,n=72;desert,n=62)和sparta-DabTram(下图;inflamed,n=66;excluded,n=91;desert,n=52)治疗组中基于这些表型的无进展生存的Kaplan-Meier估计。HR=风险比;安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。

[0155] 图16A-16C是显示基于T细胞表型的治疗益处的一系列图。显示了基于每个治疗分支中inflamed(N=139)(图16A)、excluded(N=163)(图16B)和immune desert(N=115)(16C)的CD8+肿瘤浸润淋巴细胞表型的无进展生存和总体生存的Kaplan-Meier估计。CD=分化簇;HR=风险比;安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。

[0156] 图17A-17C是显示基线ctDNA脱落与疾病负荷相关的一系列图。基于乳酸脱氢酶水平(N=391)(图17A)、病变直径总和(N=474)(图17B)和靶病变数量(N=474)(图17C)的基线ctDNA脱落。ctDNA=循环肿瘤DNA;LDH,乳酸脱氢酶。

[0157] 图18A和18B是显示基于最佳总体响应和治疗分支的基线ctDNA脱落的一对图。基于用安慰剂-DabTram(N=246)(图18A)或sparta-DabTram(N=234)(图18B)治疗的患者的最佳总体响应的基线ctDNA脱落。BOR=最佳总体响应;cfDNA=无细胞DNA;CR=完全响应;ctDNA=循环肿瘤DNA;PD=进展性疾病;安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼;PR=部分响应;SD=稳定疾病;sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼;UNK=未知。

[0158] 图19A和19B是显示基线和治疗中ctDNA脱落的预测和预后值的一系列图。图19A中示出了安慰剂-DabTram或sparta-DabTram分支中基于基线和治疗中ctDNA脱落的无进展生存和总体生存的Kaplan-Meier估计。“无脱落”表示在基线或第8周末观察到ctDNA脱落(安

慰剂-DabTram, n=53; sparta-DabTram, n=56), “在W8时缺失”表示在基线观察到但未在第8周观察到脱落(安慰剂-sparta-DabTram, n=122; sparta-DabTram, n=136), 并且“在W8时脱落”表示在基线和第8周均观察到脱落(安慰剂-DabTram, n=27; sparta-DabTram, n=16)。对于具有(N=342)或不具有(N=138)基线ctDNA脱落的患者, 基于用安慰剂-DabTram或sparta-DabTram治疗的无进展生存和总体生存的Kaplan-Meier估计显示在图19B中。ctDNA=循环肿瘤DNA; HR=风险比; 安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼; sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。

[0159] 详述

[0160] 本公开提供了用于癌症, 特别是黑素瘤的治疗和诊断方法以及组合物。本公开内容至少部分地基于以下发现: 向靶向疗法中添加免疫肿瘤学疗法可以延长具有高基线CD4+/CD8+比例的患者的无进展生存。不希望受理论束缚, 认为在一些实施方案中, 血液CD4+/CD8+比例与对包括靶向疗法和免疫肿瘤学疗法的疗法的响应相关, 表明它是有用的癌症患者的非侵入性预测和预后指标。在这些患者中, 与单独的靶向疗法相比, 用靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合治疗可以改善无进展生存。

[0161] 因此, 确定CD4+免疫效应细胞(例如, CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如, CD8+T细胞)的水平或活性可以用作患有癌症(例如黑素瘤)的受试者治疗中的生物标志物(例如, 预测生物标志物), 用于确定患有癌症(例如黑素瘤)的受试者是否可能响应包括靶向疗法(例如, 包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的靶向疗法)与免疫肿瘤学疗法组合的癌症疗法(例如, 黑素瘤疗法)、用于优化包括靶向疗法(例如, 包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的靶向疗法)与免疫肿瘤学疗法组合的癌症疗法(例如, 黑素瘤疗法)的治疗功效, 以及用于包括靶向疗法(例如, 包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的靶向疗法)与免疫肿瘤学疗法组合的癌症疗法(例如, 黑色素瘤疗法)的患者选择。

[0162] 定义

[0163] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0164] 应当理解, 本文所述的本公开的方面和实施方案包括“包含”方面和实施方案、“由方面和实施方案组成”和“基本上由方面和实施方案组成”。

[0165] 如本文所用, 单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数指代, 除非另有说明。

[0166] 除非内容明确提示, 否则术语“或”在本文中用来意指术语“和/或”并且与之互换使用。

[0167] “约”和“大约”应当通常意指鉴于测量的性质或精度, 所测量的量的可接受误差程度。示例性误差程度在所给出的值或值范围的20百分数(%)范围内, 一般在其10%范围内和更一般在其5%范围内。

[0168] “组合”或“与……组合”并不旨在暗示疗法或治疗剂必须同时施用和/或配制用于一起递送, 尽管这些递送方法在本文所述的范围内。组合中的治疗剂可以与一种或多种其他另外的疗法或治疗剂同时、在其之前或之后施用。治疗剂或治疗方案可以以任何顺序施用。通常, 每种药剂将以针对该药剂确定的剂量和/或时间表施用。还应当理解, 在该组合中使用的另外的治疗剂可以在单一组合物中一起施用或在不同的组合物中分开施用。通常,

预期组合使用的另外的治疗剂以不超过它们单独使用的水平的水平使用。在一些实施方案中,组合使用的水平将低于单独使用的水平。

[0169] 在一些实施方案中,另外的治疗剂以治疗剂量或低于治疗剂量施用。在某些实施方案中,第二治疗剂或第三治疗剂与第一治疗剂组合施用,实现抑制(例如生长抑制)所需的第二治疗剂或第三治疗剂的浓度低于第二治疗剂或第三治疗剂单独施用时的浓度。在某些实施方案中,第一治疗剂与第二治疗剂或第三治疗剂组合施用,实现抑制(例如生长抑制)所需的第一治疗剂的浓度低于当第一治疗剂单独施用时的浓度。在某些实施方案中,在组合疗法中,实现抑制(例如生长抑制)所需的第二治疗剂或第三治疗剂的浓度低于作为单一疗法的第二治疗剂或第三治疗剂的治疗剂量,例如低10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%或80-90%。在某些实施方案中,在组合疗法中,实现抑制(例如生长抑制)所需的第一治疗剂的浓度低于作为单一疗法的第一治疗剂的治疗剂量,例如低10-20%、20-30%、30-40%、40-50%、50-60%、60-70%、70-80%或80-90%。

[0170] 术语“抑制”、“抑制剂”、“拮抗剂”或“拮抗剂”包括给定分子的某一参数(例如活性)的降低,例如免疫检查点抑制剂。例如,该术语包括至少5%、10%、20%、30%、40%或更多的活性(例如给定分子(例如抑制性分子)的活性)的抑制。因此,抑制不需要是100%。

[0171] 术语“激活”、“激活剂”或“激动剂”包括给定分子( )、的某一参数(例如活性)的增加,例如共刺激分子。例如,该术语包括至少5%、10%、25%、50%、75%或更高的活性增加,例如共刺激活性。

[0172] 术语“抗癌作用”是指可以通过各种方式表现的生物作用,包括但不限于例如肿瘤体积减小、癌细胞数量减少、转移数量减少、预期寿命增加、癌细胞增殖减少、癌细胞生存减少或与癌症病症相关的各种生理症状的改善。“抗癌作用”也可以通过肽、多核苷酸、细胞和抗体首先预防癌症发生的能力来表现。

[0173] 术语“抗肿瘤作用”是指可以通过各种手段表现的生物学作用,包括但不限于例如肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞生存减少。

[0174] 术语“癌症”是指特征在于异常细胞的快速和不受控制的生长的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部分。本文描述了各种癌症的实例,包括但不限于黑素瘤、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中可互换使用,例如,两个术语都涵盖固体和液体,例如弥漫性或循环性肿瘤。如本文所用,术语“癌症”或“肿瘤”包括恶变前以及恶性癌症和肿瘤。如本文所用的术语“癌症”包括原发性恶性细胞或肿瘤(例如,其细胞尚未迁移到受试者体内除了原始恶性肿瘤或肿瘤部位之外的部位的那些)和继发性恶性细胞或肿瘤(例如,由转移引起的那些,恶性细胞或肿瘤细胞迁移到与原始肿瘤部位不同的继发性部位)。

[0175] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指由施用一种或多种疗法引起的病症(例如增殖性病症)的进展、严重程度和/或持续时间的减轻或改善,或病症的一种或多种症状(优选地,一种或多种可辨别的症状)的改善。在具体的实施方案中,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指改善增殖性病症的至少一种可测量的物理参数,例如肿瘤的生长,其不一定是患者可辨别的。在其他实施方案中,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指物理上

通过例如稳定可辨别的症状、生理上通过例如稳定物理参数或两者来抑制增殖性病症的进展。在其他实施方案中,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和“治疗(treating)”是指肿瘤大小或癌细胞计数的减少或稳定。

[0176] 本公开的组合物和方法涵盖具有指定序列或与其基本上相同或相似的序列的多肽和核酸,例如,与指定序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%相同或更高相同的序列。在氨基酸序列的上下文中,术语“基本上相同”在本文中用于指含有足够或最小数目的氨基酸残基的第一氨基酸,所述氨基酸残基i)与第二氨基酸序列中的比对的氨基酸残基相同,或ii)第二氨基酸序列中的比对的氨基酸残基的保守取代,使得第一和第二氨基酸序列可具有共同的结构域和/或共同的功能活性。例如,含有与参考序列(例如,本文提供的序列)具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的共同结构域的氨基酸序列。

[0177] 在核苷酸序列的情况下,术语“基本上相同”在本文中用来指第一核苷酸序列,所述第一核苷酸序列含有足够或最少数目的与第二核苷酸序列中对齐的核苷酸相同的核苷酸,从而第一和第二核苷酸序列编码具有共同功能活性的多肽,或编码共同结构的多肽结构域或共同功能的多肽活性。例如,与参考序列(例如,本文中提供的序列)具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。

[0178] 术语“氨基酸”意在包括包含氨基官能团和酸官能团并且能够纳入天然存在氨基酸的聚合物中的全部分子,无论是天然或合成的。示例性氨基酸包括天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物和同类物;具有变异侧链的氨基酸类似物;和前述任一者的任一个的全部立体异构体。如本文所用,术语“氨基酸”包括D-光学异构体或L-光学异构体和和肽模拟物。

[0179] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”(如果为单链)在本文中互换地使用并且任意长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是线形或分支的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以由非氨基酸隔断。该术语也包括已经被修饰(例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作,如以标记组分缀合)的氨基酸聚合物。多肽可以从天然来源分离,可以通过重组技术从真核或原核宿主产生并且可以是合成方法的产物。

[0180] 术语“核酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“多核苷酸序列”和“多核苷酸”互换使用。它们指聚合物形式的任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物。多核苷酸可以是单链或双链,并且如果为单链,可以是编码链或非编码(反义)链。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸及核苷酸类似物。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。可以在聚合后进一步修饰多核苷酸,如通过与标记组分缀合。核酸可以是重组多核苷酸或在自然界中不存在或与另一个多核苷酸以非自然布局连接的基因组来源、cDNA来源、半合成来源或合成来源的多核苷酸。

[0181] 下面进一步详细描述本公开内容的各个方面。在整个说明书中阐述了其他定义。

[0182] 治疗用途和生物标志物

[0183] 在一个方面中,本文提供了以下方法:(i) 鉴定可能受益于疗法(例如,包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法或没有免疫肿瘤学疗法的靶向疗法)的受试者(例如,患有癌症,例如本文所述的癌症的受试者);(ii) 鉴定可能从疗法(例如,与包括靶向疗法而不含免疫-肿瘤学药剂的疗法相比,包括靶向疗法与免疫-肿瘤学疗法组合的疗法)中具有增加的益处的受试者;(iii) 为受试者选择疗法;(iv) 治疗受试者;和(v) 对受试者进行分层。该

方法包括评估一种或多种生物标志物,其中所述一种或多种生物标志物指示疗法的益处或有效性的可能性。

[0184] 在一些实施方案中,该方法包括获取、确定和/或评估以下中的一个或多个(例如,2、3、4个或全部):

[0185] (i) CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;

[0186] (ii) 免疫激活的水平或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、由数字病理学图像分析定义的CD8表型(例如,基于数字病理学图像分析的inflamed、excluded和desert)、 $IFN \gamma$  或T细胞炎症性基因表达特征,例如,如本文所描述,例如,具有CD8+TIL炎症性表型的肿瘤;

[0187] (iii) 肿瘤突变负荷(TMB)的值,

[0188] (iv) PD-L1的水平和/或活性的值;和/或

[0189] (v) 循环肿瘤DNA(ctDNA)的值。

[0190] 在一些实施方案中,该方法包括获取、确定和/或评估CD4+免疫效应细胞(例如CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如CD8+T细胞)的水平或活性的值。在一些实施方案中,该方法进一步包括获取、确定和/或评估(ii)、(iii)、(iv)或(v)中的任一个。在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估(ii)、(iii)、(iv)或(v)中的任何两个。在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估(ii)、(iii)、(iv)或(v)中的任何三个。在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估(ii)、(iii)、(iv)或(v)中的全部。

[0191] 因此,在一些实施方案中,鉴定可能受益于疗法的患有癌症的受试者的方法包括使用具有肿瘤标记区域的数字病理学图像分析以确定肿瘤巢和/或基质隔室内CD8+TIL的绝对数量,来获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+细胞因子的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。

[0192] 在一些实施方案中,大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法(例如,包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂)与免疫肿瘤学疗法(例如,抗PD-1疗法)组合的疗法的受试者。在一些实施方案中,与包括靶向疗法而没有免疫肿瘤学疗法的疗法相比,所述受试者可能具有增加的来自疗法的益处。

[0193] 在一些实施方案中,大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者,其中所述疗法是免疫肿瘤学疗法(例如PD-1结合拮抗剂)作为单一疗法。在一些实施方案中,与免疫肿瘤学疗法以外的疗法相比,受试者可能具有增加的来自疗法的益处。

[0194] 在一些实施方案中,小于参考值的值将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法(例如,包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂)与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。

[0195] 在一些实施方案中,为患有癌症的受试者选择疗法的方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值大于或等于参考值,则为受试者选择包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0196] 在一些实施方案中,为患有癌症的受试者选择疗法的方法包括获取受试者中(例

如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值大于或等于参考值,则为受试者选择疗法,其中该疗法是免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)作为单一疗法。

[0197] 在一些实施方案中,为患有癌症的受试者选择疗法的方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值小于参考值,则为受试者选择包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法。

[0198] 在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,治疗方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0199] 在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,治疗方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法,从而治疗患有癌症的受试者,其中所述疗法是免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)作为单一疗法。

[0200] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值大于或等于参考值,则施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0201] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值大于或等于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法,从而治疗患有癌症的受试者,其中所述疗法是免疫肿瘤学疗法(例如PD-1结合拮抗剂)作为单一疗法。

[0202] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法。并且响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的免疫肿瘤学疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0203] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值。

[0204] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法,其中所述疗法是免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)作为单一疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水

平或活性的值大于或等于参考值。

[0205] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,其中受试者的特征在于受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0206] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法,其中所述疗法是免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)作为单一疗法,其中受试者的表征为受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0207] 在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包含靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0208] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,并且如果该值小于参考值,则向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0209] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法;并且响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),从而治疗患有癌症的受试者。

[0210] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0211] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,其中受试者表征为具有受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性的值小于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0212] 在一些实施方案中,响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平

或活性的值,治疗方法包括向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0213] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括获取受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值;并且向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0214] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法;并且响应于受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,向具有小于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法,或向具有大于或等于参考值的值的受试者施用(例如,开始施用或继续施用)包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法,从而治疗患有癌症的受试者。

[0215] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用有效量的疗法,所述疗法包括:

[0216] (a) 靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;

[0217] (b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合,其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者;或

[0218] (c) 免疫肿瘤学疗法(例如,作为单一疗法),其中在施用前,已经确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0219] 在一些实施方案中,治疗患有癌症的受试者的方法包括向受试者施用有效量的疗法,所述疗法包括:

[0220] (a) 施用于受试者的靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法),其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,在来自该受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值小于参考值;

[0221] (b) 靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合,其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患

有癌症的受试者;或

[0222] (c) 免疫肿瘤学疗法(例如,作为单一疗法),其中受试者被表征为或已经被表征为受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值大于或等于参考值,从而治疗患有癌症的受试者。

[0223] 在一些实施方案中,将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组的方法包括:

[0224] (i) 获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

[0225] (ii) 将具有小于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法的第一组,和

[0226] (iii) 将具有大于或等于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法的第二组。

[0227] 在一些实施方案中,将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组的方法包括:

[0228] (i) 获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

[0229] (ii) 将具有小于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法的第一组,和

[0230] (iii) 将具有大于或等于参考值的值的受试者分配给可能受益于包括免疫肿瘤学疗法的疗法的第二组。

[0231] 在一些实施方案中,将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组以选择疗法的方法包括:

[0232] (i) 获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

[0233] 其中小于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法的第一组成员,和

[0234] 其中大于或等于参考值的值将受试者鉴定为第二组的成员,其可能受益于包括靶向疗法与免疫疗法组合的疗法。

[0235] 在一些实施方案中,将患有癌症的受试者分层为第一组和第二组以选择疗法的方法包括:

[0236] (i) 获得受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值,

[0237] 其中小于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法(例如,没有免疫肿瘤学疗法)的疗法的第一组的成员,并且其中大于或等于参考值的值将受试者鉴定为可能受益于包括免疫疗法的疗法的第二组的成员。

[0238] 在一些实施方案中,CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值包括CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的总量与CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的总量的比率,并且可以通过本文公开的任何测定法,例如流式细胞术免疫表型分析来测量。

[0239] 在一些实施方案中,大于或等于2.01的值(例如,大于或等于2.5、3、3.5、4、4.5、5、

5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10的值)将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法(例如,包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的疗法)与免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)组合的疗法的受试者。在一些实施方案中,大于或等于3.34的值(例如,大于或等于3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10的值)将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法(例如,包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的疗法)与免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)组合的疗法的受试者。

[0240] 在一些实施方案中,大于或等于2.01的值(例如,大于或等于2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10的值)将受试者鉴定为可能受益于包括免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)的疗法的受试者。在一些实施方案中,大于或等于3.34的值(例如,大于或等于3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10的值)将受试者鉴定为可能受益于包括免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂)的疗法的受试者。

[0241] 在一些实施方案中,获取值包括确定受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性。

[0242] 在一些实施方案中,来自受试者的样品包含血液样品(例如,外周血样品,例如包含外周血单个核细胞(PBMC))或肿瘤样品。

[0243] 在一些实施方案中,在开始施用疗法前获取该值(例如,是基线值)。在一些实施方案中,在开始施用疗法后获取该值。例如,该值可以在开始施用疗法后1、2、3、4、8、10、12、20、30、40周或更长时间,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20个月或更长时间获取。

[0244] 在本文所述方法的某些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估一种或多种另外的生物标志物。

[0245] 在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估受试者中(例如,来自受试者的样品中)CD8+肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)(例如,具有CD8+TIL炎症性表型的肿瘤)的水平或活性的值。在一些实施方案中,与参考值相比,CD8+TIL的水平或活性值的增加将进一步将受试者鉴定为可能受益于治疗的受试者。

[0246] 在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估受试者中(例如,来自受试者的样品中)PD-L1的水平和/或活性的值。在一些实施方案中,与参考值相比降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如,连同与参考值相比增加的TMB值,进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法的受试者。在一些实施方案中,癌症具有低PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

[0247] 在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估免疫激活的水平和/或活性的值,所述免疫激活包括TIL、PD-L1、CD8、IFN  $\gamma$  或T细胞炎症基因表达标签,例如如本文所述。

[0248] 具有CD8+TIL的肿瘤(例如,具有发炎症表型的那些)可以通过多种标志物来表征和量化;例如,通过肿瘤浸润淋巴细胞(如通过H/E染色或CD8基因/蛋白质表达水平所确定的)、干扰素  $\gamma$  和相关标志物、PD-L1(蛋白质或基因表达)、其他已知检查点(例如LAG3、TIM3)或特征中的标志物的组合(例如IFN  $\gamma$ 、T细胞、炎症基因表达特征)的增加。对免疫疗法的应答主要发生在具有此类预先存在的肿瘤内T细胞适应性免疫应答的患者中。

[0249] IFN  $\gamma$  是细胞因子,其不仅对于宿主对病毒感染的应答是关键的,而且在癌症相关免疫中也起着关键作用。IFN-  $\gamma$  由肿瘤微环境中的免疫细胞分泌并且协调先天和适应性抗

肿瘤应答的过程(例如增强MHC I类表达,促进效应细胞的募集)。同时,相同的IFN- $\gamma$ 信号传导过程可以诱导反馈抑制。作为这种反馈环路的一部分,IFN- $\gamma$ 信号传导使得PD-1信号传导轴能够通过直接上调肿瘤细胞、免疫浸润细胞和基质细胞中的配体PD-L1和PD-L2而被激活,这最终损害抗肿瘤免疫。

[0250] 对免疫基因比如CD8和PD-L1存在多种检测方法:例如IHC,流式细胞术,在样品例如组织、血液和外来体中的mRNA表达。通过免疫组织化学(IHC)测试PD-L1蛋白例如可以通过不同的抗体克隆,例如PD-L1 IHC 22C3 PharmDx试剂盒(丹科北美公司(Dako North America),卡平特里亚,加利福尼亚州,美国)、PD-L1 28-8 PharmDx试剂盒(丹科北美公司)、PD-L1 SP263 Ventana测试(Ventana Medical Systems Inc.,Tucson,AZ,USA)和PD-L1 SP142文塔纳测试(文塔纳医疗系统公司(Ventana Medical Systems Inc.),图森,亚利桑那州,美国)来进行。可以对例如肿瘤细胞和免疫细胞检查PD-L1蛋白水平。

[0251] 文献(例如T细胞炎症,在Cristescu等人,“Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1checkpoint blockade-based immunotherapy”,Science[科学]2018中)中描述了多种特征(例如T细胞炎症、IFN $\gamma$ 、T细胞/CD8基因表达特征)。这些基因特征代表用于通过区分具有预先存在的炎症组分的肿瘤和非炎症肿瘤来捕获对肿瘤的动态免疫应答的复杂性的新颖方法。检查这些特征的基因清单表明在选择基因和特别地生物学特征(例如包括IFN- $\gamma$ 信号传导、细胞溶解活性、抗原呈递和T细胞运输以及在T细胞体内平衡中明显的抑制机制)上存在相当大的重叠,因为所有这些特征是高度相关的并且鉴定具有持续适应性Th1应答和细胞毒性CD8+T细胞应答的肿瘤。本领域技术人员应理解,这些基因表达特征可以被其他T细胞炎症和IFN- $\gamma$ 特征替换(例如,Cristescu等,“Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1checkpoint blockade-based immunotherapy”,Science 2018;Ayers等,IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1blockade,The Journal of Clinical Investigation 2017)。

[0252] 还有几种其他报道的IFN $\gamma$ 特征,一个实例是Ayers等发表的6-基因特征(IFN-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1blockade,The Journal of Clinical Investigation 2017):ID01,CXCL10,CXCL9,HLA-DRA,STAT1,IFNG。

[0253] 公认的T细胞炎症特征是由与抗原呈递、趋化因子表达、细胞溶解活性和适应性免疫抗性相关的18个炎症基因组成的,包括CCL5、CD27、CD274(PD-L1)、CD276(B7-H3)、CD8A、CMKLR1、CXCL9、CXCR6、HLA-DQA1、HLA-DRB1、HLA-E、ID01、LAG3、NKG7、PDCD1LG2(PDL2)、PSMB10、STAT1、以及TIGIT。T细胞炎症特征可以用于将患者分成低和高T细胞炎症特征水平(大于或等于-0.318的截止点=高,小于-0.318截止点=低)(例如Cristescu等,“Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1checkpoint blockade-based immunotherapy”,Science 2018;Ayers等,IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1blockade,The Journal of Clinical Investigation 2017)。

[0254] 本领域技术人员应理解,对于在本专利说明书和在文献中描述的其他IFN- $\gamma$ 和T细胞特征,可以建立类似的截止点。例如, $\geq 1\%$ 、 $\geq 5\%$ 、 $\geq 10\%$ (优选地1%)的PD-L1截止点可以用于定义低/高免疫激活。

[0255] 在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估受试者中(例如,来自受试者的样品中)的肿瘤突变负荷(TMB)值。在一些实施方案中,与参考值相比增加的TMB值进一

步将受试者鉴定为可能受益于治疗的受试者。在一些实施方案中, TMB的值大于或等于10mut/Mb, 例如, 大于或等于11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mut/Mb或更大。

[0256] 在一些实施方案中, 该方法还包括获取或评估受试者中(例如, 在来自受试者的样品中)的肿瘤突变负荷(TMB)值。在一些实施方案中, 与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为可能受益于疗法(例如, 没有免疫肿瘤学疗法)的受试者。在一些实施方案中, 与参考值相比降低的TMB值进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。在一些实施方案中, TMB的值小于10mut/Mb, 例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1mut/Mb或更小。

[0257] 如本文所用的, 术语“肿瘤突变负荷”、“肿瘤突变的负荷”、“突变负荷”、“突变的负荷”或“TMB”可以互换理解, 并且是指从肿瘤(例如, 肿瘤组织样品, 例如, 福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)肿瘤样品、存档肿瘤样品、新鲜冷冻肿瘤样品, 或含有肿瘤细胞、肿瘤RNA、DNA或蛋白质的血液样品)检测的预定基因集(例如, 在预定基因集的编码区中)中每个预先选择的单位(例如, 每百万碱基(Mb))的改变水平(例如一种或多种改变, 例如一种或多种体细胞改变)。TMB及其测量公开于WO 2018/068028中, 其通过引用整体并入本文。

[0258] TMB评分可以例如基于全基因组或外显子组, 或基于基因组或外显子组的子集来测量。在某些实施方案中, 可以外推基于基因组或外显子组的子集测量的TMB评分以确定全基因组或外显子组突变负荷。在一些实施方案中, TMB评分是指个体(例如动物, 例如人)内累积的体细胞突变的水平。TMB评分可以指患有癌症(例如黑素瘤)的患者中累积的体细胞突变。在一些实施方案中, TMB评分是指个体的全基因组中累积的突变。在一些实施方案中, TMB评分是指从患者收集的特定样品(例如肿瘤样品, 例如黑素瘤样品)内累积的突变。

[0259] 术语“体细胞突变”或“体细胞改变”是指在体细胞组织(例如生殖系外的细胞)中发生的遗传改变。遗传改变的实例包括但不限于点突变(例如单个核苷酸与另一个核苷酸的交换(例如沉默突变、错义突变和无义突变))、插入和缺失(例如一个或多个核苷酸的添加和/或去除(例如插入缺失))、扩增、基因复制、拷贝数目改变(CAN)、重排和剪接位点突变。特定突变的存在可与疾病状态(例如癌症, 例如黑素瘤)相关。

[0260] 在某些实施方案中, 体细胞改变是沉默突变(例如同义改变)。在其他实施方案中, 体细胞改变是非同义单核苷酸变体(SNV)。在其他实施方案中, 体细胞改变是过客突变(例如, 对克隆的适合度没有可检测的影响的改变)。在某些实施方案中, 体细胞改变是意义未知的变体(VUS), 例如, 其致病性既不能确认也不能排除的改变。在某些实施方案中, 体细胞改变尚未被鉴定为与癌症表型相关。

[0261] 在某些实施方案中, 体细胞改变与对细胞分裂、生长或生存的影响无关或未知与其相关。在其他实施方案中, 体细胞改变与对细胞分裂、生长或生存的影响相关。

[0262] 在某些实施方案中, 体细胞改变的数目不包括亚基因组区间中的功能改变。在一些实施方案中, 功能改变是与参考序列(例如野生型或未突变序列)相比对细胞分裂、生长或生存具有影响(例如促进细胞分裂、生长或生存)的改变。在某些实施方案中, 通过包含在功能改变的数据库(例如COSMIC数据库)中来鉴定功能改变(参见Forbes等, Nucl. Acids Res. 43(D1):D805-D811, 2015, 其通过引用整体并入本文)。在其他实施方案中, 功能改变是具有已知功能状态的改变(例如, 作为COSMIC数据库中的已知体细胞改变发生)。在某些实

实施方案中,功能改变是具有可能的功能状态的改变(例如肿瘤抑制基因中的截短)。在某些实施方案中,功能改变是驱动突变(例如,在其微环境中给予克隆选择性优势的改变,例如通过增加细胞生存或繁殖)。在其他实施方案中,功能改变是能够引起克隆扩增的改变。在某些实施方案中,功能改变是能够引起以下中的一种、两种、三种、四种、五种或全部六种改变:(a)生长信号中的自给自足;(b)对抗生长信号降低,例如不敏感性;(c)细胞凋亡减少;(d)增加的复制潜力;(e)持续的血管生成;或(f)组织侵袭或转移。

[0263] 在某些实施方案中,排除预定基因集中的所有基因(例如肿瘤基因)中的所有功能改变。在某些实施方案中,体细胞改变的数目不包括样品中低于频率阈值(例如低于5%、低于3%、低于1%)存在的改变。在某些实施方案中,体细胞改变的数目不包括亚基因组区间的种系突变。在某些实施方案中,种系改变是SNP、碱基置换、插入、缺失、插入缺失或沉默突变(例如同义突变)。

[0264] 在某些实施方案中,通过使用不使用与匹配的正常序列比较的方法来排除种系改变。在其他实施方案中,种系改变通过包括使用算法的方法来排除。在某些实施方案中,通过包括在种系改变的数据库(例如dbSNP数据库)中的来按原样鉴定种系改变(参见Sherry等,Nucleic Acids Res.29(1):308-311,2001,其通过引用整体并入本文)。在其他实施方案中,通过包括在ExAC数据库中的来按原样鉴定种系改变(参见Exome Aggregation Consortium等bioRxiv preprint,2015年10月30日,其通过引用整体并入本文)。在一些实施方案中,通过包括在ESP数据库(外显子组变体服务器,NHLBI GO外显子组测序项目(ESP),西雅图,华盛顿州)中的来按原样鉴定种系改变。在一些实施方案中,通过对样品的肿瘤含量建模来鉴定种系改变(参见Riester等,Source Code Biol Med.2016Dec 15;11:13)。在一些实施方案中,通过对未患有癌症的个体的样品进行测序来鉴定种系改变。

[0265] 如本文所用,“低TMB评分”是指等于或低于参考TMB评分的TMB评分,而“高TMB评分”是指高于参考TMB评分的TMB评分。

[0266] 如本文所用,“低免疫激活评分”是指等于或低于参考免疫激活评分的免疫激活评分,而“高免疫激活评分”是指高于参考免疫激活评分的免疫激活评分。

[0267] 如本文所用,术语“参考TMB评分”是指与另一TMB评分进行比较的TMB评分,例如以进行诊断、预测、预后和/或治疗确定。例如,参考TMB评分可以是参考样品、参考群体和/或预定值中的TMB评分。在一些情况下,相对于个体对采用截止值或低于截止值的非靶向疗法的治疗的响应性,个体对采用靶向疗法的治疗的响应性显著改善。在一些情况下,个体对用非靶向疗法治疗的响应性相对于个体对用高于截止值的靶向疗法治疗的响应性显著改善。

[0268] 本领域技术人员将理解,参考TMB评分的数值可以根据癌症类型、用于测量TMB评分的方法和/或用于生成TMB评分的统计方法而变化。

[0269] 术语“等同TMB值”是指对应于TMB评分的数值,其可以通过将体细胞变体(例如体细胞突变)的计数除以测序的碱基数(例如,如通过靶向小组评估的约1.5Mb)来计算。应当理解,通常,TMB评分与测序的基因组区域的大小线性相关。此类等同TMB值指示与TMB评分相比等效程度的肿瘤突变负荷,并且可以在本文所述的方法中互换使用,例如,以预测癌症患者对靶向疗法(例如包含靶向BRAF和/或MEK的药剂,例如达拉非尼和曲美替尼或例如维罗菲尼和考比替尼的靶向疗法)的响应。作为示例,在一些实施方案中,等同TMB值是归一化TMB值,其可以通过将体细胞变体(例如体细胞突变)的计数除以测序的碱基数来计算。例

如,等同TMB值可以表示为在限定数量的测序碱基(例如,如通过靶向组评估的约1.5MB)上计数的体细胞突变的数量。应当理解,如本文所述的TMB评分(例如,表示为在限定数量的测序碱基(例如,本文所述的靶向组的1.5Mb)上计数的体细胞突变数的TMB评分)涵盖使用不同方法(例如,全外显子组测序或全基因组测序)获得的等同TMB值。例如,对于全外显子组,靶区域可以是约50Mb,并且检测到的具有约500个体细胞突变的样品是与约10个突变/Mb的TMB评分相等的TMB值。

[0270] 在一些实施方案中,该方法还包括获取、确定和/或评估受试者中(例如,来自受试者的样品中)PD-L1的水平和/或活性的值。在一些实施方案中,降低的PD-L1的水平和/或活性的值,例如,连同降低的TMB值一起,进一步将受试者鉴定为不太可能从包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法中具有显著增加的益处的受试者。在一些实施方案中,癌症具有低的PD-L1表达或不可检测的PD-L1表达。

[0271] 在一些实施方案中,该方法还涉及获取、确定和/或评估受试者中(例如,来自受试者的样品中)循环肿瘤DNA(ctDNA)的值。在一些实施方案中,与参考值相比,增加的ctDNA值进一步将受试者鉴定为可能受益于包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法的受试者。

[0272] 术语“检测”包括任何检测手段,包括直接和间接检测。

[0273] 如本文所用的术语“生物标志物”是指可以在样品中检测的指示物,例如预测性、诊断性和/或预后性指示物,例如特定基因(改变和表达水平)或由所述基因编码的蛋白质,或所述特定基因的一种或多种体细胞突变。生物标志物可以用作疾病或病症(例如癌症)的特定亚型的指示物,所述疾病或病症通过某些分子、病理学、组织学和/或临床特征(例如对疗法的响应性,所述疗法包括包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的靶向疗法与免疫肿瘤学疗法(例如PD-1结合拮抗剂)的组合)来表征。

[0274] 如本文所用,术语“样品”或“生物样品”是指从目的受试者和/或个体获得或衍生的组合物,其含有例如基于物理、生物化学、化学和/或生理特性待表征和/或鉴定的细胞和/或其他分子实体。样品包括但不限于,组织样品、原代或培养的细胞或细胞系、细胞上清液、细胞裂解物、血小板、血清、血浆、玻璃体液、淋巴液、滑液、滤泡液、精液、羊水、乳汁、全血、血液衍生细胞、尿液、脑脊液(CSF)、唾液、痰液、泪液、汗液、粘液、肿瘤裂解物和组织培养基、组织提取物,如均质化组织、肿瘤组织、细胞提取物及其组合。在一个实施方案中,“样品”意指“组织样品”或“细胞样品”。在另一个实施方案中,“样品”意指“血液样品”。

[0275] “组织样品”或“细胞样品”意指从受试者或个体的组织获得的类似细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是来自新鲜、冷冻和/或保存的器官、组织样品、活组织检查和/或抽吸物的实体组织;血液或任何血液成分如血浆;体液,如脑脊髓液、羊水、腹膜液或间质液;来自受试者妊娠或发育的任何时间的细胞。组织样品也可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地,组织或细胞样品获自疾病组织/器官。例如,“肿瘤样品”是从肿瘤或其他癌组织获得的组织样品。组织样品可以含有细胞类型(例如,肿瘤细胞和非肿瘤细胞、癌细胞和非癌细胞)的混合群体。组织样品可以含有在自然界中不与组织天然混合的化合物,如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。在一些情况下,组织样品或肿瘤组织样品不是血液样品或样品或血液成分,如血浆。在优选的实施方案中,组织样品或细胞样品是肿瘤样品。

[0276] 如本文所用,“肿瘤细胞”是指肿瘤或其样品中存在的任何肿瘤细胞。可以使用本

领域已知的和/或本文所述的方法将肿瘤细胞与肿瘤样品中可能存在的其他细胞(例如基质细胞和肿瘤浸润性免疫细胞)区分开。

[0277] 术语“量”和“水平”通常是指生物样品中生物标志物的量。它可以通过本领域技术人员已知的并且也在本文中公开的方法来测量。例如,可以通过如流式细胞术、IHC、qRT-PCR、Nanostring等方法和本领域技术人员已知的其他方法分析基因或蛋白质表达水平。

[0278] “表达”通常是指将信息(例如基因编码和/或表观遗传信息)转化为细胞中存在和运行的结构的过程。因此,如本文所用,“表达”可以指转录成多核苷酸,翻译成多肽,或甚至多核苷酸和/或多肽修饰(例如多肽的翻译后修饰)。转录的多核苷酸、翻译的多肽或多核苷酸和/或多肽修饰(例如多肽的翻译后修饰)的片段也应被认为是表达的,无论它们是源自通过可变剪接产生的转录物或降解的转录物,或是源自多肽的翻译后加工,例如通过蛋白水解。“表达的基因”包括转录为作为mRNA的多核苷酸并且随后翻译成多肽的那些,以及也转录成RNA但不翻译成多肽的那些(例如,转运RNA和核糖体RNA)。

[0279] “增加的表达”、“增加的表达水平”、“增加的水平”、“升高的表达”、“升高的表达水平”或“升高的水平”是指相对于对照,如未患有疾病或病症(例如癌症)的一个或多个个体或内部对照(例如管家生物标志物),个体中生物标志物增加的表达或增加的水平。

[0280] “降低的表达”、“降低的表达水平”、“降低的水平”、“减少的表达”、“减少的表达水平”或“减少的水平”是指相对于对照,如未患有疾病或病症(例如癌症)的一个或多个个体或内部对照(例如管家生物标志物),个体中生物标志物降低的表达或降低的水平。

[0281] 如本文所用,术语“参考水平”是指样品值与之进行比较的值,例如,以做出诊断、预测、预后和/或治疗确定。例如,参考水平可以是参考样品、参考群体中的值和/或预定值。如本文所用,“参考样品”、“参考组织”、“参考细胞”、“对照样品”、“对照组织”或“对照细胞”是指用于比较目的样品、组织、细胞、标准或水平。在一个实施方案中,参考样品、参考组织、参考细胞、对照样品、对照组织或对照细胞获自同一受试者或个体的身体的健康和/或非患病部分(例如,组织或细胞)。例如,参考样品、参考组织、参考细胞、对照样品、对照组织或对照细胞可以是邻近患病组织或细胞的健康和/或非患病组织或细胞(例如,邻近肿瘤的组织或细胞)。在另一个实施方案中,参考样品获自同一受试者或个体的身体的未治疗组织和/或细胞。在又一个实施方案中,参考样品、参考组织、参考细胞、对照样品、对照组织或对照细胞是从不是相同受试者或个体的个体的身体的健康和/或非患病部分(例如组织或细胞)获得的。在甚至另一个实施方案中,参考样品、参考组织、参考细胞、对照样品、对照组织或对照细胞是从不是相同受试者或个体的个体身体的未治疗组织和/或细胞获得。

[0282] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括向受试者施用(例如,开始施用或继续施用)有效量的疗法(例如,包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的靶向疗法,有或没有免疫肿瘤学疗法(例如,PD-1结合拮抗剂))。在其他实施方案中,该方法涉及向受试者施用疗法的改变的给药方案(例如,具有比参考给药方案更高剂量和/或更频繁施用的给药方案)。在一些实施方案中,该方法包括中断向受试者施用不同的疗法。

[0283] 在一些实施方案中,本文所述的方法包括向受试者施用另外的疗法。在一些实施方案中,该方法涉及向受试者施用预处理,其中预处理增加了受试者中(例如,在来自受试者的样品中)CD4+免疫效应细胞(例如,CD4+T细胞)的水平或活性相对于CD8+免疫效应细胞(例如,CD8+T细胞)的水平或活性的值。

[0284] 在一些实施方案中,该疗法是一线、二线、三线或四线或之外的治疗(beyond treatment)。在一些实施方案中,疗法是辅助或新辅助治疗。

[0285] 受试者的选择

[0286] 在一些实施方案中,本文所述的受试者是患有癌症的受试者。受试者可以是哺乳动物,例如灵长类动物,例如高等灵长类动物,例如人(例如,患有本文所述的病症(例如癌症)或处于患有本文所述的病症(例如癌症)的风险中的患者)。在一个实施方案中,受试者需要增强免疫应答。在一个实施方案中,受试者患有本文所述的病症(例如,如本文所述的癌症)或处于患有本文所述的病症(例如,如本文所述的癌症)的风险中。在某些实施方案中,受试者是免疫受损的或处于免疫受损的风险中。例如,受试者正在经历或已经历化疗和/或放疗。可替代地或组合地,受试者由于感染而免疫受损或处于由于感染而免疫受损的风险中。

[0287] 在某些实施方案中,根据本文所述的方法治疗的癌症包括但不限于实体肿瘤(例如,黑素瘤、肺癌(例如,NSCLC)、胰腺癌或结肠直肠癌)、血液癌症(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤),或其转移性病变。在一个实施方案中,癌症是实体肿瘤。实体肿瘤的实例包括恶性肿瘤,例如肉瘤和癌,例如各种器官系统的腺癌,如影响肺、乳腺、卵巢、淋巴、胃肠(例如结肠)、肛门、生殖器和泌尿生殖道(例如肾、尿路上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如脑、神经或神经胶质细胞)、头颈、皮肤(例如黑素瘤)和胰腺的那些,以及腺癌,其包括恶性肿瘤,如结肠癌、直肠癌、肾癌(例如肾细胞癌(透明细胞或非透明细胞肾细胞癌)、肝癌、肺癌(例如非小细胞肺癌(鳞状或非鳞状非小细胞肺癌))、小肠癌和食道癌。癌症可以是早期、中期、晚期或转移性癌症。

[0288] 在一个实施方案中,癌症是黑素瘤,例如晚期黑素瘤。在一个实施方案中,癌症是晚期或不可切除的黑素瘤,其对其他疗法没有响应(即,是难治性的)。在其他实施方案中,癌症是具有BRAF突变(例如,BRAF V600突变)的黑素瘤。在其它实施方案中,本文公开的组合(例如,包含抗PD-1抗体分子的组合)是靶向BRAF的药剂(例如,维罗菲尼或达拉非尼)和/或靶向MEK的药剂(例如,曲美替尼)。

[0289] 在某些实施方案中,癌症是具有BRAF突变(例如本文所述的BRAF突变)的癌症(例如黑素瘤)。在某些实施方案中,BRAF突变是V600突变。在某些实施方案中,BRAF突变位于激酶结构域的激活区段中。在其他实施方案中,BRAF突变导致激酶活性增加,并且任选地在体外转化。在一些实施方案中,BRAF突变选自V600E突变、V600K突变或V600D突变。在某些实施方案中,BRAF突变是V600E突变。在其他实施方案中,该组合用于治疗除野生型BRAF癌症(例如,野生型BRAF黑素瘤)之外的癌症(例如,黑素瘤)。在某些实施方案中,BRAF突变是对BRAF抑制剂、MEK抑制剂或两者敏感或响应的突变。

[0290] 示例性BRAF突变包括但不限于BRAF c.1779\_1780delTGinsGA(D594N)、BRAF c.1780G>C(D594H)、BRAF c.1780G>A(D594N)、BRAF c.1781A>G(D594G)、BRAF c.1781A>T(D594V)、BRAF c.1782T>A(D594E)、BRAF c.1782T>G(D594E)、BRAF c.1789C>G(L597V)、BRAF c.1789\_1790delCTinsTC(L597S)、BRAF c.1790T>A(L597Q)、BRAF c.1790T>G(L597R)、BRAF c.1798G>A(V600M)、BRAF c.1798\_1799delGTinsAA(V600K)、BRAF c.1798\_1799delGTinsAG(V600R)、BRAF c.1799T>A(V600E)、BRAF c.1799T>G(V600G)、BRAF c.1799\_1800delTGinsAT(V600D)、BRAF c.1799\_1800delTGinsAA(V600E)或BRAF c.1801A>

G (K601E)。其他示例性BRAF突变还包括BRAF融合,例如,如Botton等,Pigment Cell Melanoma Res.2013;26(6):845-51;Hutchinson等,Clin Cancer Res.2013;19(24):6696-702)中所述的。

[0291] 在一个实施方案中,癌症选自肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC)(例如,具有鳞状和/或非鳞状组织学的NSCLC,或NSCLC腺癌))、皮肤癌(例如,Merkel细胞癌或黑素瘤(例如,晚期黑素瘤))、肾癌(例如,肾癌(例如,肾细胞癌))、肝癌、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、前列腺癌、乳腺癌(例如,不表达雌激素受体、孕酮受体或HER2/neu中的一种、两种或全部的乳腺癌,例如,三阴性乳腺癌)、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌(HNSCC)、肛门癌、胃食道癌、甲状腺癌(例如,未分化甲状腺癌)、宫颈癌、神经内分泌肿瘤(NET)(例如,非典型肺类癌)、淋巴组织增生性疾病(例如,移植后淋巴组织增生性疾病)或血液癌症、T细胞淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤或白血病(例如,骨髓性白血病或淋巴性白血病)。

[0292] 在另一个实施方案中,选择癌症以形成癌(例如晚期或转移性癌)、黑素瘤或肺癌,例如非小细胞肺癌。

[0293] 在一个实施方案中,癌症是肺癌,例如非小细胞肺癌或小细胞肺癌。在一些实施方案中,非小细胞肺癌是I期(例如,Ia或Ib期)、II期(例如IIa或IIb期)、III期(例如IIIa或IIIb期)或IV期非小细胞肺癌。

[0294] 在另一个实施方案中,癌症是具有或不具有病毒感染(例如慢性病毒性肝炎)的肝癌,例如晚期肝癌。

[0295] 在另一个实施方案中,癌症是前列腺癌,例如晚期前列腺癌。

[0296] 在另一个实施方案中,癌症是骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤。

[0297] 在另一个实施方案中,癌症是肾癌,例如肾细胞癌(RCC)(例如转移性RCC、非透明细胞肾细胞癌(ccRCC)或透明细胞肾细胞癌(ccRCC))。

[0298] 在一些实施方案中,受试者是已经用或正在用靶向疗法(例如,包含靶向BRAF的药剂和/或靶向MEK的药剂的疗法)治疗的受试者。在一些实施方案中,受试者尚未用或未正在用靶向疗法治疗。

[0299] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受免疫肿瘤学疗法(例如PD-1结合拮抗剂或PD-L1结合拮抗剂)。在一些实施方案中,受试者尚未接受或未正在接受免疫肿瘤学疗法。

[0300] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。在一些实施方案中,受试者尚未接受或未正在接受包括靶向疗法与免疫肿瘤学疗法组合的疗法。

[0301] 在一些实施方案中,受试者已经接受或正在接受靶向疗法,并且癌症已经复发。在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的非响应者。在一些实施方案中,受试者是或已经被鉴定为靶向疗法的部分响应者。

[0302] 对治疗的响应

[0303] 在一些实施方案中,根据本文所述方法的治疗可导致以下中的一种或多种:抗原呈递的增加、效应细胞功能(例如,T细胞增殖、IFN- $\gamma$ 分泌或细胞溶解功能中的一种或多种)的增加、调节性T细胞功能的抑制、对多种细胞类型(如调节性T细胞、效应T细胞和NK细

胞)的活性的影响、肿瘤浸润淋巴细胞的增加、T细胞受体介导的增殖的增加和癌细胞的免疫逃避的减少。在一个实施方案中,在组合中使用PD-1抑制剂抑制、降低或中和PD-1的一种或多种活性,导致免疫检查点的阻断或减少。因此,此类方法可用于治疗或预防需要增强受试者中免疫应答的病症。

[0304] 因此,在另一个方面中,提供了调节受试者中的免疫应答的方法。该方法包括向受试者单独施用本文公开的组合(例如,包含治疗有效量的抗PD-1抗体分子的组合),或与一种或多种药剂或程序组合,从而受试者中的免疫应答得到调节。在一个实施方案中,抗体分子增强、刺激或增加受试者中的免疫应答。

[0305] 在一个方面中,提供了治疗受试者的癌症或肿瘤(例如,减少、抑制或延迟进展中的一种或多种)的方法。该方法包括向受试者施用本文公开的组合(例如,包含治疗有效量的抗PD-1抗体分子的组合)。

[0306] 在本文所述方法的一些实施方案中,与不太可能受益于疗法或不太可能从疗法具有增加的受益的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法具有增加的受益的受试者具有改善的无进展生存(PFS)、客观响应持续时间(DOR)和/或总体生存(OS)。

[0307] 在一些实施方案中,与未接受疗法或仅接受靶向疗法但未接受免疫肿瘤学疗法的受试者相比,可能受益于疗法或可能从疗法具有增加的受益的受试者具有改善的PFS、DOR和/或OS。

[0308] 在一些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、42、48、54、60个月或更长时间。在一些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多。

[0309] 在一些实施方案中,根据本文所述方法的治疗导致改善的无进展生存(PFS)、客观响应持续时间(DOR)和/或总体生存(OS)。在一些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18、24、30、36、42、48、54、60个月或更长时间。在一些实施方案中,PFS、DOR和/或OS改善10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍或更多。

[0310] 可以使用指示对个体的益处的任何终点来评估“个体响应”或“响应”,包括但不限于(1)在一定程度上抑制疾病进展(例如癌症进展),包括减缓或完全阻止;(2)肿瘤大小减小;(3)抑制(即减少、减缓或完全停止)癌细胞浸润到邻近的外周器官和/或组织中;(4)抑制(即减少、减缓或完全停止)转移;(5)在一定程度上缓解与疾病或病症(例如癌症)相关的一种或多种症状;(6)生存长度的增加或延长,包括总体生存、无进展生存和无复发生存;和/或(7)治疗后给定时间点的死亡率降低。

[0311] 患者对药物治疗的“有效响应”或患者的“响应性”和类似措辞是指将临床或治疗益处赋予处于疾病或病症(如癌症)风险或患有疾病或病症(如癌症)的患者。在一个实施方案中,此类益处包括以下中的任何一种或多种:延长生存(包括总体生存和/或无进展生存和/或无regression生存);产生客观响应(包括完全响应或部分响应);或改善癌症的体征或症状。

[0312] “客观响应”是指可测量的响应,包括完全响应(CR)或部分响应(PR)。在一些实施方案中,“客观响应率(ORR)”是指完全响应(CR)率和部分响应(PR)率的总和。

[0313] “完全响应”或“CR”意指响应于治疗的癌症的所有体征的消失(例如所有靶病变的

消失)。这并不总是意味着癌症已经治愈。

[0314] “持续响应”是指在停止治疗后对减少肿瘤生长的持续作用。例如,与给药阶段开始时的尺寸相比,肿瘤尺寸可以是相同的尺寸或更小。在一些实施方案中,持续响应具有与治疗持续时间至少相同的持续时间,至少1.5x、2.0x、2.5x或3x。治疗持续时间的长度或更长。

[0315] 如本文所用,“减少或抑制癌症复发”意指减少或抑制肿瘤或癌症复发或肿瘤或癌症进展。如本文所公开的,癌症复发和/或癌症进展包括但不限于癌症转移。

[0316] 术语“生存”是指患者保持生存,并且包括总体生存以及无进展生存和无复发生存。

[0317] 如本文所用,“无复发生存”或“RFS”是指在治疗期间和治疗后完全手术切除肿瘤后没有任何疾病复发的时间长度,在此期间没有出现所治疗的疾病(例如癌症)的体征或症状。无复发生存可包括患者经历完全响应或部分响应的的时间量,以及患者经历稳定疾病的时间量。

[0318] 如本文所用,“总体生存”或“OS”是指组中在特定持续时间后可能生存的个体的百分比。

[0319] “延长生存”意指相对于未治疗的患者(即相对于未用药物治疗的患者),或相对于不具有指定水平的体细胞突变的患者,和/或相对于用抗肿瘤剂治疗的患者而言,在被治疗的患者中增加了总体或无进展和无复发生存。

[0320] 术语“癌症疗法”是指可用于治疗癌症的疗法。在一些实施方案中,癌症疗法是组合疗法。

[0321] 在一些实施方案中,“可能受益于”某种疗法的受试者是以更高的可能性或更高的量级响应该疗法的受试者。

[0322] 如本文所用,术语“个体”、“患者”和“受试者”可互换使用,并且是指任何需要所述治疗的单个动物,更优选哺乳动物(包括此类非人动物,例如,狗、猫、马、兔子、动物园动物、牛、猪、绵羊和非人灵长类)。在特定实施方案中,本文的个体或患者是人。

[0323] 如本文所用,“施用(administering)”和“施用(administration)”意指向受试者(例如患者)给予一定剂量的化合物(例如拮抗剂)或药物组合物(例如包括拮抗剂的药物组合物)的方法。施用可以通过任何合适的方式进行,包括肠胃外、肺内和鼻内,以及如果需要局部治疗,病灶内施用。肠胃外输注包括例如肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了各种给药方案,包括但不限于在不同时间点单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0324] 术语“同时”在本文中用于指施用两种或更多种治疗剂,其中至少部分施用在时间上重叠。因此,同时施用包括在停止施用一种或多种其他药剂后继续施用一种或多种药剂时的给药方案。

[0325] “降低或抑制”意指引起20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更大的总体降低的能力。减少或抑制可以指例如所治疗的病症的症状、转移的存在或大小、或原发性肿瘤的大小。

[0326] 在本文中使用时,短语“基于”意指关于一种或多种生物标志物的信息用于告知治

疗决定、包装说明书上提供的信息或营销/促销指导等。

[0327] 靶向疗法

[0328] 在某些实施方案中,本文所描述的疗法包括靶向疗法。

[0329] 如本文中所使用的,“靶向疗法”是指使用通过干扰参与癌症的生长、进展、复发和扩散的特定分子(“分子靶标”)来阻断癌症的生长和扩散的药物或其他物质的癌症疗法。靶向癌症疗法有时称为“分子靶向药物”、“分子靶向疗法”、“精准药物”或类似名称。

[0330] 如本文中所使用的,术语“药剂”应理解为意指在组织、系统、动物、哺乳动物、人类或其他受试者中产生期望的效果的物质,也应理解为“药剂”可以是单一化合物或两种或更多种化合物的组合或组合物。

[0331] 如本文中所使用的,“靶向BRAF的药剂”是指直接地或间接地靶向、减少或抑制BRAF的活性和/或功能的药剂。靶向BRAF的示例性药剂包括但不限于靶向BRAF的化合物、蛋白质或抗体。优选地,所述靶向BRAF的药剂是“BRAF抑制剂”。

[0332] 如本文中所使用的,“靶向MEK的药剂”是指直接地或间接地靶向、减少或抑制MEK的活性和/或功能的药剂。靶向MEK的示例性药剂包括但不限于靶向MEK的化合物、蛋白质或抗体。优选地,所述靶向MEK的药剂是“MEK抑制剂”。

[0333] 本文所描述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂可以含有一个或多个手性原子,或可以以其他方式能够作为对映异构体存在。因此,本发明的化合物包括对映异构体的混合物以及纯化的对映异构体或富含对映异构体的混合物。另外,应理解,所有互变异构体和互变异构体的混合物被包含在本文所描述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂的范围内。

[0334] 此外,应当理解,本文所描述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂可以单独地或两者都以溶剂化物呈现。如本文中所使用的,术语“溶剂化物”是指由溶质(在本发明中,具有式(I)或(II)或(III)或(IV)的化合物或其盐)和溶剂形成的可变化学计量的复合物。出于本发明目的的此类溶剂不会干扰溶质的生物学活性。合适的溶剂的实例包括但不限于水、甲醇、二甲亚砜、乙醇和乙酸。在一个实施方案中,所使用的溶剂是药学上可接受的溶剂。合适的药学上可接受的溶剂的实例包括但不限于水、乙醇和乙酸。在另一个实施方案中,所使用的溶剂是水。

[0335] 本文所描述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂可以具有以多于一种形式结晶的能力(一种被称为多晶型的特征),并且应理解此类多晶型形式(“多晶型物”)在本文所述的治疗剂的范围内。多晶型通常可以作为对温度或压力或两者的变化的响应而发生并且还可以由结晶过程中的变化造成。多晶型物可以通过本领域中已知的多种物理特征比如X射线衍射图、溶解度和熔点来区分。

[0336] 涵盖在术语“药学上可接受的盐”内的盐是指本发明化合物的无毒盐。本发明的化合物的盐可以包括由本发明化合物中的取代基上的氮衍生的酸加成盐。代表性的盐包括以下盐:乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、依地酸钙盐、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、克拉维酸盐、柠檬酸盐、二盐酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酰基阿散酸盐(glycollylarsanilate)、己基间苯二酚盐、海巴明、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基溴化物、甲基硝酸盐、甲基硫酸盐、马来酸单钾盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸

盐、N-甲基葡糖胺(N-methylglucannine)、草酸盐、双羟萘酸盐(pamoate)(恩波酸盐(embonate))、棕榈酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、钾盐、水杨酸盐、钠盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、鞣酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐、三乙基碘、三甲基铵和戊酸盐。不是药学上可接受的其他盐可以用于制备本发明的化合物并且这些盐形成本发明的另外的方面。盐可以由本领域技术人员容易地制备。

[0337] 虽然为了在疗法中使用,本文所描述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂可能可以作为化学原料施用,但可以将所述活性成分作为药物组合物呈现。因此,本发明进一步提供药物组合物,所述药物组合物包含本文所描述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。一种或多种载体、稀释剂或赋形剂在与配制品(能够是药物配制品)的其他成分相容的意义上必须是可接受的,并且对其接受者无害。根据本发明的另一个方面,还提供了用于制备药物组合物的工艺,其包括将本文所述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂与一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合。所用药物组合物的这些成分可以以单独的药物组合存在或一起配制在一种药物组合物中。因此,本公开还提供了药物组合物的组合,其中一种药物组合物包括BRAF抑制剂(例如,本文所述的BRAF抑制剂)和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂,以及一种药物组合物,其含有MEK抑制剂(例如,本文所述的MEK抑制剂)和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

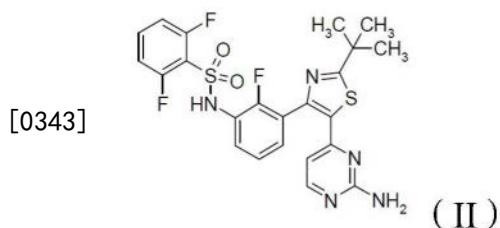
[0338] 本文所述的BRAF抑制剂和/或MEK抑制剂可以通过在包括两种化合物的单一药物组合物中同时施用来用于根据本公开的组合中。或者,所述组合可以在单独的药物组合物中以顺序方式单独施用,所述药物组合物各自包含BRAF抑制剂或MEK抑制剂中的任一种,其中例如首先施用BRAF抑制剂,然后施用MEK抑制剂,或者可选地,首先施用MEK抑制剂,然后施用BRAF抑制剂。这种顺序施用可以在时间上接近(例如同时)或在时间上远离。

[0339] 此外,组合的化合物是否以相同的剂型施用无关紧要,例如,一种化合物可以局部施用,并且另一种化合物可以口服施用。合适地,口服施用这两种化合物。

[0340] 示例性BRAF抑制剂

[0341] 在一个实施方案中,本文所述的靶向疗法包括靶向BRAF的药剂(例如,BRAF的抑制剂)。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗癌症,例如本文所述的癌症,例如皮肤癌(例如黑素瘤)。不希望受理论束缚,认为在一些实施方案中,丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径在许多人类癌症中被异常激活,例如通过BRAF激酶中的突变(其已经在几乎50%的转移性黑素瘤中发现)。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗具有BRAF突变(例如本文所述的BRAF突变)的癌症。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗黑素瘤,例如不可切除的或转移性黑素瘤。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗受试者的黑素瘤,其中黑素瘤具有BRAF突变(例如,BRAF V600突变)。

[0342] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂是达拉非尼。达拉非尼也称为GSK2118436,或TAFINLAR®(CAS号1195765-45-7)。达拉非尼的化学式由化合物式(II)示出:



[0344] 或其药学上可接受的盐表示。为了方便起见,可能的化合物和盐的组统称为达拉菲尼,这意味着提及达拉菲尼将是指可替代的化合物或其药学上可接受的盐中的任何一种。

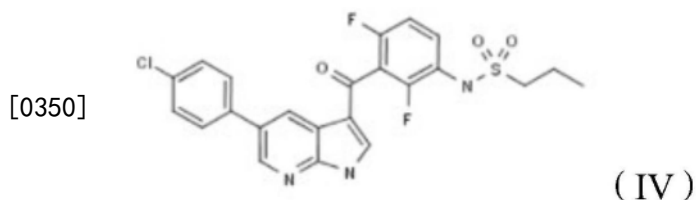
[0345] 根据命名惯例,达拉菲尼也可以适当地称为N- {3- [5- (2-氨基咪唑-4-基) -2-叔丁基-1,3-噻唑-4-基] -2-氟苯基} -2,6-二氟苯磺酰胺。

[0346] 在PCT专利申请PCT/US 09/42682中披露并且要求保护达拉菲尼连同其药学上可接受的盐,其作为BRAF活性的抑制剂是有用的,特别是在治疗癌症中是有用的。达拉菲尼由所述申请中的实例58a至58e体现。所述PCT申请以公开物WO 2009/137391公布于2009年11月12日,并且通过引用特此并入。达拉菲尼可以根据WO 2011/047238 (参见例如第15至21页) 描述的方法制备,其通过引用并入本文。

[0347] 达拉菲尼是人野生型BRAF和CRAF酶以及BRAF酶的突变形式(例如BRAF V600E、BRAF V600K和BRAF V600D)的口服生物可利用的、有效的和选择性的RAF激酶抑制剂。达拉菲尼的作用模式与ATP结合的竞争性抑制一致。在某些实施方案中,该组合用于治疗已经确定患有具有BRAF突变(例如,本文所述的BRAF突变(例如,BRAF V600突变))的癌症(例如,黑素瘤)的受试者。在其他实施方案中,该组合用于治疗除野生型BRAF癌症(例如,野生型BRAF黑素瘤)之外的癌症(例如,黑素瘤)。

[0348] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂或达拉菲尼以50mg和300mg(例如100mg和200mg之间)之间的剂量施用,例如每天两次。在某些实施方案中,BRAF抑制剂或达拉菲尼以100mg和200mg之间的剂量(例如,以约150mg的剂量)施用,例如每天两次。例如,可以在施用第一剂量后约12小时施用BRAF抑制剂或达拉菲尼的第二剂量。在一些实施方案中,BRAF抑制剂或达拉菲尼以100mg至600mg之间(例如,200mg至400mg之间)的总日剂量施用。在某些实施方案中,BRAF抑制剂或达拉菲尼以200mg至400mg(例如,以约300mg的总日剂量)的总日剂量施用。在一些实施方案中,达拉菲尼的BRAF抑制剂口服施用。

[0349] 在另一个实施方案中,BRAF抑制剂是维罗菲尼。维罗菲尼公开于WO 2005/062795、WO 2007/013896、WO 2007/002325和WO 2007/002433中,其通过引用整体并入本文。维罗菲尼也称为PLX4032、RG7204、R05185426或ZELBORAF® (CAS号918504-65-1)。如本文所用,BRAF抑制剂维罗菲尼或其药学上可接受的盐或溶剂化物由式(IV)的化合物表示:



[0351] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物。为了方便起见,可能的化合物和盐或溶剂化物的组统称为维罗菲尼,意指对维罗菲尼的提及将指替代方案中的任何化合物或其药学上可

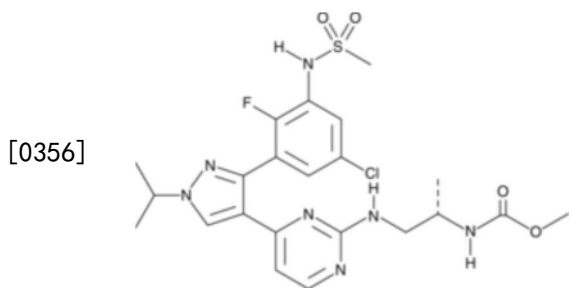
接受的盐或溶剂化物。

[0352] 根据命名惯例,维罗菲尼也可以适当地称为N-[3-[[5-(4-氯苯基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基]羰基]-2,4-二氟苯基]-1-丙磺酰胺。

[0353] 在WO 2007/002325中公开并要求保护维罗菲尼及其药学上可接受的盐以及其溶剂化物,其可用作BRAF活性的抑制剂,特别是在癌症的治疗中。维罗菲尼可以根据WO 2007/002325中的方法制备。

[0354] 可用于本文所述的靶向疗法的BRAF的其他示例性抑制剂包括但不限于康奈非尼、ABM-1310、ARQ 736、ASN003、BGB-283、BGB-3245、CEP-32496、GDC-0879、LUT014、PLX4720、PLX8394、R05212054或其药学上可接受的盐。

[0355] 在一个实施方案中,BRAF抑制剂是康奈非尼或PCT公开号WO 2011/025927中公开的化合物。康奈非尼也称为LGX818(CAS号1269440-17-6)。如本文所用,BRAF抑制剂康奈非尼或其药学上可接受的盐或溶剂化物由式(IV)的化合物表示:



[0357] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0358] 根据命名惯例,康奈非尼也可以适当地称为N-[(1S)-2-[[4-[3-[5-氯-2-氟-3-[(甲基磺酰基)氨基]苯基]-1-(1-甲基乙基)-1H-吡唑-4-基]-2-嘧啶基]氨基]-1-氨基甲酸甲酯。

[0359] 在一个实施方案中,BRAF抑制剂或康奈非尼以例如每天约200-300、200-400或300-400mg的剂量施用。在一个实施方案中,化合物以约200、约300或约400mg的剂量施用。

[0360] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括ABM-1310。

[0361] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括ARQ 736。

[0362] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括ASN003。

[0363] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括BGB-283。

[0364] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括BGB-3245。

[0365] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括CEP-32496(CAS号1188910-76-0)。根据命名惯例,CEP-32496也可以适当地称为N-[3-[(6,7-二甲氧基-4-喹唑啉基)氧]苯基]-N'-[5-(2,2,2-三氟-1,1-二甲基乙基)-3-异噁唑基]-脲。

[0366] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括GDC-0879(CAS号905281-76-7)。根据命名惯例,GDC-0879也可以适当地称为2,3-二氢-5-[1-(2-羟乙基)-3-(4-吡啶基)-1H-吡唑-4-基]-1H-茛-1-酮脒。

[0367] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括LUT014。

[0368] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括PLX4720。PLX4720也称为Raf激酶抑制剂V(CAS号918505-84-7)。根据命名惯例,PLX4720也可以适当地称为N-[3-[(5-氯-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)羰基]-2,4-二氟苯基]-1-丙磺酰胺。

[0369] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括PLX8394。

[0370] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂包括R05212054。R05212054也称为PLX3603。

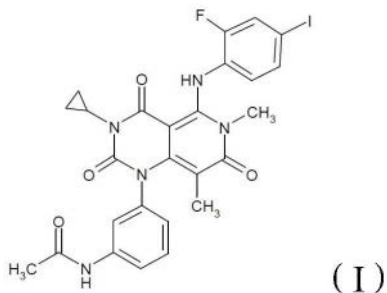
[0371] 示例性MEK抑制剂

[0372] 在一个实施方案中,本文所述的靶向疗法包括靶向MEK的药剂(例如,MEK的抑制剂)。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗癌症,例如本文所述的癌症,例如皮肤癌(例如黑素瘤)。不希望受理论束缚,认为MAPK信号传导级联的成员MEK被抑制时,可以阻断细胞增殖,并且可以诱导细胞凋亡。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗黑素瘤,例如不可切除的或转移性黑素瘤。在一些实施方案中,靶向疗法用于治疗受试者的黑素瘤,其中黑素瘤具有BRAF突变(例如,BRAF V600突变)。

[0373] 在一些实施方案中,MEK抑制剂是曲美替尼。曲美替尼也称为GSK1120212、JTP-74057、TMT212、G-02442104或**MEKINIST®**(CAS号871700-17-3)。不希望受理论束缚,认为在一些实施方案中,曲美替尼是MEK1和MEK2的可逆和高选择性变构抑制剂。MEK蛋白是MAPK通路的关键组分,其通常在肿瘤细胞如黑素瘤细胞中超激活。BRAF和RAS两者中的致癌突变可以通过MEK1或MEK2发信号。

[0374] 曲美替尼的化学式由化合物式(I)显示:

[0375]



[0376] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物。为方便起见,可能的化合物和盐或溶剂化物的组统称为曲美替尼,意指提及曲美替尼将指替代方案中的任何化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

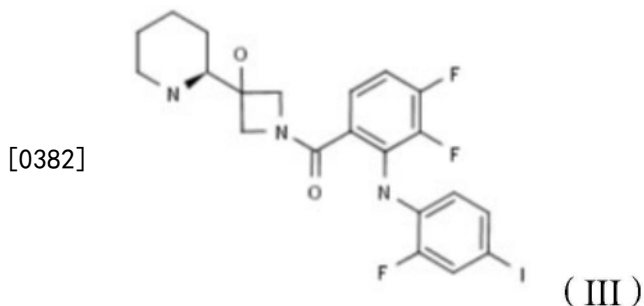
[0377] 根据命名惯例,曲美替尼也可以适当地称为N- {3- [3-环丙基-5- [ (2-氟-4-碘苯基) 氨基]-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代-3,4,6,7-四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-1(2H)-基] 苯基} 乙酰胺。

[0378] 在WO 2005/121 142中披露并且要求保护曲美替尼连同其药学上可接受的盐和溶剂化物,其作为MEK活性的抑制剂是有用的,特别是在治疗癌症中是有用的。曲美替尼是实例4-1的化合物,可以如WO 2005/121 142中描述来制备。

[0379] 曲美替尼可以呈二甲亚砜溶剂化物的形式,钠盐的形式或选自以下的溶剂化物的形式:水合物、乙酸、乙醇、硝基甲烷、氯苯、1-戊醇、异丙醇、乙二醇和3-甲基-1-丁醇。这些溶剂化物和盐形式可以由本领域技术人员根据WO 2005/121142中的描述来制备。

[0380] 在一些实施方案中,MEK抑制剂或曲美替尼以0.1mg至4mg之间的剂量(例如0.5mg至3mg之间,例如以0.5mg的剂量)施用,例如每天一次。在一些实施方案中,MEK抑制剂或曲美替尼以0.5mg的剂量施用,例如每天一次。在某些实施方案中,MEK抑制剂或曲美替尼以1mg至3mg之间的剂量(例如以约2mg的剂量)施用,例如每天一次。在一些实施方案中,口服施用MEK抑制剂或曲美替尼。

[0381] 在另一个实施方案中,MEK抑制剂是考比替尼。考比替尼公开于WO 2007/044515,其通过引用整体并入本文。考比替尼也称作XL-518,GDC-0973,RG-7420,或COTELLIC® (CAS号934660-93-2)。如本文所用,MEK抑制剂考比替尼或其药学上可接受的盐或溶剂化物由式(III)的化合物表示:



[0383] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物。为了方便起见,可能的化合物和盐或溶剂化物的组统称为考比替尼,这意味着提及考比替尼将是指可替代的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物中的任何一种。

[0384] 根据命名惯例,考比替尼也可以适当地称为[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]苯基][3-羟基-3-(2S)-2-哌啶基-1-氮杂环丁烷基]-甲酮。

[0385] 在WO 2007/044515中披露并且要求保护考比替尼连同其药学上可接受的盐和溶剂化物,其作为MEK活性的抑制剂是有用的,特别是在治疗癌症中是有用的。考比替尼可以如WO 2007/044515中所述来制备。

[0386] 可用于本文所述的靶向疗法的其他示例性MEK抑制剂包括但不限于比尼美替尼、米达美替尼、匹马赛替、瑞法替尼、司美替尼、AS703988、AZD 8330、BI 847325、BIX 02188、BIX 02189、CI-1040、CS3006、E6201、FCN-159、G-38963、GDC-0623、HL-085、PD 98059、R04987655、R05126766、SHR 7390、TAK-733、U0126、WX-554,或其药学上可接受的盐。

[0387] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含比尼美替尼。比尼美替尼也称为ARRY-438162、MEK162或MEKTOVI® (CAS号606143-89-9)。根据命名惯例,比尼美替尼也可以适当地称为5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺。在一些实施方案中,MEK抑制剂包括米达美替尼。米达美替尼也称为PD 0325901 (CAS号391210-10-9)。根据命名惯例,mirdametinib也可以适当地称为N-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺。米达美替尼描述于例如PCT公开号WO 2002/006213中。

[0388] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含匹马赛替。匹马赛替也称为AS-703206G-02443714或MSC1936369B (CAS号1236699-92-5)。根据命名惯例,匹马赛替也可以适当地称为N-[(2S)-2,3-二羟基丙基]-3-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-4-吡啶甲酰胺。

[0389] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含瑞法替尼。瑞法替尼也称为BAY 86-9766或RDEA119 (CAS号923032-37-5)。根据命名惯例,瑞法替尼也可以适当地称为N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2S)-2,3-二羟基丙基]-环丙磺酰胺。

[0390] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含司美替尼。司美替尼也称为AZD 6244、ARRY 142886、CL 1,040、G 00039805或NSC 741078 (CAS号606143-52-6)。根据命名惯例,司美替尼也可以适当地称为5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯

并咪唑-6-甲酰胺 (CAS号606143-52-6)。司美替尼描述于例如PCT公开号PCT公开号W02003/077914中。

[0391] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含AS703988。AS703988也称为MSC2015103B。

[0392] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含AZD 8330。AZD 8330也称为ARRY-424704 (CAS号869357-68-6)。根据命名惯例,AZD 8330也可以适当地称为2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-1,6-二氢-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-3-吡啶甲酰胺。

[0393] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含BI847325 (CAS编号1207293-36-4)。根据命名惯例,也可以适当地称为3-[3-[[[4-[(二甲基氨基)甲基]苯基]氨基]苯基亚甲基]-2,3-二氢-2-氧代-1H-吡啶-6-基]-N-乙基-2-丙炔酰胺。

[0394] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含BIX 02188 (CAS号334949-59-6)。根据命名惯例,BIX 02188也可以适当地称为(3Z)-3-[[[3-[(二甲基氨基)甲基]苯基]氨基]苯基亚甲基]-2,3-二氢-2-氧代-1H-吡啶-6-甲酰胺。

[0395] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含BIX 02189 (CAS号1265916-41-3)。根据命名惯例,BIX 02189也可以适当地称为(3Z)-3-[[[3-[(二甲基氨基)甲基]苯基]氨基]苯基亚甲基]-2,3-二氢-N,N-二甲基-2-氧代-1H-吡啶-6-甲酰胺。

[0396] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含CI-1040。CI-1040也称为PD184352 (CAS号212631-79-3)。根据命名惯例,司美替尼也可以适当地称为2-[(2-氯-4-碘苯基)氨基]-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲酰胺。CI-1040描述于例如PCT公开号W02000/035436中。

[0397] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含CS3006。

[0398] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含E6201。根据命名惯例,司美替尼也可以适当地称为(3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙基氨基)-8,9,16-三羟基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氢-1H-2-苯并氧杂环十四烷-1,7(8H)-二酮。E6201描述于例如PCT公开号W0 2003/076424中。

[0399] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含FCN-159。

[0400] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含G-38963。根据命名惯例,G-38963也可以适当地称为3-((2-氟-4-碘苯基)氨基)-N-(2-羟基乙氧基)咪唑并[3,2-c]吡啶-2-甲酰胺。

[0401] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含GDC-0623 (CAS编号1168091-68-6)。根据命名惯例,GDC-0623也可以适当地称为5-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-N-(2-羟基乙氧基)-咪唑并[1,5-a]吡啶-6-甲酰胺。

[0402] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含HL-085。

[0403] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含PD 98059 (CAS编号167869-21-8)。根据命名惯例,PD 98059也可以适当地称为2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮。

[0404] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含R04987655。R04987655也称为CH4987655 (CAS号874101-00-5)。根据命名惯例,R04987655也可以适当地称为3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-N-(2-羟基乙氧基)-5-[(四氢-3-氧代-2H-1,2-噁嗪-2-基)甲基]-苯甲酰胺。

[0405] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含R05126766。R05126766也称为CH5126766 (CAS号946128-88-7)。根据命名惯例,也可以适当地称为N-[3-氟-4-[[4-甲基-2-氧代-7-(2-噻啉氧基)-2H-1-苯并吡喃-3-基]甲基]-2-吡啶基]-N-甲基-磺酰胺。

[0406] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含SHR 7390。

[0407] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含TAK-733 (CAS号1035555-63-5)。根据命名惯例,TAK-733也可以适当地称为3-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-6-氟-5-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-8-甲基-吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮。

[0408] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包括U0126 (CAS编号109511-58-2)。根据命名惯例,U0126也可以适当地称为2,3-双[氨基[(2-氨基苯基)硫代]亚甲基]-丁二腈。U0126描述于例如美国专利号2,779,780中。U0126描述于例如美国专利号2,779,780中。

[0409] 在一些实施方案中,MEK抑制剂包含WX-554。

[0410] MEK抑制剂的其他实例公开于WO 2013/019906、WO 03/077914、WO 2005/121142、WO 2007/04415、WO 2008/024725和WO 2009/085983中,其内容通过引用并入本文。

[0411] BRAF和MEK抑制剂的组合

[0412] 在一些实施方案中,本文所述的靶向疗法包括靶向BRAF的药剂(例如,本文所述的BRAF抑制剂)和靶向MEK的药剂(例如,本文所述的MEK抑制剂)。在某些实施方案中,BRAF抑制剂是达拉非尼,并且MEK抑制剂是曲美替尼。两种分子及其组合公开于例如WO 2011/047238中,其通过引用整体并入本文。在其他实施方案中,BRAF抑制剂是维罗菲尼,并且MEK抑制剂是考比替尼。

[0413] 体外和体内临床前数据表明通过BRAF抑制剂(例如,达拉非尼)和MEK抑制剂(例如,曲美替尼)的组合增加的抗肿瘤活性。例如,达拉非尼和曲美替尼的组合已经证明在体外增强了对一组BRAF-突变细胞系的抗增殖活性,表明达拉非尼和曲美替尼在解决对每种单一药剂的原发性抗性方面的协同作用。该组合有效抑制达拉非尼抗性BRAF-突变型黑色素瘤细胞克隆的生长,表明该组合疗法克服获得性抗性的潜在能力。该细胞系数据与其他实验性BRAF-和MEK-抑制剂组合的体外结果相当(Corcoran等,Sci Signal.2010;3(149):ra84;Emery等,Proc.Natl Acad Sci U S A 2009;106(48):20411-6)。

[0414] 作为另一个实例,与任一单一药剂相比,达拉非尼和曲美替尼的组合在BRAF-突变型黑色素瘤的小鼠异种移植模型中显示出改善的活性。在大鼠中进行的皮肤毒性研究中,将曲美替尼添加到达拉非尼中防止了单独用达拉非尼处理后观察到的增殖性皮肤损伤的发展。这些结果表明,向BRAF抑制剂中添加MEK抑制剂可以抑制正常皮肤细胞中的增殖信号,这可以导致过度增殖性皮肤病变的发展,包括例如在涉及BRAF抑制剂的临床试验中经常观察到的角化棘皮瘤和皮肤鳞状细胞癌(Flaherty等,Curr Opin Oncol.2010;22(3):178-83;Chapman等,Expert Opin Investig Drugs.2011;20(2):209-20;Robert等,Curr Opin Oncol.2011;23(2):177-82)。用BRAF和MEK抑制剂的另一种组合观察到类似的结果(Carnahan等,Mol Cancer Ther.2010;9(8):2399-410)。

[0415] 免疫肿瘤学疗法

[0416] 在某些实施方案中,本文所述的疗法包括免疫肿瘤学疗法。

[0417] 如本文所用,“免疫肿瘤学疗法”是指改变对免疫应答的调节的癌症疗法。在一些实施方案中,免疫肿瘤学疗法包括免疫检查点抑制剂。术语“免疫检查点抑制剂”通常是指靶向至少一种免疫检查点蛋白质以改变免疫应答的调节(例如下调或抑制免疫应答)的治疗剂。免疫检查点蛋白质在本领域中是已知的并且包括但不限于程序性细胞死亡1(PD-1)、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)、程序性细胞死亡配体1(PD-L1)、程序性细胞死亡配体2(PD-L2)、T细胞激活的V结构域Ig抑制剂(VISTA)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、

HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP $\alpha$  (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、IDO、OX40、以及A2aR。在一些情况下,免疫检查点蛋白质可以在激活的T细胞的表面上表达。可以充当用于本发明的方法中的免疫检查点抑制剂的治疗剂包括但不限于靶向以下中的一种或多种的治疗剂:PD-1、CTLA-4、PD-L1、PD-L2、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP $\alpha$  (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、IDO、OX40、以及A2aR。在一些情况下,免疫检查点抑制剂增强或遏制一种或多种靶向免疫检查点蛋白质的功能。在一些情况下,免疫检查点抑制剂是如本文中描述的PD-L1轴结合拮抗剂。

[0418] PD-1抑制剂

[0419] 在某些实施方案中,本文所述的免疫肿瘤学疗法包含PD-1结合拮抗剂,例如PD-1抑制剂。

[0420] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂选自PDR001 (诺华公司 (Novartis))、纳武单抗 (百时美施贵宝公司 (Bristol-Myers Squibb))、派姆单抗 (默克公司 (Merck&Co))、匹地利珠单抗 (CureTech公司)、MEDI0680 (医学免疫公司 (Medimmune))、REGN2810 (再生元公司 (Regeneron))、TSR-042 (泰萨罗公司 (Tesarro))、PF-06801591 (辉瑞制药公司 (Pfizer))、BGB-A317 (百济神州公司 (Beigene))、BGB-108 (百济神州公司)、INCSHR1210 (因赛特公司 (Incyte))、或AMP-224 (安普利公司 (Amplimmune))。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是PDR001。PDR001还被称为斯巴达珠单抗。纳武单抗 (克隆5C4) 和其他抗PD-1抗体披露在US 8,008,449和WO 2006/121168中,将这些文献通过引用以其全文并入。派姆单抗和其他抗PD-1抗体披露于Hamid, O. 等人 (2013) *New England Journal of Medicine* [新英格兰医学杂志] 369 (2): 134-44; US 8,354,509; 和WO 2009/114335中,将这些文献通过引用以其全文并入。MEDI0680和其他抗PD-1抗体披露于US 9,205,148和WO 2012/145493中,将这些文献通过引用以其全文并入。其他已知的抗PD-1抗体包括描述于例如以下中的那些:WO 2015/112800、WO 2016/092419、WO 2015/085847、WO 2014/179664、WO 2014/194302、WO 2014/209804、WO 2015/200119、US 8,735,553、US 7,488,802、US 8,927,697、US 8,993,731、和US 9,102,727,将这些文献通过引用以其全文并入。

[0421] 示例性PD-1抑制剂

[0422] 在一个实施方案中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体分子。在一个实施方案中,PD-1抑制剂是如US2015/0210769中所述的抗PD-1抗体分子,其通过引用整体并入。在一些实施方案中,抗PD-1抗体分子是司他利珠单抗 (也称为PDR001)。

[0423] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含来自重链和轻链可变区的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个互补性决定区 (CDR) (或总体上全部CDR),所述重链和轻链可变区包含表1 (例如,来自表1中披露的BAP049-克隆-E或BAP049-克隆-B的重链和轻链可变区序列) 中所示的氨基酸序列,或由表1中所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在一些实施方案中,CDR根据卡巴特 (Kabat) 定义 (例如,如表1中所列出的)。在一些实施方案中,CDR根据乔西亚 (Chothia) 定义 (例如,如表1中所列出的)。在一些实施方案中,CDR根据卡巴特和乔西亚两者的组合CDR定义 (例如,如表1中所列出的)。在一个实施方案中,VH CDR1的卡巴特和乔西亚CDR的组合包含氨基酸序列GYTFTTYWMH (SEQ ID NO:541)。在一个实施方案中,

相对于表1中所示的氨基酸序列,或由表1中所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列,CDR中的一种或多种(或总体上全部CDR)具有一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个变化,例如氨基酸取代(例如,保守氨基酸取代)或缺失。

[0424] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:501的VHCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:502的VHCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:503的VHCDR3氨基酸序列的重链可变区(VH);以及含有SEQ ID NO:510的VLCDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:511的VLCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:512的VLCDR3氨基酸序列的轻链可变区(VL),各自披露于表1中。

[0425] 在一个实施方案中,抗体分子包含:含有由SEQ ID NO:524的核苷酸序列编码的VHCDR1、由SEQ ID NO:525的核苷酸序列编码的VHCDR2、和由SEQ ID NO:526的核苷酸序列编码的VHCDR3的VH;以及含有由SEQ ID NO:529的核苷酸序列编码的VLCDR1、由SEQ ID NO:530的核苷酸序列编码的VLCDR2、和由SEQ ID NO:531的核苷酸序列编码的VLCDR3的VL,各自披露于表1中。

[0426] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:506具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的氨基酸序列的VH。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:520具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的氨基酸序列的VL。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:516具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的氨基酸序列的VL。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:520的氨基酸序列的VL。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:506的氨基酸序列的VH和含有SEQ ID NO:516的氨基酸序列的VL。

[0427] 在一个实施方案中,抗体分子包含:由SEQ ID NO:507的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:507具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的核苷酸序列编码的VH。在一个实施方案中,抗体分子包含:由SEQ ID NO:521或517的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:521或517具有至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的核苷酸序列编码的VL。在一个实施方案中,抗体分子包含由SEQ ID NO:507的核苷酸序列编码的VH和由SEQ ID NO:521或517的核苷酸序列编码的VL。

[0428] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:508具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的氨基酸序列的重链。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:522的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:522具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:518的氨基酸序列、或与SEQ ID NO:518具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:522的氨基酸序列的轻链。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含:含有SEQ ID NO:508的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:518的氨基酸序列的轻链。

[0429] 在一个实施方案中,抗体分子包含:由SEQ ID NO:509的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:509具有至少85%、90%、95%、或99%、或更高同一性的核苷酸序列编码的重链。在一个实施方案中,抗体分子包含:由SEQ ID NO:523或519的核苷酸序列、或与SEQ ID NO:523或

519具有至少85%、90%、95%、或99%或更高同一性的核苷酸序列编码的轻链。在一个实施方案中,抗体分子包含由SEQ ID NO:509的核苷酸序列编码的重链和由SEQ ID NO:523或519的核苷酸序列编码的轻链。

[0430] 本文所述的抗体分子可以通过载体、宿主细胞、和在US2015/0210769(将其通过引用以其全文并入)中描述的方法制得。

[0431] 表1. 示例性抗PD-1抗体分子的氨基酸和核苷酸序列

<b>BAP049-Clone-B HC</b>		
SEQ ID NO: 501 (Kabat)	HCDR 1	TYWMH
SEQ ID NO: 502 (Kabat)	HCDR 2	NIYPGTGGSNFDEKFKN
SEQ ID NO: 503 (Kabat)	HCDR 3	WTTGTGAY
[0432] SEQ ID NO: 504 (Chothia)	HCDR 1	GYTFTTY
SEQ ID NO: 505 (Chothia)	HCDR 2	YPGTGG
SEQ ID NO: 503 (Chothia)	HCDR 3	WTTGTGAY
SEQ ID NO: 506	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWV RQATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTTGTGAYWGQGT

[0433]

		TVTSS
SEQ ID NO: 507	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAA GAAGCCCGGCGAGTCACTGAGAATTAGCTGTAAAGG TTCAGGCTACACCTTCACTACCTACTGGATGCACTGG GTCCGCCAGGCTACCGGTCAAGGCCTCGAGTGGATG GGTAATATCTACCCCGGCACCGGCGGCTCTAACTTCG ACGAGAAGTTAAGAATAGAGTGACTATCACCGCCG ATAAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGC CTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCACTA GGTGGACTACCGGCACAGGCGCCTACTGGGGTCAAG GCACTACCGTGACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 508	重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWV RQATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRWTGTGAYWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
SEQ ID NO: 509	DNA 重链	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAA GAAGCCCGGCGAGTCACTGAGAATTAGCTGTAAAGG TTCAGGCTACACCTTCACTACCTACTGGATGCACTGG GTCCGCCAGGCTACCGGTCAAGGCCTCGAGTGGATG GGTAATATCTACCCCGGCACCGGCGGCTCTAACTTCG ACGAGAAGTTAAGAATAGAGTGACTATCACCGCCG ATAAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGC CTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCACTA GGTGGACTACCGGCACAGGCGCCTACTGGGGTCAAG GCACTACCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGG GCCCGTCCGTGTTCCCCCTGGCACCTTGTAGCCGGAG CACTAGCGAATCCACCGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTC AAGGATTACTTCCCGGAGCCCGTGACCGTGTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCACACCTTC CCCCTGTGCTGCAGAGCTCCGGGCTGTACTCGCTGT

[0434]

		CGTCGGTGGTCACGGTGCCTTCATCTAGCCTGGGTAC CAAGACCTACACTTGCAACGTGGACCACAAGCCTTC CAACACTAAGGTGGACAAGCGCGTCGAATCGAAGTA CGGCCACCGTGCCCGCCTTGTCCCGCGCCGGAGTT CCTCGGCGGTCCCTCGGTCTTTCTGTTCACCGAAG CCCAAGGACACTTTGATGATTTCCCGCACCCCTGAAG TGACATGCGTGGTCGTGGACGTGTACAGGAAGATC CGGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTCG AGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCGAGGGAGGAG CAGTTCAACTCCACTTACCGCGTCGTGTCCGTGCTGA CGGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGT ACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGGACTTCCTAGCT CAATCGAAAAGACCATCTCGAAAGCCAAGGGACAGC CCCGGAACCCCAAGTGTATACCTGCCACCGAGCC AGGAAGAAATGACTAAGAACCAAGTCTCATTGACTT GCCTTGTGAAGGGCTTCTACCCATCGGATATCGCCGT GGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCGGAACAACACT ACAAGACCACCCCTCCGGTGCTGGACTCAGACGGAT CCTTCTTCTCTACTCGCGGCTGACCGTGGATAAGAG CAGATGGCAGGAGGGAATGTGTTTCAGCTGTTCTGT GATGCATGAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAA GTCCCTGTCCCTCTCCCTGGGA
<b>BAP049-Clone-B LC</b>		
SEQ ID NO: 510 (Kabat)	LCDR1	KSSQSLDSDGNQKNFLT
SEQ ID NO: 511 (Kabat)	LCDR2	WASTRES
SEQ ID NO: 512 (Kabat)	LCDR3	QNDYSYPYT
SEQ ID NO: 513 (Chothia)	LCDR1	SQSLDSDGNQKNF
SEQ ID NO: 514 (Chothia)	LCDR2	WAS
SEQ ID NO: 515 (Chothia)	LCDR3	DYSYPY
SEQ ID NO: 516	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLDSDGNQKNFLT WYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSDFT

[0435]

		FTISLQPEDATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 517	DNA VL	GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCC TGAGCCCTGGCGAGCGGGCTACACTGAGCTGTAAAT CTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGA ACTTCCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAG CCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCTTCACTATCTCTAGCCTGCAGC CCGAGGATATCGCTACCTACTACTGTGAGAACGACTA TAGTACCCCTACACCTTCGGTCAAGGCACTAAGGTC GAGATTAAG
SEQ ID NO: 518	轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSDGNQKNFLT WYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFE FTISLQPEDATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 519	DNA 轻链	GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCC TGAGCCCTGGCGAGCGGGCTACACTGAGCTGTAAAT CTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGA ACTTCCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTAAAG CCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCTTCACTATCTCTAGCCTGCAGC CCGAGGATATCGCTACCTACTACTGTGAGAACGACTA TAGTACCCCTACACCTTCGGTCAAGGCACTAAGGTC GAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTC TCTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAC CGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA GCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGG CCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
<b>BAP049-Clone-E HC</b>		

[0436]

SEQ ID NO: 501 (Kabat)	HCDR 1	TYWMH
SEQ ID NO: 502 (Kabat)	HCDR 2	NIYPGTGGSNFDEKFKN
SEQ ID NO: 503 (Kabat)	HCDR 3	WTTGTGAY
SEQ ID NO: 504 (Chothia)	HCDR 1	GYTFTTY
SEQ ID NO: 505 (Chothia)	HCDR 2	YPGTGG
SEQ ID NO: 503 (Chothia)	HCDR 3	WTTGTGAY
SEQ ID NO: 506	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWV RQATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRWTGTGAYWGQGT TVTSS
SEQ ID NO: 507	DNA VH	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAA GAAGCCCGGCGAGTCACTGAGAATTAGCTGTAAAGG TTCAGGCTACACCTTCACTACCTACTGGATGCACTGG GTCCGCCAGGCTACCGGTCAAGGCCTCGAGTGGATG GGTAATATCTACCCCGGCACCGGCGGCTCTAACTTCG ACGAGAAGTTTAAGAATAGAGTGACTATCACCGCCG ATAAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGC CTGAGATCAGAGGACACCGCGTCTACTACTGCACTA GGTGGACTACCGGCACAGGCGCCTACTGGGGTCAAG GCACTACCGTGACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 508	重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTTYWMHWV RQATGQGLEWMGNIYPGTGGSNFDEKFKNRVTITADK STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRWTGTGAYWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

[0437]

<p>SEQ ID NO: 509</p>	<p>DNA 重链</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAA                  GAAGCCCGGCGAGTCACTGAGAATTAGCTGTAAAGG                  TTCAGGCTACACCTTCACTACCTACTGGATGCACTGG                  GTCCGCCAGGCTACCGGTCAAGGCCTCGAGTGGATG                  GGTAATATCTACCCCGGCACCGGCGGCTCTAACTTCG                  ACGAGAAGTTTAAGAATAGAGTGACTATCACCGCCG                  ATAAGTCTACTAGCACCGCCTATATGGAAGTGTCTAGC                  CTGAGATCAGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCACTA                  GGTGGACTACCGGCACAGGCGCCTACTGGGGTCAAG                  GCACTACCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGG                  GCCCGTCCGTGTTCCCCCTGGCACCTTGTAGCCGGAG                  CACTAGCGAATCCACCGCTGCCCTCGGCTGCCTGGTC                  AAGGATTACTTCCCGGAGCCCGTGACCGTGTCTCTGG                  AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAGTGCACACCTTC                  CCCGCTGTGCTGCAGAGCTCCGGGCTGTACTCGCTGT                  CGTCGGTGGTCACGGTGCCTTCATCTAGCCTGGGTAC                  CAAGACCTACACTTGCAACGTGGACCACAAGCCTTC                  CAACACTAAGGTGGACAAGCGCGTCGAATCGAAGTA                  CGGCCACCGTGCCCCGCTTGTCCCGCGCCGGAGTT                  CCTCGGCGGTCCCTCGGTCTTTCTGTCCCACCGAAG                  CCCAAGGACACTTTGATGATTTCCCGCACCCCTGAAG                  TGACATGCGTGGTCGTGGACGTGTACAGGAAGATC                  CGGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTTCG                  AGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCGAGGGAGGAG                  CAGTTCAACTCCACTTACCGCGTCGTGTCCGTGCTGA                  CGGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGT                  ACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGGACTTCTTAGCT                  CAATCGAAAAGACCATCTCGAAAGCCAAGGGACAGC                  CCCGGGAACCCCAAGTGTATACCTGCCACCGAGCC                  AGGAAGAAATGACTAAGAACCAAGTCTCATTGACTT                  GCCTTGTGAAGGGCTTCTACCCATCGGATATCGCCGT                  GGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCGAAAACA                  ACTACAAGACCACCCCTCCGGTGTGGACTCAGACGGAT                  CCTTCTTCTCTACTCGCGGCTGACCGTGGATAAGAG                  CAGATGGCAGGAGGGAAATGTGTTTCTGTTCTGT                  GATGCATGAAGCCCTGCACAACCACTACACTCAGAA                  GTCCCTGTCCCTCTCCCTGGGA</p>
<p><b>BAP049-Clone-E</b></p>		

[0438]

<b>LC</b>		
SEQ ID NO: 510 (Kabat)	LCDR1	KSSQSLLDSGNQKNFLT
SEQ ID NO: 511 (Kabat)	LCDR2	WASTRES
SEQ ID NO: 512 (Kabat)	LCDR3	QNDYSYPYT
SEQ ID NO: 513 (Chothia)	LCDR1	SQSLLDSGNQKNF
SEQ ID NO: 514 (Chothia)	LCDR2	WAS
SEQ ID NO: 515 (Chothia)	LCDR3	DYSYPY
SEQ ID NO: 520	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSGNQKNFLT WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDF FTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 521	DNA VL	GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCC TGAGCCCTGGCGAGCGGGCTACACTGAGCTGTAAAT CTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGA ACTTCCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCTAGACTGCTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT GGCACCGACTTCACCTTCACTATCTCTAGCCTGGAAG CCGAGGACGCCGCTACCTACTACTGTGACAACGACTA TAGCTACCCCTACACCTTCGGTCAAGGCACTAAGGTC GAGATTAAG
SEQ ID NO: 522	轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCKSSQSLLDSGNQKNFLT WYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDF FTISSLEAEDAATYYCQNDYSYPYTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 523	DNA 轻链	GAGATCGTCCTGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCC TGAGCCCTGGCGAGCGGGCTACACTGAGCTGTAAAT CTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGA ACTTCCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCTAGACTGCTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGA ATCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGT

[0439]

		GGCACCGACTTCACCTTCACTATCTCTAGCCTGGAAG CCGAGGACGCCGCTACCTACTACTGTGTCAGAACGACTA TAGCTACCCCTACACCTTCGGTCAAGGCACTAAGGTC GAGATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTC TCTCCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACC CCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAC CGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA GCATAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGG CCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC
<b>BAP049-Clone-B HC</b>		
SEQ ID NO: 524 (Kabat)	HCDR 1	ACCTACTGGATGCAC
SEQ ID NO: 525 (Kabat)	HCDR 2	AATATCTACCCCGGCACCGGCGGCTCTAACTTCGACG AGAAGTTTAAGAAT
SEQ ID NO: 526 (Kabat)	HCDR 3	TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC
SEQ ID NO: 527 (Chothia)	HCDR 1	GGCTACACCTTCACTACCTAC
SEQ ID NO: 528 (Chothia)	HCDR 2	TACCCCGGCACCGGCGGC
SEQ ID NO: 526 (Chothia)	HCDR 3	TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC
<b>BAP049-Clone-B LC</b>		
SEQ ID NO: 529 (Kabat)	LCDR1	AAATCTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGA AGAACTTCCTGACC
SEQ ID NO: 530 (Kabat)	LCDR2	TGGGCCTCTACTAGAGAATCA
SEQ ID NO: 531 (Kabat)	LCDR3	CAGAACGACTATAGCTACCCCTACACC
SEQ ID NO: 532 (Chothia)	LCDR1	AGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGAAC TTC
SEQ ID NO: 533	LCDR2	TGGGCCTCT

(Chothia)		
SEQ ID NO: 534 (Chothia)	LCDR3	GACTATAGCTACCCCTAC
<b>BAP049-Clone-E HC</b>		
SEQ ID NO: 524 (Kabat)	HCDR 1	ACCTACTGGATGCAC
SEQ ID NO: 525 (Kabat)	HCDR 2	AATATCTACCCCGGCACCGGCGGCTCTAACTTCGACG AGAAGTTTAAGAAT
SEQ ID NO: 526 (Kabat)	HCDR 3	TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC
SEQ ID NO: 527 (Chothia)	HCDR 1	GGCTACACCTTCACTACCTAC
SEQ ID NO: 528 (Chothia)	HCDR 2	TACCCCGGCACCGGCGGC
[0440] SEQ ID NO: 526 (Chothia)	HCDR 3	TGGACTACCGGCACAGGCGCCTAC
<b>BAP049-Clone-E LC</b>		
SEQ ID NO: 529 (Kabat)	LCDR1	AAATCTAGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGA AGAACTTCCTGACC
SEQ ID NO: 530 (Kabat)	LCDR2	TGGGCCTCTACTAGAGAATCA
SEQ ID NO: 531 (Kabat)	LCDR3	CAGAACGACTATAGCTACCCCTACACC
SEQ ID NO: 532 (Chothia)	LCDR1	AGTCAGTCACTGCTGGATAGCGGTAATCAGAAGAAC TTC
SEQ ID NO: 533 (Chothia)	LCDR2	TGGGCCTCT
SEQ ID NO: 534 (Chothia)	LCDR3	GACTATAGCTACCCCTAC

[0441] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂以约200mg至约500mg(例如约300mg至约400mg)的剂量施用。在一些实施方案中,每3周一次施用PD-1抑制剂。在一些实施方案中,每4周一次施用PD-1抑制剂。在一些实施方案中,PD-1抑制剂以约200mg至约400mg(例如约300mg)的剂量每3周一次施用。在又其他实施方案中,PD-1抑制剂以约300mg至约500mg(例如约400mg)的剂量每4周一次施用。

[0442] 其他示例性PD-1抑制剂

[0443] 其他示例性PD-1抑制剂包括但不限于纳武单抗(Bristol-Myers Squibb)、派姆单抗(Merck&Co)、MEDI0680(Medimmune)、REGN2810/西米利单抗(Regeneron)、TSR-042(Tesaro)、PF-06801591(Pfizer)、BGB-A317/Tislelizumab(Beigene)、BGB-108(Beigene)、INCSHR1210(Incyte)和AMP-224(AMPLIMMUNE)。

[0444] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是纳武单抗(百时美施贵宝公司),也称为

MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558、或**OPDIVO®**。纳武单抗(克隆5C4)和其他抗PD-1抗体披露在US 8,008,449和WO 2006/121168中,将这些文献通过引用以其全文并入。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含以下中的一种或多种:纳武单抗的CDR序列(或总体上全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列、或重链或轻链序列,例如,如表2中所披露的。

[0445] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是派姆单抗(默克公司(Merck&Co)),也称为Lambrolizumab、MK-3475、MK03475、SCH-900475、或**KEYTRUDA®**。派姆单抗和其他抗PD-1抗体披露于Hamid, O.等人(2013)New England Journal of Medicine[新英格兰医学杂志]369(2):134-44;US 8,354,509;和WO 2009/114335中,将这些文献通过引用以其全文并入。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含以下中的一种或多种:派姆单抗的CDR序列(或总体上全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列、或重链或轻链序列,例如,如表2中所披露的。

[0446] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是MEDI0680(Medimmune),也称为AMP-514。MEDI0680和其他抗PD-1抗体公开于US 9,205,148和WO 2012/145493中,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含MEDI0680的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0447] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是REGN2810/西米利单抗(Regeneron)。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含REGN2810的CDR序列(或总称为所有CDR序列)、重链或轻链可变区序列或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0448] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是PF-06801591(Pfizer)。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含PF-06801591的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0449] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是BGB-A317/tislelizumab或BGB-108(Beigene)。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含BGB-A317/Tislelizumab或BGB-108的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0450] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是INCSHR1210(Incyte),也称为INCSHR01210或SHR-1210。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含INCSHR1210的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0451] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子是TSR-042(Tesaro),也称为ANB011。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子包含TSR-042的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0452] 其他已知的抗PD-1抗体包括例如WO 2015/112800、WO 2016/092419、WO 2015/085847、WO 2014/179664、WO 2014/194302、WO 2014/209804、WO 2015/200119、US 8,735,553、US 7,488,802、US 8,927,697、US 8,993,731和US 9,102,727中描述的那些,其通过引用整体并入。

[0453] 在一个实施方案中,抗PD-1抗体是与本文所述的抗PD-1抗体之一竞争结合和/或结合与本文所述的抗PD-1抗体之一相同的PD-1上的表位的抗体。

[0454] 在一个实施方案中,PD-1抑制剂是抑制PD-1信号传导途径的肽,例如,如在US 8,

907,053中描述的,将其通过引用以其全文并入。在一个实施方案中,PD-1抑制剂是免疫粘附素(例如包含融合到恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区)的PD-L1或PD-L2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是AMP-224(B7-DCIg(安普利公司),例如,披露于WO 2010/027827和WO 2011/066342中,将其通过引用以其全文并入。

[0455] 表2.其它示例性抗PD-1抗体分子的氨基酸序列

那武单抗		
SEQ ID NO: 535	重链	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVR QAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKSN TLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK
SEQ ID NO: 536	轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEDF AVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
<b>Pembrolizumab</b>		
SEQ ID NO: 537	重链	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTNYYMYWV RQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSST TTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK
SEQ ID NO: 538	轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQ QKPGQAPRLLIYLAASYLESVGPARGSGSGTDFTLTISSE LEQFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN

[0457]		SQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
--------	--	--

[0458] PD-L1抑制剂

[0459] 在某些实施方案中,本文所述的免疫肿瘤学疗法包含PD-L1结合拮抗剂,例如PD-L1抑制剂。在一些实施方案中,PD-L1抑制剂是抗PD-L1抗体分子。

[0460] 在一些实施方案中,PD-L1抑制剂选自FAZ053 (Novartis)、阿特殊单抗 (Atezolizumab, Genentech/Roche)、阿维单抗 (Avelumab, Merck Serono和Pfizer)、德瓦鲁单抗 (Durvalumab, MedImmune/AstraZeneca, 也称为MEDI4736) 或BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb, 也称为MDX-1105或12A4的)。

[0461] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体分子是FAZ053。FAZ053和其他抗PD-L1抗体分子描述于US2016/0108123中,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子包含FAZ053的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0462] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子是阿特殊单抗 (Genentech/Roche), 也称为MPDL3280A、RG7446、R05541267、YW243.55.S70或TECENTRIQ™。阿特殊单抗和其他抗PD-L1抗体公开于US 8,217,149和WO 2013/079174中,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子包含阿特殊单抗的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0463] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子是阿维单抗 (Merck Serono和Pfizer), 也称为MSB0010718C。阿维单抗和其他抗PD-L1抗体公开于WO 2013/079174中,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子包含阿维单抗的CDR序列(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列中的一个或多个。

[0464] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子是德瓦鲁单抗 (MedImmune/AstraZeneca), 也称为MEDI4736。德瓦鲁单抗和其他抗PD-L1抗体公开于US 8,779,108中,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子包含CDR序列中的一个或多个(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或度伐单抗的重链或轻链序列。

[0465] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子是BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb), 也称为MDX-1105或12A4。BMS-936559和其他抗PD-L1抗体公开于US 7,943,743和WO 2015/081158中,其通过引用整体并入。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体分子包含BMS-936559的CDR序列中的一个或多个(或总称为全部CDR序列)、重链或轻链可变区序列,或重链或轻链序列。

[0466] 其他已知的抗PD-L1抗体包括例如WO 2015/181342、WO 2014/100079、WO 2016/000619、WO 2014/022758、WO 2014/055897、WO 2015/061668、WO 2013/079174、WO 2012/145493、WO 2015/112805、WO 2015/109124、WO 2015/195163、US 8,168,179、US 8,552,154、US 8,460,927和US 9,175,082中描述的那些,其通过引用整体并入。

[0467] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体是与本文所述的抗PD-L1抗体之一竞争结合和/或结合与本文所述的抗PD-L1抗体之一相同的PD-L1上的表位的抗体。

[0468] CTLA-4抑制剂

[0469] 在某些实施方案中,本文所述的免疫肿瘤学疗法包含CTLA-4结合拮抗剂,例如

CTLA-4抑制剂。在一些实施方案中,CTLA-4抑制剂是抗CTLA-4抗体分子。在一些实施方案中,抗CTLA-4抗体分子是伊匹单抗(ipilimumab,也称为BMS-734016、MDX-010或MDX-101)。在一些实施方案中,抗CTLA-4抗体分子是曲美木单抗(tremelimumab,也称为ticilimumab或CP-675,206)。

[0470] 靶向治疗和免疫肿瘤学治疗的组合

[0471] 在一些实施方案中,本文所述的疗法包括靶向疗法(例如,本文所述的靶向疗法)和免疫肿瘤学疗法(例如,本文所述的免疫肿瘤学疗法)。

[0472] 在一些实施方案中,靶向疗法包括靶向BRAF的药剂(例如,本文所述的BRAF抑制剂)和/或靶向MEK的药剂(例如,本文所述的MEK抑制剂),并且免疫肿瘤学疗法包括PD-1抑制剂(例如,本文所述的PD-1抑制剂)。不希望受理论束缚,认为在一些实施方案中,与BRAF抑制剂、MEK抑制剂或两者组合使用免疫检查点抑制剂(例如PD-1抑制剂)可以改善由BRAF和/或MEK的抑制引起的响应(例如,更快速的响应、更持久的响应、更高的响应率或更完全的响应)。

[0473] 在一些实施方案中,BRAF抑制剂是达拉非尼或维罗菲尼。在一些实施方案中,MEK抑制剂是维罗菲尼或考比替尼。在一些实施方案中,PD-1抑制剂是司他利珠单抗。在某些实施方案中,疗法包括包含达拉非尼和维罗菲尼的靶向疗法和包含司他利珠单抗的免疫肿瘤学疗法。在其他实施方案中,疗法包括包含维罗菲尼和考比替尼的靶向疗法和包含司他利珠单抗的免疫肿瘤学疗法。

[0474] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以200mg至600mg之间,例如300mg至500mg之间的剂量(例如,以400mg的剂量)每三周一次、每四周一次或每八周一次施用。

[0475] 在某些实施方案中,PD-1抑制剂(例如抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以300mg至500mg之间的剂量(例如以400mg的剂量)施用,每四周一次,例如静脉内施用,例如经15至120分钟(例如约30分钟)的时间段。在其它实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以300mg至500mg之间的剂量(例如,以400mg的剂量)施用,每八周一次,例如静脉内施用,例如经15至120分钟(例如,约30分钟)的时间段。在一些实施方案中,剂量可以中断长达12周,例如长达8周或长达4周。

[0476] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以300mg至500mg之间的剂量(例如,以400mg的剂量)施用,例如,每四周一次,例如,静脉内施用,并且(i) 靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)以50mg至300mg之间的剂量(例如,100mg至200mg之间,例如,以150mg的剂量)施用,例如,每天两次,例如,口服,或以100mg至600mg之间的总日剂量(例如,200mg至400mg之间,例如,以300mg的总日剂量)施用(例如,口服), (ii) 靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.5mg至4mg之间的剂量(例如1mg至3mg之间,例如2mg的剂量)施用,例如每天一次,例如口服;或(iii) (i)和(ii)两者。

[0477] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)的施用施用靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)、靶向MEK的药剂(例如,曲美替尼)或两者的同一天开始。在其他实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)在靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)、靶向MEK的药剂(例如,曲美替尼)或两者已经施用约四周或更长时间之后施用。例如,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)的

施用可以在第29天开始,此时靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)、靶向MEK的药剂(例如,曲美替尼)或两者的施用在第1天开始。作为实例,靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)可以按照给药方案每天施用两次,持续28天周期的第1-28天,并且靶向MEK的药剂(例如,曲美替尼)可以按照给药方案施用,持续28天周期的第1-28天。

[0478] 在某些实施方案中,疗法包括PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)、靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)和靶向MEK的药剂(例如,曲美替尼)。

[0479] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以300mg至500mg之间的剂量(例如,以400mg的剂量)施用,例如每四周一次,例如静脉内施用;靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以50mg至300mg之间的剂量(例如100mg至200mg之间,例如150mg的剂量)施用,例如每天两次,例如口服,或以100mg至600mg之间的总日剂量(例如200mg至400mg之间,例如300mg的总日剂量)施用,例如口服;并且靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.5mg至4mg之间的剂量(例如1mg至3mg之间,例如以2mg的剂量)施用,例如每天一次,例如口服施用。

[0480] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以300mg至500mg之间的剂量(例如,以400mg的剂量)施用,例如,每八周一次,例如,静脉内施用,并且(i)靶向BRAF的药剂(例如,达拉非尼)以50mg至300mg之间的剂量(例如,100mg至200mg之间,例如,以150mg的剂量)施用,例如,每天两次,例如口服,或以100mg至600mg之间的总日剂量(例如200mg至400mg之间,例如300mg的总日剂量)施用(例如,口服),(ii)靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.5mg至4mg之间的剂量(例如1mg至3mg之间,例如2mg的剂量)施用,例如每天一次,例如口服;或(iii) (i)和(ii)两者。

[0481] 在一些实施方案中,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)以300mg至500mg之间的剂量(例如,以400mg的剂量)施用,例如每八周一次,例如静脉内施用;靶向BRAF的药剂(例如达拉非尼)以50mg至300mg之间的剂量(例如100mg至200mg之间,例如150mg的剂量)施用,例如每天两次,例如口服,或以100mg至600mg之间的总日剂量(例如200mg至400mg,例如300mg的总日剂量)施用,例如口服;并且靶向MEK的药剂(例如曲美替尼)以0.5mg至4mg的剂量(例如1mg至3mg,例如以2mg的剂量)施用,例如每天一次,例如口服。

[0482] 抗体分子

[0483] 在一个实施方案中,免疫肿瘤学疗法包含抗体分子(例如,抗PD-1抗体分子)。

[0484] 如本文所用,术语“抗体分子”指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如,免疫球蛋白链或其片段。术语“抗体分子”例如包括单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)。在一个实施方案中,抗体分子包括全长抗体或全长免疫球蛋白链。在一个实施方案中,抗体分子包括全长抗体或全长免疫球蛋白链的抗原结合或功能性片段。

[0485] 在一个实施方案中,抗体分子包含双体抗体(diabody)和单链分子以及抗体的抗原结合片段(例如,Fab、 $F(ab')_2$ 和Fv)。例如,抗体分子可以包括重链(H)可变结构域序列(本文中缩写为VH)和轻链(L)可变结构域序列(本文中缩写为VL)。在一个实施方案中,抗体分子包含一条重链和一条轻链(在本文中称作半抗体)或由其组成。在另一个例子中,抗体分子包含两个重链(H)可变结构域序列和两个轻链(L)可变结构域序列,因而形成两个抗原

结合位点,如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fd、Fd'、Fv、单链抗体(例如scFv)、单一可变域抗体、双体抗体(Dab)(双价和双特异性)和嵌合(例如,人源化)抗体,它们可以通过修饰完整抗体产生,或使用重组DNA技术从头合成的那些抗体分子。这些功能性抗体片段保留选择性地与其相应抗原或受体结合的能力。抗体和抗体片段可以来自任何抗体类别,包括但不限于IgG、IgA、IgM、IgD和IgE并且来自任何抗体亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。本公开的抗体可以是单克隆或多克隆的。抗体也可以是人抗体、人源化抗体、CDR移植抗体或体外生成的抗体。抗体可以具有例如选自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的重链恒定区。抗体还可以具有例如选自κ或λ的轻链。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中与术语“抗体”互换地使用。

[0486] 抗体分子的抗原结合片段的例子包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,包含由二硫键在铰链区连接的两个Fab片段的双价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH域组成的双体抗体(dAb)片段;(vi) 骆驼(或骆驼化可变结构域);(vii) 单链Fv(scFv),参见,例如,Bird等人(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等人(1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883);(viii) 单结构域抗体。使用本领域技术人员已知的常规技术,获得这些抗体片段,并且按照与完整抗体相同的方式筛选所述片段的用途。

[0487] 术语“抗体”包括完整分子以及其功能性片段。抗体的恒定区可以改变,例如,突变,以修饰抗体特性(例如,以增加或减少以下一个或多个特性:Fc受体结合作用,抗体糖基化、半胱氨酸残基数目、效应细胞功能或补体功能)。

[0488] 抗体分子也可以是单结构域抗体。单结构域抗体可以包括其互补决定区是单结构域多肽组成部分的抗体。例子包括但不限于重链抗体、天然缺少轻链的抗体、衍生自常规4-链抗体的单结构域抗体、工程化抗体和除衍生自抗体的那些支架之外的单结构域支架。单结构域抗体可以是现有技术的任何抗体,或将来的任何单结构域抗体。单结构域抗体可以衍生自任何物种,包括但不限于小鼠、人、骆驼、羊驼、鱼类、鲨鱼、山羊、兔和牛。根据本发明的另一个方面,单结构域抗体是天然存在的单结构域抗体,称作缺少轻链的重链抗体。这类单结构域抗体例如在WO 94/04678中公开。出于清晰原因,从天然缺少轻链的重链抗体衍生的这种可变结构域在本文中称作VHH或纳米体以将它与四链免疫球蛋白的常规VH区分。这种VHH分子可以衍生自骆驼科(Camelidae)物种(例如骆驼、羊驼、单峰驼、驼羊和原驼)中产生的抗体。除骆驼之外的其他物种可以产生天然缺少轻链的重链抗体;这类VHH处于本发明的范围内。

[0489] VH区和VL区可以再划分为超变区,称作“互补性决定区”(CDR),其间插有更保守的区域,称作“构架区”(FR或FW)。

[0490] 构架区和CDR的范围已经通过许多方法(参见,Kabat,E.A.等人(1991) (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版,美国卫生和公众服务部,NIH出版编号91-3242;Chothia,C.等人(1987) *J.Mol.Biol.*196:901-917;和Oxford Molecular's AbM抗体建模软件所使用的AbM定义精确地界定。通常参见,例如,*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*.引自:*Antibody Engineering Lab Manual* (Duebel,S.和Kontermann,R.编著,Springer-Verlag,Heidelberg)。

[0491] 如本文所用,术语“互补决定区”和“CDR”指在抗体可变区内部赋予抗原特异性和

结合亲和力的氨基酸序列。通常而言,在每个重链可变区中存在三种CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)并且在每个轻链可变区中存在三种CDR (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

[0492] 可以使用多种熟知方案之一确定给定CDR的精确氨基酸序列界限,所述熟知方案包括由Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案)描述的那些。如本文所用,“Chothia”编号方案的CDR定义有时还称作“高变环”。

[0493] 例如,根据Kabat,将重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3);并且将在轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)。根据Chothia,将VH中的CDR氨基酸编号为26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和95-102(HCDR3);并且将VL中的氨基酸残基编号为26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3)。通过组合Kabat和Chothia二者的CDR定义,CDR由人VH中的氨基酸残基26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)以及人VL中的氨基酸残基24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3)组成。

[0494] 通常,除非专门指出,否则本文公开的抗体分子可以包括一种或多种KabatCDR和/或Chothia高变环的任何组合。在一个实施方案中,以下定义用于表1中所述的抗PD-1抗体分子:根据Kabat和Chothia的组别的CDR定义的HCDR1和根据Kabat的CDR定义的HCCDR 2-3及LCCDR 1-3。根据全部定义,每个VH和VL一般包括从氨基端到羧基端按以下顺序排列的3个CDR和4个FR:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0495] 如本文所用,“免疫球蛋白可变结构域序列”指可以形成免疫球蛋白可变结构域的结构氨基酸序列。例如,该序列可以包括天然存在的可变结构域的全部或部分氨基酸序列。例如,该序列可以包括或不包括一个、两个或更多个N-或C端氨基酸或可以包括与蛋白质结构的形成相容的其他改变。

[0496] 术语“抗原结合位点”指包含决定簇的抗体分子组成部分,所述决定簇形成与PD-1多肽或其表位结合的界面。相对于蛋白质(或蛋白质拟似物)而言,抗原结合位点一般包括形成与PD-1多肽结合的界面的一个或多个环(具有至少四个氨基酸或氨基酸模拟物)。一般,抗体分子的抗原结合位点包含至少一个或两个CDR和/或高变环或更一般地至少三、四、五或六个CDR和/或高变环。

[0497] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。一种单克隆抗体组合物对特定表位显示单一结合特异性和亲和力。单克隆抗体可以通过杂交瘤技术或通过不使用杂交瘤技术的方法(例如,重组方法)产生。

[0498] “有效的人”蛋白是不激发中和抗体反应(例如,人抗鼠抗体例如(HAMA)反应)的蛋白质。例如,如果抗体子是反复地施用(例如,在治疗慢性或复发性疾病状况下),则HAMA可以在许多情景下棘手。HAMA反应可以令重复的抗体施用潜在地无效,原因是抗体从血清中的清除增加(参见,例如,Saleh等人,Cancer Immunol.Immunother.,32:180-190(1990))并且还因为潜在过敏反应(参见,例如,LoBuglio等人,Hybridoma,5:5117-5123(1986))。

[0499] 抗体分子可以是多克隆或单克隆抗体。在其他实施方案中,可以重组地产生抗体,例如,通过噬菌体展示法或通过组合方法产生。

[0500] 产生抗体的噬菌体展示法和组合方法是本领域已知的(如以下文献中所述,例如,

Ladner等人美国专利号5,223,409;Kang等人国际公开号W0 92/18619;Dower等人国际公开号W0 91/17271;Winter等人国际公开W0 92/20791;Markland等人国际公开号W0 92/15679;Breitling等人国际公开W0 93/01288;McCafferty等人国际公开号W0 92/01047;Garrard等人国际公开号W0 92/09690;Ladner等人国际公开号W0 90/02809;Fuchs等人(1991)Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等人(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81-85;Huse等人(1989)Science 246:1275-1281;Griffths等人(1993)EMBO J12:725-734;Hawkins等人(1992)J Mol Biol 226:889-896;Clackson等人(1991)Nature 352:624-628;Gram等人(1992)PNAS 89:3576-3580;Garrad等人(1991)Bio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom等人(1991)Nuc Acid Res19:4133-4137;和Barbas等人(1991)PNAS 88:7978-7982,所述全部文献的内容均通过引用的方式并入本文)。

[0501] 在一个实施方案中,抗体是完全的人抗体(例如,在已经被基因工程以从人免疫球蛋白序列产生抗体的小鼠中产生的抗体)或非人类抗体,例如,啮齿类(小鼠或大鼠)抗体、山羊抗体、灵长类(例如,猴)抗体、骆驼抗体。优选地,非人类抗体是啮齿类(小鼠或大鼠)抗体。产生啮齿类抗体的方法是本领域已知的。

[0502] 可以使用携带人免疫球蛋白基因而非小鼠系统的转基因小鼠,产生人单克隆抗体。采用目的抗原免疫的这些转基因小鼠的脾细胞用来产生杂交瘤,所述杂交瘤分泌对来自人蛋白质的表位具有特异性亲和力的人mAb(参见,例如,Wood等人,国际申请W0 91/00906;Kucherlapati等人,PCT公开W0 91/10741;Lonberg等人,国际申请W0 92/03918;Kay等人,国际申请92/03917;Lonberg,N.等人,1994Nature 368:856-859;Green,L.L.等人,1994Nature Genet.7:13-21;Morrison,S.L.等人,1994Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855;Bruggeman等人,1993Year Immunol 7:33-40;Tuailon等人,1993PNAS 90:3720-3724;Bruggeman等人,1991Eur J Immunol 21:1323-1326)。

[0503] 抗体可以是其中可变区或其部分(例如,CDR)在非人类生物(例如,大鼠或小鼠)中生成的一种抗体。嵌合抗体、CDR移植抗体和人源化抗体处于本发明范围内。在非人类生物(例如,大鼠或小鼠)中生成并且随后在可变构架或恒定区中修饰以减少人类中抗原性的抗体处于本发明范围内。

[0504] 可以通过本领域已知的重组DNA技术产生嵌合抗体(参见Robinson等人,国际专利公布PCT/US 86/02269;Akira等人,欧洲专利申请184,187;Taniguchi.M.,欧洲专利申请171,496;Morrison等人,欧洲专利申请173,494;Neuberger等人,国际申请W086/01533;Cabilly等人,美国专利号4,816,567;Cabilly等人,欧洲专利申请125,023;Better等人,(1988Science 240:1041-1043);Liu等人(1987)PNAS 84:3439-3443;Liu等人,1987,J.Immunol.139:3521-3526;Sun等人(1987)PNAS 84:214-218;Nishimura等人,1987,Canc.Res.47:999-1005;Wood等人(1985)Nature 314:446-449;and Shaw等人,1988,J.Natl Cancer Inst.80:1553-1559)。

[0505] 人源化抗体或CDR移植抗体将使得(免疫球蛋白重链和或轻链的)至少一个或两个、但是通常全部三个受者CDR替换为供者CDR。抗体可以更换为非人类CDR的至少一部分或仅一些CDR可以更换为非人类CDR。仅需要更换人源化抗体与PD-1结合所需要的CDR数目。优选地,供者将是啮齿类抗体,例如,大鼠或小鼠抗体,并且受者将是人类构架或人共有构架。一般,提供CDR的免疫球蛋白称作“供者”并且提供构架的免疫球蛋白称作“接纳体”。在一个

实施方案中,供者免疫球蛋白是非人类(例如,啮齿类)的。接纳体构架是天然存在的(例如,人类构架或共有构架或与之约85%或更高、优选地90%、95%、99%或更高相同的序列)。

[0506] 如本文所用,术语“共有性序列”指从相关序列家族中最频繁出现的氨基酸(或核苷酸)中形成的序列(参见,例如,Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 德国1987))。在蛋白家族中,共有序列中的每个位置由该家族中这个位置处出现最频繁的氨基酸占据。如果两个氨基酸以相同频率出现,则可以在共有序列中包括任一个。“共有性构架”指共有性免疫球蛋白序列中的构架区。

[0507] 抗体可以通过本领域已知的方法人源化(参见,例如,Morrison, S.L., 1985, *Science* 229:1202-1207;通过Oi等人, 1986, *BioTechniques* 4:214并且通过Queen等人US 5,585,089、US 5,693,761和US 5,693,762,所述全部文献的内容因而通过引用的方式并入)。

[0508] 可以通过CDR移植或CDR置换产生人源化抗体或CDR移植抗体,其中可以替换免疫球蛋白链一个、两个或全部CDR。参见,例如,美国专利5,225,539; Jones等人, 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeyan等人, 1988 *Science* 239:1534; Beidler等人, 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060; Winter US 5,225,539,所述全部文献的内容因而明确地通过引用的方式并入。Winter描述了一种可以用来制备本发明人源化抗体的CDR移植方法(1987年3月26日提交的英国专利申请GB 2188638A; Winter US 5,225,539),所述文献的内容明确地通过引用的方式并入。

[0509] 也处于本发明的范围内是其中已经置换、缺失或添加特定氨基酸的人源化抗体。从供者选择氨基酸的标准在US 5,585,089,例如,US 5,585,089的第12-16栏,例如,US 5,585,089的第12-16栏中描述,所述文献的内容因而通过引用的方式并入。使抗体人源化的其他技术在1992年12月23日公开的Padlan等人EP 519596A1中描述。

[0510] 抗体分子可以是单链抗体。单链抗体(scFv)可以工程化(参见,例如,Colcher, D.等人(1999) *Ann N Y Acad Sci* 880:263-80;和Reiter, Y. (1996) *Clin Cancer Res* 2:245-52)。单链抗体可以二聚化或多聚化以产生对相同靶蛋白的不同表位具有特异性的多价抗体。

[0511] 在另外的其他实施方案中,抗体分子具有例如选自IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE的重链恒定区中;特别地,例如选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的(例如,人)重链恒定区中的重链恒定区。在另一个实施方案中,抗体分子具有例如选自 $\kappa$ 或 $\lambda$ 的(例如,人)轻链恒定区中的轻链恒定区。恒定区可以改变,例如,突变,以修饰抗体特性(例如,以增加或减少以下一个或多个特性:Fc受体结合作用,抗体糖基化、半胱氨酸残基数目、效应细胞功能和/或补体功能)。在一个实施方案中抗体具有:效应子功能;并且可以固定补体。在其他实施方案中抗体不;招募效应细胞;或固定补体。在另一个实施方案中,抗体具有结合Fc受体的减弱能力或没有这种能力。例如,它是不支持与Fc受体结合的同种型或亚型、片段或其他突变体,例如,它具有诱变的或缺失的Fc受体结合区域。

[0512] 用于改变抗体恒定区的方法是本领域已知的。可以通过将抗体恒定部分中的至少一个氨基酸残基替换为不同残基,产生功能改变(例如,对效应子配体(如细胞上的FcR或补体C1组分)的亲合力改变)的抗体(参见,例如,EP388,151A1、美国专利号5,624,821和美国专利号5,648,260,所述全部文献的内容因而通过引用的方式并入)。可以描述相似类型的

改变,其中如果应用于鼠或其他物种免疫球蛋白,所述改变将减少或消除这些功能。

[0513] 抗体分子可以用另一种功能分子(例如,另一种肽或蛋白质)衍生化或与之连接。如本文所用,“衍生化的”抗体分子是已经被修饰的一种抗体分子。衍生化方法包括但不限于添加荧光部分、放射性核苷酸、毒素、酶或亲和配体如生物素。因此,本发明的抗体分子意在包括衍生化和否则修饰形式的本文所述抗体,包括免疫黏附分子。例如,抗体分子可以功能性连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式)至一个或多个其他分子实体,如另一种抗体(例如,双特异性抗体或双体抗体)、可检测物质、细胞毒药物、药物活性剂和/或可以介导所述抗体或抗体部分与另一种分子结合的蛋白质或肽(如,链霉亲和素核心区或多组氨酸标签)。

[0514] 通过交联两种或更多种抗体(相同类型或不同类型,例如,以产生双特异性抗体)产生一个类型的衍生化抗体分子。合适的交联剂包括这些试剂,它们是异双官能的,具有由适宜间隔序列分隔的两个不同反应性基团(例如,间-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺酯),或同双官能的(例如,辛二酸二琥珀酰亚胺酯)。这类接头从Pierce Chemical Company, Rockford, Ill可获得。

[0515] 可以用其衍生(或标记)化本发明的抗体分子的可用可检测活性剂包括荧光化合物、多种酶、辅基、发光物质、生物发光物质、发射荧光的金属原子,例如,铕(Eu)和其他镧系元素和放射性物质(下文描述)。示例性荧光的可检测物质包括荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等。抗体也可以用可检测的酶,如碱性磷酸酶、辣根过氧化物、 $\beta$ -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶等衍生化。当抗体用可检测的酶衍生化时,通过添加这种酶用来产生可检测反应产物的额外试剂而检测所述抗体。例如,当可检测物质辣根过氧化物存在时,添加过氧化氢和二氨基联苯胺导致有色的反应产物,其是可检测的。抗体分子也可以用辅基(例如,链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素)衍生化。例如,抗体可以用生物素衍生化并且通过间接测量抗生物素蛋白或链霉亲和素结合作用而检出。合适荧光物质的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的例子包括鲁米诺;和生物发光物质的例子包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白。

[0516] 标记的抗体分子可以在多种背景下例如诊断性和/或实验性使用,所述背景包括(i)通过标准技术(如亲和色谱或免疫沉淀法)分离预定的抗原;(ii)检测(例如,细胞裂解物或细胞上清液中)的预定抗原,以评价蛋白质的丰度和表达模式;(iii)作为临床检验方法的组成部分,监测组织中的蛋白质水平,例如,以便确定给定治疗方案的有效性。

[0517] 抗体分子可以缀合至另一个分子实体,一般为标记物或治疗药(例如,细胞毒或细胞抑制药物)或部分。放射性同位素可以用于诊断应用或治疗应用中。可以与抗体偶联的放射性同位素包括但不限于 $\alpha$ -、 $\beta$ -或 $\gamma$ -发射体或 $\beta$ -和 $\gamma$ -发射体。这类放射性同位素包括但不限于碘( $^{131}\text{I}$ 或 $^{125}\text{I}$ )、钇( $^{90}\text{Y}$ )、镱( $^{177}\text{Lu}$ )、锕( $^{225}\text{Ac}$ )、镭、砷( $^{211}\text{At}$ )、铼( $^{186}\text{Re}$ )、铋( $^{212}\text{Bi}$ 或 $^{213}\text{Bi}$ )、铟( $^{111}\text{In}$ )、锝( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、磷( $^{32}\text{P}$ )、铑( $^{188}\text{Rh}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、氚( $^3\text{H}$ )、铬( $^{51}\text{Cr}$ )、氯( $^{36}\text{Cl}$ )、钴( $^{57}\text{Co}$ 或 $^{58}\text{Co}$ )、铁( $^{59}\text{Fe}$ )、硒( $^{75}\text{Se}$ )或镓( $^{67}\text{Ga}$ )。可用作治疗药的放射性同位素包括钇( $^{90}\text{Y}$ )、镱( $^{177}\text{Lu}$ )、锕( $^{225}\text{Ac}$ )、镭、砷( $^{211}\text{At}$ )、铼( $^{186}\text{Re}$ )、铋( $^{212}\text{Bi}$ 或 $^{213}\text{Bi}$ )和铑( $^{188}\text{Rh}$ )。可用作标记物(例如,用于诊断学)的放射性同位素包括碘( $^{131}\text{I}$ 或 $^{125}\text{I}$ )、铟( $^{111}\text{In}$ )、锝( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、磷( $^{32}\text{P}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )和氚( $^3\text{H}$ )或上文所列的一种或多种治疗性同位素。

[0518] 本发明提供放射标记的抗体分子和标记抗体分的方法。在一个实施方案中,公开了一种标记抗体分子的方法。该方法包括使抗体分子与螯合剂接触,因而产生缀合的抗体。缀合的抗体可以是放射性同位素(例如,<sup>111</sup>铟、<sup>90</sup>钇和<sup>177</sup>镱)放射标记的,以便因而产生标记抗体分子。

[0519] 如上文讨论,抗体分子可以缀合至治疗剂。已经提到有治疗活性的放射性同位素。其他治疗药的例子包括紫杉酚、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、道诺霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、类美登素(maytansinoid),例如,美登醇(参见例如美国专利号5,208,020)、CC-1065(参见例如美国专利号5,475,092、5,585,499、5,846,545)及其类似物或同源物。治疗药包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷基化剂(例如,氮芥、硫代苯丁酸氮芥、CC-1065、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和罗莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如,道诺霉素(以前柔红霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,更生霉素(dactinomycin)(前称放线菌素D)、博来霉素、光神霉素和安曲霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱、长春碱、紫杉酚和类美登素)。

[0520] 另外的治疗剂

[0521] 本文所述的疗法可以是单一疗法或组合疗法。在一些实施方案中,本文所述的疗法还包括一种或多种其他治疗剂、程序或方式。

[0522] 在一个实施方案中,疗法包括本文所述的靶向疗法和/或本文所述的免疫肿瘤学疗法,其与用于治疗本文所述的癌症的另外的治疗剂、程序或方式组合。

[0523] 在某些实施方案中,本文所述的疗法与以下一者或多者组合施用:其他抗体分子、化疗、其他抗癌疗法(例如,靶向抗癌疗法、基因治疗、病毒治疗、RNA治疗骨髓移植、纳米疗法或溶瘤药物)、细胞毒药物、基于免疫的治疗药(例如,细胞因子或基于细胞的免疫治疗药)、外科手术(例如,肿块切除术或乳房切除术)或照射术或前述任一者的组合。额外的疗法可以为辅助疗法或新辅助疗法形式。在一些实施方案中,额外的疗法是酶抑制剂(例如,小分子的酶促抑制剂)或转移性抑制剂。可以组合施用的示例性细胞毒药物包括抗微管药物、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、烷基化剂、蒽环类、长春碱类生物碱、嵌入剂、能够干扰信号转导途径的活性剂、促凋亡活性剂、蛋白酶体抑制剂和照射(例如,局部或全身照射(例如, $\gamma$ 辐射)。在其他实施方案中,其它疗法是手术或辐射或其组合。在一些实施方案中,另外的疗法是一线、二线、三线或四线或之外的治疗。在一些实施方案中,另外的疗法是辅助治疗或新辅助治疗。

[0524] 在一些实施方案中,另外的疗法用于治疗黑素瘤。用于治疗黑素瘤的示例性的其他疗法包括但不限于手术、化疗(例如,达卡巴嗪)、靶向疗法(例如,TLR激动剂或CD40激动剂)、免疫疗法(例如,细胞因子(例如,IFN- $\alpha$ 或IL-2)、过继性细胞转移)、放疗、溶瘤病毒疗法,或其组合。

[0525] 药物组合物

[0526] 在另一方面,本公开提供了组合物,例如药学上可接受的组合物,其包括与药学上可接受的载体一起配制的一种或多种本文所述的治疗剂。

[0527] 术语“药物制剂”是指这样的制剂,其处于允许其中包含的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对将施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的其他组分。

[0528] 如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。载体可以适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊髓或表皮施用(例如,通过注射或输注)。

[0529] 本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型,如液态溶液剂(例如,可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、分散体剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。常见的组合物处于可注射用溶液剂或可输注溶液剂形式。在某些实施方案中,施用模式是肠胃外(例如,静脉内、皮下、腹内、肌内)。在一个实施方案中,组合物通过静脉内输注或注射施用。在另一个实施方案中,组合物通过肌内或皮下注射施用。

[0530] 如本文所用的短语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”意指除了肠内和局部施用之外的施用模式,通常通过注射施用,并且包括,而不仅限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、椎管内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0531] 治疗性组合物一般应当是无菌的并且在制造和储存条件下稳定。可以将组合物配制为溶液、微乳液、分散剂、脂质体或适合高抗体浓度的其他有序结构。可以通过将活性化合物(即抗体或抗体部分)以要求的量连同上文所列举的一种成分或成分组合在适宜的溶剂中并入,根据需要,随后过滤消毒,制备无菌可注射溶液剂。通常,通过将所述活性化合物并入无菌溶媒中来制备分散剂,所述无菌溶媒含有基础分散介质和来自上文所列举那些成分中的所要求的其他成分。在用于制备无菌注射溶液剂的无菌粉末情况下,优选的制备方法是从其先前无菌过滤的溶液产生有效成分外加任何额外所需成分的粉末的真空干燥和冷冻干燥。可以例如通过使用涂料如卵磷脂,在分散剂的情况下通过维持要求的粒度和通过使用表面活性剂,维持溶液剂的适宜流动性。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中并入延迟吸收的活性剂例如单硬脂酸盐和明胶而引起。

[0532] 在一些实施方案中,检查点抑制剂、靶向BRAF的药剂、靶向MEK的药剂或其任何组合可以配制成适合于向如本文所述的受试者施用的制剂(例如,剂量制剂或剂型)。例如,PD-1抑制剂(例如,抗PD-1抗体分子,例如司他利珠单抗)可以配制成适合于静脉内施用于如本文所述的受试者的制剂(例如,剂量制剂或剂型)。作为另一个实例,BRAF抑制剂(例如,达拉非尼)和/或MEK抑制剂(例如,曲美替尼)可以配制成适合于向如本文所述的受试者口服施用的制剂(例如,剂量制剂或剂型)。

[0533] 治疗剂,例如抑制剂、拮抗剂或结合剂,可以通过本领域已知的多种方法施用,但是对于许多治疗用途,优选的施用途径/模式是静脉内注射或输注。例如,抗体分子可以通过静脉内输注以超过20mg/分钟,例如,20-40mg/分钟和典型地大于或等于40mg/分钟的速率施用,以达到约35至440mg/m<sup>2</sup>、典型地约70至310mg/m<sup>2</sup>和更典型地约110至130mg/m<sup>2</sup>的剂量。在一些实施方案中,抗体分子可以通过静脉内输注以小于10mg/分钟;优选地小于或等于5mg/分钟的速率施用,以达到约1至100mg/m<sup>2</sup>、优选地约5至50mg/m<sup>2</sup>、约7至25mg/m<sup>2</sup>和更优选地,约10mg/m<sup>2</sup>的剂量。熟练技术人员将理解,施用的途径和/或模式将取决于所希望的结果而变。在某些实施方案中,活性化合物可以连同将保护蛋白质免于快速释放的载体一起

制备,如控释制剂,包括植入物、经皮贴剂和微囊化输送系统。可以使用生物可降解、生物相容性聚合物,如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此类制剂的多种方法是专利授权的或总体上是本领域技术人员已知的。参见,例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, 编著, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0534] 在某些实施方案中,治疗剂或化合物在某些实施方案中,抗体分子可以口服施用,例如随惰性稀释剂或可吸收性可食用载体一起口服施用。化合物(和其他成分,如果需要)也可以封闭在硬壳或软壳明胶胶囊剂中、压缩成片剂或直接掺入受试者的膳食中。对于口服治疗施用,所述化合物可以随赋形剂一起掺入并且以可摄取的片剂、颊用片剂、药锭剂(troche)、胶囊剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂(wafer)等形式使用。为了通过非肠胃外施用方法施用本发明的化合物,可以将化合物用防止其失活的材料包衣或随这种材料共施用。还可以用本领域已知的医疗装置施用治疗组合物。

[0535] 调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以施用单次团注,可以随时间推移施用几个分开的剂量或可以如治疗情况的危急性所示,按比例减少或增加该剂量。特别有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以易于剂量的施用和均匀性。如本文所用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗受试者的单一剂量的物理分立的单元;每个单元含有预定量的活性化合物,所述的预定量经计算与所要求的药用载体结合时产生所需的治疗效果。用于本发明剂量单位形式的说明书(a)由活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗效果决定并且完全取决于此,并且(b)限制作用是复合这种活性化合物用于治疗个体中敏感性的领域内固有的。

[0536] 治疗剂的治疗有效量或预防有效量的示例的非限制性范围是0.1-30mg/kg、更优选地1-25mg/kg。抗PD-1抗体分子的剂量和治疗方案可以由技术人员确定。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子通过注射(例如,皮下或静脉内)以约1至40mg/kg,例如,1至30mg/kg,例如,约5至25mg/kg、约10至20mg/kg、约1至5mg/kg、1至10mg/kg、5至15mg/kg、10至20mg/kg、15至25mg/kg或约3mg/kg的剂量施用。给药方案可以从例如一周一次变动至每2、3或4周一次。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子以约10至20mg/kg的剂量每隔一周施用。

[0537] 作为另一个实例,抗体分子的治疗或预防有效量的非限制性范围是200-500mg,更优选300-400mg/kg。抗PD-1抗体分子的剂量和治疗方案可由技术人员确定。在某些实施方案中,抗PD-1抗体分子通过注射(例如皮下或静脉内)以约200mg至500mg,例如约250mg至450mg、约300mg至400mg、约250mg至350mg、约350mg至450mg、或约300mg或约400mg的剂量(例如平剂量(flat dose))施用。给药方案(例如,平给药方案(flat dosing schedule))可以从例如每周一次变化至每2、3、4、5或6周一次。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子以约300mg至400mg的剂量施用,每三周一次或每四周一次。在一个实施方案中,抗PD-1抗体分子以从约300mg的剂量施用,每三周一次。在一个实施方案中,该抗PD-1抗体分子以从约400mg的剂量施用,每四周一次。在一个实施方案中,该抗PD-1抗体分子以从约300mg的剂量施用,每四周一次。在一个实施方案中,将该抗PD-1抗体分子以从约400mg的剂量施用,每三周一次。虽然不希望受理论束缚,但在一些实施方案中,平坦或固定给药可有益于患者,例如,以节省药物供应并减少药房错误。

[0538] 抗体分子可以通过静脉内输注以超过20mg/分钟,例如,20-40mg/分钟和典型地大

于或等于40mg/分钟的速率施用,以达到约35至440mg/m<sup>2</sup>、典型地约70至310mg/m<sup>2</sup>和更典型地约110至130mg/m<sup>2</sup>的剂量。在实施方案中,约110至130mg/m<sup>2</sup>的输注速率实现约3mg/kg的水平。在其他实施方案中,抗体分子可以通过静脉内输注以小于10mg/分钟,例如,小于或等于5mg/分钟的速率施用,以达到约1至100mg/m<sup>2</sup>,例如,约5至50mg/m<sup>2</sup>、约7至25mg/m<sup>2</sup>,或约10mg/m<sup>2</sup>的剂量。在一些实施方案中,抗体经约30分钟时间输注。应当指出,剂量值可以随待减轻的病状的类型和严重性变化。应进一步理解,对于任何特定的受试者,应当根据个体需要和施用组合物或监督其施用的人的专业判断,随时间推移调节特定剂量方案和本文中所述的剂量范围仅是示例性和不意在限制要求保护的组合物的范围或实施。

[0539] 本公开的药物组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本公开的治疗剂。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需治疗结果的量。修饰的抗体或抗体片段的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。治疗有效量也是这样的—一个量,其中修饰的抗体或抗体片段的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。在癌症的情况下,治疗有效量的治疗剂可以减少癌细胞的数量;减小原发性肿瘤大小;抑制(即在一定程度上减缓并优选停止)癌细胞浸润到外周器官中;抑制(即在一定程度上减缓并优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与病症相关的一种或多种症状。在药物可以阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,它可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。对于癌症疗法,体内功效可以例如通过评估生存持续时间、疾病进展时间(TTP)、复发时间、响应率(例如CR和PR)、响应持续时间和/或生活质量来测量。

[0540] 相对于未治疗的受试者,“治疗有效的剂量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约20%、更优选地至少约40%、甚至更优选地至少约60%和仍更优选地至少约80%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数(例如,癌症)的能力。可选地,可以通过检验化合物抑制的能力评价组合物的这种特性,所述抑制在体外通过熟练技术人员已知的测定法。

[0541] “预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段,有效实现所需预防结果的量。通常,由于预防性剂量在受试者中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用,故预防有效量将小于治疗有效量。

## 实施例

[0542] 实施例1:使用司他利珠单抗、达拉非尼和曲美替尼的组的临床试验(“COMBI-I”试验)的生物标志物分析

[0543] 该实施例鉴定了可以更好地定义最可能从用司他利珠单抗、达拉非尼和曲美替尼的组治疗获得治疗益处的患者群体的示例性生物标志物。

[0544] COMBI-i是一项综合、随机化、安慰剂对照的三部分3期研究,其包括安全性试验(第1部分)、生物标志物群组(第2部分)和随机化、双盲、安慰剂对照的比较sparta-DabTram与安慰剂-DabTram的第3部分。在第3部分中随机分配总共532名患者。

[0545] COMBI-i比较了每4周静脉内400mg司他利珠单抗加每天两次口服达拉非尼150mg和每天一次口服曲美替尼2mg相对于安慰剂加达拉非尼和曲美替尼。参与者年龄为≥18岁,患有不可切除的或转移性BRAF V600突变黑素瘤。基线PD-L1状态的功效是次要终点;其他

生物标志物分析是预先指定的探索性终点。经由基于流式细胞术的免疫表型分析和血浆细胞因子谱分析评估基线/治疗中药效动力学标志物。经由免疫组织化学和RNA-/DNA-测序评估基线肿瘤PD-L1状态、肿瘤突变负荷和基因表达。

[0546] 由高肿瘤突变负荷定义的亚组(无论PD-L1状态如何)受益于司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼,而具有免疫冷肿瘤的那些(例如,肿瘤突变负荷低/PD-L1阴性,immune desert)则不会。BRAF V600K突变、基线T细胞炎症性表型和基线循环肿瘤DNA脱落也能预测从司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼中受益。司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼增加治疗中T细胞增殖/激活和与效应T细胞活性相关的细胞因子水平,并延长基线CD4+/CD8+比例等于或高于中值的患者的无进展生存。诸如基线处高循环肿瘤DNA脱落、高肿瘤突变负荷、T细胞炎症和BRAF V600K的特征表征了可以从司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼获得更大益处的亚组。预期具有PD-L1阴性/TMB高肿瘤的患者可能特别有益。

[0547] 方法

[0548] 参与者

[0549] COMBI-1第3部分登记的成年患者( $\geq 18$ 岁),其具有组织学证实的、不可切除的或转移性的(根据美国癌症分期联合委员会,7.0版的IIIC/IV期)BRAF V600突变型皮肤黑素瘤。另外的标准包括无临床活动性脑转移、东部肿瘤协作组体能状态(ECOGPS)  $\leq 2$ ,以及对于不可切除或转移性黑素瘤没有先前的全身性抗癌治疗(例如,化疗、免疫疗法、生物疗法、肿瘤疫苗疗法、靶向疗法或任何全身性研究性治疗)。先前的限于局部区域的治疗和/或(新)辅助疗法是可接受的,只要它们不发生在研究治疗开始的6个月内。

[0550] 随机化和掩蔽

[0551] 将患者1:1随机化以在治疗组中接受司他利珠单抗加达拉非尼和曲美替尼的组合法,或在对照组中接受司他利珠单抗匹配的安慰剂加达拉非尼和曲美替尼的组合法。达拉非尼加曲美替尼被批准用于患有BRAF V600突变型不可切除或转移性黑素瘤和其他实体瘤的患者的一线治疗。随机化遵循随机排列区组方案,并且使用交互式响应技术提供者进行,该交互式响应技术提供者具有自动将患者编号随机分配到随机化编号的经验证的系统。通过东部肿瘤协作组体能状态(0对1对2)和乳酸脱氢酶水平( $< 1 \times$ 正常上限[ULN] vs  $\geq 1$ 至 $< 2 \times$ ULN vs  $\geq 2 \times$ ULN)将患者分层。

[0552] 从随机化的时间到初步分析的数据库锁定,治疗身份是蒙蔽的。为了监管报告的目的,或者如果需要,为了确定疾病进展后的后续治疗,可以对个体患者进行揭盲以管理医疗紧急情况。

[0553] 结局

[0554] 主要终点是研究者评估的无进展生存,使用实体瘤响应评估标准(RECIST)版本1.1,并且定义为从随机化日期到第一次记录进展或由于任何原因死亡的日期的时间。总体生存是关键次要终点,定义为从随机化日期到由于任何原因死亡的时间。对于一些生物标志物亚组,将下一线治疗的无进展生存(PFS2)评估为探索性终点,其定义为从随机化到停止研究性治疗后开始的第一种新的全身性抗肿瘤疗法中的第一次被记录的研究者评估的疾病进展,或由于任何原因导致的死亡的时间。

[0555] 使用RECIST 1.1的肿瘤评估在基线、12周时进行,然后在治疗的前18个月每8周进行,然后每3个月进行,直到疾病进展、死亡、失去随访或退出研究。在首次满足响应标准

后不少于4周,需要额外的确认性肿瘤评估。还通过基于原始成像扫描的盲态独立中心审查来评估肿瘤响应。

[0556] 基线PD-L1状态的功效是次要终点,单独或与PD-L1状态组合的肿瘤突变负荷(TMB)的功效是关键的探索性终点。所有其他生物标志物分析是探索性终点。使用从同意的患者获得的肿瘤组织和血液样品进行生物标志物分析。在筛选期间收集新获得的(优选的)或存档的(在诊断时或自诊断以来获得,优选在研究治疗之前3个月内获得)基线肿瘤组织样品是强制性的。根据研究者的判断,进行额外的治疗中肿瘤样品收集(2-3周、8-12周或疾病进展时)。只有来自中枢神经系统或骨以外的组织的空芯针、切除或切取活检是可接受的。在基线、4周、8周和疾病进展时,强制性收集血液样品用于循环生物标志物分析(例如,肿瘤DNA、细胞因子谱分析和流式细胞术)。

[0557] 通过流式细胞术分析的免疫表型分析

[0558] 为了确定治疗对黑色素瘤患者外周中T细胞亚群的成熟、激活和增殖状态的影响,在基线和治疗中的第28天(第4周)在外周血单个核细胞(PBMC)中进行多参数流式细胞术分析。通过Ficoll密度梯度离心分离PBMC,并在二甲基亚砜/胎牛血清(DMSO[10%]/FBS)冷冻缓冲液中冷冻保存。使用荧光染料缀合的单克隆抗体对基线和第28天(第4周)配对样品进行PBMC的免疫表型分析,用于CD45 BUV395(克隆HI30)、CD3 FITC(克隆SK7)、CD4 BUV737(SK3)、CD8 BVY5.521(克隆RPA-TA)、TCRvd2 PerCP-Cy5.5(克隆B6)、CD45RABV711(克隆HI100)、CCR7 PE(克隆150503)、HLA-DR BV786(克隆G46-6)、CD38APC-eF780(克隆HIT2)、PD-1PE-Cy7(克隆EH12·1)、LAG-3PE-eF610(克隆3DS223H)和TIM-3BV650(7D3)(BD Biosciences;San Jose,CA)的细胞表面表达和Ki67 AF647(克隆B56)的细胞内表达。使用Viability Dye BV510(Thermo Fisher Scientific;Waltham,MA)测量细胞活力。通过CD38+/HLA-DR+/CD8+(激活/细胞毒性CD8+T细胞)、Ki67+/CD8+(增殖性CD8+T细胞)、Ki67+/PD-1+/CD8+和PD-1+/Ki67+/CD8+(激活/增殖性CD8+T细胞)的共表达来定义T细胞的药效动力学生物标志物以及表型和功能特性。使用BD LSRFortessa™X-20获取每个样品最少5000个白细胞,并通过FlowJo(V10-2)软件(BD Biosciences)在(Navigate Biopharma)进行分析。为了可视化的目的,对绘制的分析物呈阳性的比例应用逻辑转换 $\log(P/[1-P])$ ,将比例转换为“对数比(logit)”。由于0·0或1·0的比例将是未定义的,因此在应用逻辑转换之前,使用转换 $([100P+1/2]/[100+1])$ 将所有比例向0·5收缩。

[0559] 细胞因子谱分析

[0560] 使用Meso Scale Diagnostics(MSD;Rockville,MD)和多重夹心电化学发光免疫测定(Bioagilytix;Durham,NC)进行人细胞因子(干扰素(IFN)- $\gamma$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、TNF- $\beta$ 、嗜酸性粒细胞趋化因子、IP-10、MDC、MIP1a、PLGF、VEGFC、VEGFR1、CRP、ICAM-1、SAA1、VCAM-1和IL-18)的谱分析,在由研究赞助者选择的临床研究组织中验证。简言之,将血浆样品用测定试剂盒制造商(Meso Scale Diagnostics[MSD];Rockville,MD)推荐的稀释剂2稀释2倍,每个重复使用50微升校准物和稀释样品。每次运行中包括三个水平的对照。按一式两份测试标准品、对照和样品。在MSD仪器上读取与样品中存在的分析物的量成比例的测定信号。使用四参数逻辑曲线拟合来构建标准曲线,从中确定测试样品中的细胞因子水平。在接受样品结果之前检查来自对照的结果。分析低于检测下限的那些并绘制为限度/2,分析高于检测上限的那些并绘制为 $1 \cdot 1 \times$ 限度。限度

是批次特异性的,并且数据集包含某些分析物的多个下限和上限。

[0561] 免疫组织化学(IHC)

[0562] 在HistoGenex(现为Cellcarta;Autwerp,比利时),将福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)组织块或未染色的载玻片用于IHC染色。将块以无核酸酶的方式切片成4 $\mu$ m厚的FFPE载玻片,并在60 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C下烘烤(根据抗体,30分钟至2小时)。肿瘤评估由经认证的病理学家进行。

[0563] 如在Histogenex实施和广泛验证的,在Autostainer Link 48(Agilent Technologies;Santa Clarita,CA)上使用IHC 28-8PharmDX测定(DAKO;Carpinteria,CA)评估PD-L1表达<1%或 $\geq$ 1%,以遵循FDA批准的指南。根据Dako提供的黑素瘤解释手册对表达PD-L1的活肿瘤细胞的百分比进行评分。包括任何强度的可辨别的膜染色,而排除细胞质染色、免疫细胞和坏死细胞。检查阴性和阳性对照以确定任何干扰变量的存在。

[0564] 通过Halo的双重IHC测定和数字图像分析(IA)

[0565] 为了评估黑素瘤肿瘤巢和基质区室内CD8+免疫细胞的水平,在Benchmark XT平台(Ventana)上进行由抗CD8兔单克隆一抗(SP57,Ventana:Roche Diagnostics;Basel, Switzerland)和MTC(HMB45、A103和T311抗体)组成的特异性双重IHC测定(CD8/黑素瘤三重混合物[MTC]),并使用Halo<sup>®</sup>软件v2.3(Indica Labs;Albuquerque,NM)进行定量,包括通过过滤分析。

[0566] 使用Aperio AT2,Leica Digital Whole Slide Scanner(Leica Biosystems;Wetzlar,Germany)以20x放大倍数扫描染色的载玻片。然后使用多重IHC模块,Halo v2.3软件平台(Indica Labs;Albuquerque,NM)进行数字IA。Novartis Precision Medicine内部开发了一种特定的IA算法,以评估由与成像科学家密切合作的病理学家注释的黑色素瘤病变内的CD8+细胞;从IA中排除驻留淋巴组织。该算法与组织分类器一起用于定量评估黑素瘤肿瘤和基质隔室内的CD8+细胞百分比。最后,使用来自黑素瘤病变分类器的肿瘤边界作为浸润边缘,在限定的目的区域内进行浸润分析。分析肿瘤边缘内和外的五个条带(每个30 $\mu$ m),每侧的总距离为150 $\mu$ m。报告每个浸润带的CD8+细胞密度(细胞/mm<sup>2</sup>)。

[0567] 本文描述了预定义CD8+T细胞表型的详细方法和说明。在Navigate Biopharma(Carlsbad,CA)通过自动定量分析(Aqua<sup>®</sup>)使用多重荧光免疫组织化学(FIHC)进行定义的黑素瘤肿瘤区室内的抗原呈递细胞的评估。

[0568] NanoString测试和TIS

[0569] 从接受的所有组织块切成4- $\mu$ m( $\pm$ 1 $\mu$ m)厚度的切片。病理学家目视检查存档FFPE和新鲜切割的载玻片,以记录目的区域(ROI)和总肿瘤面积(mm<sup>2</sup>)中肿瘤含量的近似百分比。根据肿瘤含量,宏观解剖4至8个载玻片用于RNA和DNA分离。如果ROI含有<10%的肿瘤含量,则取消进一步处理。使用来自FFPE组织的AllPrep RNA/DNA提取试剂盒(Qiagen;Itilden,德国)从所有可用的样品中共提取RNA和DNA。收获RNA浓度<5ng/ $\mu$ L的样品不进一步处理。在RNA和DNA分离后,将多达200ng的RNA与来自Nanostring Pancancer IO 360<sup>TM</sup>组(Nanostring Technologies;Seatle,WA)的捕获和报告探针在65 $^{\circ}$ C下组合过夜。杂交后,纯化靶-探针复合物,与链霉亲和素包被的柱缀合,并使用nCounter<sup>®</sup>分析系统(NanoString)计数。

[0570] 根据先前描述的方法计算T细胞炎症特征评分 (TIS)。对于每个样品和对照,将包含标签的18个靶基因的计数除以10个内部管家基因 (HKG) 的几何平均值,以产生HKG归一化的表达数据。然后通过对照样品中的HKG归一化表达来缩放每个样品的HKG归一化数据,以产生参考样品校正的和HKG归一化的结果。然后将这些进行log2变换,应用靶标特异性系数,然后求和归一化表达值并产生TIS。定义低TIS对比高TIS的HKG归一化计数的截止log2值为6.29,源自排除了最低25%的值的分布。

[0571] 用于浸润分析的CD8表型

[0572] 使用浸润分析,基于肿瘤-间质侵袭边缘周围的CD8密度的五个30.µm内部(150至0µm)和两个30.µm外部(0至60.µm)条带,来确定三种CD8表型(T细胞excluded/infiltrated/immune desert)。将样品按其平均肿瘤CD8密度值排序,并且将前1/3的肿瘤定义为炎症性的。类似地,基质和具有排名在底部1/3的值的其他样品被定义为desert。低于炎症性的肿瘤阈值和高于desert的基质截止值的样品被定义为excluded。少数病例在肿瘤区域中具有高CD8密度,但在基质中具有低CD8密度,这通常由小的基质区域引起,并且被定义为炎症性肿瘤。通过自动定量分析(AQUA®)的CD11b/CD14/CD80/CD86/HLA-DR/DAPI多重荧光IHC(FIHC)和IA

[0573] 将福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 组织样品脱蜡并通过一系列二甲苯至醇洗涤至蒸馏水再水合。然后使用NxGen Decloaking室在DIVA缓冲液 (Biocare Medical; Pacheco, CA) 中进行热诱导的抗原修复并转移至氨丁三醇缓冲的盐水中。所有随后的染色步骤在室温进行。使用Peroxidazed 1 (Biocare) 封闭内源性过氧化物酶,然后与蛋白质封闭溶液 (Background Sniper; Biocare) 孵育,以减少非特异性抗体染色。按照下述程序对载玻片进行染色:

	烘烤和脱蜡	抗原修复	第一轮: CD80		
[0574]	20 min	20 min	一抗, 60 min	二抗, 30 min	检测, 10 min

	脱蜡缓冲液, 95°C	ER1, 95°C	小鼠抗 CD80 (DVGD 中 1:100)	Envision 小鼠	Opal 570 (1:200)
	<b>剥离</b>		<b>第二轮: CD14</b>		
	20 min		一抗, 60 min	二抗, 30 min	检测, 10 min
	ER1, 95°C		兔抗-CD14 (DVGD 中 1:500)	Envision 兔	Opal 520 (1:200)
	<b>剥离</b>		<b>第三轮: CD11b</b>		
	20 min		一抗, 60 min	二抗, 30 min	检测, 10 min
	ER1, 95°C		兔抗-CD11b (DVGD 中 1:500)	Envision 兔	Opal 620 (1:200)
	<b>剥离</b>		<b>第四轮: CD86</b>		
	20 min		一抗, 60 min	二抗, 30 min	检测, 10 min
[0575]	ER1, 95°C		兔抗-CD86 (1:100 in DVGD)	Envision 兔	Opal 480 (1:200)
	<b>剥离</b>		<b>第五轮: HLA-DR</b>		
	20 min		一抗, 60 min	二抗, 30 min	检测, 10 min
	ER1, 95°C		小鼠 anti-HLA-DR (1:500 in DVGD)	Envision 小鼠	Opal DIG (1:50)
	<b>剥离</b>		<b>第五轮(cont): Opal 780</b>		
	20 min		一抗, 70 min		
	ER1, 95°C		抗-DIG Opal 780 (1:50)		
	<b>第六轮: DAPI</b>				
	一级, 5 min				
	DAPI				

[0576] CD=分化簇。Cont=继续。DAPI=4,6-二脒基-2-苯基吡啶。DIG=地高辛配基(digoxygenin)。ER1=表位修复溶液1。HLA-DR=人白细胞抗原,DR亚型。

[0577] 在Vectra 2Intelligent Slide Analysis System(Akoya Biosciences;Menlo Park,CA)上获取荧光图像,首先在4×下基于DAPI信号识别组织区域。使用自动Inform软件富集算法(Inform GmbH;Aachen,德国)处理这些4×放大图像,以根据CD11b和HLA-DR的最高共同表达来鉴定和排序20×高倍视野(HPF)。病理学家审查所有原始图像的可接受性。在通过经由完全自动化过程的自动定量分析(AQUA®[v3·2·4];HistoRx;New Haven,CT)分析之前,排除缺乏肿瘤或高度坏死细胞的图像。AQUA®已经在临床环境中广泛验

证,用于组织中生物标志物的客观定量。在这些分析中应用的AQUA测定在供应商(Navigate Biopharma Services)验证,该供应商是诺华子公司,使用诺华内部指导和用于探索性测定开发的标准操作程序。每个接受的图像内的DAPI信号用于鉴定细胞核,然后扩张至整个细胞的近似尺寸。使用重叠方法,创建CD11b和HLA-DR的二元掩模以鉴定代表髓源性抑制细胞(MDSC)的CD11b+/HLA-DR-群体。

[0578] 靶向和CfRNA测序

[0579] 将样品提交给Foundation Medicine, Inc. (Cambridge, MA), 用FoundationOne CDx™测定对肿瘤和无细胞DNA进行下一代测序(NGS)。

[0580] 在FFPE组织的样品充分性评估后, FMI进行DNA提取并对提取的DNA进行QC检查。如果DNA样品具有足够的量, 则进行文库构建, 并检查所得文库的质量。在构建成功的文库后, FMI使用Dx1 baitset进行杂交捕获, 其包括在癌症中经常重排或改变的总共324个基因。这些包括309个癌症相关基因的编码序列、1个启动子区、1个非编码RNA和来自34个通常重排的基因的选定内含子区(其中21个还包括编码外显子)。如果杂交捕获成功通过质量检查, 则FMI使用其实体瘤(Dx1)测定进行全面的基因组分析, 并使用专有软件解释所得NGS数据以鉴定遗传改变。然后将测序数据映射到人类基因组(build hg19)。在靶向基因组区域中进行变异体调用, 包括碱基取代、插入/缺失(插入缺失)、拷贝数改变和基因组重排。使用Illumina v4化学和配对末端100bp读取(HiSeq; Illumina; San Diego, CA)对文库进行测序。

[0581] 通过计数以 $\geq 5\%$ 等位基因频率存在的所有同义和非同义变体并过滤出潜在的种系变体来确定肿瘤突变负荷(TMB)。过滤掉已知和可能的驱动突变以排除数据集的偏差。然后将所得突变数除以对应于计数的总变体数的编码区, 或793千碱基(kb), 并报告为每兆碱基(Mb)的突变(mut/Mb)。

[0582] cfDNA测序数据处理和分析

[0583] 对于cfDNA-seq数据, 使用UMI-Toolkit v.1从读段修剪独特分子标识符(UMI), 然后使用BWA-MEM将读段与人参考基因组(build hg38)比对。然后局部重新比对来进行比对并重新校准碱基质量评分(Genome Analysis Toolkit[GATK])。使用UMI和比对位置创建共有读段以去除PCR重复读段和测序伪像(UMI-Toolkit)。用MuTect v.1.1.7鉴定单核苷酸变体(SNV)。使用Pindel v.1.0鉴定插入缺失。使用PureCN v.1.8.1鉴定结构变体。使用Socrates v.1调用染色体重排。

[0584] 如果覆盖率为 $\geq 500\times$ 且GC/AT dropout $< 20\%$ , 则cfDNA文库被包括入下游分析。从下游分析除去潜在测序伪像和种系遗传变体。基于来自24名健康对照的血浆测序计算了位置特异性误差率, 并且仅在突变具有显著大于位置特异性误差率的支持时才保留突变。基于低等位基因分数除去其他潜在的伪像( $< 0.005$ , 除了未知的或可能的癌基因)、支持差的比对( $> 50MQ0$ 读段)、低碱基质量( $< 20$ )、低覆盖率( $< 100\times$ )、或在重复区域中。通过数据库dbSNP 147、Exome Sequencing Project (ESP6500SI-V2-SSA137 • GRCh38-liftover)和Exome Aggregation Consortium(release 0.3; 现在是gnomAD的一部分)中以可接受频率(ESP最小等位基因频率 $> 0.001$ 或ExAC计数 $> 3$ , 除非已知的热点突变)的存在来鉴定可能的种系SNV和插入缺失。SNV和插入缺失基于其在癌症体细胞突变目录(COSMIC v-83)中的存在和功能效应而被指定为功能显著性, 并且在COSMIC中 $\geq 5$ 个肿瘤中报告的突变被认为是

“已知的”致癌,具有COSMIC计数 $<5$ 但预测导致过早截短的蛋白质的突变被认为是“可能”致癌,并且所有其他的突变被认为具有“未知的”致癌状态。如果估计的拷贝数为 $\cdot 7$ ,则拷贝数变异被认为是扩增,或者如果估计的拷贝数为 $\leq 0 \cdot 5$ ,则拷贝数变异被认为是纯合缺失。PureCN使用拷贝数变体中单核苷酸多态性的B $\cdot$ 等位基因频率和体细胞点突变的等位基因频率的组合来确定源自肿瘤的cfDNA的比例。

[0585] RNA测序

[0586] 使用RNaseH (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) 从提取的总RNA中耗尽核糖体RNA (rRNA)。然后将rRNA耗尽的样品片段化,转化为cDNA,并使用TruSeq RNA文库制备试剂盒v2 (Illumina; San Diego, CA) 进行下一代测序文库构建的剩余步骤:末端修复、A加尾、索引接头(adaptor)连接和PCR扩增。将捕获的文库与其他文库合并,每个文库具有独特的接头索引序列,并应用于测序流动池,用于簇扩增和使用Illumina v4化学和配对末端100bp读段(Illumina)进行大规模平行的边合成边测序。

[0587] 使用STAR将序列数据比对到参考人类基因组(build hg19)。然后用HTSeq和RefSeq GRCh38 v82基因注释将映射的读段用于定量转录本。使用如在edgeR R/Bioconductor包中实施的M-值归一化的修剪平均值对数据进行归一化。使用每个集中所有基因的几何平均表达量导出通路/基因集表达。该分析包括了来自MSigDB C2 Canonical Pathway的1329个基因集加上内部和公开的基因集。使用双侧Wilcoxon秩和检验在无偏分析中对通路进行排序。

[0588] 统计分析

[0589] 对于每个测定,在具有和不具有生物标志物数据的群组之间比较基线临床协变量;可用,以便评估潜在的病例选择偏差;基于Pearson $\cdot \chi^2$ 、比例几率似然比和Wilcoxon秩和检验的多重性未调整的p值分别用于评估无序分类、有序分类和连续协变量的“无差异”的零假设。使用Cox比例风险模型(视情况单变量或多变量)估计生物标志物和协变量对无进展生存和总体生存的贡献。组间比较通过Wald或Wilcoxon秩和检验处理,未调整的描述性p值用于多重比较。

[0590] 使用R-3 $\cdot 6 \cdot 1$ 和Bioconductor 3 $\cdot 9$ 进行所有生物标志物分析。使用R Survival (3 $\cdot 1 \cdot 7$ )和SurvMiner (0 $\cdot 4 \cdot 6$ )包生成生物标志物队列的Kaplan-Meier曲线和Cox比例风险模型。使用R Hmisc (4 $\cdot 3 \cdot 0$ )包评估群体比较。

[0591] 结果

[0592] 基线表征

[0593] 在COMBI-i的第3部分中,将总共532名患者随机化以接受sparta-DabTram (n=267)或安慰剂-DabTram (n=265) (图1);基线表征在治疗分支之间良好平衡(表A)。

[0594] 表A. 意向治疗(ITT)群体的基线表征

[0595]

	Sparta-DabTram (n=267)	安慰剂-DabTram (n=265)
年龄, 岁	56 (46–66)	55 (47–65)
<65 岁	189 (71%)	195 (74%)
≥65 岁	78 (29%)	70 (26%)
ECOG PS		
0	195 (73%)	196 (74%)
1	67 (25%)	66 (25%)
2	5 (2%)	3 (1%)
疾病阶段*		
IIIC	16 (6%)	15 (6%)
IV M1a	30 (11%)	42 (16%)
IV M1b	55 (21%)	36 (14%)
IV M1c	166 (62%)	172 (65%)
<i>BRAF</i> 突变状态 (局部) †		
V600E	228 (85%)	229 (86%)
V600K	33 (12%)	29 (11%)
V600 其他	6 (2%)	7 (3%)
<i>BRAF</i> 突变状态 (中心) ‡		
V600E	200 (75%)	202 (76%)
V600K	25 (9%)	28 (11%)
不可评估	42 (16%)	35 (13%)
LDH 水平		
<1 × ULN	162 (61%)	161 (61%)
≥1 至 <2 × ULN	70 (26%)	68 (26%)
≥2 × ULN	35 (13%)	36 (14%)
基线的病变直径总和, mm	49 (29–88)	48 (28–81)
患病器官部位的数量		
<3	145 (54%)	143 (54%)
≥3	121 (45%)	122 (46%)
未知的	1 (<1%)	0
辅助疗法前	6 (2%)	4 (2%)
TMB 状态		
<10 mut/Mb (低)	115 (43%)	122 (46%)
≥10 mut/Mb (高)	87 (33%)	90 (34%)

	不可评估	65 (24%)	53 (20%)
	PD-L1 状态		
	<1% (阴性)	98 (37%)	115 (43%)
	≥1% (阳性)	138 (52%)	126 (48%)
[0596]	不可评估	31 (12%)	24 (9%)
	T-细胞炎症性特征表达, log2 CPM		
	<6.29 log2 CPM (低)	52 (19%)	58 (22%)
	≥6.29 log2 CPM (高)	160 (60%)	163 (62%)
	不可评估	55 (21%)	44 (17%)

[0597] 数据是n(%)或中值(IQR)。

[0598] \*根据American Joint Committee on Cancer Staging Manual,第7版。• †基于中心BRAF测试结果招募的没有来自局部BRAF突变测试的结果的患者(n=17)。如果V600E与另一种V600突变一起存在,则将患者分类为“V600E”。如果V600K突变与另一种V600突变一起存在,不包括V600E,则将患者分类为“V600K”。“V600其他”包括除V600E和V600K之外的V600突变。‡如果存在V600E和V600K两者,患者被分类为V600K。

[0599] CPM=每百万计数。ECOGPS=Eastem Cooperative Oncology Group体力状态。LDH=乳酸脱氢酶。mut/Mb=每百万碱基的突变。PD-L1=程序性死亡配体1。安慰剂-Dabtram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼。sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。TMB=肿瘤突变负荷。ULN=正常上限。

[0600] 表B总结了每个计划分析的可用性。

[0601] 表B.可用生物标志物结果的总结

	PD-L1	DNA-seq (Foundation One CDx™)	NanoString (TIS)	数字 IHC (CD8)	多重 x IHC	RNA-seq	流式细胞术	细胞因子谱分析 (n=21)	靶向 DNA-seq (ctDNA)
[0602]	样品数量, n	443 (TMB, 414)	433	419	339	395	基线, 409; 第4周, 405	基线, 511; 第4周, 479	基线, 481; 第8周, 440
	意向治疗群体	83% (TMB, 78%)	81%	79%	64%	74%	基线, 77%;	基线, 96%;	基线, 90%;
[0603]	(N=532)						第4周, 76%	第4周, 90%	第8周, 83%

[0604] CD=分化簇; ctDNA=循环肿瘤DNA; DNA-seq=DNA测序; IHC=免疫组织化学; PD-L1=程序性死亡配体1; RNA-seq=RNA测序; TIS=T细胞炎症性基因表达特征评分; TMB=肿瘤突变负荷。

[0605] 大多数患者得到代表,样本可从意向治疗群体的约64%至90%(532名中的339至481名)获得。关键临床和人口统计学变量在大多数生物标志物群组和没有可获得的生物标

志物结果的相应子集之间是可比较的(表C)。在基线时缺乏流式细胞术数据的队列富集了更高的肿瘤负荷特性(例如,疾病阶段或病变直径总和)。

[0606] 表C. 与没有生物标志物数据的相应群组相比,生物标志物群组的基线表征

[0607]

存在 TMB 和 PD-L1 数据 vs 一者或两者不存在				
	N*	存在 (n=375)	不存在 (n=157)	p 值
用 sparta-DabTram 治疗	532	179 (48%)	88 (56%)	0.08
女性	532	155 (41%)	70 (45%)	0.5
年龄, 岁	532	56 (46-66)	56 (44-66)	0.7
LDH 水平	532			0.2
<1 × ULN		234 (62%)	89 (57%)	
≥1 to <2 × ULN		89 (24%)	49 (31%)	
≥2 × ULN		52 (14%)	19 (12%)	
病变直径的总和, mm	526	50 (28-90)	48 (28-79)	0.6
≥3 转移部位	531	177 (47%)	66 (42%)	0.3
ECOG PS	531			0.8
0		278 (74%)	116 (74%)	
1		91 (24%)	40 (25%)	
2		5 (1%)	1 (1%)	
阶段 (根据 AJCC 7)	532			0.5
IIIC		24 (6%)	7 (4%)	
IV M1a		48 (13%)	24 (15%)	
IV M1b		64 (17%)	27 (17%)	

[0608]

IV M1c, 具有正常的 LDH 水平		117 (31%)	38 (24%)	
IV M1c, 具有升高的 LDH 水平		122 (33%)	61 (39%)	
存在 T-cell 炎症性特征数据 vs 不存在				
	N*	存在 (n=433)	不存在 (n=99)	p 值
用 sparta-DabTram 治疗	532	212 (49%)	55 (56%)	0.2
女性	532	178 (41%)	47 (47%)	0.2
年龄, 岁	532	55 (46-66)	59 (46-66)	0.3
LDH 水平	532			0.04
<1 × ULN		273 (63%)	50 (51%)	
≥1 至 <2 × ULN		103 (24%)	35 (35%)	
≥2 × ULN		57 (13%)	14 (14%)	
病变直径的总和, mm	526	48 (27-83)	53 (33-93)	0.1
≥3 转移性部位	531	202 (47%)	41 (41%)	0.4
ECOG PS	531			0.7
0		324 (75%)	70 (71%)	
1		103 (24%)	28 (28%)	
2		5 (1%)	1 (1%)	
阶段 (根据 AJCC 7)	532			0.09
IIIC		28 (6%)	3 (3)	
IV M1a		57 (13%)	15 (15%)	
IV M1b		75 (17%)	16 (16%)	
IV M1c, 具有正常的 LDH 水平		134 (31%)	21 (21%)	
IV M1c, 具有升高的 LDH 水平		139 (32%)	44 (44%)	
存在流式细胞术 (基线 CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 比例) vs 不存在				
	N*	存在 (n=409)	不存在 (n=123)	p 值
用 sparta-DabTram 治疗	532	200 (49%)	67 (54%)	0.3
女性	532	169 (41%)	56 (46%)	0.4
年龄, 岁	532	56 (46-65)	57 (46-66)	0.4
LDH 水平	532			0.2
<1 × ULN		255 (62%)	68 (55%)	
≥1 至 <2 × ULN		105 (26%)	33 (27%)	
≥2 × ULN		49 (12%)	22 (18%)	
病变直径的总和, mm	526	47 (27-79)	60 (34-104)	0.02

[0609]

≥3 转移部位	532	178 (44%)	65 (53%)	0·2
ECOG PS	532			0·02
0		315 (77%)	79 (64%)	
1		88 (22%)	43 (35%)	
2		5 (1%)	1 (1%)	
不可获得		1 (<1%)	0	
阶段 (根据 AJCC 7)	532			0·009
IIIC		27 (7%)	4 (3%)	
IV M1a		60 (15%)	12 (10%)	
IV M1b		73 (18%)	18 (15%)	
IV M1c, 具有正常的 LDH 水平		118 (29%)	37 (30%)	
IV M1c, 具有升高的 LDH 水平		131 (32%)	52 (42%)	
存在中心 <i>BRAF</i> 突变状态 vs 不存在				
	N*	存在 (n=455)	不存在 (n=77)	p 值
用 sparta-DabTram 治疗	532	225 (49%)	42 (55%)	0·4
女性	532	191 (42%)	34 (44%)	0·7
年龄, 岁	532	55 (46–65)	60 (48–68)	0·08
LDH 水平	532			0·6
<1 × ULN		280 (62%)	43 (56%)	
≥1 至 <2 × ULN		115 (25%)	23 (30%)	
≥2 × ULN		60 (13%)	11 (14%)	
病变直径的总和, mm	526	48 (27–80)	60 (33–101)	0·03
≥3 转移部位	532	204 (45%)	39 (51%)	0·03
ECOG PS	532			0·8
0		336 (74%)	58 (75%)	
1		112 (25%)	19 (25%)	
2		6 (1%)	0	
不可获得		1 (<1%)	0	
阶段 (根据 AJCC 7)	532			0·2
IIIC		29 (6%)	2 (3%)	
IV M1a		59 (13%)	13 (17%)	
IV M1b		81 (18%)	10 (13%)	
IV M1c, 具有正常的 LDH 水平		136 (30%)	19 (25%)	
IV M1c, 具有升高的 LDH 水平		150 (33%)	33 (43%)	

存在数字免疫组织化学 (CD8) 数据 vs 不存在				
	N*	存在 (n=409)	不存在 (n=116)	p 值
用 sparta-DabTram 治疗	532	207 (51%)	56 (48%)	0.7
女性	532	171 (42%)	48 (41%)	0.9
年龄, 岁	532	56 (47-65)	56 (46-66)	0.7
LDH 水平	532			0.9
<1 × ULN		250 (61%)	68 (59%)	
≥1 至 <2 × ULN		106 (26%)	31 (27%)	
≥2 × ULN		53 (13%)	17 (15%)	
病变直径的总和, mm	526	48 (27-79)	54 (32-95)	0.09
≥3 转移部位	532	186 (45%)	54 (47%)	0.8
ECOG PS	532			0.8
0		306 (75%)	83 (72%)	
1		97 (24%)	32 (28%)	
2		5 (1%)	1 (1%)	
不可获得		1 (<1%)	0	
阶段 (根据 AJCC 7)	532			0.3
IIIC		23 (6%)	7 (6%)	
IV M1a		59 (14%)	12 (10%)	
IV M1b		74 (18%)	16 (14%)	
IV M1c, 具有正常的 LDH 水平		114 (28%)	39 (34%)	
IV M1c, 具有升高的 LDH 水平		139 (34%)	42 (36%)	

[0611] 数据是n(%)或中值(IQR)。

[0612] \*N对应于在意向治疗群体中可能总共532名患者中从其收集关于每个基线表征的数据的患者的总数。

[0613] AJCC 7-American Joint Committee on Cancer Staging Manual,第7版。ECOGPS = 东部肿瘤协作组体能状态。IQR = 四分位距。LDH = 乳酸脱氢酶。PD-L1 = 程序性死亡配体1。sparta-DabTram = 司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。TMB = 肿瘤突变负荷。ULN = 正常上限。

[0614] 药效动力学标志物

[0615] 在基线和治疗4周后使用预选的药效动力学标志物进行外周血单个核细胞(PBMC)的免疫表型分析和细胞因子谱分析,以评估T细胞激活、增殖和细胞毒性(图2)。在来自sparta-DabTram分支的患者样本中从基线至第4周观察到增殖的CD8+/PD-1+T细胞增加(中值变化,2.49),相比于安慰剂-DabTram组(中值变化,1.09)。sparta-DabTram组具有效应/细胞毒性表型(CD38+/HLA-DR+)的CD8+T细胞从基线至第4周也增加了(中值变化,3.79),相比于安慰剂-DABTRAM(中值变化,1.57)。总T细胞计数(CD3+)在正常范围内,而在sparta-DabTram分支中CD8+和CD4+增殖和激活增加(图3)。在全部两个分支中,治疗产生了增强的细胞毒性效应T细胞调节,反映为IFN-γ血浆水平的增加(图2C)。统计分析和建模方

法表明,在来自sparta-DabTram分支的样品中观察到更稳健的T细胞调节(数据未显示)。提示效应T细胞免疫活性的其他细胞因子显示类似的结果(图4)。

#### [0616] CD4+/CD8+T细胞比例的分析

[0617] 除了药效学生物标志物之外,通过流式细胞术免疫表型分析测定外周血辅助/细胞毒性T细胞比例(CD4+/CD8+)来评估基线全身性T细胞介导的免疫活性。基线CD4+/CD8+比例与安慰剂-DabTram组中的无进展生存相关(图5);具有较高CD4+/CD8+比例的患者通常经历较短的无进展生存。然而,在sparta-DabTram组中没有观察到这种缔合。

[0618] 治疗组之间CD4+/CD8+比例的分析表明,将司他利珠单抗添加到达拉非尼和曲美替尼中可以延长基线CD4+/CD8+比例 $\geq$ 中值 $2 \cdot 9$ 的患者的无进展生存。在这些患者中,与安慰剂-DabTram相比,用sparta-DabTram治疗改善了无进展生存(HR, $0 \cdot 58$ [95%CI, $0 \cdot 40-0 \cdot 84$ ];图6)。通过测试数值比值的第10至第90百分位之间所有可能的值,系统性地评估超过中值基线CD4+/CD8+比例的患者选择的其他截止点。这种数据驱动的方法建议截止值范围在2.01和3.34之间,其将分别在73.8%和40.8%的患者之间选择。

#### [0619] PD-L1和TMB亚组的分析

[0620] 在数据截止时,sparta-DabTram组中总共147名患者(55%)具有无进展生存事件,安慰剂-DabTram组中165名患者(62%);中位无进展生存分别为16.2个月(95%CI,12.7-23.9个月)与12.0个月(95%CI,10.2-15.4个月)。

[0621] 主要终点未满足(HR, $0.82$ [95%CI, $0.66-1.03$ ];单侧; $p=0.042$ )。预先计划的亚组分析表明,无论PD-L1状态如何,sparta-DabTram的益处是相似的,PD-L1阳性( $\geq 1\%$ )亚组的HR数值上更低(阳性HR, $0.76$ [95%CI, $0.54-1.07$ ]相对于阴性HR, $0.84$ [95%CI, $0.60-1.18$ ])。同时,具有较高TMB( $\geq 10$ mut/Mb)的患者似乎比具有较低TMB的患者获得更大的益处(分别为HR, $0.70$ [95%CI, $0.47-1.06$ ]对比HR, $0.91$ [95%CI, $0.65-1.26$ ])。

[0622] 作为预先指定的关键探索性终点,在基于组合的PD-L1状态和TMB的亚组中进一步评估结果(图7)。具有缺乏免疫原性潜力的“冷”肿瘤(表征为阴性PD-L1表达和低TMB)的患者没有从sparta-DabTram获得无进展生存益处(HR, $1.11$ [95%CI, $0.71-1.75$ ];图7A)。在具有表征为高TMB的肿瘤的患者中,sparta-DabTram与数值上更长的无进展生存相关,与PD-L1状态无关(PD-L1阴性/TMB高:HR, $0.71$ [95%CI, $0.38-1.32$ ];PD-L1阳性/TMB高:HR, $0.73$ [95%CI, $0.44-1.23$ ];图7A)。用sparta-DabTram治疗也与PD-L1阴性/TMB高亚组(HR, $0.33$ [95%CI, $0.13-0.79$ ];图7B)中改善的总体生存相关,但与其他PD-L1/TMB限定的亚组无关。这一亚组在sparta-DabTram分支中的下一线治疗后也具有无进展生存受益(图8)。

[0623] 为了进一步探索在PD-L1阴性/TMB高亚组中观察到的生存益处背后的潜在机制,分析了组合的PD-L1/TMB亚组的肿瘤微环境。无论TMB水平如何,每个NanoString TIS的T细胞炎症性基因表达特征的基线水平在具有PD-L1阴性肿瘤的患者中更低(图9A)。然而,多重荧光免疫组织化学显示与所有其他肿瘤相比,PD-L1阴性/TMB高肿瘤中的HLA-DR+和CD11b+抗原呈递细胞(APC)更少,表明该亚组中基线新抗原呈递减少(图9B-9E)。

#### [0624] V600E vs V600K亚组

[0625] 患者亚组也通过BRAF突变状态(V600E vs V600K)来定义。根据中心结果,较高的TMB以及较大的年龄与BRAF V600K-突变体(N=53) vs BRAF V600E-突变体(N=402)疾病相关(图10)。一致地,无进展分析生存证明,V600K亚组比V600E亚组从sparta-DabTram获得更大

的益处,V600K:HR,0.45[95%CI,0.21-0.99];V600E:HR 0.87[95%CI 0.67-1.13];基于局部BRAF突变状态重复了这些结果(数据未显示),尽管并非所有局部可用的测试都区分谷氨酸(E)或赖氨酸(K)取代。与sparta-DabTram相关的总体生存益处也在V600K亚组中也更大(V600K:HR,0.46[95%CI,0.17-1.26];V600E:HR 0.84[95%CI 0.60-1.18];图12),尽管在该分析时事件的数量对于穿过1.00的两个亚组都是低95% CI。

[0626] 通过RNA测序比较V600E和V600K亚组中的基因表达特征,用顶部信号传导通路(表D)。MAPK信号传导通路的SPRY介导的负反馈环是与V600E相比在V600K亚组中下调的顶部通路,表明相对降低的MAPK通路活性(图13)。

[0627] 表D.BRAF V600E vs V600K亚组中差异表达的顶部基因特征

[0628]

	W <sub>STAT</sub>	倍数变化	p 值	错误发现率
BIOCARTA_SPRY_PATHWAY	9314	1.04060867	1.64388E-06	0.002544492
REACTOME_COMMON_PATHWAY_OF_FIBRIN_CLOT_FORMATION	9276	1.098765602	2.20684E-06	0.002544492
REACTOME_FORMATION_OF_FIBRIN_CLOT_CLOTTING_CASCADE	9132	1.072751962	6.53214E-06	0.004425804
REACTOME_MELANIN_BIOSYNTHESIS	3385	0.793820096	7.67702E-06	0.004425804
REACTOME_CHL1_INTERACTIONS	9003	1.082241351	1.65684E-05	0.006785144
BIOCARTA_GHRELIN_PATHWAY	8994	1.110051935	1.76543E-05	0.006785144
REACTOME_VASOPRESSIN_LIKE_RECEPTORS	8921	1.178884055	2.93379E-05	0.009664736
Endothelial_3	8864	1.061692603	4.32414E-05	0.012464329
REACTOME_CARGO_RECOGNITION_FOR_CLATHRIN_MEDIATED_ENDOCYTOSIS	8843	1.022069373	4.97895E-05	0.012605904
Lineage_endothelial_AvivRegev	8829	1.08681084	5.46657E-05	0.012605904
KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BI	8808	1.052530752	6.2836E-05	0.013172706

[0629]

CARBONATE_RECLAMATION				
REACTOME_TRAFFICKING_OF_GLUR2_CONTAINING_AMPA_RECEPTORS	8766	1.052477515	8.2767E-05	0.015769406
REACTOME_PTK6_REGULATES_CELL_CYCLE	3740	0.939950195	8.88995E-05	0.015769406
REACTOME_RHO_GTPASE_CYCLE	8731	1.022596588	0.000103801	0.016261322
REACTOME_TP53_REGULATES_TRANSCRIPTION_OF_DEATH_RECEPTORS_AND_LIGANDS	8724	1.069996786	0.000108574	0.016261322
BIOCARTA_PPARA_PATHWAY	8718	1.027416588	0.000112828	0.016261322
BIOCARTA_CBL_PATHWAY	8658	1.043975777	0.000164948	0.020244712
REACTOME_G2_PHASE	3843	0.925036238	0.000171254	0.020244712
REACTOME_INTRINSIC_PATHWAY_OF_FIBRIN_CLOT_FORMATION	8651	1.05850306	0.000172327	0.020244712
REACTOME_COENZYME_A_BIOSYNTHESIS	3847	0.973782362	0.000175583	0.020244712
BIOCARTA_SPPA_PATHWAY	8611	1.040333768	0.000220805	0.02424651
Lineage_Megakarocyte_AvivRegev	8595	1.070434669	0.000243569	0.024793299
PID_PTP1B_PATHWAY	8573	1.032366492	0.00027848	0.024793299
REACTOME_G_ALPHA_Q_SIGNALING_EVENTS	8573	1.035230308	0.00027848	0.024793299
REACTOME_PHASE_3_RAPID_REPOLARISATION	8571	1.085241564	0.000281876	0.024793299
REACTOME_TRAIL_SIGNALING	8565	1.069790492	0.000292298	0.024793299
BIOCARTA_PDGF_PATHWAY	8550	1.024763299	0.00031995	0.024793299

[0630]

			6	
BIOCARTA_NOS1_PATHWAY	8548	1·030742472	0·00032382 3	0·024793299
PID_THROMBIN_PAR1_PATHWAY	8545	1·019872982	0·00032970 6	0·024793299
REACTOME_AXON_GUIDANCE	8535	1·016715722	0·00035004 8	0·024793299
BIOCARTA_EXTRINSIC_PATHWAY	8529	1·10243525	0·00036281	0·024793299
BIOCARTA_LDL_PATHWAY	8522	1·088048533	0·00037824 9	0·024793299
BIOCARTA_EDG1_PATHWAY	8521	1·029039939	0·00038050 4	0·024793299
REACTOME_PKMTS_METHYLATE _HISTONE_LYSINES	8520	1·032124475	0·00038277 2	0·024793299
REACTOME_SYNTHESIS_OF_UDP_N_ACETYL_GLUCOSAMINE	3975	0·967120684	0·00038277 2	0·024793299
BIOCARTA_INTRINSIC_PATHWAY	8514	1·062691896	0·00039664 4	0·024793299
REACTOME_BIOSYNTHESIS_OF_THE_N_GLYCAN_PRECURSOR_DOLICHOYL_LIPID_LINKED_OLIGOSACCHARIDE_AND_TRANSFER_TO_A_NASCENT_PROTEIN	3985	0·978633425	0·00040615 3	0·024793299
BIOCARTA_EGF_PATHWAY	8509	1·022124448	0·00040856 3	0·024793299
BIOCARTA_MSP_PATHWAY	8503	1·110684132	0·00042330 6	0·025029312
REACTOME_SIGNALING_BY_EGFR_IN_CANCER	8494	1·02677227	0·00044635 5	0·025732344
REACTOME_EGFR_DOWNREGULATION	8484	1·029195342	0·00047333 6	0·026622241

[0631]

REACTOME_INTERLEUKIN_7_SIGNALING	8479	1·050811254	0·00048739	0·026665436
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	8473	1·028576502	0·00050476 8	0·026665436
BIOCARTA_AMI_PATHWAY	8471	1·06361796	0·00051068 8	0·026665436
REACTOME_INTERLEUKIN_27_SIGNALING	8467	1·04015791	0·00052272 2	0·026665436
REACTOME_ACTIVATION_OF_HOX_GENES_DURING_DIFFERENTIATION	8464	1·049488586	0·00053192 1	0·026665436
BIOCARTA_IL1R_PATHWAY	8456	1·033210804	0·00055719 4	0·026768528
REACTOME_AMYLOID_FIBER_FORMATION	8456	1·04872505	0·00055719 4	0·026768528
PID_EPHB_FWD_PATHWAY	8450	1·022773677	0·00057687 8	0·027148577
BIOCARTA_ERYTH_PATHWAY	8446	1·10219787	0·00059035 8	0·027227312
KEGG_CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	4058	0·977645958	0·00062176 8	0·02792646
BIOCARTA_AMAN_PATHWAY	8433	1·031174028	0·00063622 1	0·02792646
REACTOME_TRANSPORT_OF_NUCLEOTIDE_SUGARS	4065	0·969715072	0·00064726 5	0·02792646
REACTOME_MAPK_FAMILY_SIGNALING_CASCADES	8427	1·01734774	0·00065848 7	0·02792646
BIOCARTA_HER2_PATHWAY	8425	1·020910241	0·00066606 9	0·02792646
REACTOME_RET_SIGNALING	8406	1·024150114	0·00074225 4	0·030564979
REACTOME_GLUCAGON_LIKE_PEPTIDE_1_GLP1_REGULATES_INSULIN_SECRETION	8399	1·019548981	0·00077230 7	0·031244575
BIOCARTA_ACETAMINOPHEN_PATHWAY	8393	1·167484069	0·00079896 2	0·03176563

[0632]

REACTOME_SYNTHESIS_OF_IP3_AND_IP4_IN_THE_CYTOSOL	8386	1·030800011	0·00083113 7	0·032123758
REACTOME_INTEGRIN_SIGNALING	8385	1·030217397	0·00083583 1	0·032123758
BIOCARTA_PLCD_PATHWAY	8375	1·086351613	0·00088413 5	0·033154233
PID_EPHA2_FWD_PATHWAY	8371	1·016506429	0·00090417 2	0·033154233
REACTOME_SULFUR_AMINO_ACID_METABOLISM	4135	0·972793647	0·00096146 3	0·033154233
REACTOME_ERYTHROCYTES_TAKE_UP_OXYGEN_AND_RELEASE CARBON_DIOXIDE	8360	1·169158795	0·00096146 3	0·033154233
REACTOME_ION_HOMEOSTASIS	8360	1·026611946	0·00096146 3	0·033154233
REACTOME_SYNTHESIS_OF_SUBSTRATES_IN_N_GLYCAN_BIOSYTHESIS	4137	0·976605573	0·00097223 4	0·033154233
REACTOME_CHONDROITIN_SULFATE_BIOSYTHESIS	8357	1·03711389	0·00097766 2	0·033154233
NABA_ECM_AFFILIATED	8357	1·042901978	0·00097766 2	0·033154233
REACTOME_ORGANIC_ANION_TRANSPORT	8352·5	1·283890351	0·00099861 8	0·033374112
BIOCARTA_NFAT_PATHWAY	8350	1·022941354	0·00101644 6	0·033484625
REACTOME_SIGNALING_BY_EGFR	8341	1·016892971	0·00106840 4	0·034700552
PID_S1P_S1P3_PATHWAY	8334	1·024304081	0·00111050 3	0·035273599
BIOCARTA_EICOSANOID_PATHWAY	8333	1·098150309	0·00111664	0·035273599
REACTOME_O_GLYCOSYLATION_OF_TSR	8323	1·066358042	0·00117976 7	0·036473469

[0633]

DOMAIN_CONTAINING_PROTEINS				
REACTOME_PRE_NOTCH_PROCESSING_IN_THE_ENDOPLASMIC_RETICULUM	8322	1·026456681	0·001186258	0·036473469
REACTOME_OTHER_INTERLEUKIN_SIGNALING	8319	1·018089292	0·001205928	0·036514443
Endothelial_4	8311	1·118760339	0·001259866	0·036514443
BIOCARTA_VEGF_PATHWAY	8311	1·021817962	0·001259866	0·036514443
PID_S1P_S1P1_PATHWAY	8310	1·033638727	0·001266763	0·036514443
REACTOME_SIGNALING_BY_GPCR	8310	1·020135866	0·001266763	0·036514443
BIOCARTA_AT1R_PATHWAY	8305	1·021060757	0·001301772	0·037060326
BIOCARTA_GATA3_PATHWAY	8302	1·027400547	0·001323204	0·037211076
PID_RAC1_REG_PATHWAY	8299	1·025786037	0·001344961	0·037367228
BIOCARTA_NTHI_PATHWAY	8284	1·0255393	0·001458781	0·039780267
BIOCARTA_PKC_PATHWAY	8281	1·041343129	0·001482584	0·039780267
BIOCARTA_PAR1_PATHWAY	8279	1·026948091	0·001498652	0·039780267
REACTOME_SIGNALING_BY_NUCLEAR_RECEPTORS	8273	1·021345984	0·00154782	0·039780267
REACTOME_NOTCH4_INTRACELLULAR_DOMAIN_REGULATES_TRANSCRIPTION	8270	1·022116459	0·001572958	0·039780267
REACTOME_CHONDROITIN_SULFATE	8268	1·032612899	0·001589925	0·039780267

	_DERMATAN_SULFATE_META BOLISM				
	KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERY THEMATOSUS	8267	1·070143867	0·00159847 1	0·039780267
	REACTOME_RUNX1_REGULAT ES_GENES _INVOLVED_IN_MEGAKARYO CYTE_ DIFFERENTIATION_AND_PLAT ELET_ FUNCTION	8267	1·046313144	0·00159847 1	0·039780267
	REACTOME_PLATELET_ACTIV ATION _SIGNALING_AND_AGGREGA TION	8263	1·024495232	0·00163308 1	0·039780267
	KEGG_VASCULAR_SMOOTH_ MUSCLE _CONTRACTION	8254	1·029242109	0·00171349	0·039780267
[0634]	REACTOME_G_ALPHA_12_13_ SIGNALLING_ EVENTS	8253	1·020677939	0·00172264 5	0·039780267
	KEGG_NEUROACTIVE_LIGAN D_RECEPTOR_ INTERACTION	8251	1·046701909	0·00174109 1	0·039780267
	REACTOME_G_ALPHA_I_SIGN ALLING_ EVENTS	8250	1·026857887	0·00175038 2	0·039780267
	REACTOME_NOTCH3_INTRAC ELLULAR_ DOMAIN_REGULATES_TRANS CRIPTION	8250	1·027200829	0·00175038 2	0·039780267
	PID_EPHRINB_REV_PATHWAY	8248	1·035588352	0·00176910 1	0·039780267
	REACTOME_BIOSYNTHESIS_O F_ SPECIALIZED_PRORESOLVING _MEDIATORS_SPMS	8248	1·062796091	0·00176910 1	0·039780267
	REACTOME_RUNX1_REGULAT	8246	1·039812053	0·00178800	0·039780267
[0635]	ES_ EXPRESSION_OF_COMPONEN TS_OF_TIGHT_JUNCTIONS			4	

[0636] 炎症在两个治疗组中都是预后性的

[0637] 还评估了总共2311个基因特征和通路的预后价值。在每个治疗分支中鉴定的顶部100个基因特征中,49个与两个分支中改善的无进展生存相关(表E;图14)。

[0638] 表E. sparta-DabTram和安慰剂-DabTram组中与改善的无进展生存相关的顶部基因特征

[0639]

	安慰剂-DabTram						Sparta-DabTram					
	测试	D F	p 值	HR	Avg Log CPM	FDR	测试	D F	p 值	HR	Avg Log CP M	FDR
Tcell_inflamed_1 8gene_Merck	6·99 7338 6	1	0·00 8163 1	0·77 5462 5	4·990 0542	0·15 4640 5	14·16 93644	1	0·00 0167 1	0·67 5738 5	5·03 0909 3	0·03 4122 4
PID_CD8_TCR_ DOWNSTREA M_PATHWAY	7·35 5282 5	1	0·00 6686 6	0·54 6390 6	3·885 8485	0·15 4640 5	13·22 59484	1	0·00 0276 1	0·41 2027 4	3·90 3971 7	0·03 4122 4
CD8_Tcell_Dan	9·47 0488 4	1	0·00 2088 0	0·73 3880 3	2·260 9517	0·15 4640 5	13·09 72479	1	0·00 0295 7	0·67 6074 5	2·32 1169 5	0·03 4122 4
Cytotoxic	9·47 0488 4	1	0·00 2088 0	0·73 3880 3	2·260 9517	0·15 4640 5	13·09 72479	1	0·00 0295 7	0·67 6074 5	2·32 1169 5	0·03 4122 4
REACTOME_IN TERFERON_ GAMMA_SIGN ALING	7·93 8180 3	1	0·00 4840 2	0·64 2313 9	5·538 3384	0·15 4640 5	12·61 17407	1	0·00 0383 3	0·55 4283 1	5·56 7972 4	0·03 4122 4
IFNG_28gene_ Merck	8·26 0108 4	1	0·00 4052 6	0·80 0167 7	4·181 2939	0·15 4640 5	12·55 93452	1	0·00 0394 2	0·74 1911 3	4·26 5457 0	0·03 4122 4
REACTOME_	6·83	1	0·00	0·68	3·816	0·15	12·00	1	0·00	0·57	3·84	0·03

[0640]

IMMUNOREGULATORY_INTERACTIONS_BETWEEN_A_LYMPHOID_AND_A_NON_LYMPHOID_CELL	5920 9		8934 3	3844 9	0393	4640 5	76453		0529 8	9256 0	5840 5	4122 4
PID_IL27_PATHWAY	7·56 1245 2	1	0·00 5963 7	0·57 2522 8	3·876 6134	0·15 4640 5	11·73 68010	1	0·00 0612 8	0·48 0207 2	3·91 1017 9	0·03 4122 4
Lineage_CD8T_Jincheng	8·74 8503 6	1	0·00 3098 6	0·82 6446 4	3·025 9587	0·15 4640 5	11·60 90260	1	0·00 0656 3	0·79 2288 8	3·09 7972 4	0·03 4122 4
BIOCARTA_CTL_PATHWAY	8·31 8433 9	1	0·00 3924 5	0·76 7491 6	4·861 7674	0·15 4640 5	11·25 53225	1	0·00 0794 0	0·70 9190 0	4·93 3063 0	0·03 4122 4
PID_IFNG_PATHWAY	6·56 6027 8	1	0·01 0394 4	0·36 9484 9	6·009 1049	0·15 9174 6	11·21 05077	1	0·00 0813 4	0·21 6943 6	6·01 8570 4	0·03 4122 4
M1_BMS	7·09 5402 3	1	0·00 7728 2	0·80 0382 6	3·510 3698	0·15 4640 5	11·17 87650	1	0·00 0827 4	0·73 2688 8	3·54 6668 7	0·03 4122 4
KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	9·30 8696 6	1	0·00 2280 7	0·41 4667 3	3·908 8796	0·15 4640 5	11·11 36270	1	0·00 0857 0	0·34 3541 7	3·92 0559 8	0·03 4122 4
NK_function_GlennDranoff	8·20 4217 7	1	0·00 4179 3	0·61 3449 9	2·733 9870	0·15 4640 5	11·03 54024	1	0·00 0893 9	0·53 3767 3	2·77 8298 9	0·03 4122 4
Lineage_CytotoxicT_AvivRegev	8·32 3661 4	1	0·00 3913 2	0·77 5403 9	2·668 3406	0·15 4640 5	11·01 22213	1	0·00 0905 1	0·71 5643 8	2·72 2106 9	0·03 4122 4
Lineage_immune_Jincheng	6·62 3703 9	1	0·01 0063 0	0·75 7147 7	3·476 7614	0·15 7289 6	10·91 99217	1	0·00 0951 4	0·66 5769 4	3·48 7478 1	0·03 4122 4

[0641]

BIOCARTA_IL5_PATHWAY	7-30 7546 1	1	0-00 6866 6	0-61 0800 5	2-934 4007	0-15 4640 5	10-75 73498	1	0-00 1038 7	0-53 2082 1	2-92 6696 7	0-03 4122 4
PID_IL12_STAT4_PATHWAY	7-91 8106 7	1	0-00 4894 2	0-66 0488 0	4-579 8373	0-15 4640 5	10-63 97521	1	0-00 1106 8	0-59 4495 8	4-58 9257 8	0-03 4122 4
BIOCARTA_IL17_PATHWAY	7-45 9969 4	1	0-00 6308 6	0-71 2660 3	2-974 1063	0-15 4640 5	10-54 74953	1	0-00 1163 5	0-64 3525 6	3-00 0977 5	0-03 4122 4
BIOCARTA_BLYMPHOCYTE_PATHWAY	6-49 0084 7	1	0-01 0847 8	0-80 2918 1	5-320 1350	0-15 9174 6	10-46 28898	1	0-00 1218 0	0-73 9229 8	5-35 0259 7	0-03 4122 4
KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	6-88 0083 1	1	0-00 8716 2	0-68 6760 4	3-647 3478	0-15 4640 5	10-43 56119	1	0-00 1236 1	0-61 1359 9	3-66 7598 3	0-03 4122 4
PID_CD8_TCR_PATHWAY	6-90 1344 9	1	0-00 8613 1	0-66 6070 5	5-199 6307	0-15 4640 5	10-43 48920	1	0-00 1236 6	0-58 2572 2	5-23 2761 0	0-03 4122 4
IFNG_10gene_Merck	8-16 1440 9	1	0-00 4279 0	0-81 2135 5	4-235 3116	0-15 4640 5	10-39 67359	1	0-00 1262 4	0-77 5511 0	4-27 0229 9	0-03 4122 4
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	6-81 3803 5	1	0-00 9045 6	0-55 8300 9	4-336 5758	0-15 4640 5	10-34 61942	1	0-00 1297 4	0-45 8965 5	4-34 5344 6	0-03 4122 4
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	7-32 0889 7	1	0-00 6815 8	0-49 9053 7	4-993 7133	0-15 4640 5	10-33 54581	1	0-00 1305 0	0-40 4448 3	5-01 2189 9	0-03 4122 4
PID_IL12_2PATHWAY	7-61 7886 3	1	0-00 5779 2	0-64 7944 6	4-462 8423	0-15 4640 5	10-33 29663	1	0-00 1306 8	0-57 6011 7	4-49 5255 0	0-03 4122 4
Lineage_Tfh_Aviregev	8-05 8273 5	1	0-00 4529 6	0-75 8278 9	4-130 0249	0-15 4640 5	10-27 82152	1	0-00 1346 1	0-70 0212 5	4-17 5777 1	0-03 4122 4

[0642]

KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	6-69 3137 7	1	0-00 9678 5	0-34 1109 1	3-659 8379	0-15 4640 5	10-24 88589	1	0-00 1367 7	0-23 1647 5	3-67 0751 4	0-03 4122 4
REACTOME_EXTRINSIC_PATHWAY_FOR_APOPTOSIS	6-44 7436 1	1	0-01 1111 3	0-57 8185 2	5-042 5196	0-16 0206 0	10-20 57748	1	0-00 1400 0	0-44 9760 5	5-05 9890 8	0-03 4122 4
Tcell_1	8-47 2565 5	1	0-00 3605 4	0-79 2063 9	3-040 3441	0-15 4640 5	10-09 54301	1	0-00 1486 4	0-76 3395 6	3-11 3850 7	0-03 4850 5
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	7-17 2405 5	1	0-00 7403 3	0-54 6923 2	5-514 9403	0-15 4640 5	9-996 4921	1	0-00 1568 4	0-44 9525 4	5-51 8075 1	0-03 5133 3
BIOCARTA_TCYTOTOXIC_PATHWAY	8-45 0772 1	1	0-00 3648 9	0-79 2796 7	4-612 7283	0-15 4640 5	9-973 1453	1	0-00 1588 4	0-76 6756 5	4-66 4819 7	0-03 5133 3
REACTOME_PDI_SIGNALING	7-45 3255 3	1	0-00 6332 2	0-79 2421 0	4-608 0733	0-15 4640 5	9-922 5125	1	0-00 1632 7	0-75 3123 7	4-63 9258 2	0-03 5133 3
Lineage_NK_Aviregev	8-05 9692 0	1	0-00 4526 1	0-68 9688 3	3-152 1564	0-15 4640 5	9-917 7223	1	0-00 1636 9	0-63 6649 2	3-14 1734 7	0-03 5133 3
BIOCARTA_NO2IL12_PATHWAY	8-53 3272 3	1	0-00 3487 1	0-72 8762 9	3-302 6567	0-15 4640 5	9-799 5431	1	0-00 1745 6	0-69 2283 3	3-34 2741 0	0-03 6409 1
BIOCARTA_CTLA4_PATHWAY	7-41 7565 4	1	0-00 6459 0	0-74 9120 2	4-449 2272	0-15 4640 5	9-768 8724	1	0-00 1774 9	0-70 1978 4	4-45 8235 2	0-03 6409 1
BIOCARTA_IL2RB_PATHWAY	7-58 0903 2	1	0-00 5899 0	0-50 1003 3	5-937 2363	0-15 4640 5	9-704 9239	1	0-00 1837 7	0-42 5897 9	5-96 8531 7	0-03 6409 1
BIOCARTA_TCAPOPTOSIS_PATHWAY	10-1 2238 82	1	0-00 1464 8	0-76 7313 6	3-670 5106	0-15 4640 5	9-596 2888	1	0-00 1949 7	0-75 8002 3	3-69 6721 8	0-03 6453 8
BIOCARTA_IL12_PATHWAY	8-85 3788 3	1	0-00 2924 8	0-65 1775 6	3-919 8493	0-15 4640 5	9-562 5741	1	0-00 1985 8	0-62 0242 7	3-95 3742 4	0-03 6453 8
PID_TCR_PATH	6-70	1	0-00	0-65	5-471	0-15	9-504	1	0-00	0-57	5-49	0-03

WAY	6042 4		9608 7	0935 4	9976	4640 5	4319		2049 8	5886 6	6264 0	6453 8
REACTOME_COSTIMULATION_BY_THE_CD28_FAMILY	6·75 4916 6	1	0·00 9349 0	0·59 8344 5	5·437 2828	0·15 4640 5	9·484 5167	1	0·00 2072 1	0·51 1985 6	5·45 0425 2	0·03 6453 8
REACTOME_TRANSLOCATION_OF_ZAP70_TO_IMMUNOLOGICAL_SYNAPSE	7·61 4396 2	1	0·00 5790 4	0·80 9926 2	4·723 1812	0·15 4640 5	9·476 8749	1	0·00 2080 8	0·78 1590 1	4·76 0855 5	0·03 6453 8
BIOCARTA_TCRA_PATHWAY	7·87 7720 3	1	0·00 5004 8	0·80 2836 8	5·009 9223	0·15 4640 5	9·456 4479	1	0·00 2104 1	0·77 4554 2	5·05 4534 9	0·03 6453 8
Bcell_2	7·77 5765 8	1	0·00 5295 2	0·81 6059 2	2·799 0354	0·15 4640 5	9·427 2769	1	0·00 2137 8	0·79 4924 7	2·97 5674 1	0·03 6503 0
REACTOME_GENERATION_OF_SECOND_MESSENGER_MOLECULES	7·26 6214 7	1	0·00 7026 4	0·74 7747 1	5·181 6082	0·15 4640 5	9·380 8282	1	0·00 2192 7	0·70 5900 1	5·21 1303 9	0·03 6503 0
General_immune_2	6·73 5189 6	1	0·00 9452 9	0·79 5762 6	3·854 3524	0·15 4640 5	9·320 0743	1	0·00 2266 6	0·75 0532 4	3·93 1788 4	0·03 6621 6
BIOCARTA_TCR_PATHWAY	6·89 3451 3	1	0·00 8651 2	0·53 5449 1	5·840 4331	0·15 4640 5	9·253 4551	1	0·00 2350 5	0·44 4658 7	5·85 9231 7	0·03 6667 7
BIOCARTA_TH1_PATHWAY	8·34 8148 0	1	0·00 3860 8	0·78 6879 3	4·843 3679	0·15 4640 5	9·105 0995	1	0·00 2549 0	0·76 7280 1	4·88 1030 6	0·03 6667 7
BIOCARTA_ASBCCELL_PATHWAY	7·82 5823 4	1	0·00 5150 5	0·70 8731 1	3·655 3289	0·15 4640 5	9·073 1863	1	0·00 2593 8	0·65 7656 2	3·63 4042 8	0·03 6667 7

[0644] CPM=每百万计数;DF=自由度;FDR=错误检测率;HR=风险比;安慰剂-DabTram=安慰剂加拉非尼和曲美替尼;sparta-DabTram=司他利珠单抗加拉非尼和曲美替尼。

[0645] 这种无偏分析富集了T细胞炎症性和NK细胞特异性特征。使用公认的T细胞炎症性特征和预定义的截止值(参见方法),与具有较高T细胞炎症性特征水平的患者相比,具有较低T细胞炎症性特征表达量的患者在所有两个治疗分支中都经历相对较差的临床结局(图14)。

[0646] 鉴于T细胞炎症性特征的预后性作用,通过数字病理学IHC表征所涉及的T细胞表型。在肿瘤和基质隔室内具有CD8+肿瘤浸润淋巴细胞“炎症性”或“excluded”表型的患者可能经历更有利的结果,而无论治疗分支如何(图15)。在具有“炎症”表型的患者中,用sparta-DabTram治疗具有更大的益处(图16)。数字病理学浸润分析揭示,在距肿瘤边缘30至150 $\mu\text{m}$ 内的多个条带中评估时,“炎症性”肿瘤样品在黑素瘤肿瘤巢中具有大量且均匀的CD8+肿瘤浸润淋巴细胞分布。

[0647] ctDNA脱落

[0648] 还从基线和治疗中的血液样品中分离循环肿瘤DNA(ctDNA)。疾病负荷的测量,包括升高的乳酸脱氢酶水平、增加的病变直径和更多数量的靶病变,与基线ctDNA水平相关(图17)。该特性也与最佳总体响应相关;与具有部分响应或稳定疾病的患者相比,实现完全响应的患者具有较低的基线ctDNA水平(图18)。基线和第8周ctDNA脱落在治疗分支中都具有预后性价值(图19A)。尽管基线ctDNA水平与疾病负荷的量度之间存在相关性,但在针对东部肿瘤协作组体能状态(ECOGPS)、疾病阶段、乳酸脱氢酶水平、BRAF突变状态和治疗进行调整后,仍然存在强预后性价值的证据(数据未显示)。此外,在基线处没有可检测的ctDNA的患者没有从sparta-DabTram获得治疗益处(图19B),而具有可检测的ctDNA的患者显示出改善的结果。

[0649] 据申请人所知,本文报道的COMBI-i的结果代表了在患有转移性黑素瘤的患者中可用的最大预期收集的生物标志物数据集,并突出了可以告知治疗选择的几个特性。

[0650] 这些结果证明PD-L1和炎性标志物与临床结局和对sparta-DabTram的响应的关联。据预测,被预测为仅从检查点抑制或靶向疗法获得有限益处的一些亚组可能受益于司他利珠单抗与达拉非尼和曲美替尼的组合。相反,注意到PD-L1水平通常与IFN- $\gamma$ ·特征的表达相关,这些结果证明PD-L1和炎性标志物与临床结局的更复杂的关联,其中由较高TMB定义的亚组产生最大的临床益处,而无关PD-L1状态如何;有趣的是,sparta-DabTram在PD-L1阴性/TMB高亚组中的益处特别显著,特别是在总体生存方面。高TMB与较高的突变频率相关,且因此对靶向治疗的获得性抗性突变的可能性更大;另一方面,高TMB还驱动免疫原性潜力,这可转化为对检查点抑制剂的持久应答。PD-L1阴性/TMB高可代表这样的亚群,其中与单独的PD-1抑制或靶向疗法相比,更多患者受益于检查点抑制加靶向疗法的组合。

[0651] 无论TMB如何,PD-L1阴性亚组中基线TIS较低,可能部分是由于较少的APC和因此较低的新抗原呈递;APC在来自PD-L1阴性/TMB高亚组的肿瘤样品中最少,其从sparta-DabTram获得最大的无进展和总体生存益处。然而,无论治疗组如何,较高水平的肿瘤内T细胞(如通过TIS或IHC评估的)都是积极预后的,这一结果可以想象部分地解释在整个患者群体中用sparta-DabTram观察到的有限治疗益处。此外,在PD-L1阴性/TMB高亚组之外观察到的有限的总体生存益处表明,靶向疗法-检查点抑制剂顺序对于某些亚组可能与组合一样有效,但可能对一些具有PD-L1阴性TMB高疾病的患者是有害的,因为用安慰剂-DabTram治疗的该亚组中的患者似乎从潜在的进展后暴露于检查点抑制中获得有限的益处。

[0652] 在这项分析中,sparta-DabTram的无进展生存存在具有BRAF V600K-突变型疾病的患者的相对较小的亚组中延长,所述患者通常比具有V600E-突变型疾病的患者更年长并且具有更高的突变负荷。在来自我们的数据集的V600K样品中发现DUSP6(如果MAPK通路被激活,其被上调)的较低表达水平(数据未显示)。在COMBI-i第1部分和第2部分中,很少或没有

基线ctDNA与完全应答相关。在分析中观察到低基线和/或降低的治疗中ctDNA水平的预后价值。在具有较高基线ctDNA脱落的患者中,sparta-DabTram的治疗益处更明显,类似于高TMB预示更大益处的临床发现。

[0653] 在COMBI-i中用sparta-DabTram观察到的治疗诱导的全身免疫效应是批准的PD-1抑制剂的典型特征。基于预选标志物的评估,sparta-DabTram诱导T细胞激活、增殖和细胞毒性活性,如CD38和HLA-DR的共表达,其广泛用于定义细胞毒性T细胞。该研究表明,血液CD4+/CD8+比例也与更大的sparta-DabTram益处相关,表明它是有用的非侵入性预测和预后指标。

[0654] 本分析将BRAF-突变型黑素瘤鉴定为其中将检查点抑制与靶向疗法组合可能不会导致相当大的药物非依赖性的适应症,因为由于毒性增加导致的剂量减少和中断可能损害功效。

[0655] 总之,这些结果突出了生物标志物分析定义可能更可能受益于给定治疗的患者群体的能力,以及在综合3期研究的环境中全面研究此类生物标志物是可行的事实。在具有高肿瘤突变负荷(包括具有BRAF V600K-突变疾病的那些)和较高疾病负荷(基于临床变量或ctDNA)的患者中观察到使用sparta-DabTram的治疗益处。具有PD-L1阴性/TMB高肿瘤的患者似乎从sparta-DabTram获得特定的无进展和总体生存益处。

[0656] 总的来说,这些数据提供了对肿瘤、微环境和对检查点抑制剂加靶向疗法组合的响应之间的关系见解,这些关联保证在前瞻性随机研究中作为预定义子集进行验证以告知临床决策。

[0657] 通过引用并入

[0658] 本文提及的所有出版物、专利和登录号均通过引用整体并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体和单独地指出通过引用并入一样。

[0659] 等同形式

[0660] 本文引用的每篇专利、专利申请和出版物的公开内容通过引用整体并入本文。虽然已经参考具体方面进行了本公开,但是显而易见的是,在不脱离本公开的真实精神和范围的情况下,本领域其他技术人员可以设计出本公开的其他方面和变型。所附权利要求旨在解释为包括所有这些方面和等同变型。

## 序列表

<110> NOVARTIS AG  
<120> 癌症生物标志物及其使用方法  
<130> C2160-7032W0  
<140>  
<141>  
<150> 63/162,964  
<151> 2021-03-18  
<160> 541  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<400> 1  
000  
<210> 2  
<400> 2  
000  
<210> 3  
<400> 3  
000  
<210> 4  
<400> 4  
000  
<210> 5  
<400> 5  
000  
<210> 6  
<400> 6  
000  
<210> 7  
<400> 7  
000  
<210> 8  
<400> 8  
000  
<210> 9  
<400> 9  
000  
<210> 10

<400> 10  
000  
<210> 11  
<400> 11  
000  
<210> 12  
<400> 12  
000  
<210> 13  
<400> 13  
000  
<210> 14  
<400> 14  
000  
<210> 15  
<400> 15  
000  
<210> 16  
<400> 16  
000  
<210> 17  
<400> 17  
000  
<210> 18  
<400> 18  
000  
<210> 19  
<400> 19  
000  
<210> 20  
<400> 20  
000  
<210> 21  
<400> 21  
000  
<210> 22  
<400> 22  
000  
<210> 23

<400> 23  
000  
<210> 24  
<400> 24  
000  
<210> 25  
<400> 25  
000  
<210> 26  
<400> 26  
000  
<210> 27  
<400> 27  
000  
<210> 28  
<400> 28  
000  
<210> 29  
<400> 29  
000  
<210> 30  
<400> 30  
000  
<210> 31  
<400> 31  
000  
<210> 32  
<400> 32  
000  
<210> 33  
<400> 33  
000  
<210> 34  
<400> 34  
000  
<210> 35  
<400> 35  
000  
<210> 36

<400> 36  
000  
<210> 37  
<400> 37  
000  
<210> 38  
<400> 38  
000  
<210> 39  
<400> 39  
000  
<210> 40  
<400> 40  
000  
<210> 41  
<400> 41  
000  
<210> 42  
<400> 42  
000  
<210> 43  
<400> 43  
000  
<210> 44  
<400> 44  
000  
<210> 45  
<400> 45  
000  
<210> 46  
<400> 46  
000  
<210> 47  
<400> 47  
000  
<210> 48  
<400> 48  
000  
<210> 49

<400> 49  
000  
<210> 50  
<400> 50  
000  
<210> 51  
<400> 51  
000  
<210> 52  
<400> 52  
000  
<210> 53  
<400> 53  
000  
<210> 54  
<400> 54  
000  
<210> 55  
<400> 55  
000  
<210> 56  
<400> 56  
000  
<210> 57  
<400> 57  
000  
<210> 58  
<400> 58  
000  
<210> 59  
<400> 59  
000  
<210> 60  
<400> 60  
000  
<210> 61  
<400> 61  
000  
<210> 62

<400> 62  
000  
<210> 63  
<400> 63  
000  
<210> 64  
<400> 64  
000  
<210> 65  
<400> 65  
000  
<210> 66  
<400> 66  
000  
<210> 67  
<400> 67  
000  
<210> 68  
<400> 68  
000  
<210> 69  
<400> 69  
000  
<210> 70  
<400> 70  
000  
<210> 71  
<400> 71  
000  
<210> 72  
<400> 72  
000  
<210> 73  
<400> 73  
000  
<210> 74  
<400> 74  
000  
<210> 75

<400> 75  
000  
<210> 76  
<400> 76  
000  
<210> 77  
<400> 77  
000  
<210> 78  
<400> 78  
000  
<210> 79  
<400> 79  
000  
<210> 80  
<400> 80  
000  
<210> 81  
<400> 81  
000  
<210> 82  
<400> 82  
000  
<210> 83  
<400> 83  
000  
<210> 84  
<400> 84  
000  
<210> 85  
<400> 85  
000  
<210> 86  
<400> 86  
000  
<210> 87  
<400> 87  
000  
<210> 88

<400> 88  
000  
<210> 89  
<400> 89  
000  
<210> 90  
<400> 90  
000  
<210> 91  
<400> 91  
000  
<210> 92  
<400> 92  
000  
<210> 93  
<400> 93  
000  
<210> 94  
<400> 94  
000  
<210> 95  
<400> 95  
000  
<210> 96  
<400> 96  
000  
<210> 97  
<400> 97  
000  
<210> 98  
<400> 98  
000  
<210> 99  
<400> 99  
000  
<210> 100  
<400> 100  
000  
<210> 101

<400> 101  
000  
<210> 102  
<400> 102  
000  
<210> 103  
<400> 103  
000  
<210> 104  
<400> 104  
000  
<210> 105  
<400> 105  
000  
<210> 106  
<400> 106  
000  
<210> 107  
<400> 107  
000  
<210> 108  
<400> 108  
000  
<210> 109  
<400> 109  
000  
<210> 110  
<400> 110  
000  
<210> 111  
<400> 111  
000  
<210> 112  
<400> 112  
000  
<210> 113  
<400> 113  
000  
<210> 114

<400> 114  
000  
<210> 115  
<400> 115  
000  
<210> 116  
<400> 116  
000  
<210> 117  
<400> 117  
000  
<210> 118  
<400> 118  
000  
<210> 119  
<400> 119  
000  
<210> 120  
<400> 120  
000  
<210> 121  
<400> 121  
000  
<210> 122  
<400> 122  
000  
<210> 123  
<400> 123  
000  
<210> 124  
<400> 124  
000  
<210> 125  
<400> 125  
000  
<210> 126  
<400> 126  
000  
<210> 127

<400> 127  
000  
<210> 128  
<400> 128  
000  
<210> 129  
<400> 129  
000  
<210> 130  
<400> 130  
000  
<210> 131  
<400> 131  
000  
<210> 132  
<400> 132  
000  
<210> 133  
<400> 133  
000  
<210> 134  
<400> 134  
000  
<210> 135  
<400> 135  
000  
<210> 136  
<400> 136  
000  
<210> 137  
<400> 137  
000  
<210> 138  
<400> 138  
000  
<210> 139  
<400> 139  
000  
<210> 140

<400> 140  
000  
<210> 141  
<400> 141  
000  
<210> 142  
<400> 142  
000  
<210> 143  
<400> 143  
000  
<210> 144  
<400> 144  
000  
<210> 145  
<400> 145  
000  
<210> 146  
<400> 146  
000  
<210> 147  
<400> 147  
000  
<210> 148  
<400> 148  
000  
<210> 149  
<400> 149  
000  
<210> 150  
<400> 150  
000  
<210> 151  
<400> 151  
000  
<210> 152  
<400> 152  
000  
<210> 153

<400> 153  
000  
<210> 154  
<400> 154  
000  
<210> 155  
<400> 155  
000  
<210> 156  
<400> 156  
000  
<210> 157  
<400> 157  
000  
<210> 158  
<400> 158  
000  
<210> 159  
<400> 159  
000  
<210> 160  
<400> 160  
000  
<210> 161  
<400> 161  
000  
<210> 162  
<400> 162  
000  
<210> 163  
<400> 163  
000  
<210> 164  
<400> 164  
000  
<210> 165  
<400> 165  
000  
<210> 166

<400> 166  
000  
<210> 167  
<400> 167  
000  
<210> 168  
<400> 168  
000  
<210> 169  
<400> 169  
000  
<210> 170  
<400> 170  
000  
<210> 171  
<400> 171  
000  
<210> 172  
<400> 172  
000  
<210> 173  
<400> 173  
000  
<210> 174  
<400> 174  
000  
<210> 175  
<400> 175  
000  
<210> 176  
<400> 176  
000  
<210> 177  
<400> 177  
000  
<210> 178  
<400> 178  
000  
<210> 179

<400> 179  
000  
<210> 180  
<400> 180  
000  
<210> 181  
<400> 181  
000  
<210> 182  
<400> 182  
000  
<210> 183  
<400> 183  
000  
<210> 184  
<400> 184  
000  
<210> 185  
<400> 185  
000  
<210> 186  
<400> 186  
000  
<210> 187  
<400> 187  
000  
<210> 188  
<400> 188  
000  
<210> 189  
<400> 189  
000  
<210> 190  
<400> 190  
000  
<210> 191  
<400> 191  
000  
<210> 192

<400> 192  
000  
<210> 193  
<400> 193  
000  
<210> 194  
<400> 194  
000  
<210> 195  
<400> 195  
000  
<210> 196  
<400> 196  
000  
<210> 197  
<400> 197  
000  
<210> 198  
<400> 198  
000  
<210> 199  
<400> 199  
000  
<210> 200  
<400> 200  
000  
<210> 201  
<400> 201  
000  
<210> 202  
<400> 202  
000  
<210> 203  
<400> 203  
000  
<210> 204  
<400> 204  
000  
<210> 205

<400> 205  
000  
<210> 206  
<400> 206  
000  
<210> 207  
<400> 207  
000  
<210> 208  
<400> 208  
000  
<210> 209  
<400> 209  
000  
<210> 210  
<400> 210  
000  
<210> 211  
<400> 211  
000  
<210> 212  
<400> 212  
000  
<210> 213  
<400> 213  
000  
<210> 214  
<400> 214  
000  
<210> 215  
<400> 215  
000  
<210> 216  
<400> 216  
000  
<210> 217  
<400> 217  
000  
<210> 218

<400> 218  
000  
<210> 219  
<400> 219  
000  
<210> 220  
<400> 220  
000  
<210> 221  
<400> 221  
000  
<210> 222  
<400> 222  
000  
<210> 223  
<400> 223  
000  
<210> 224  
<400> 224  
000  
<210> 225  
<400> 225  
000  
<210> 226  
<400> 226  
000  
<210> 227  
<400> 227  
000  
<210> 228  
<400> 228  
000  
<210> 229  
<400> 229  
000  
<210> 230  
<400> 230  
000  
<210> 231

<400> 231  
000  
<210> 232  
<400> 232  
000  
<210> 233  
<400> 233  
000  
<210> 234  
<400> 234  
000  
<210> 235  
<400> 235  
000  
<210> 236  
<400> 236  
000  
<210> 237  
<400> 237  
000  
<210> 238  
<400> 238  
000  
<210> 239  
<400> 239  
000  
<210> 240  
<400> 240  
000  
<210> 241  
<400> 241  
000  
<210> 242  
<400> 242  
000  
<210> 243  
<400> 243  
000  
<210> 244

<400> 244  
000  
<210> 245  
<400> 245  
000  
<210> 246  
<400> 246  
000  
<210> 247  
<400> 247  
000  
<210> 248  
<400> 248  
000  
<210> 249  
<400> 249  
000  
<210> 250  
<400> 250  
000  
<210> 251  
<400> 251  
000  
<210> 252  
<400> 252  
000  
<210> 253  
<400> 253  
000  
<210> 254  
<400> 254  
000  
<210> 255  
<400> 255  
000  
<210> 256  
<400> 256  
000  
<210> 257

<400> 257  
000  
<210> 258  
<400> 258  
000  
<210> 259  
<400> 259  
000  
<210> 260  
<400> 260  
000  
<210> 261  
<400> 261  
000  
<210> 262  
<400> 262  
000  
<210> 263  
<400> 263  
000  
<210> 264  
<400> 264  
000  
<210> 265  
<400> 265  
000  
<210> 266  
<400> 266  
000  
<210> 267  
<400> 267  
000  
<210> 268  
<400> 268  
000  
<210> 269  
<400> 269  
000  
<210> 270

<400> 270  
000  
<210> 271  
<400> 271  
000  
<210> 272  
<400> 272  
000  
<210> 273  
<400> 273  
000  
<210> 274  
<400> 274  
000  
<210> 275  
<400> 275  
000  
<210> 276  
<400> 276  
000  
<210> 277  
<400> 277  
000  
<210> 278  
<400> 278  
000  
<210> 279  
<400> 279  
000  
<210> 280  
<400> 280  
000  
<210> 281  
<400> 281  
000  
<210> 282  
<400> 282  
000  
<210> 283

<400> 283  
000  
<210> 284  
<400> 284  
000  
<210> 285  
<400> 285  
000  
<210> 286  
<400> 286  
000  
<210> 287  
<400> 287  
000  
<210> 288  
<400> 288  
000  
<210> 289  
<400> 289  
000  
<210> 290  
<400> 290  
000  
<210> 291  
<400> 291  
000  
<210> 292  
<400> 292  
000  
<210> 293  
<400> 293  
000  
<210> 294  
<400> 294  
000  
<210> 295  
<400> 295  
000  
<210> 296

<400> 296  
000  
<210> 297  
<400> 297  
000  
<210> 298  
<400> 298  
000  
<210> 299  
<400> 299  
000  
<210> 300  
<400> 300  
000  
<210> 301  
<400> 301  
000  
<210> 302  
<400> 302  
000  
<210> 303  
<400> 303  
000  
<210> 304  
<400> 304  
000  
<210> 305  
<400> 305  
000  
<210> 306  
<400> 306  
000  
<210> 307  
<400> 307  
000  
<210> 308  
<400> 308  
000  
<210> 309

<400> 309  
000  
<210> 310  
<400> 310  
000  
<210> 311  
<400> 311  
000  
<210> 312  
<400> 312  
000  
<210> 313  
<400> 313  
000  
<210> 314  
<400> 314  
000  
<210> 315  
<400> 315  
000  
<210> 316  
<400> 316  
000  
<210> 317  
<400> 317  
000  
<210> 318  
<400> 318  
000  
<210> 319  
<400> 319  
000  
<210> 320  
<400> 320  
000  
<210> 321  
<400> 321  
000  
<210> 322

<400> 322  
000  
<210> 323  
<400> 323  
000  
<210> 324  
<400> 324  
000  
<210> 325  
<400> 325  
000  
<210> 326  
<400> 326  
000  
<210> 327  
<400> 327  
000  
<210> 328  
<400> 328  
000  
<210> 329  
<400> 329  
000  
<210> 330  
<400> 330  
000  
<210> 331  
<400> 331  
000  
<210> 332  
<400> 332  
000  
<210> 333  
<400> 333  
000  
<210> 334  
<400> 334  
000  
<210> 335

<400> 335  
000  
<210> 336  
<400> 336  
000  
<210> 337  
<400> 337  
000  
<210> 338  
<400> 338  
000  
<210> 339  
<400> 339  
000  
<210> 340  
<400> 340  
000  
<210> 341  
<400> 341  
000  
<210> 342  
<400> 342  
000  
<210> 343  
<400> 343  
000  
<210> 344  
<400> 344  
000  
<210> 345  
<400> 345  
000  
<210> 346  
<400> 346  
000  
<210> 347  
<400> 347  
000  
<210> 348

<400> 348  
000  
<210> 349  
<400> 349  
000  
<210> 350  
<400> 350  
000  
<210> 351  
<400> 351  
000  
<210> 352  
<400> 352  
000  
<210> 353  
<400> 353  
000  
<210> 354  
<400> 354  
000  
<210> 355  
<400> 355  
000  
<210> 356  
<400> 356  
000  
<210> 357  
<400> 357  
000  
<210> 358  
<400> 358  
000  
<210> 359  
<400> 359  
000  
<210> 360  
<400> 360  
000  
<210> 361

<400> 361  
000  
<210> 362  
<400> 362  
000  
<210> 363  
<400> 363  
000  
<210> 364  
<400> 364  
000  
<210> 365  
<400> 365  
000  
<210> 366  
<400> 366  
000  
<210> 367  
<400> 367  
000  
<210> 368  
<400> 368  
000  
<210> 369  
<400> 369  
000  
<210> 370  
<400> 370  
000  
<210> 371  
<400> 371  
000  
<210> 372  
<400> 372  
000  
<210> 373  
<400> 373  
000  
<210> 374

<400> 374  
000  
<210> 375  
<400> 375  
000  
<210> 376  
<400> 376  
000  
<210> 377  
<400> 377  
000  
<210> 378  
<400> 378  
000  
<210> 379  
<400> 379  
000  
<210> 380  
<400> 380  
000  
<210> 381  
<400> 381  
000  
<210> 382  
<400> 382  
000  
<210> 383  
<400> 383  
000  
<210> 384  
<400> 384  
000  
<210> 385  
<400> 385  
000  
<210> 386  
<400> 386  
000  
<210> 387

<400> 387  
000  
<210> 388  
<400> 388  
000  
<210> 389  
<400> 389  
000  
<210> 390  
<400> 390  
000  
<210> 391  
<400> 391  
000  
<210> 392  
<400> 392  
000  
<210> 393  
<400> 393  
000  
<210> 394  
<400> 394  
000  
<210> 395  
<400> 395  
000  
<210> 396  
<400> 396  
000  
<210> 397  
<400> 397  
000  
<210> 398  
<400> 398  
000  
<210> 399  
<400> 399  
000  
<210> 400

<400> 400  
000  
<210> 401  
<400> 401  
000  
<210> 402  
<400> 402  
000  
<210> 403  
<400> 403  
000  
<210> 404  
<400> 404  
000  
<210> 405  
<400> 405  
000  
<210> 406  
<400> 406  
000  
<210> 407  
<400> 407  
000  
<210> 408  
<400> 408  
000  
<210> 409  
<400> 409  
000  
<210> 410  
<400> 410  
000  
<210> 411  
<400> 411  
000  
<210> 412  
<400> 412  
000  
<210> 413

<400> 413  
000  
<210> 414  
<400> 414  
000  
<210> 415  
<400> 415  
000  
<210> 416  
<400> 416  
000  
<210> 417  
<400> 417  
000  
<210> 418  
<400> 418  
000  
<210> 419  
<400> 419  
000  
<210> 420  
<400> 420  
000  
<210> 421  
<400> 421  
000  
<210> 422  
<400> 422  
000  
<210> 423  
<400> 423  
000  
<210> 424  
<400> 424  
000  
<210> 425  
<400> 425  
000  
<210> 426

<400> 426  
000  
<210> 427  
<400> 427  
000  
<210> 428  
<400> 428  
000  
<210> 429  
<400> 429  
000  
<210> 430  
<400> 430  
000  
<210> 431  
<400> 431  
000  
<210> 432  
<400> 432  
000  
<210> 433  
<400> 433  
000  
<210> 434  
<400> 434  
000  
<210> 435  
<400> 435  
000  
<210> 436  
<400> 436  
000  
<210> 437  
<400> 437  
000  
<210> 438  
<400> 438  
000  
<210> 439

<400> 439  
000  
<210> 440  
<400> 440  
000  
<210> 441  
<400> 441  
000  
<210> 442  
<400> 442  
000  
<210> 443  
<400> 443  
000  
<210> 444  
<400> 444  
000  
<210> 445  
<400> 445  
000  
<210> 446  
<400> 446  
000  
<210> 447  
<400> 447  
000  
<210> 448  
<400> 448  
000  
<210> 449  
<400> 449  
000  
<210> 450  
<400> 450  
000  
<210> 451  
<400> 451  
000  
<210> 452

<400> 452  
000  
<210> 453  
<400> 453  
000  
<210> 454  
<400> 454  
000  
<210> 455  
<400> 455  
000  
<210> 456  
<400> 456  
000  
<210> 457  
<400> 457  
000  
<210> 458  
<400> 458  
000  
<210> 459  
<400> 459  
000  
<210> 460  
<400> 460  
000  
<210> 461  
<400> 461  
000  
<210> 462  
<400> 462  
000  
<210> 463  
<400> 463  
000  
<210> 464  
<400> 464  
000  
<210> 465

<400> 465  
000  
<210> 466  
<400> 466  
000  
<210> 467  
<400> 467  
000  
<210> 468  
<400> 468  
000  
<210> 469  
<400> 469  
000  
<210> 470  
<400> 470  
000  
<210> 471  
<400> 471  
000  
<210> 472  
<400> 472  
000  
<210> 473  
<400> 473  
000  
<210> 474  
<400> 474  
000  
<210> 475  
<400> 475  
000  
<210> 476  
<400> 476  
000  
<210> 477  
<400> 477  
000  
<210> 478

<400> 478  
000  
<210> 479  
<400> 479  
000  
<210> 480  
<400> 480  
000  
<210> 481  
<400> 481  
000  
<210> 482  
<400> 482  
000  
<210> 483  
<400> 483  
000  
<210> 484  
<400> 484  
000  
<210> 485  
<400> 485  
000  
<210> 486  
<400> 486  
000  
<210> 487  
<400> 487  
000  
<210> 488  
<400> 488  
000  
<210> 489  
<400> 489  
000  
<210> 490  
<400> 490  
000  
<210> 491



<210> 502

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 502

Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe Lys

1

5

10

15

Asn

<210> 503

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 503

Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr

1

5

<210> 504

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 504

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1

5

<210> 505

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 505

Tyr Pro Gly Thr Gly Gly

1 5

<210> 506

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 506

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 507

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 507

gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgccgaa gtgaagaagc cggcgagtc actgagaatt 60

agctgtaaag gttcaggeta caccttcaact acctaactgga tgcactgggt ccgccagget 120

accggtaag gcctcgagtg gatgggtaat atctaccccg gcaccggcgg ctctaacttc 180

gacgagaagt ttaagaatag agtgactatc accgccgata agtctactag caccgcctat 240

atggaactgt ctagcctgag atcagaggac accgccgtct actactgcac taggtggact 300

accggcacag ggcctactg gggtaaggc actaccgtga ccgtgtctag c 351

<210> 508

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 508

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr  
                   20                   25                   30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                   40                   45

Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Phe Asp Glu Lys Phe  
                   50                   55                   60

Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95

Thr Arg Trp Thr Thr Gly Thr Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
                   100                   105                   110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
                   115                   120                   125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
                   130                   135                   140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145                   150                   155                   160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
                   165                   170                   175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
                   180                   185                   190

Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn  
                   195                   200                   205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro  
                   210                   215                   220

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 225                   230                   235                   240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 245 250 255  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe  
 260 265 270  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
 275 280 285  
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
 290 295 300  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
 325 330 335  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln  
 340 345 350  
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
 355 360 365  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 370 375 380  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 420 425 430  
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440

<210> 509

<211> 1329

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 509

gaggtgcagc tgggtgcagtc aggcgcccga g tgaagaagc cggcgagtc actgagaatt 60  
 agctgtaaag gttcaggeta caccttcaact acctactgga tgcactgggt ccgccagget 120  
 accggtcaag gcctcgagtg gatgggtaat atctaccccg gcaccggcgg ctctaacttc 180  
 gacgagaagt ttaagaatag agtgactatc accgccgata agtctactag caccgcctat 240  
 atggaactgt ctagcctgag atcagaggac accgccgtct actactgcac taggtggact 300

accggcacag ggcctactg ggtcaaggc actaccgtga ccgtgtctag cgctagcact 360  
 aagggcccgt ccgtgttccc cctggcacct tgtagccgga gcactagcga atccaccgct 420  
 gccctcggct gcctgggtcaa ggattacttc ccggagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc 480  
 ggagccctga cctccggagt gcacacctic cccgctgtgc tgcagagctc cgggctgtac 540  
 tcgctgtcgt cgggtggtcac ggtgccttca tctagcctgg gtaccaagac ctacacttgc 600  
 aacgtggacc acaagccttc caacactaag gtggacaagc gcgtcgaatc gaagtacggc 660  
 ccaccgtgcc cgcttgtcc cgcgccggag ttctcggcg gtccctcggc ttttctgttc 720  
 ccaccgaagc ccaaggacac tttgatgatt tcccgcacc ctgaagtac atgcgtggtc 780  
 gtggacgtgt cacaggaaga tccggagggt cagttcaatt ggtacgtgga tggcgtcgag 840  
 gtgcacaacg ccaaaaacaa gccgagggag gagcagttca actccactta ccgcgtcgtg 900  
 tccgtgtgca cgggtgtgca tcaggactgg ctgaacggga aggagtacaa gtgcaaagtg 960  
 tccaacaagg gacttcctag ctcaatcgaa aagaccatct cgaaagccaa gggacagccc 1020  
 cgggaacccc aagtgtatac cctgccaccg agccaggaag aatgactaa gaaccaagtc 1080  
 tcattgactt gccttgtgaa gggettctac ccatcgata tcgccgtgga atgggagtc 1140  
 aacggccagc cggaaaacaa ctacaagacc accctcgg tgctggactc agacggatcc 1200  
 ttcttcctct actcgcggct gaccgtgat aagagcagat ggcaggaggg aatgtgttc 1260  
 agctgttctg tgatgcatga agccctgcac aaccactaca ctcagaagtc cctgtccctc 1320  
 tcctggga 1329

<210> 510

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 510

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu

1

5

10

15

Thr

<210> 511

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"

<400> 511

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5



1 5  
 <210> 516  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /备注="人工序列的描述:合成的肽"  
 <400> 516  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 35 40 45  
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95  
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys

<210> 517  
 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /备注="人工序列的描述:合成的多核苷酸"  
 <400> 517  
 gagatcgccc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gcgggctaca 60  
 ctgagctgta aatctagtca gtcaactgctg gatagcggta atcagaagaa cttcctgacc 120  
 tggatcagc agaagcccgg taaagcccct aagctgctga tctactgggc ctctactaga 180  
 gaatcaggcg tgcctctag gtttagcggg agcggtagtg gcaccgactt caccttact 240  
 atctctagcc tgcagcccga ggatatcgct acctactact gtcagaacga ctatagctac 300  
 ccctacacct tcggtcaagg cactaaggtc gagattaag 339  
 <210> 518

<211> 220  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"  
 <400> 518  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                   20                   25                   30  
 Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
                   35                   40                   45  
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
                   50                   55                   60  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
 65                   70                   75                   80  
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn  
                   85                   90                   95  
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
                   100                   105                   110  
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
                   115                   120                   125  
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
                   130                   135                   140  
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 145                   150                   155                   160  
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
                   165                   170                   175  
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
                   180                   185                   190  
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
                   195                   200                   205  
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210                   215                   220  
 <210> 519  
 <211> 660  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <221> 来源  
 <223> /备注="人工序列的描述:合成的多核苷酸"  
 <400> 519  
 gagatcgtcc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gcgggctaca 60  
 ctgagctgta aatctagtca gtcactgctg gatagcggtg atcagaagaa cttcctgacc 120  
 tggatcagc agaagcccgg taaagcccct aagctgctga tctactgggc ctctactaga 180  
 gaatcaggcg tgccctctag gtttagcggt agcggtagtg gcaccgactt caccttact 240  
 atctctagcc tgcagcccga ggatategct acctactact gtcagaacga ctatagctac 300  
 ccctacacct tcggtaagg cactaaggtc gagattaagc gtacgggtggc cgctcccagc 360  
 gtgttcatct tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtgggtgtgc 420  
 ctgctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccttg 480  
 cagagcggca acagccagga gagegtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540  
 ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc 600  
 gaggtgacc accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcgagtgc 660  
 <210> 520  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> source  
 <221> 来源  
 <223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"  
 <400> 520  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn  
 85 90 95  
 Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110  
 Lys

<210> 521	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的多核苷酸"	
<400> 521	
gagatcgccc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gcgggctaca	60
ctgagctgta aatctagtca gtcactgctg gatagcggtg atcagaagaa cttcctgacc	120
tggtatcagc agaagcccgg tcaagcccct agactgctga tctactgggc ctctactaga	180
gaatcaggcg tgccctctag gtttagcggt agcggtagtg gcaccgactt caccttact	240
atctctagcc tggagccga ggacgccgt acctactact gtcagaacga ctatagctac	300
ccctacacct tcggtcaagg cactaaggtc gagattaag	339
<210> 522	
<211> 220	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"	
<400> 522	
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1                    5                    10                    15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser	
20                    25                    30	
Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
35                    40                    45	
Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50                    55                    60	
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr	
65                    70                    75                    80	
Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn	
85                    90                    95	
Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	
100                    105                    110	
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	
115                    120                    125	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	

130	135	140	
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
	165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr			
	180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser			
	195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210	215	220
<210> 523			
<211> 660			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /备注="人工序列的描述:合成的多核苷酸"			
<400> 523			
gagatcgtcc tgactcagtc acccgctacc ctgagcctga gccctggcga gcgggctaca			60
ctgagctgta aatctagtca gtcactgctg gatagcggta atcagaagaa cttcctgacc			120
tggtatcagc agaagcccgg tcaagcccct agactgctga tctactgggc ctctactaga			180
gaatcaggcg tgccctctag gtttagcggg agcggtagtg gcaccgactt caccttact			240
atctctagcc tggaagccga ggacgcccgt acctactact gtcagaacga ctatagctac			300
ccctacacct tcggtcaagg cactaaggtc gagattaagc gtacgggtggc cgctcccagc			360
gtgttcatct tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtgggtgtgc			420
ctgctgaaca acttctaccc ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg			480
cagagcggca acagccagga gagcgtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc			540
ctgagcagca ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcataaggt gtacgcctgc			600
gaggtgaccc accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gtttcaacag gggcgagtgc			660
<210> 524			
<211> 15			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"			
<400> 524			
acctactgga tgcac			15

<210> 525	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 525	
aatatctacc ccggcaccgg cggtctaac ttcgacgaga agtttaagaa t	51
<210> 526	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 526	
tggactaccg gcacaggcgc ctac	24
<210> 527	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 527	
ggctacacct tcactaccta c	21
<210> 528	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 528	
taccccgga ccggcggc	18
<210> 529	
<211> 51	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 529	
aaatctagtc agtcactgct ggatagcggg aatcagaaga acttcctgac c	51
<210> 530	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 530	
tgggcctcta ctagagaatc a	21
<210> 531	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> source	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 531	
cagaacgact atagctaccc ctacacc	27
<210> 532	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 532	
agtcagtcac tgctggatag cggtaatcag aagaacttc	39
<210> 533	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 533	
tgggcctct	9
<210> 534	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的寡核苷酸"	
<400> 534	
gactatagct acccctac	18
<210> 535	
<211> 440	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"	
<400> 535	
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1                    5                    10                    15	
Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser	
20                    25                    30	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35                    40                    45	
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50                    55                    60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe	
65                    70                    75                    80	
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85                    90                    95	
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	
100                    105                    110	
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser	
115                    120                    125	
Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp	
130                    135                    140	

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
 165 170 175  
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys  
 180 185 190  
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
 195 200 205  
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 210 215 220  
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 245 250 255  
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
 260 265 270  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 275 280 285  
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 290 295 300  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
 305 310 315 320  
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 325 330 335  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
 340 345 350  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 355 360 365  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 370 375 380  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 385 390 395 400  
 Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
 405 410 415  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 420 425 430  
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440  
 <210> 536

<211> 214  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <221> 来源  
 <223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"  
 <400> 536  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
                   20                   25                   30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
                   35                   40                   45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
                   50                   55                   60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65                   70                   75                   80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg  
                   85                   90                   95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                   100                   105                   110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                   115                   120                   125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
                   130                   135                   140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                   150                   155                   160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                   165                   170                   175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                   180                   185                   190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                   195                   200                   205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210  
 <210> 537  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 537

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20						25					30	
Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35						40					45	
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe
			50						55					60	
Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr
65									70					75	
Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
									85					90	
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
									100					105	
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
									115					120	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala
									130					135	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145									150					155	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
									165					170	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
									180					185	
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
									195					200	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
									210					215	
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225									230					235	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
									245					250	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
									260					265	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys

275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 538		
<211> 218		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /备注="人工序列的描述:合成的多肽"		
<400> 538		
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser		
20	25	30
Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro		
35	40	45
Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
65	70	75
		80



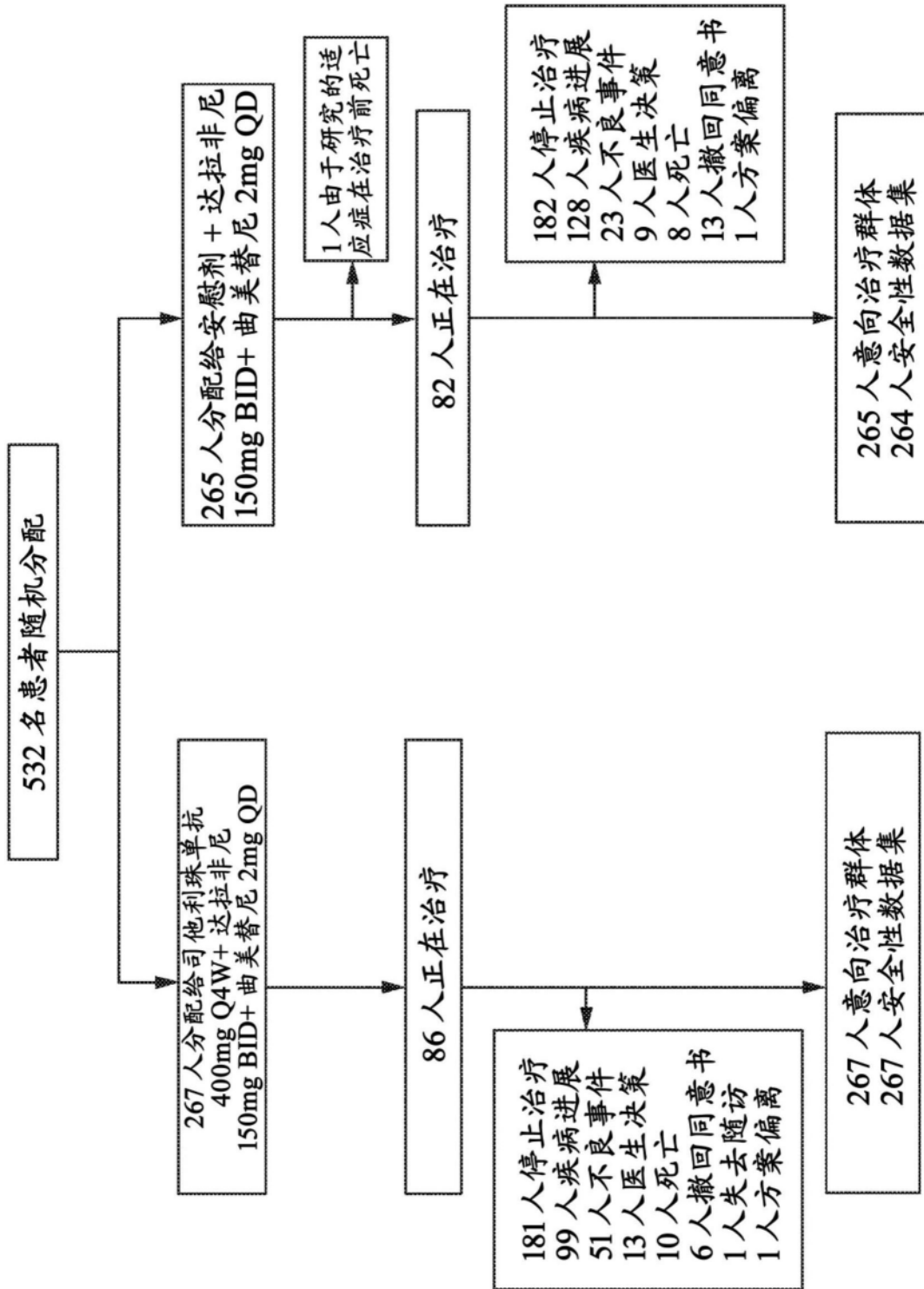


图1

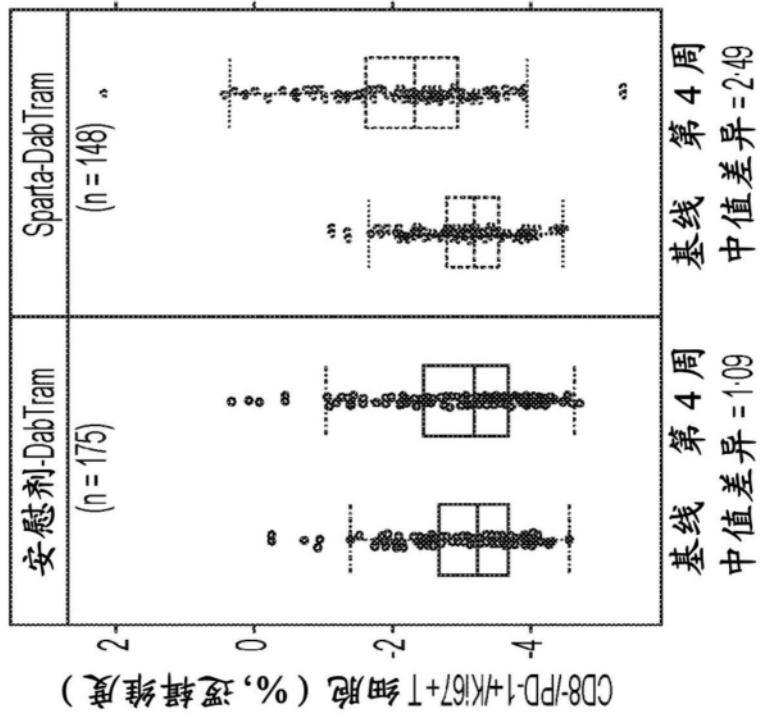


图2A

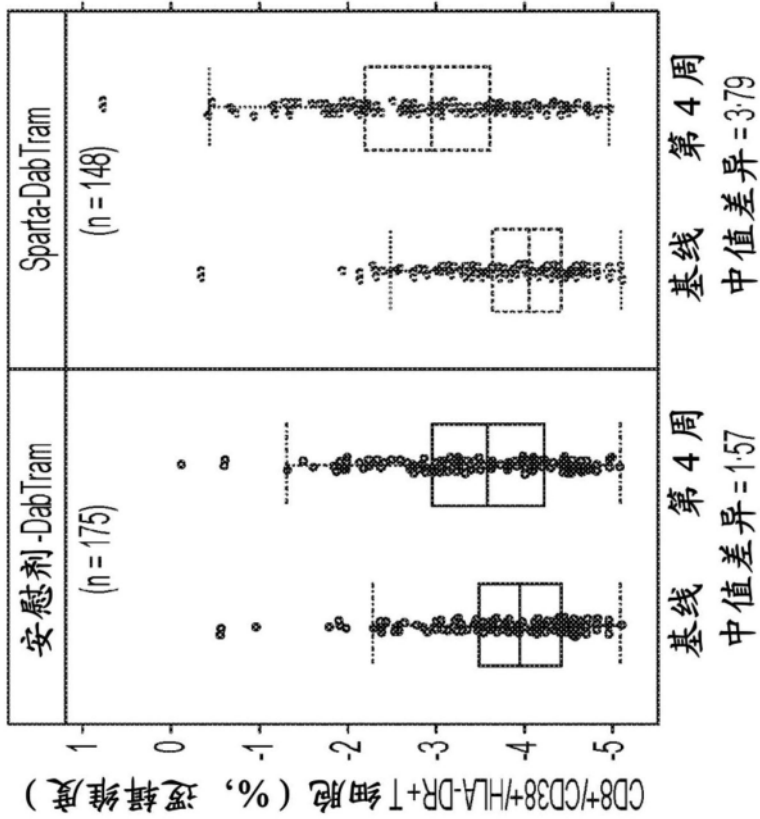


图2B

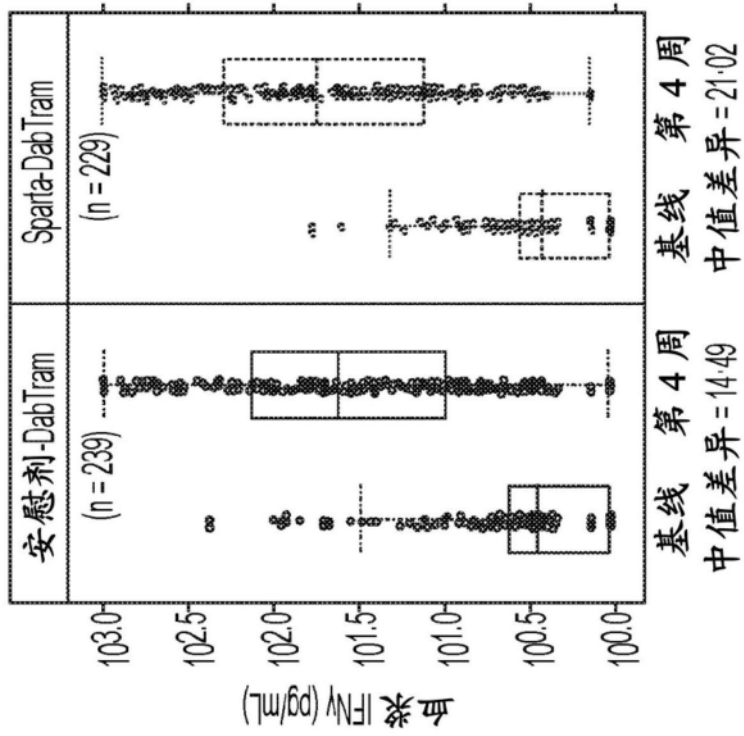


图2C

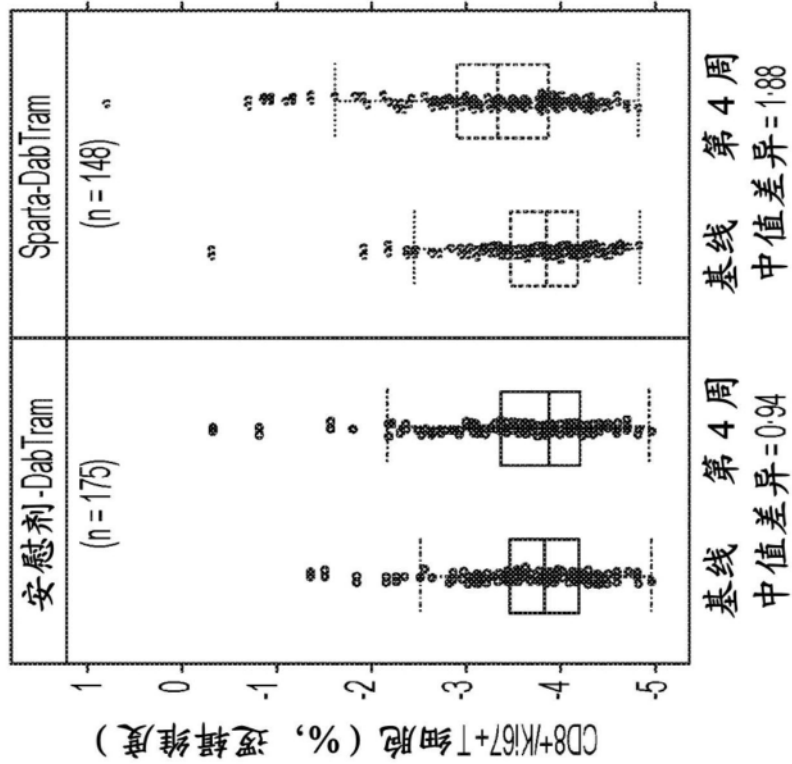


图3A

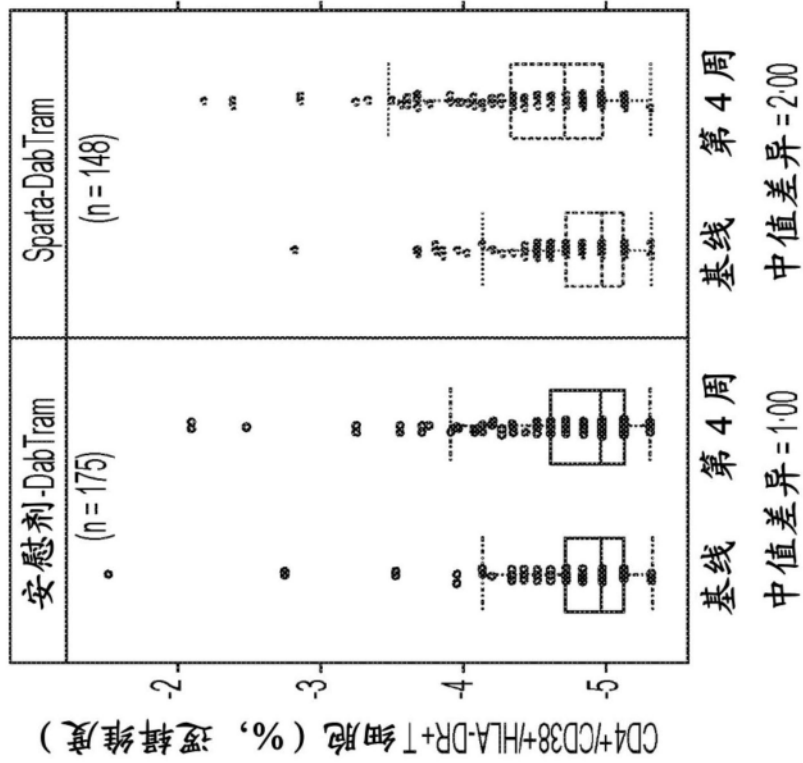


图3B

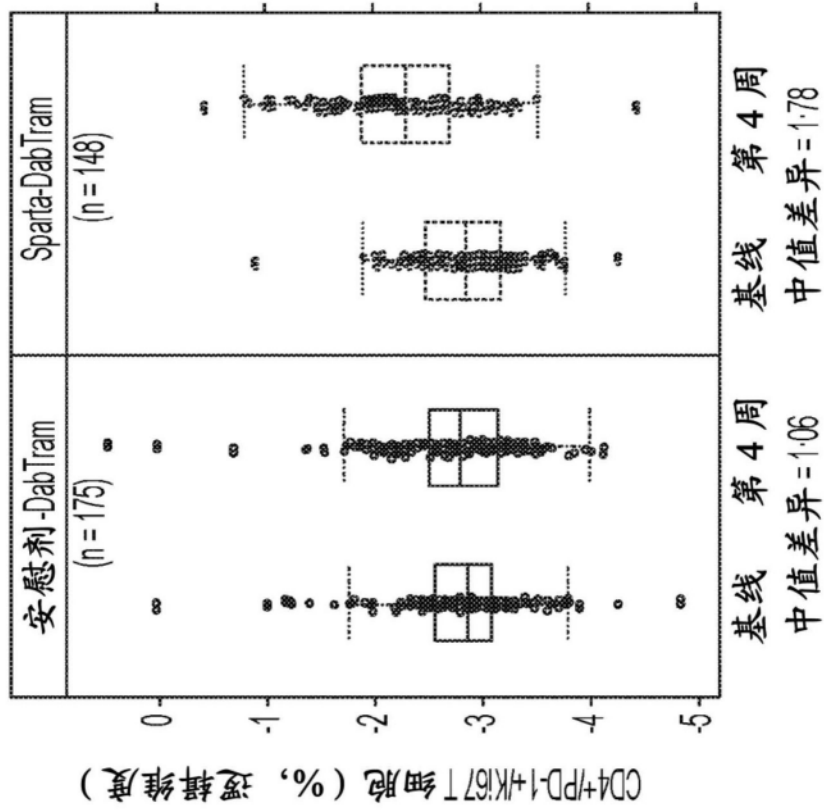


图3C

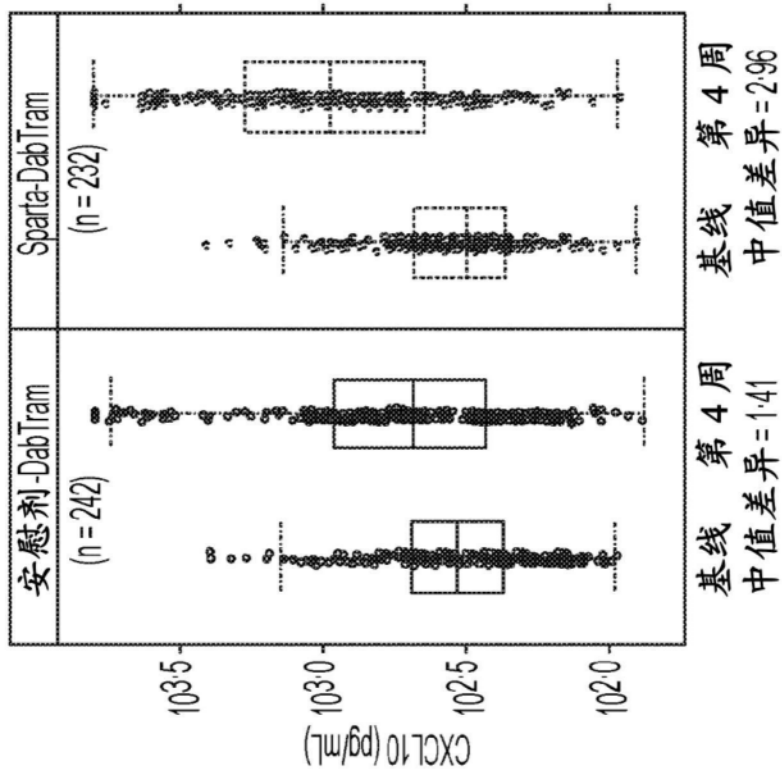


图4A

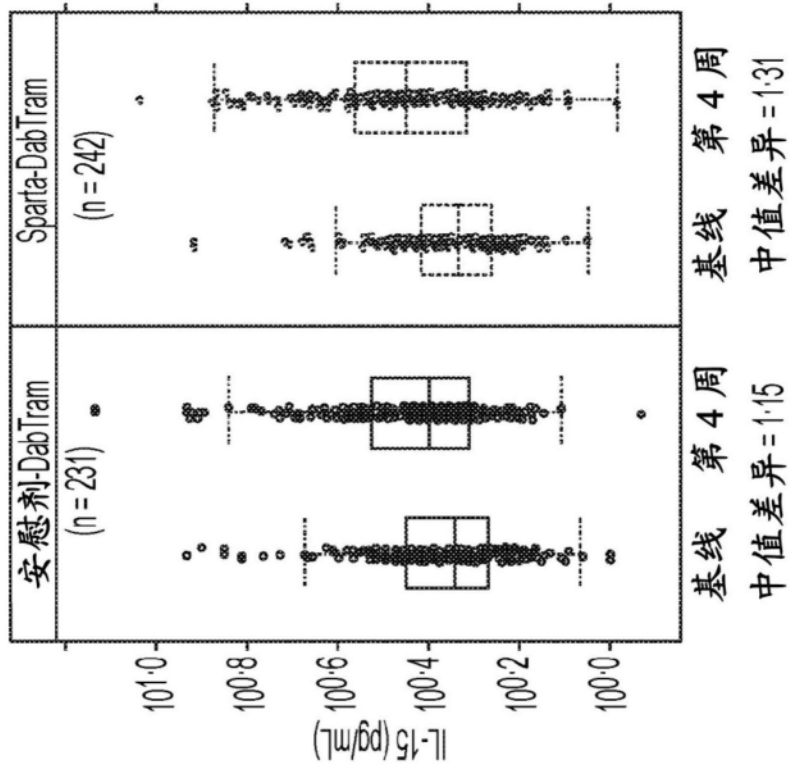


图4B

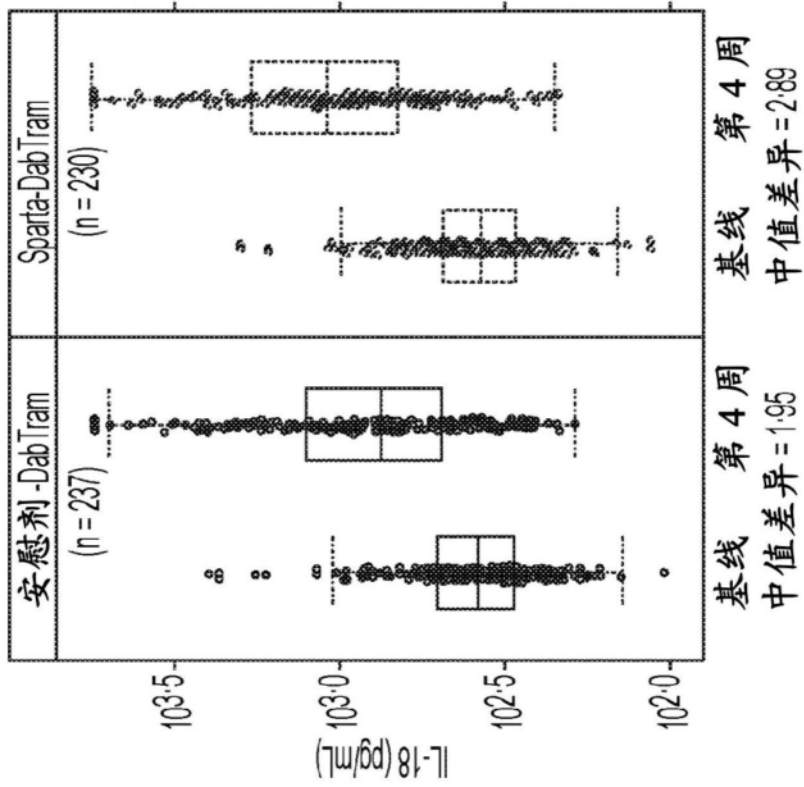


图4C

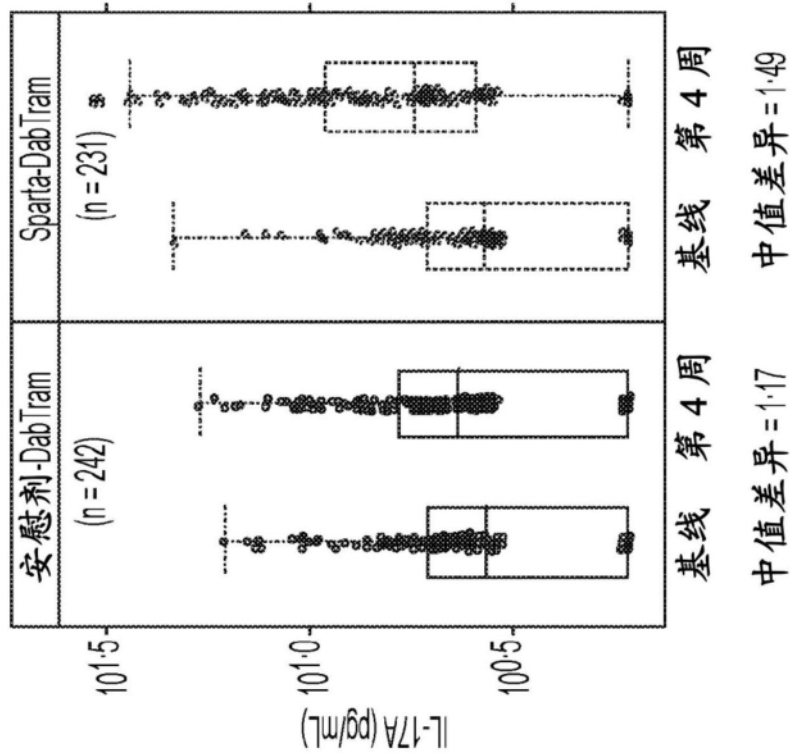


图4D

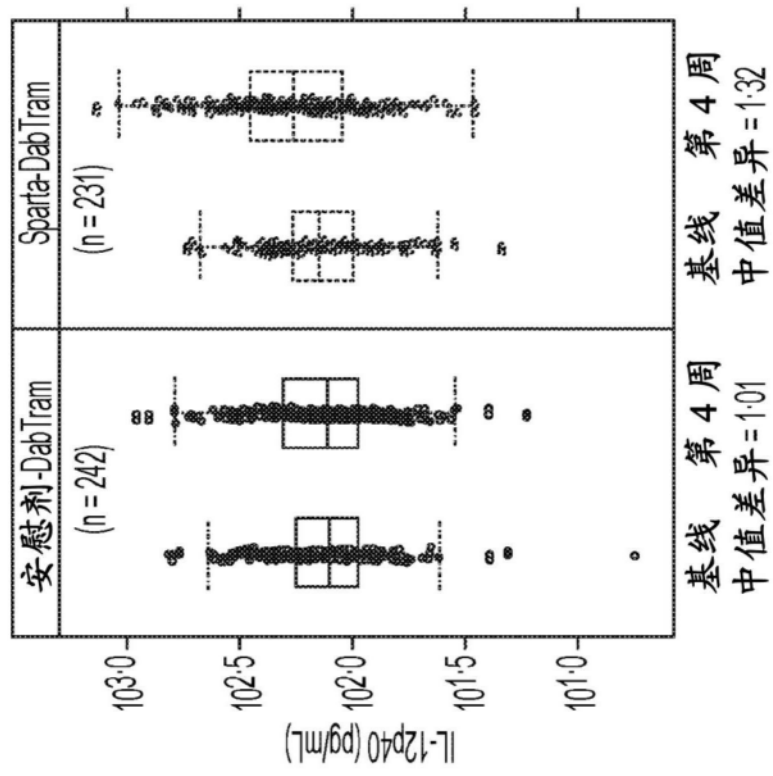


图4E

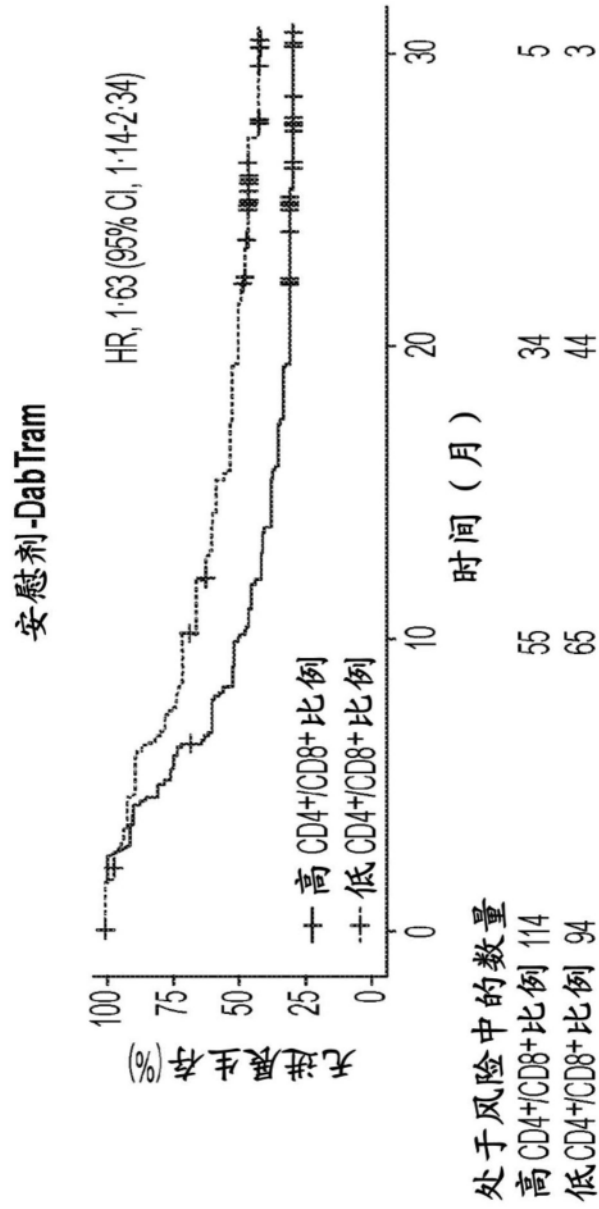


图5A

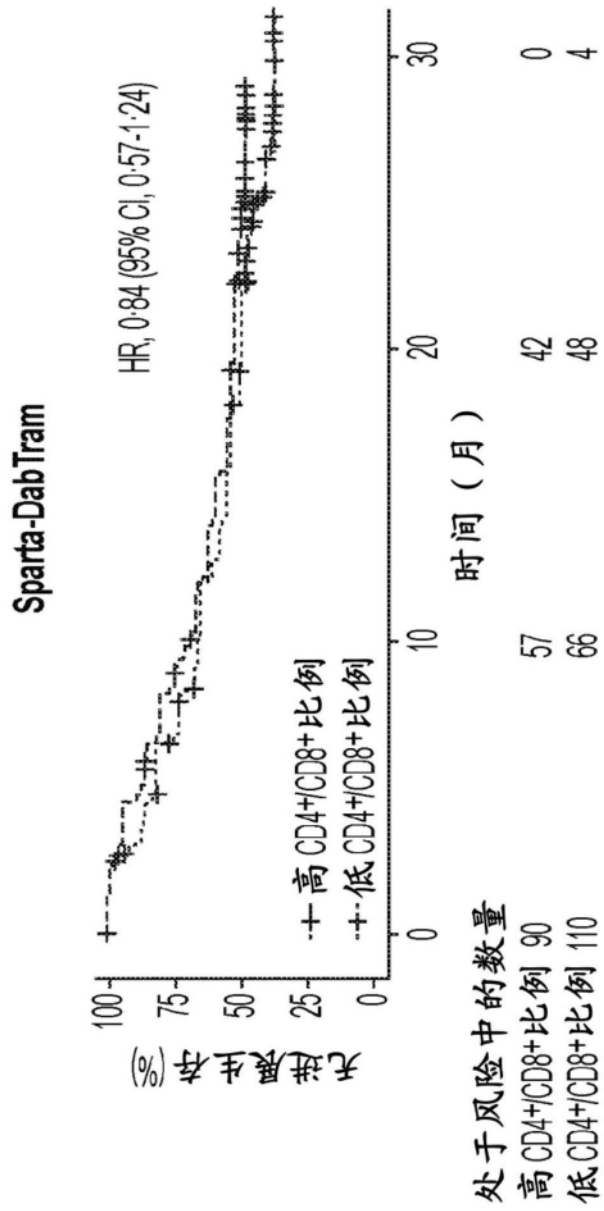


图5B

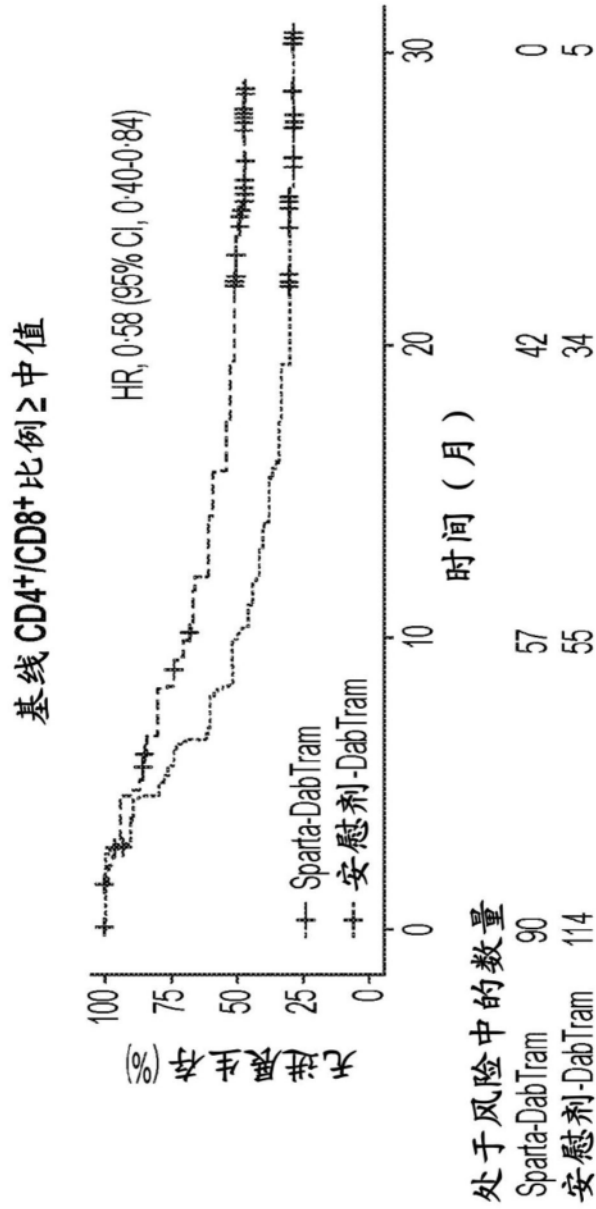


图6A

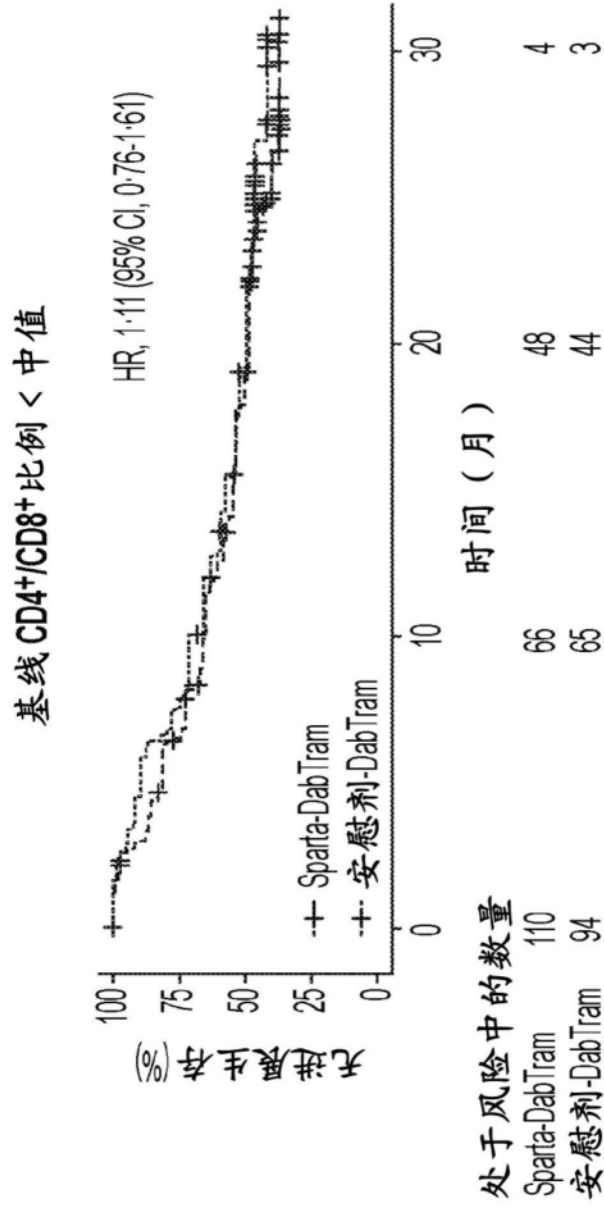


图6B

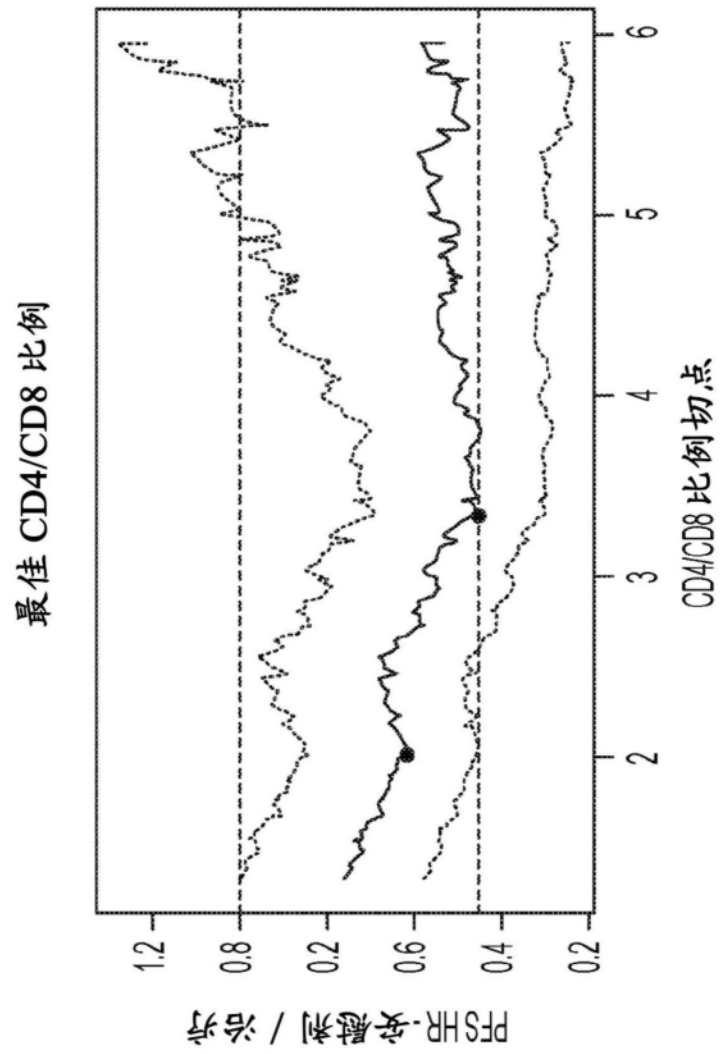


图6C

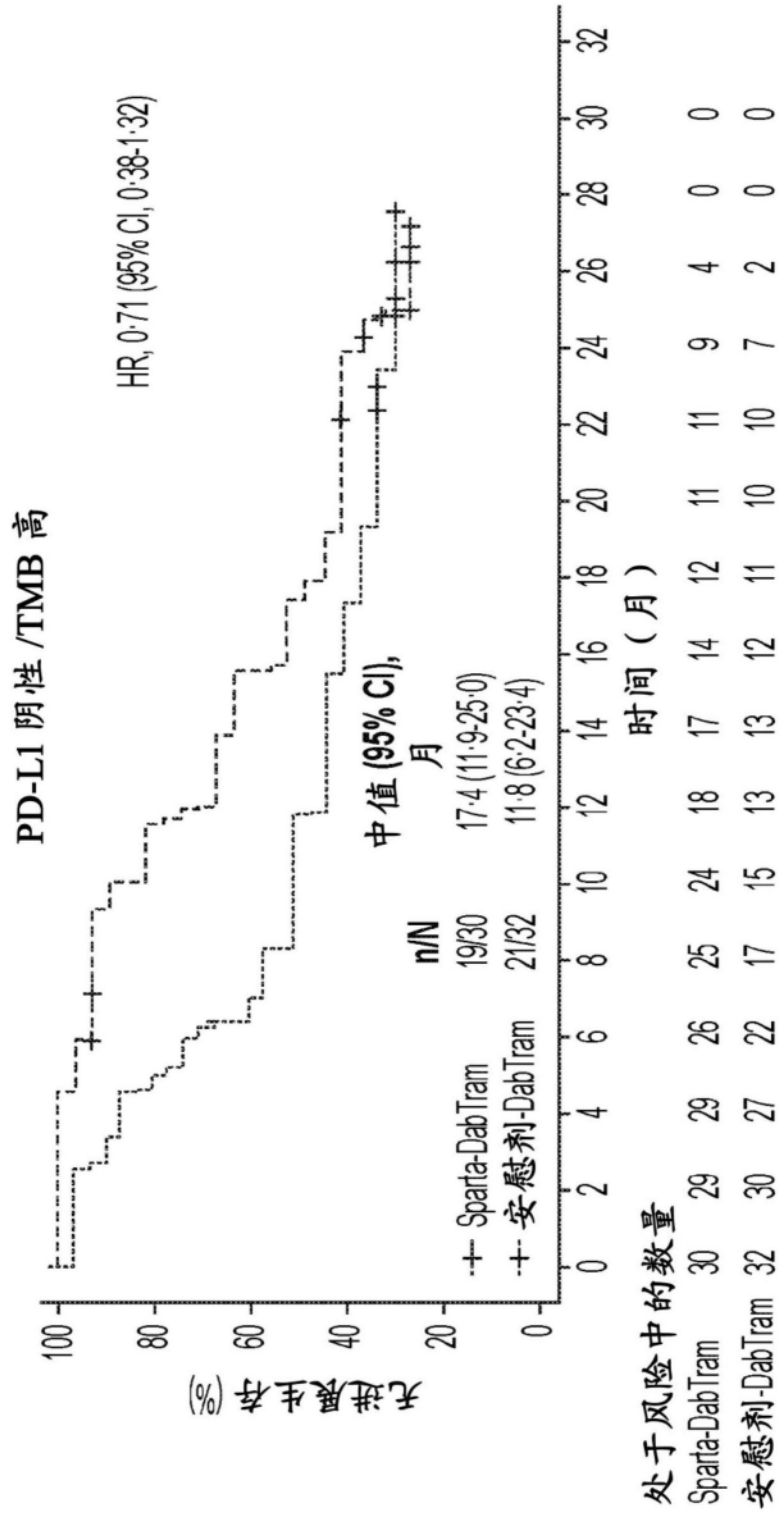


图7A

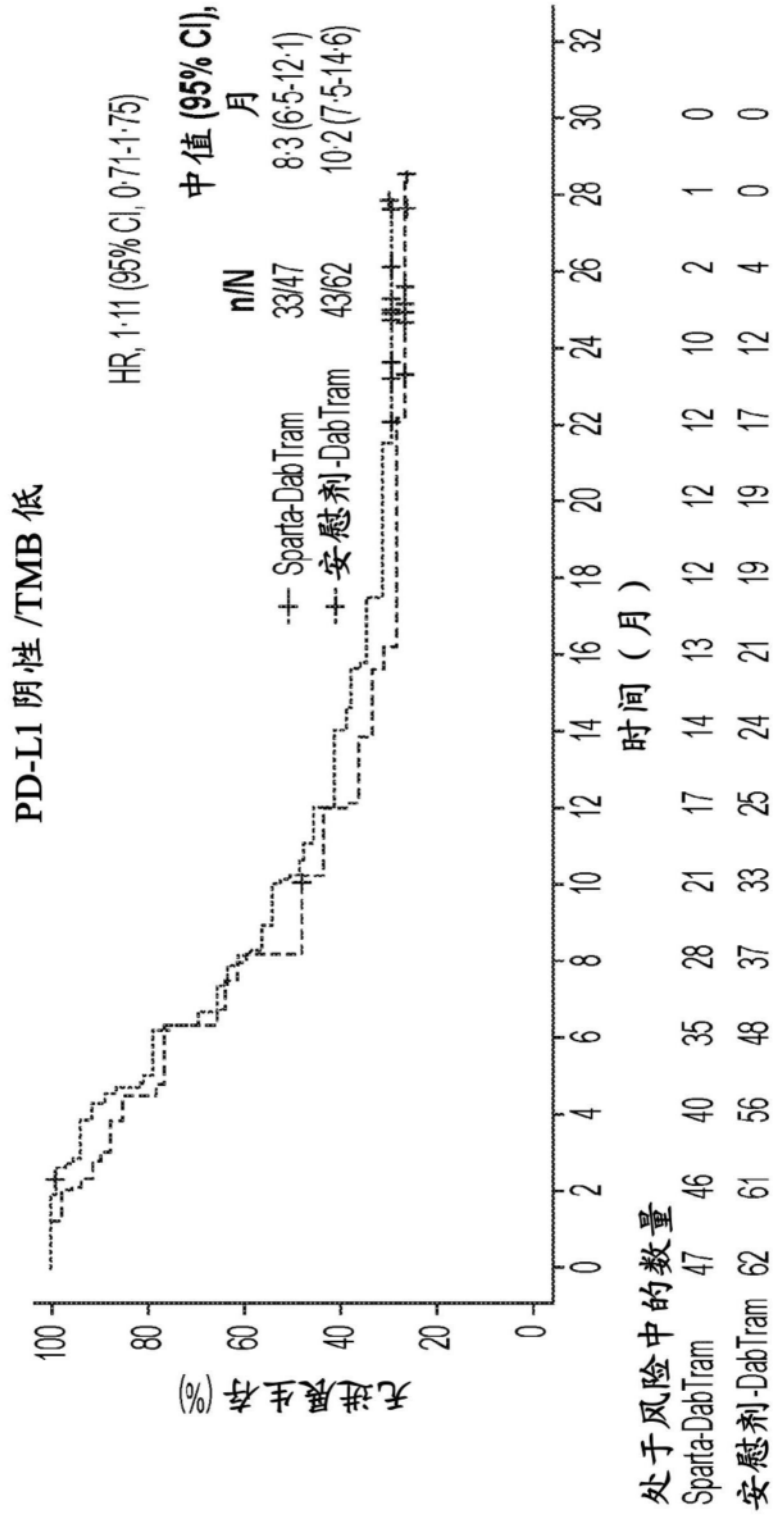


图7A(续)

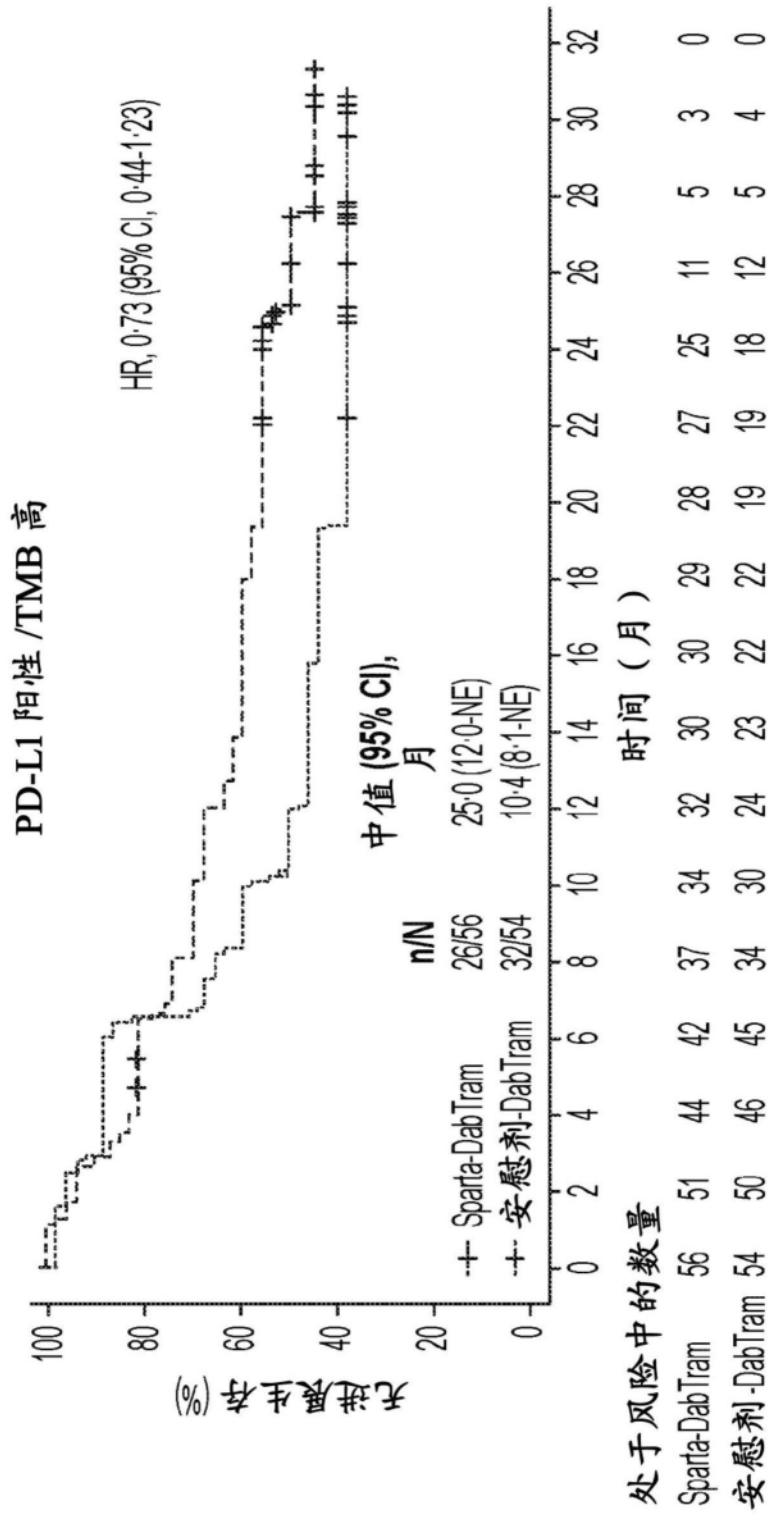


图7A(续)

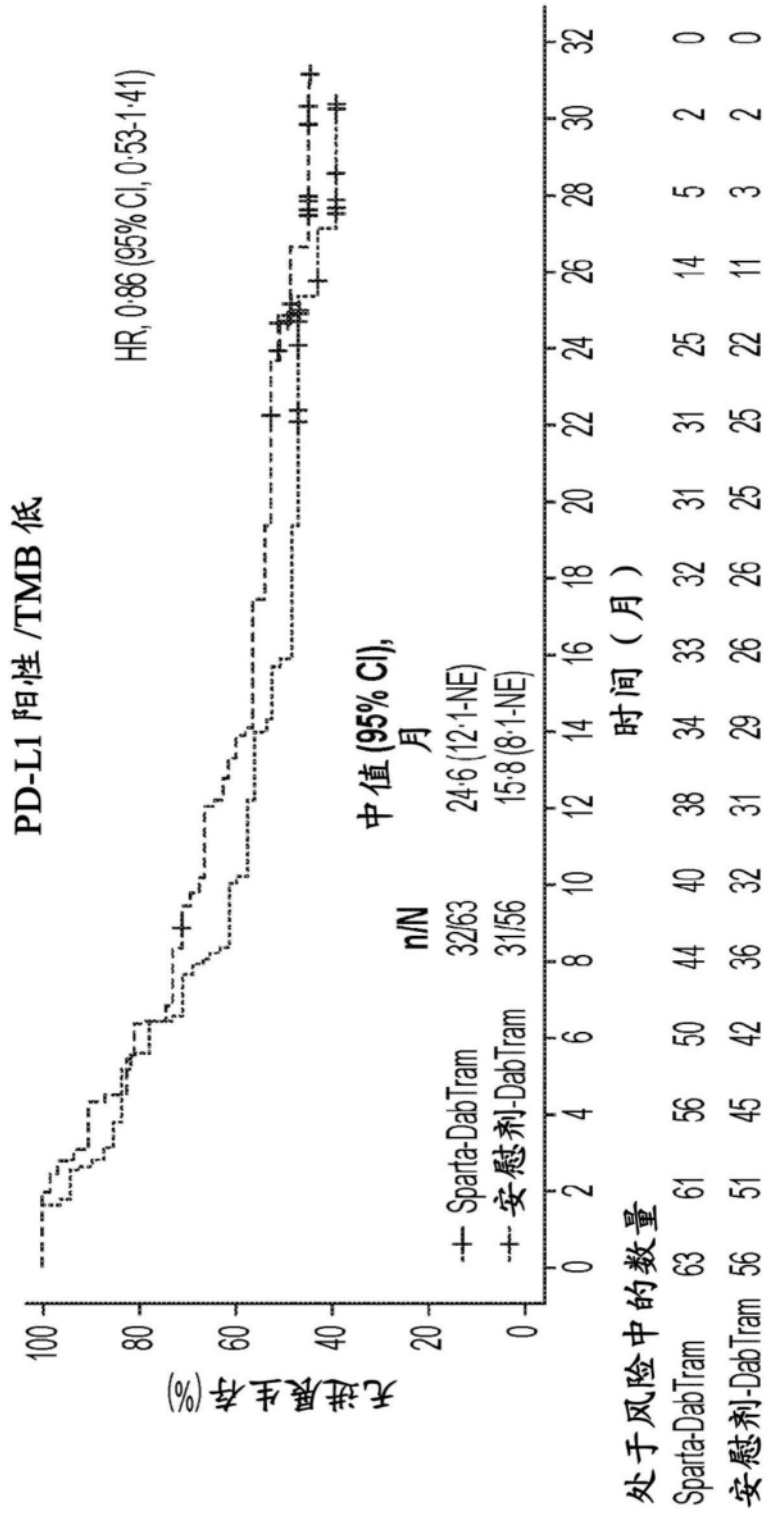


图7A(续)

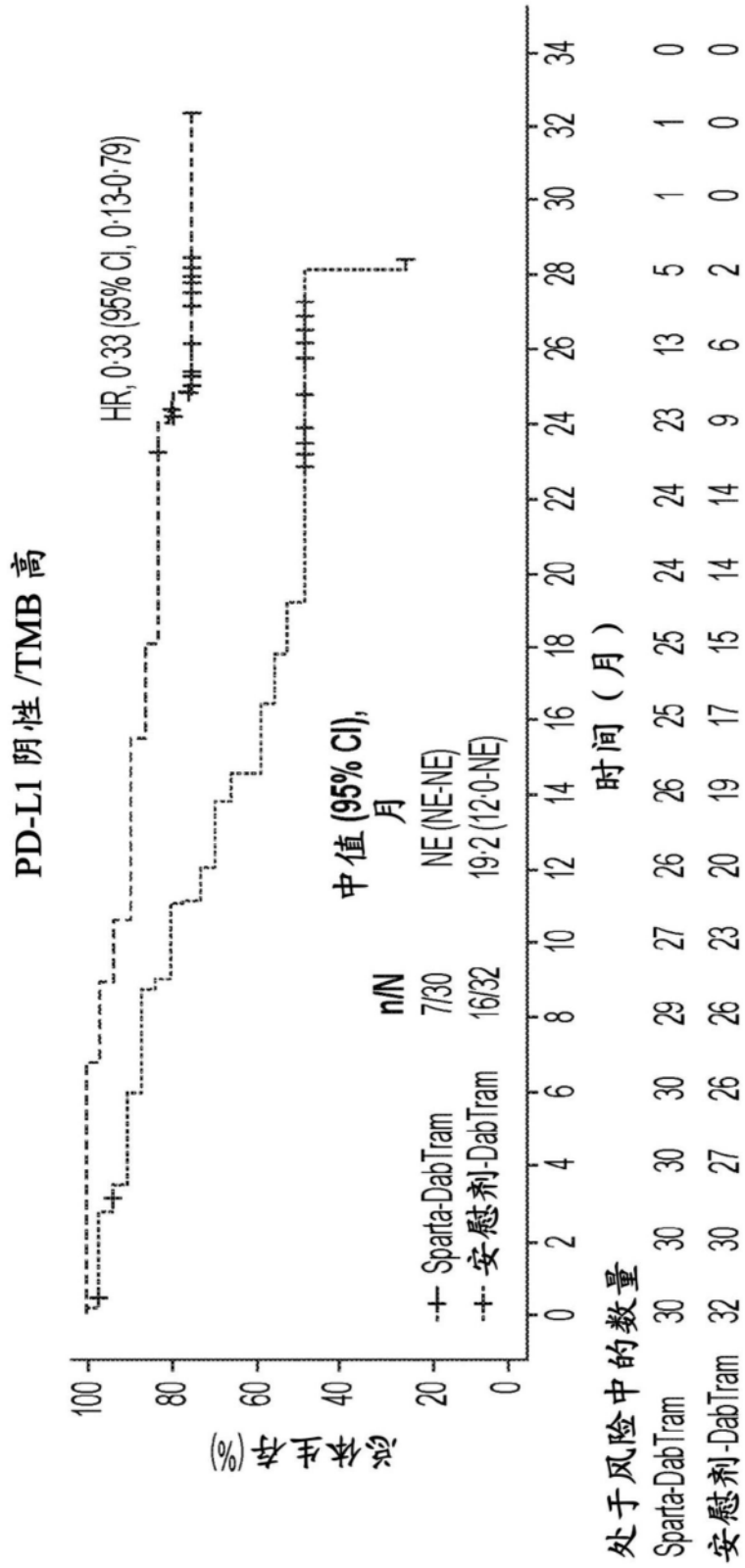


图7B

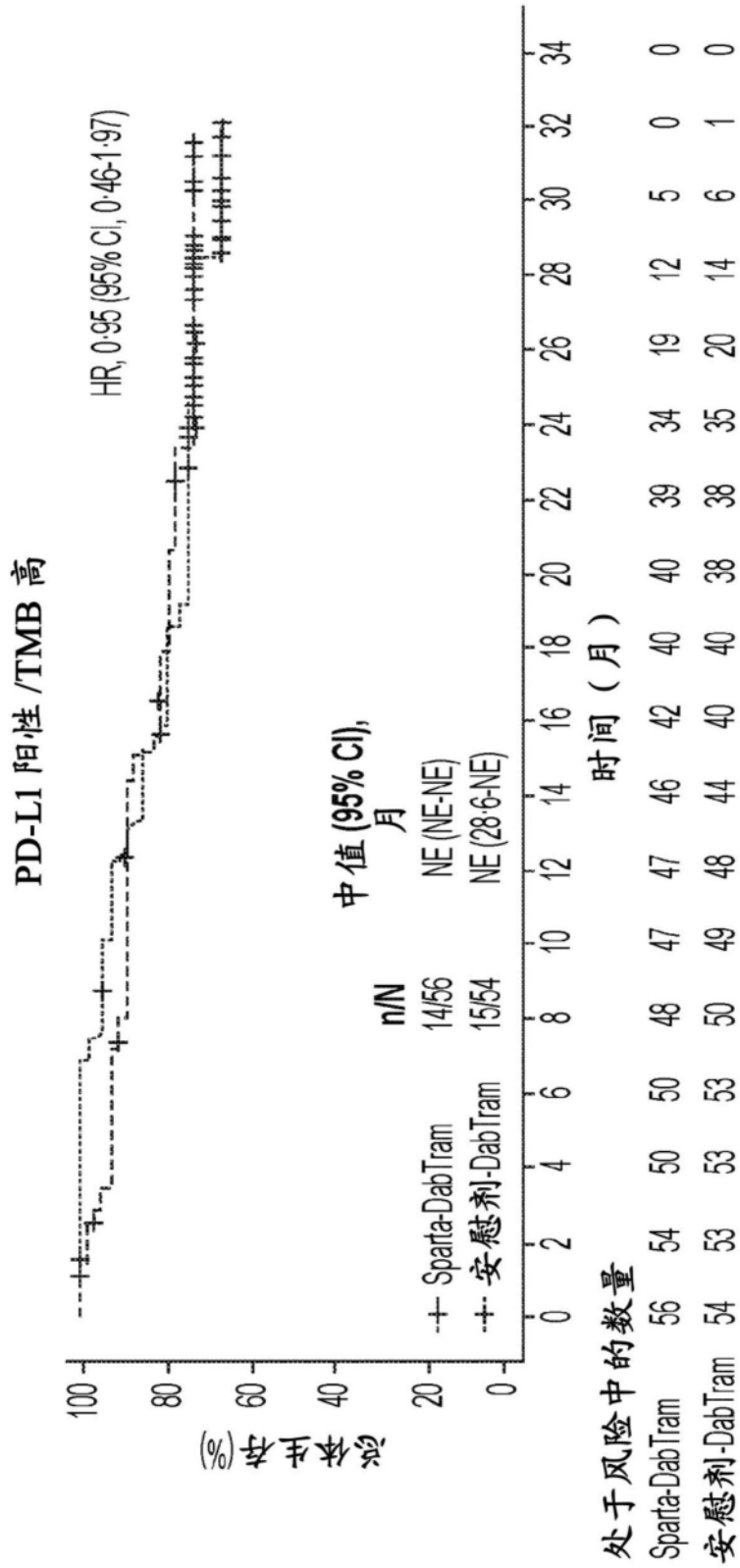


图7B(续)

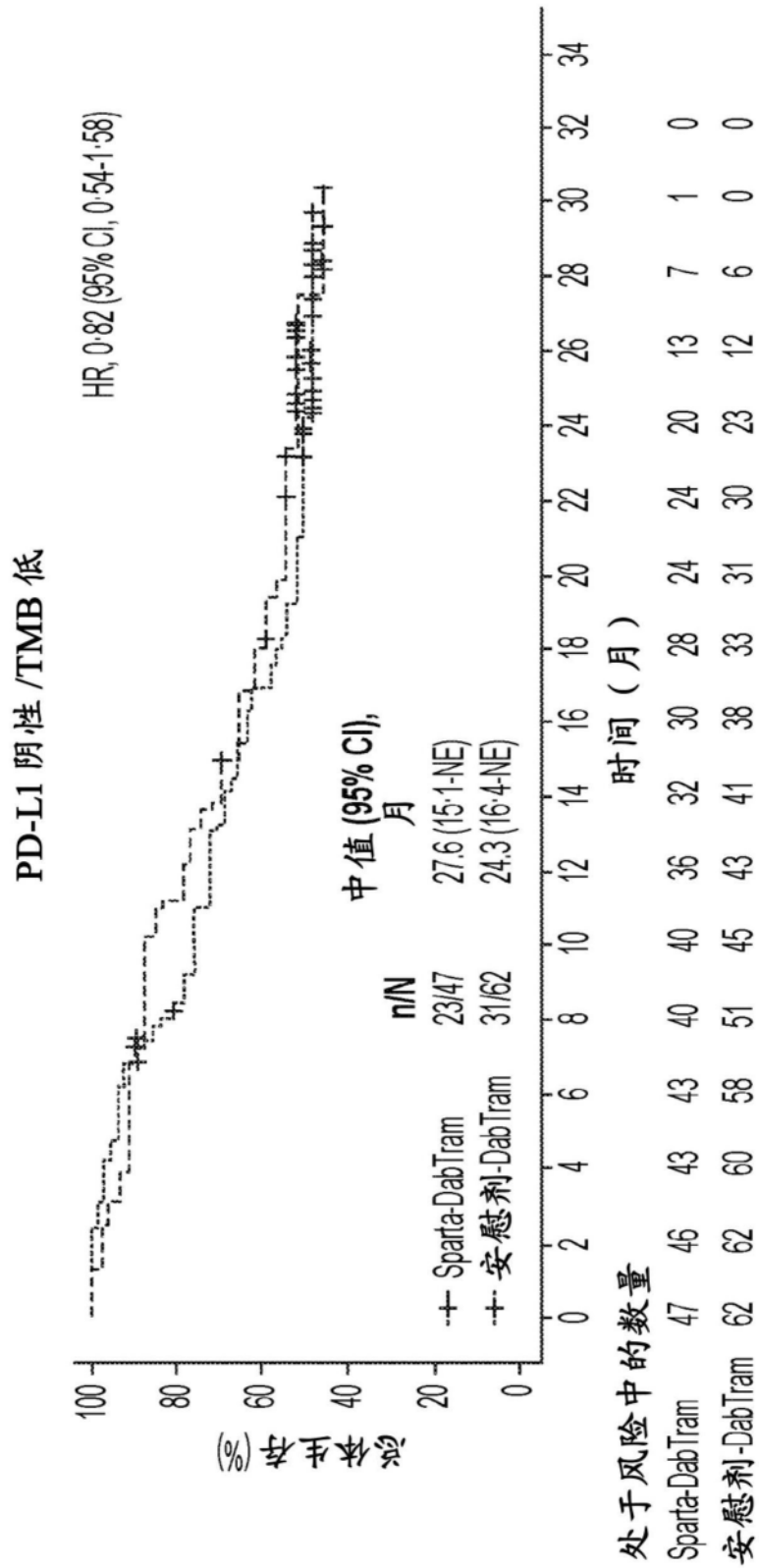


图7B(续)

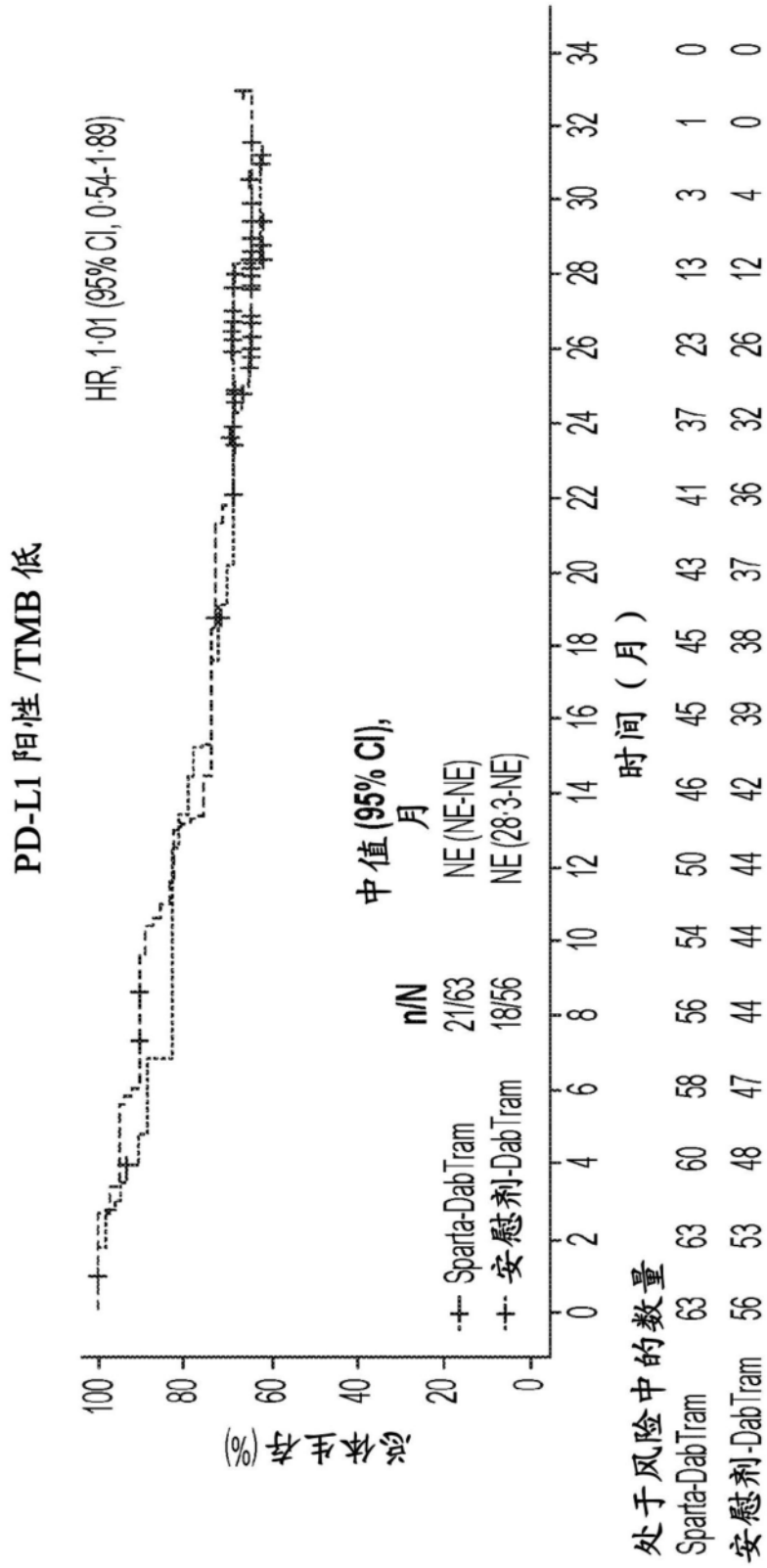


图7B(续)

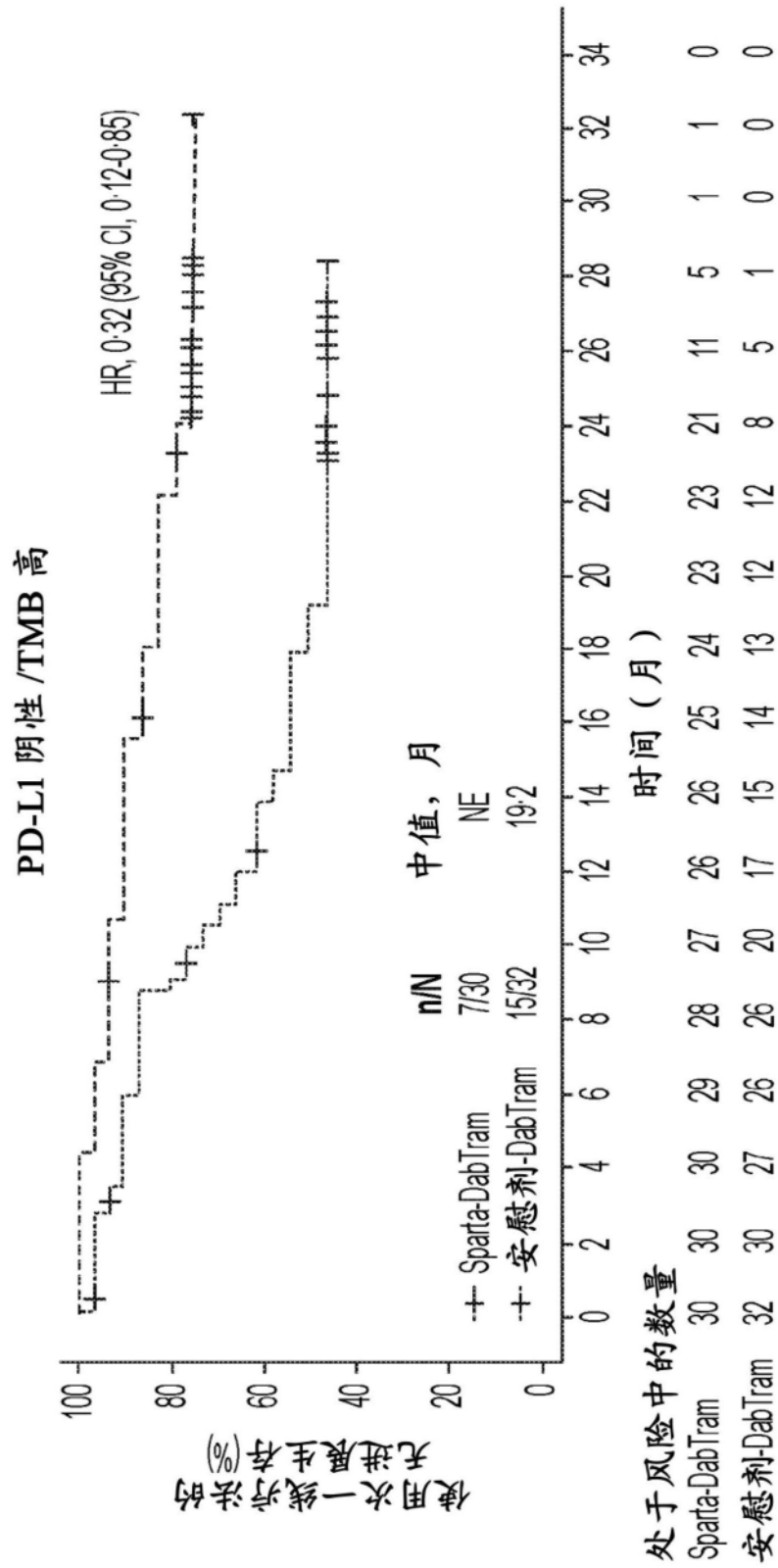


图8A

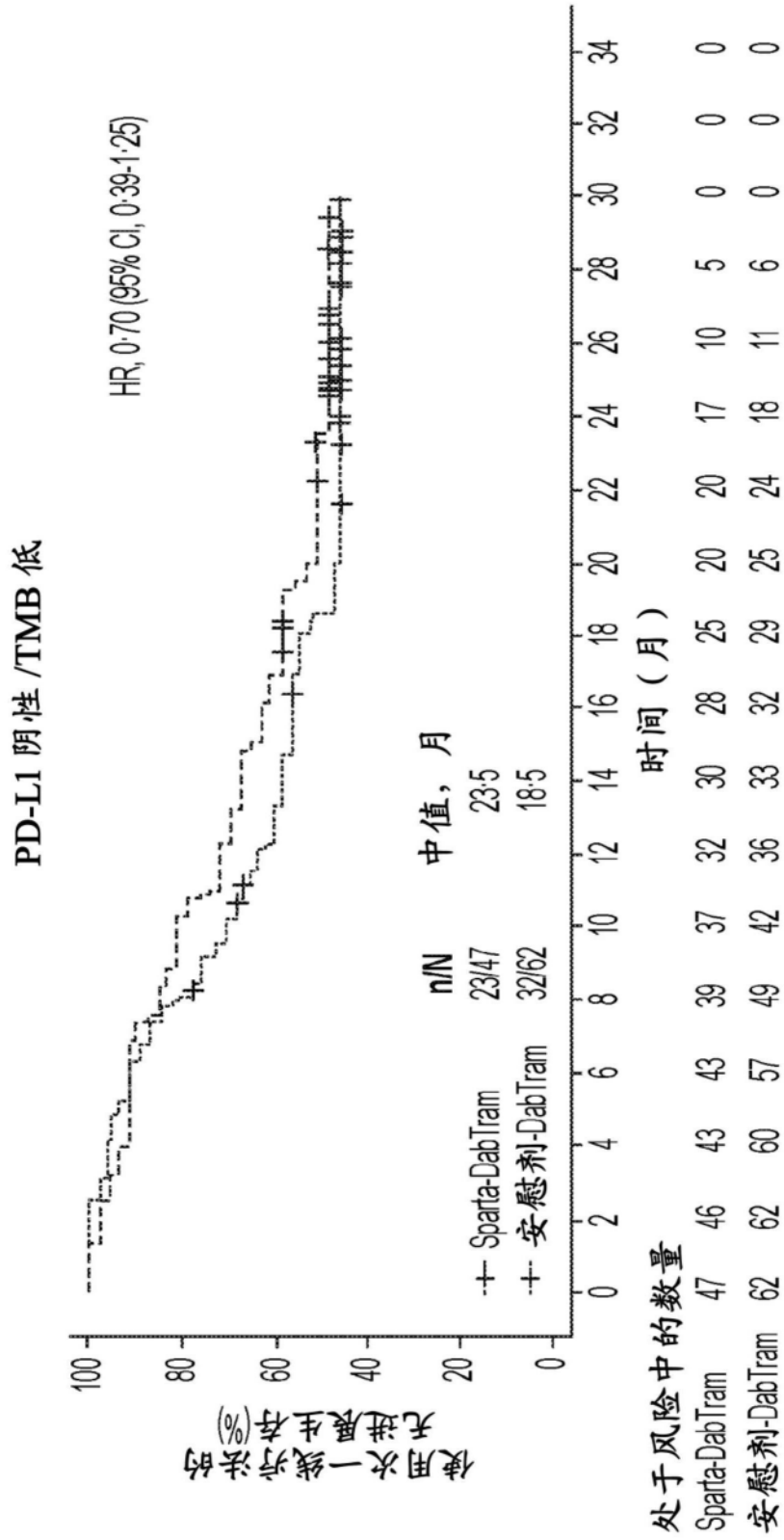


图8B

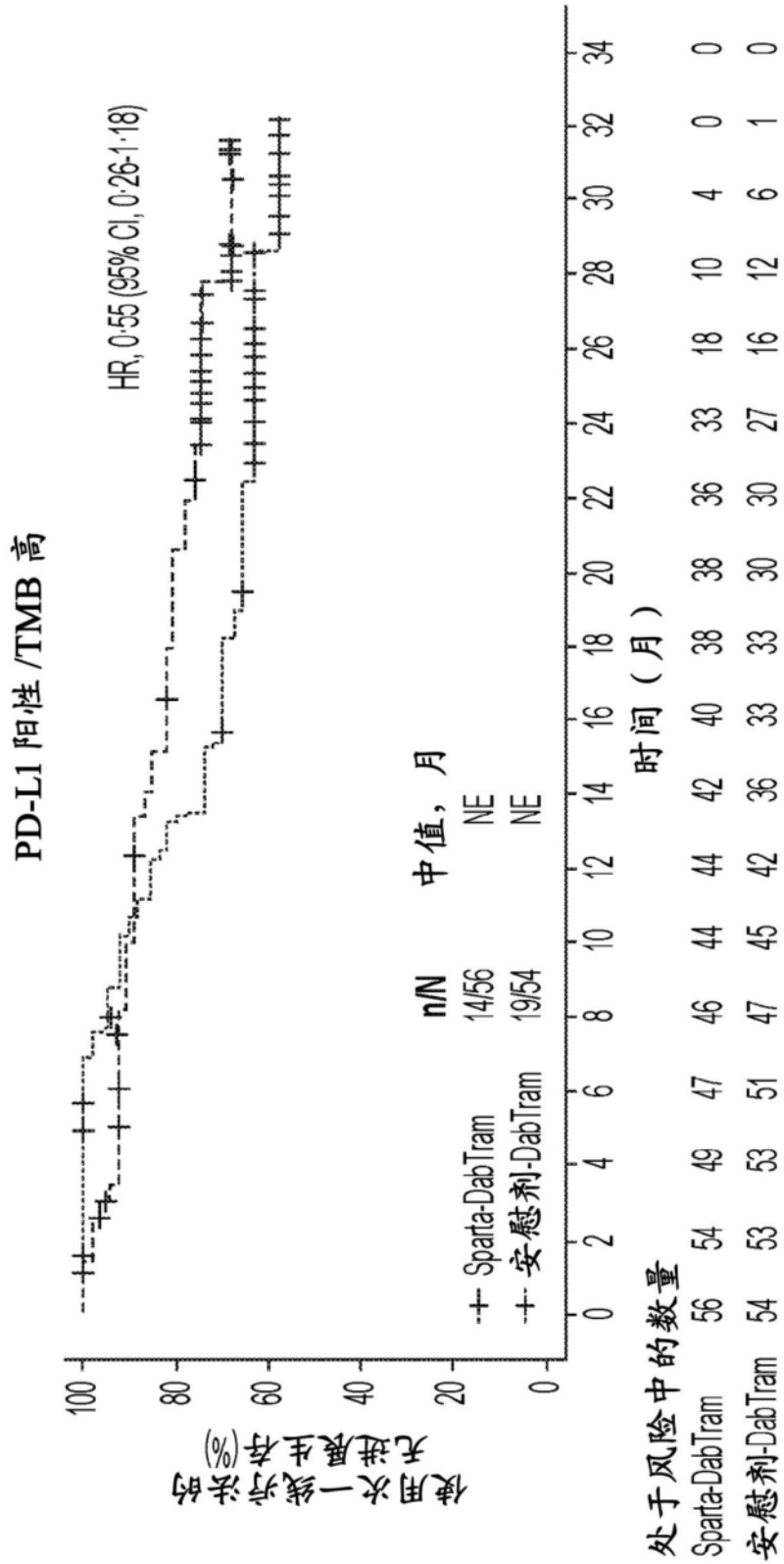


图8C

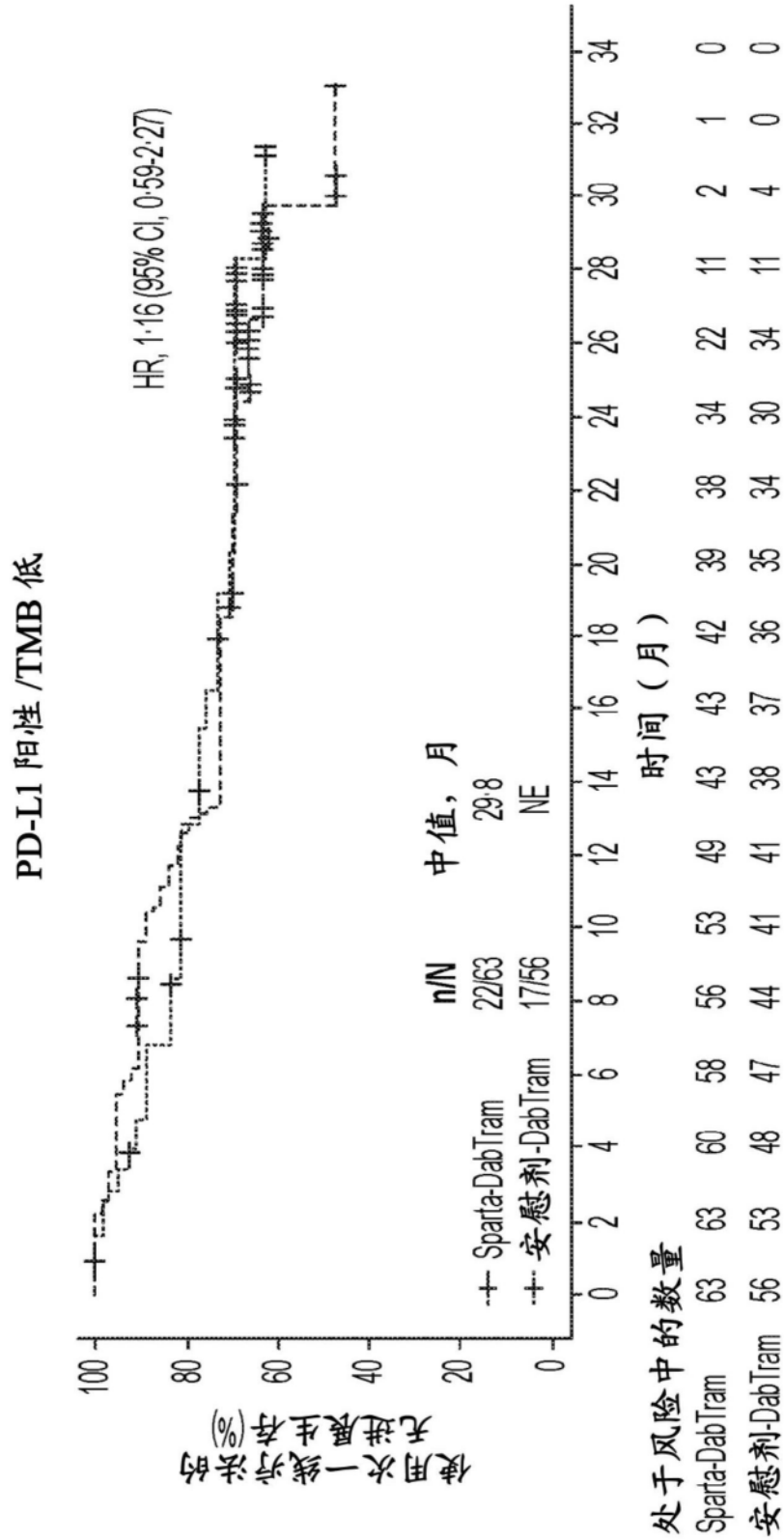


图8D

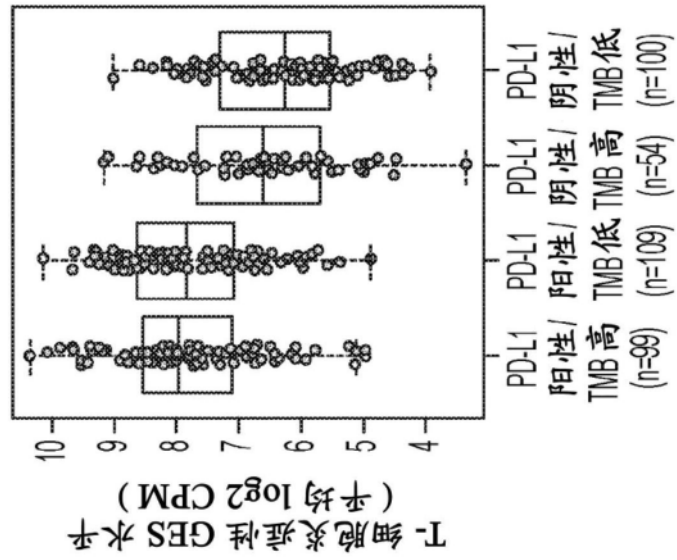


图9A

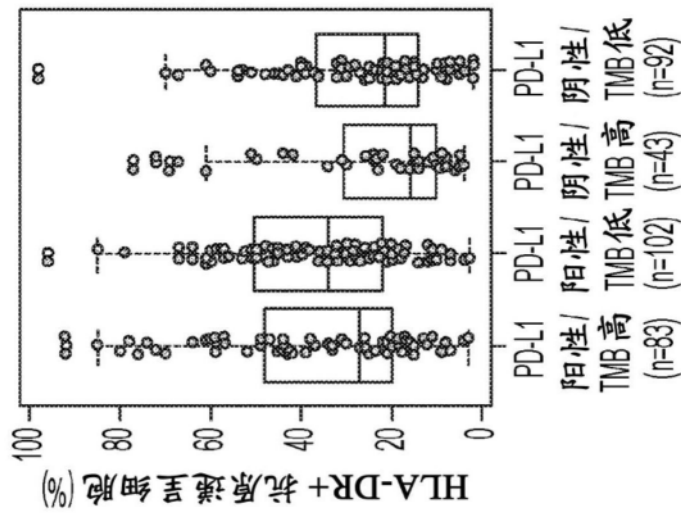


图9B

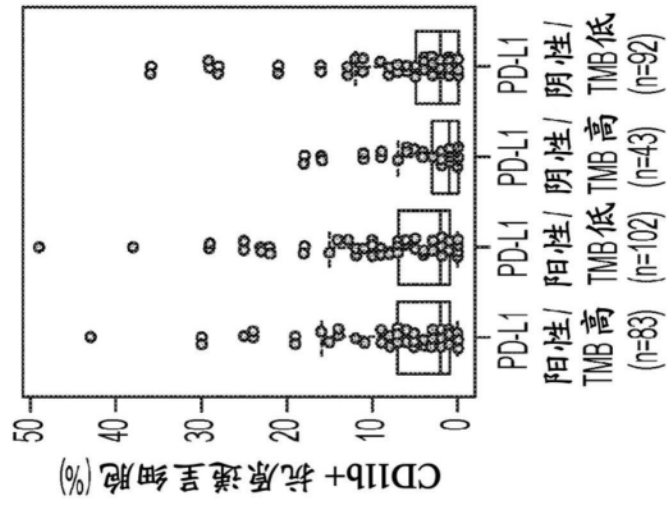


图9C

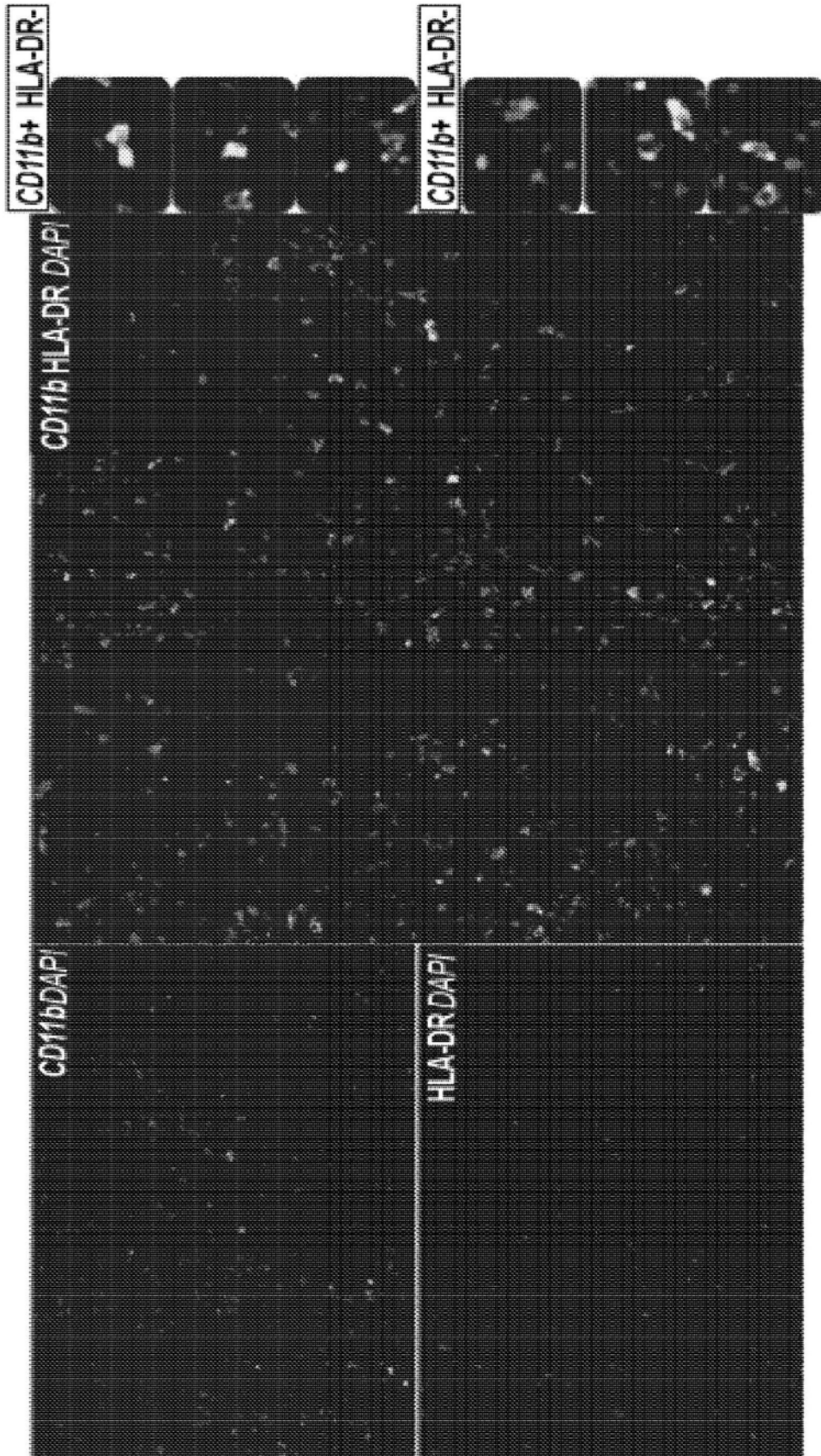


图9D

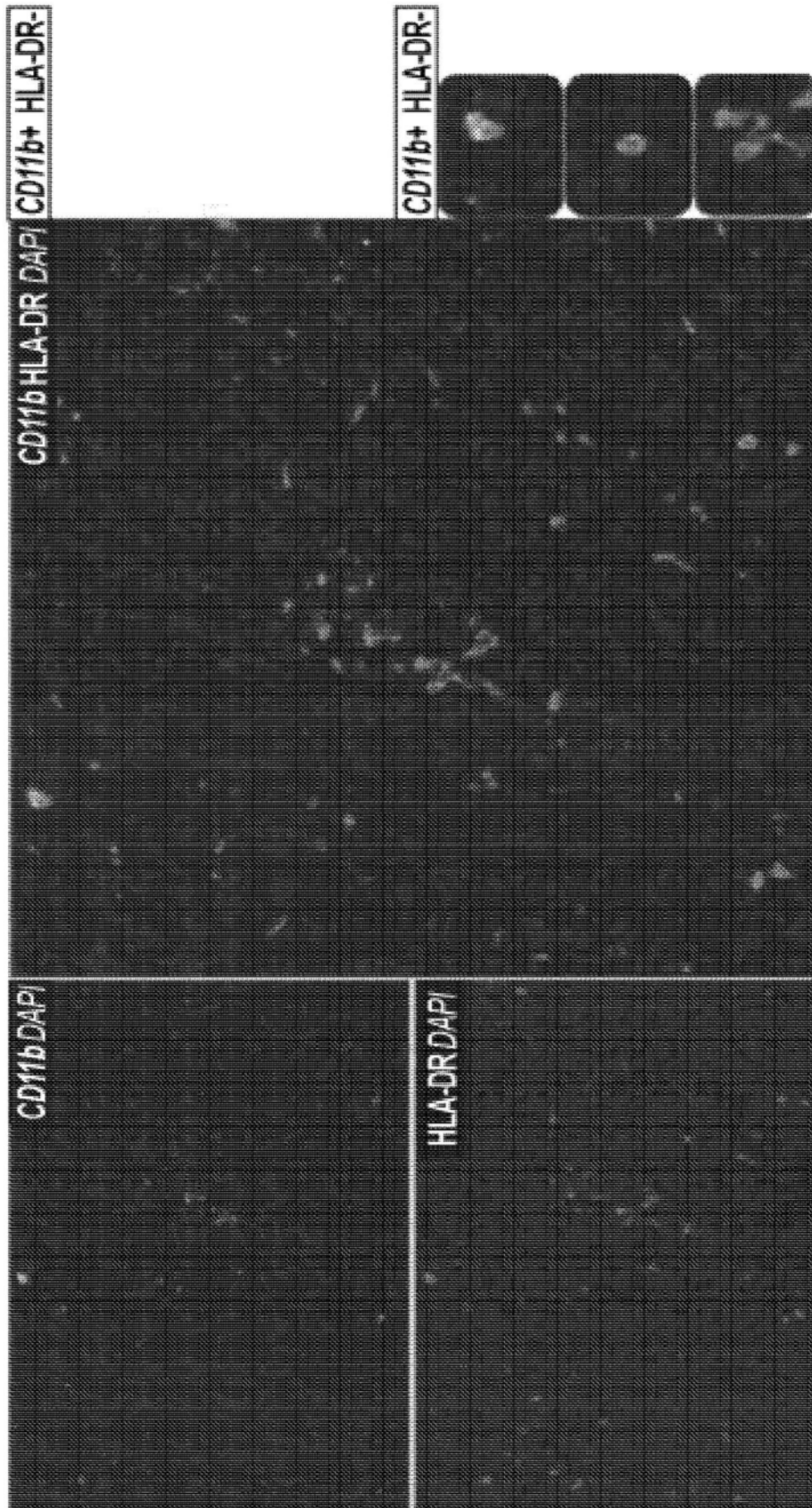


图9E

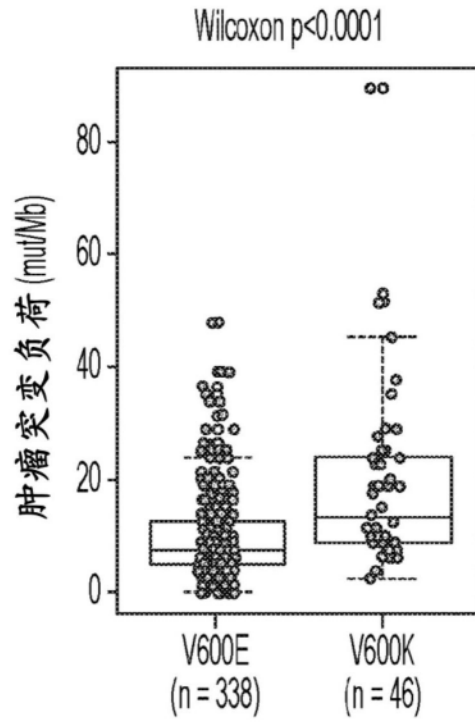


图10A

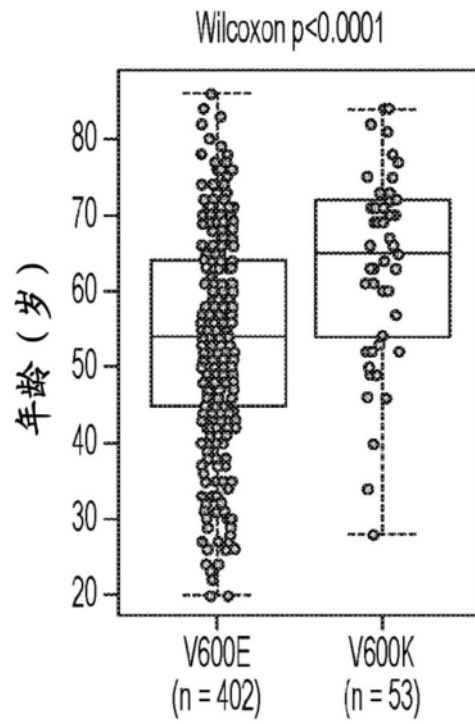


图10B

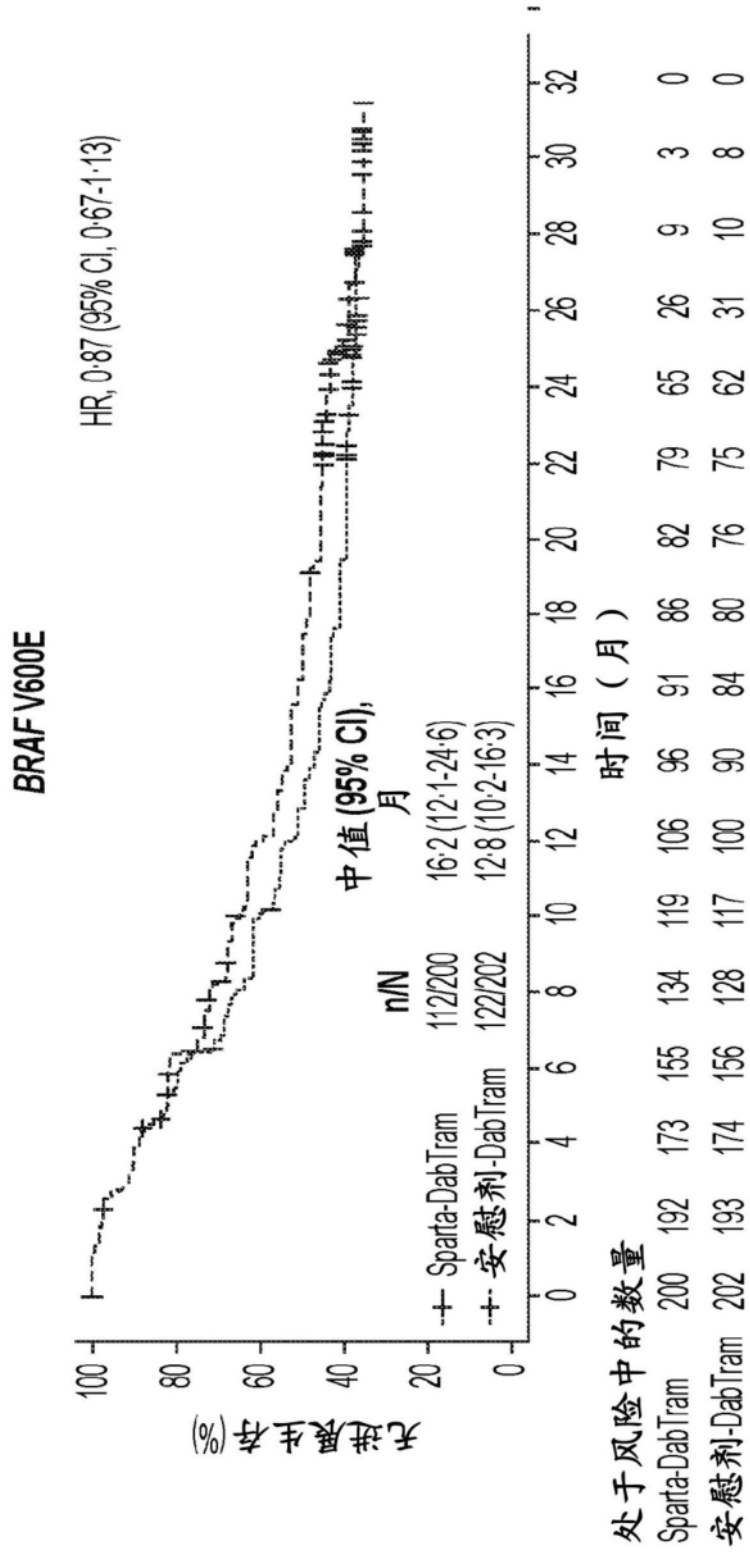


图11A

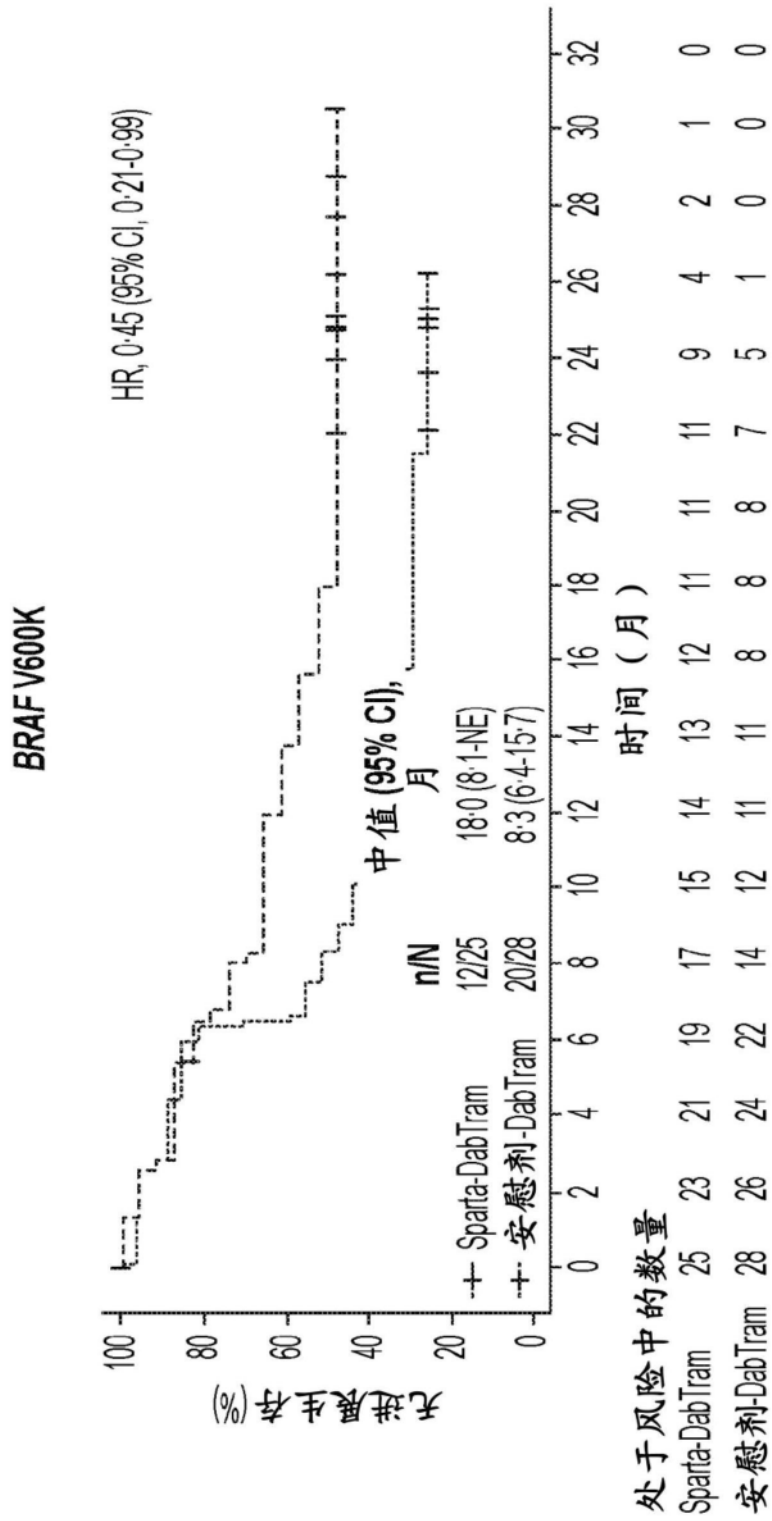


图11B

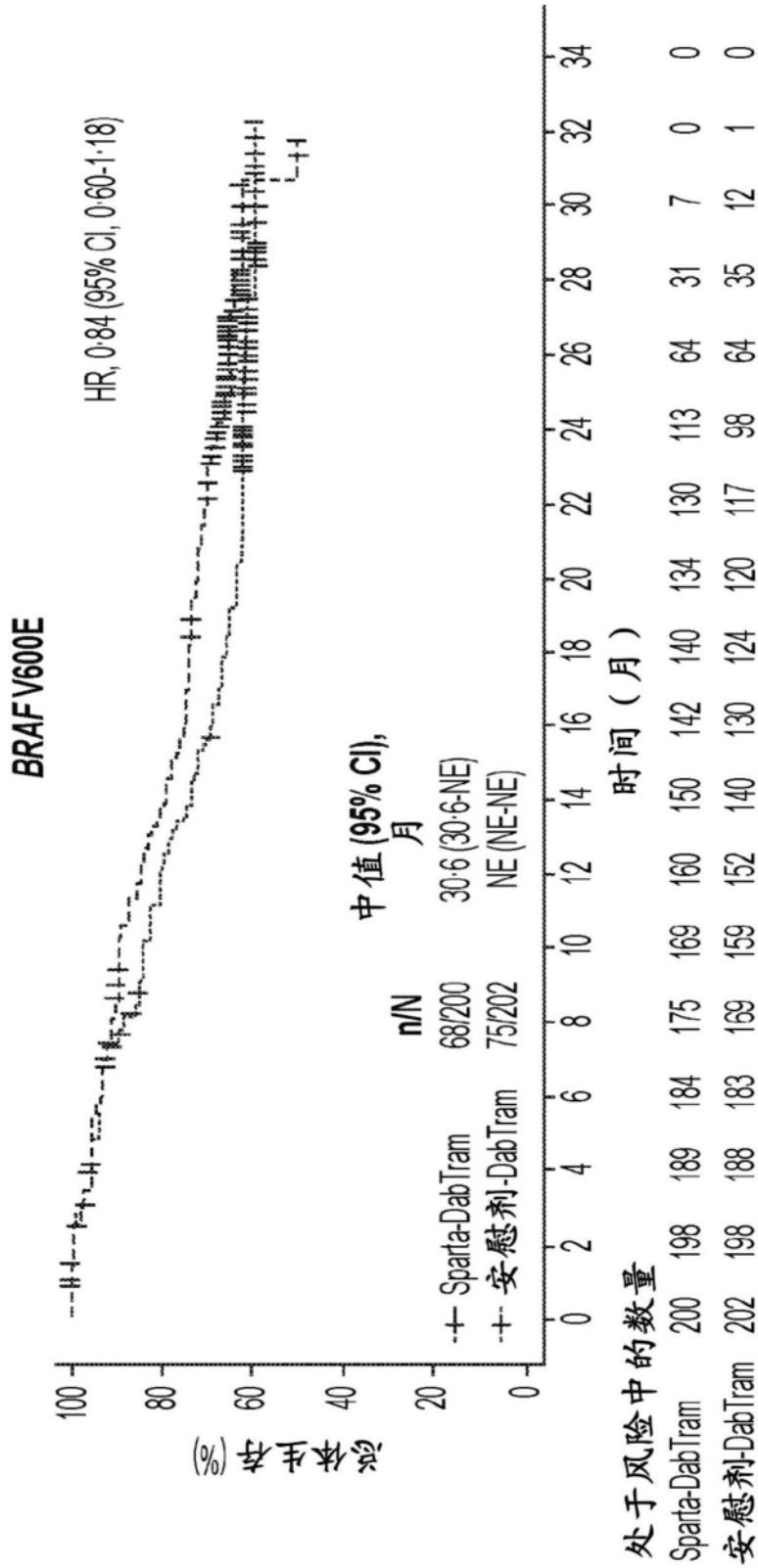


图12A

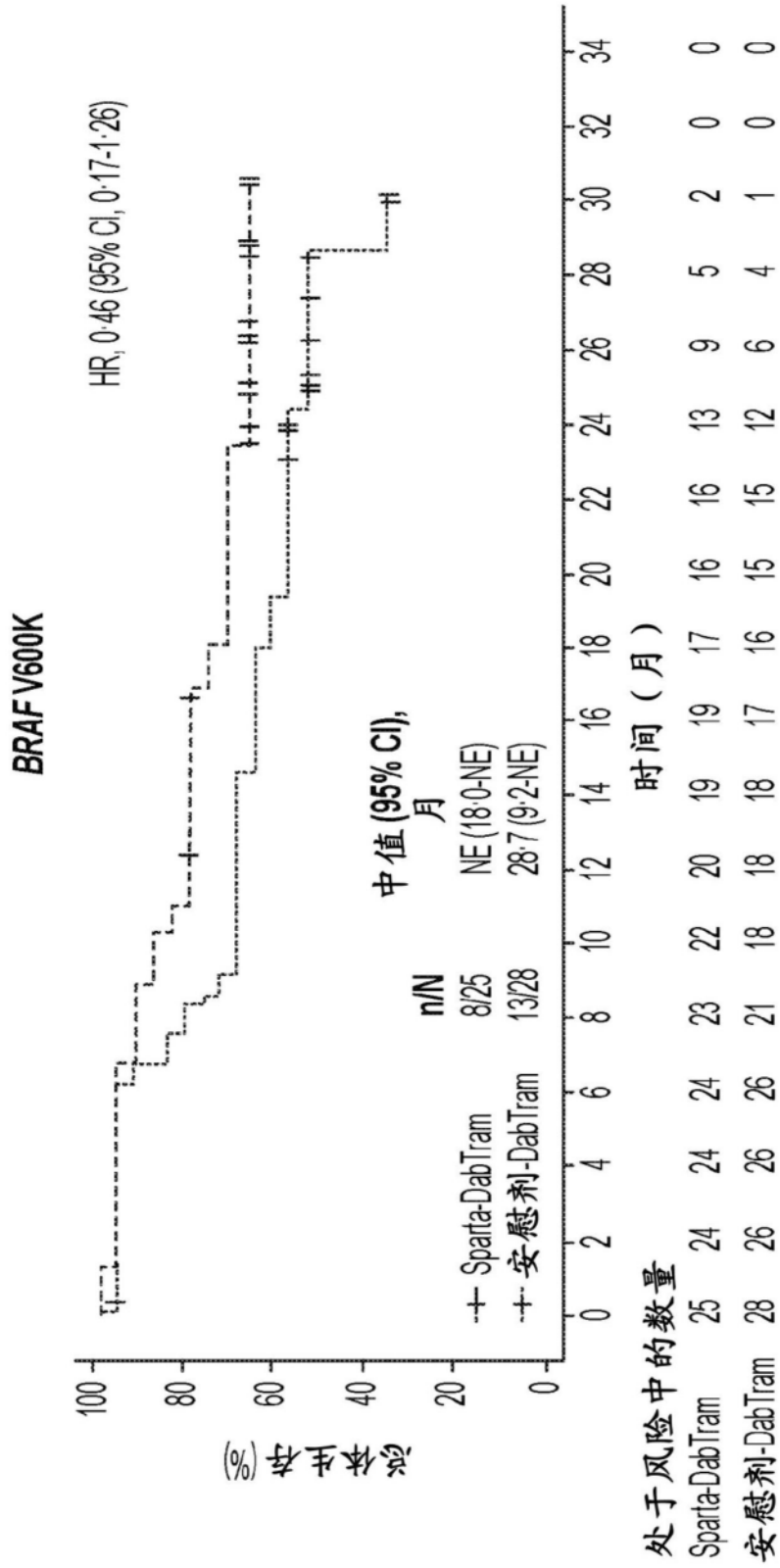


图12B

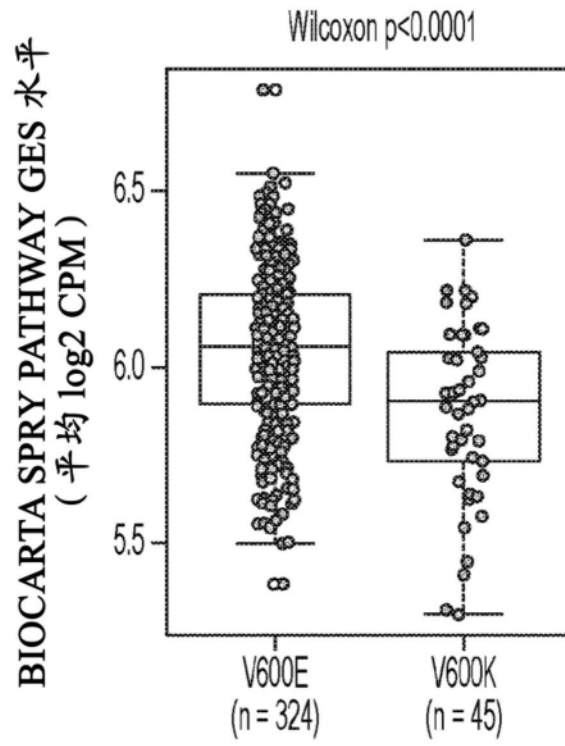


图13

与无进展生存相关的前 100 个途径

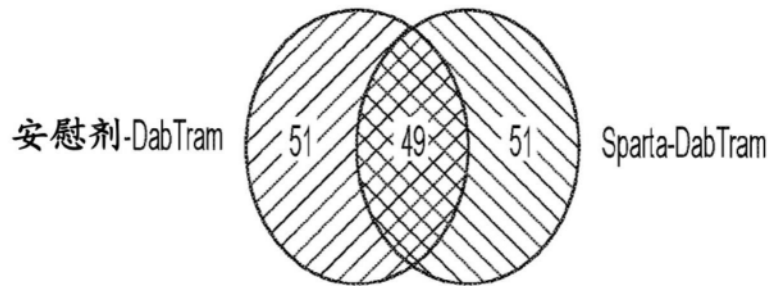


图14A

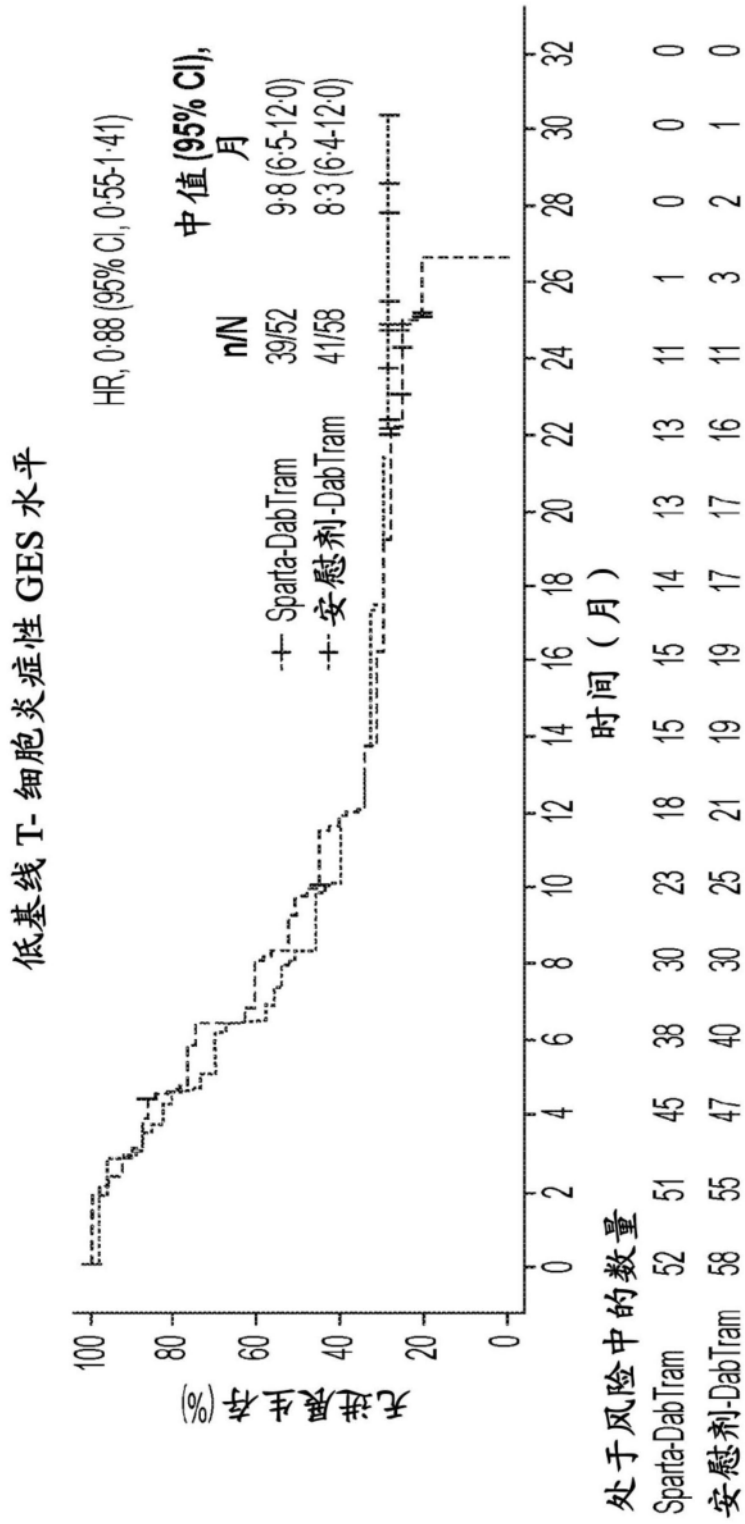


图14B

高基线 T-细胞炎症性 GES 水平

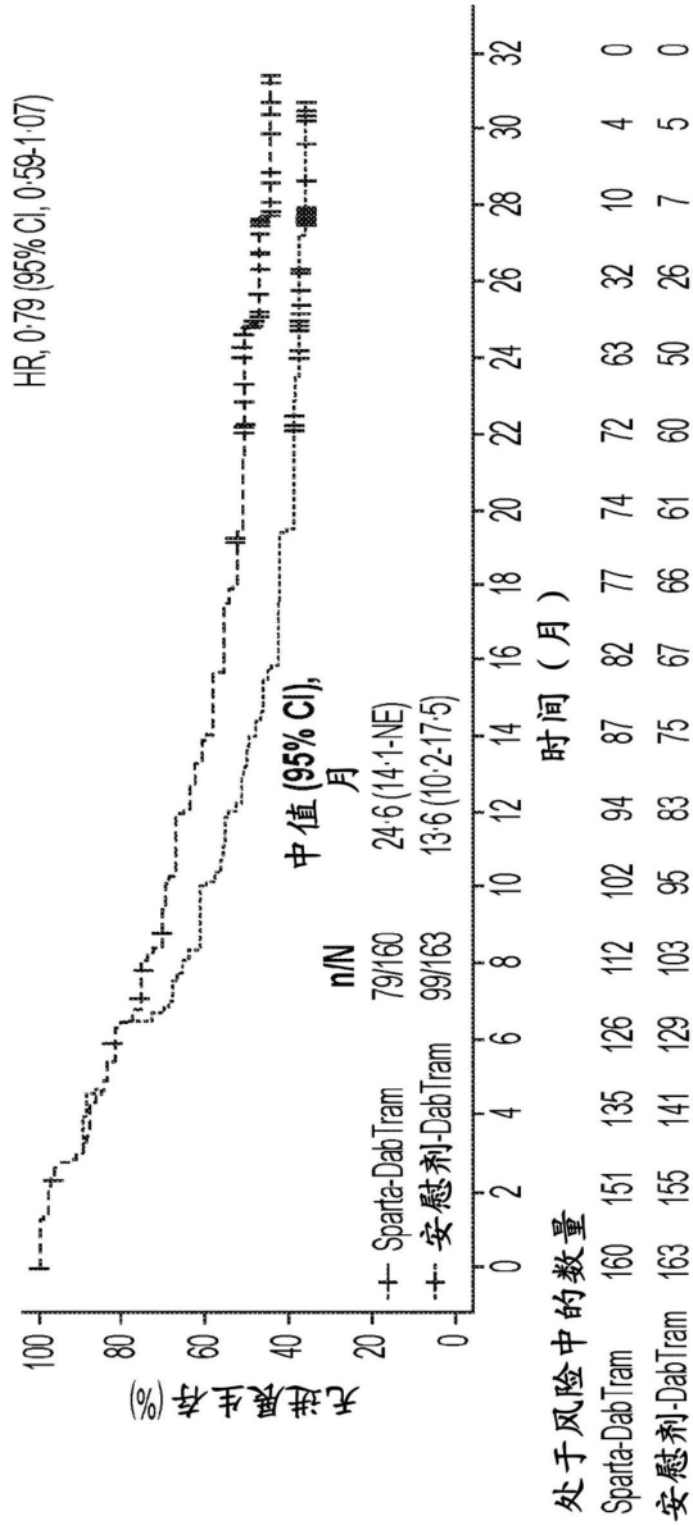


图14B(续)

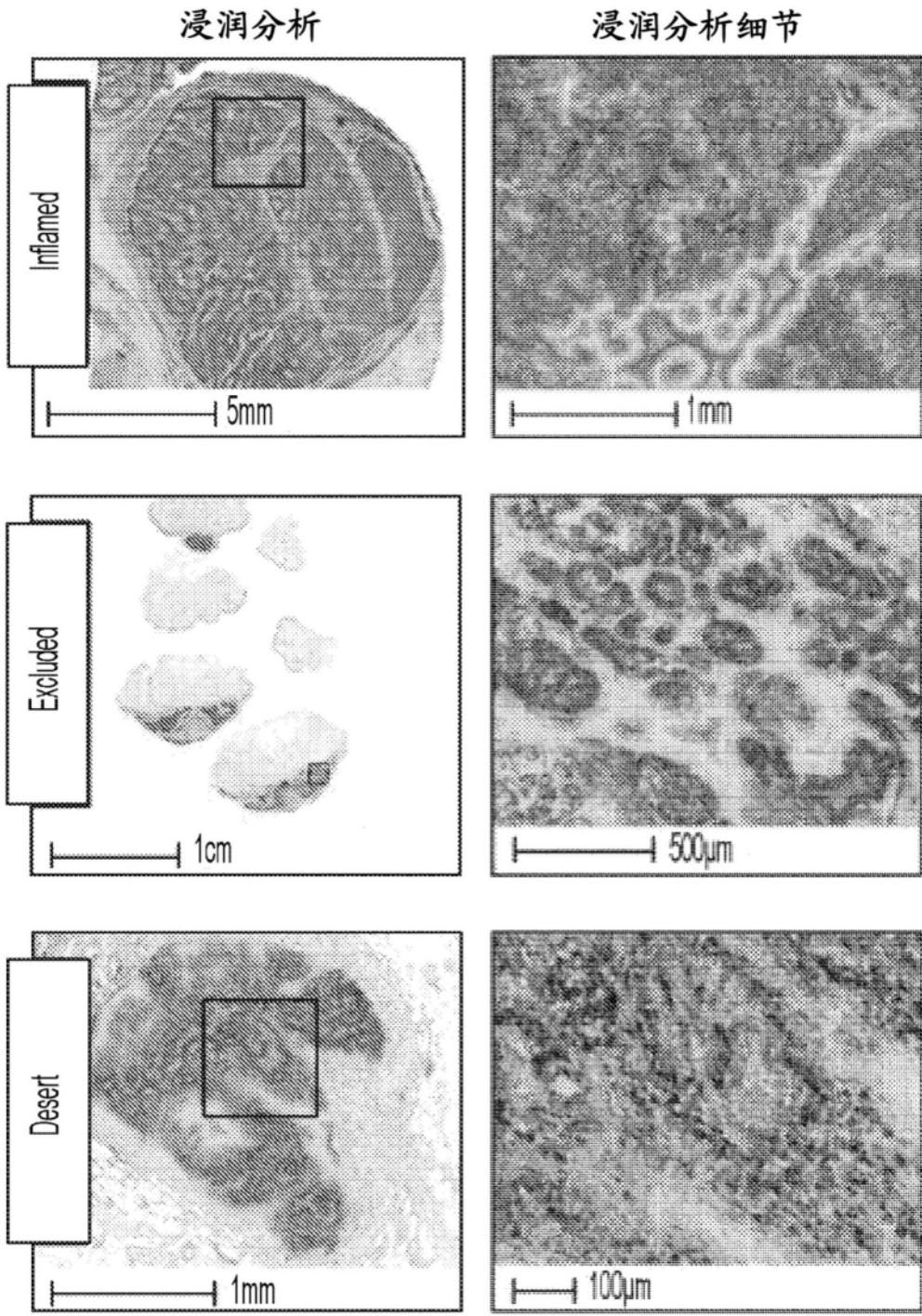


图15A

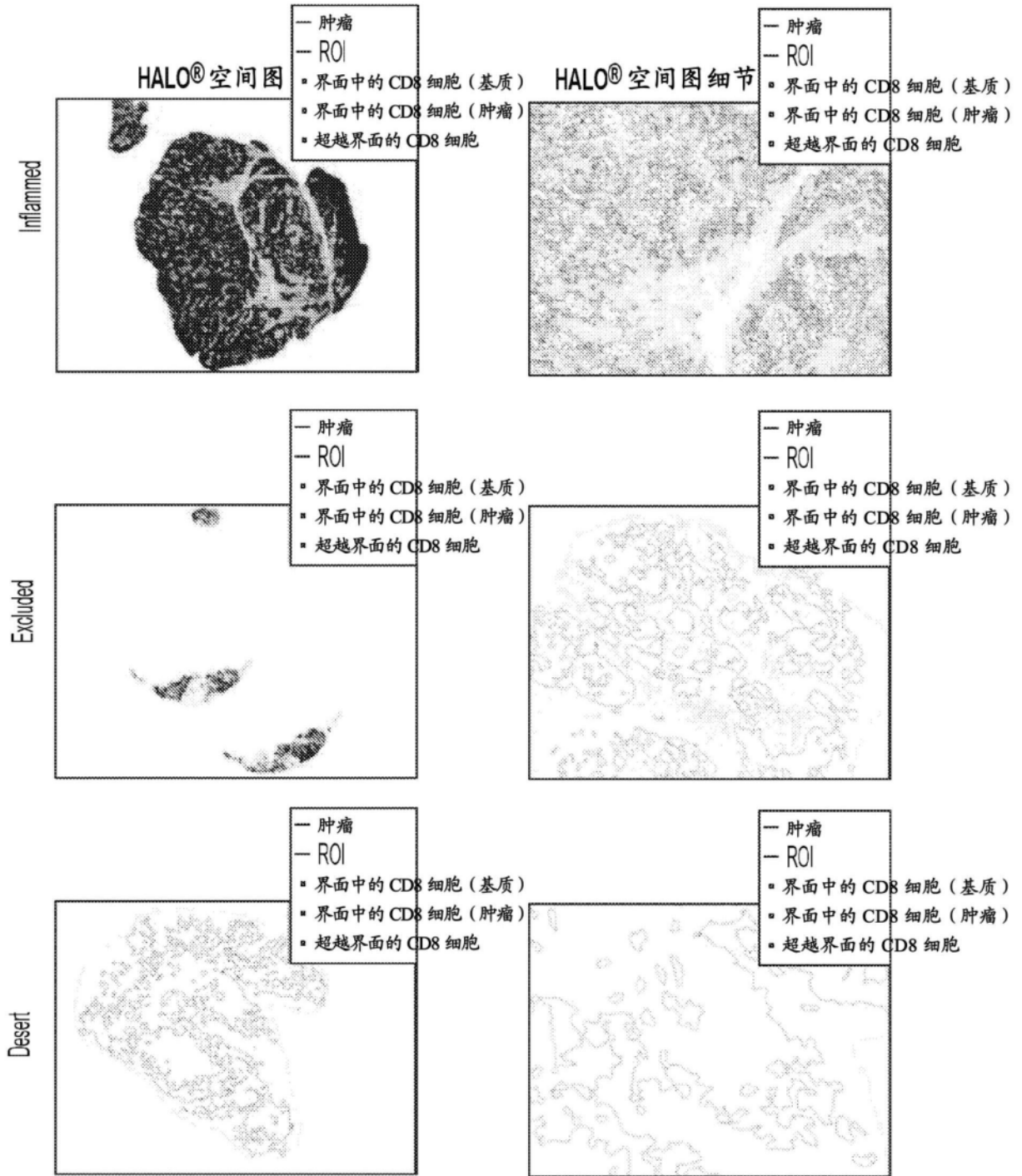


图15A(续)

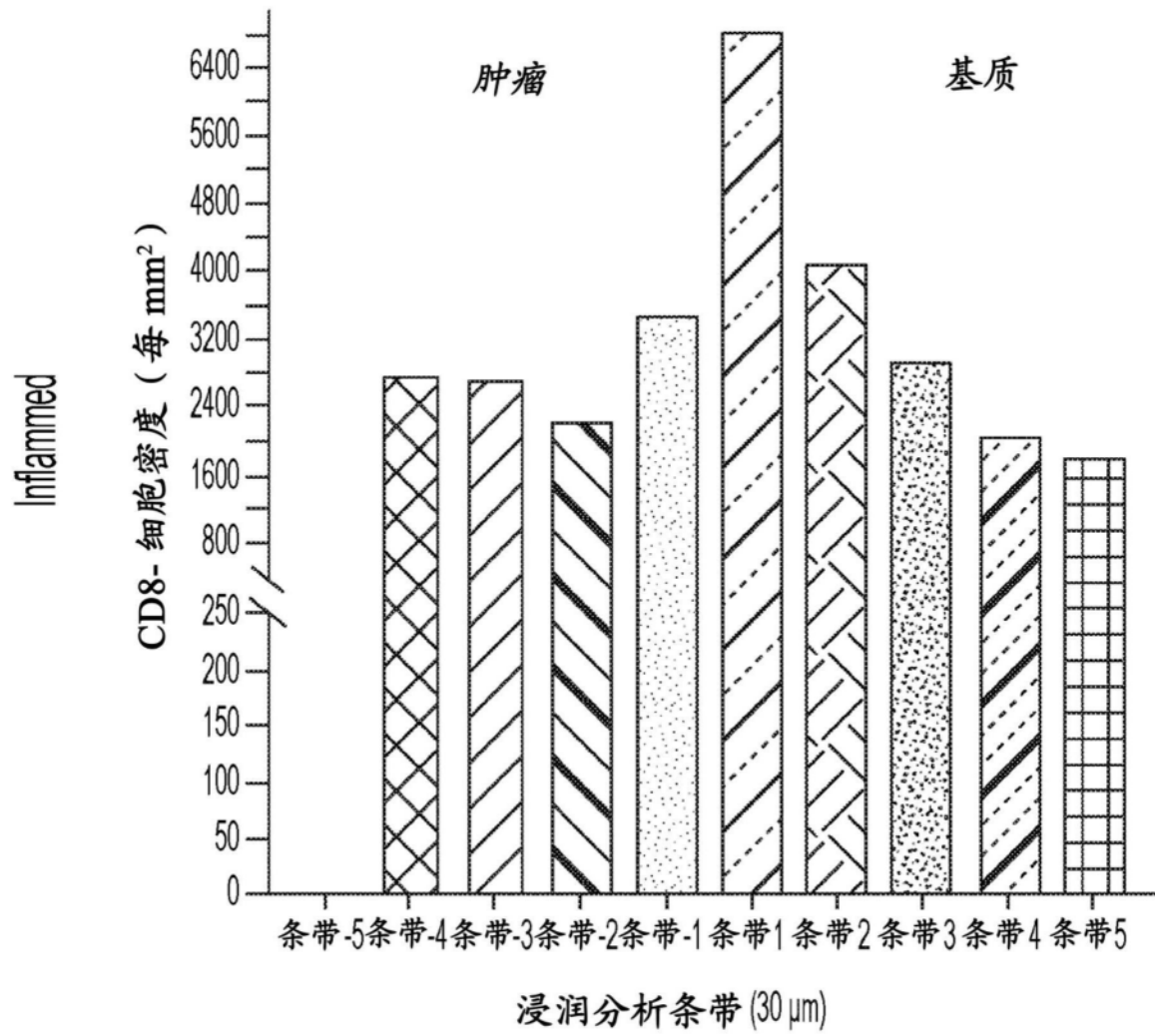


图15A (续)

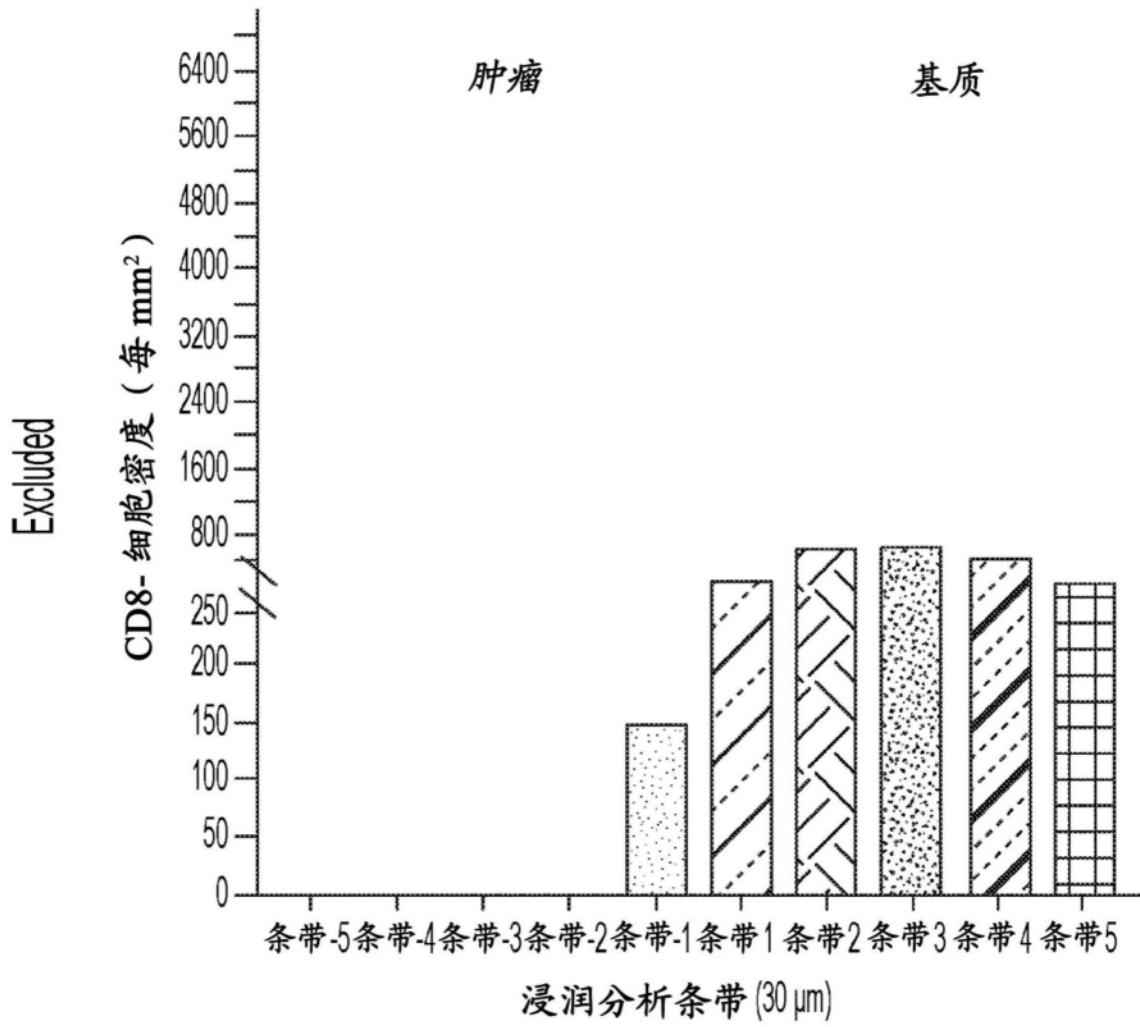


图15A (续)

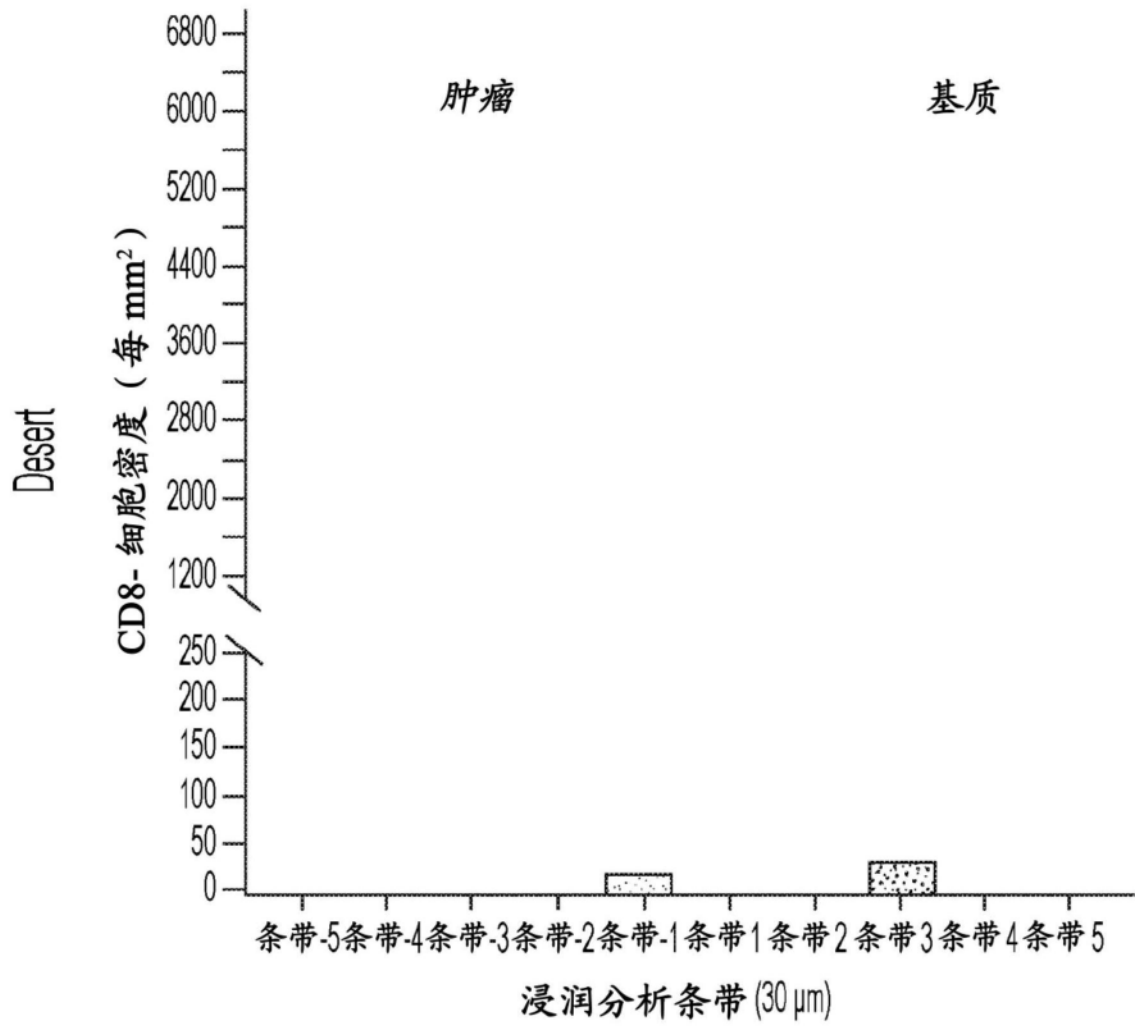


图15A(续)

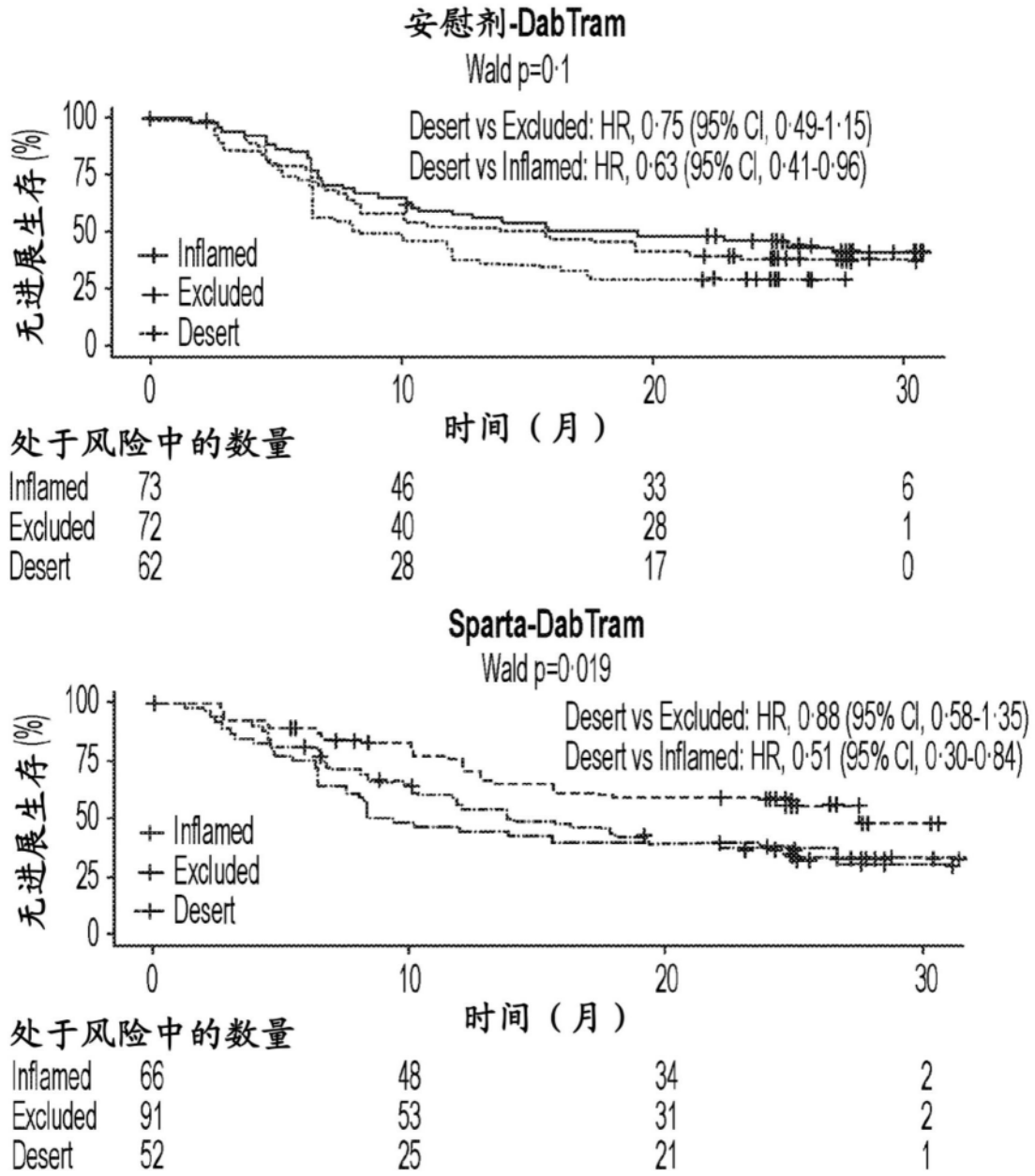


图15B

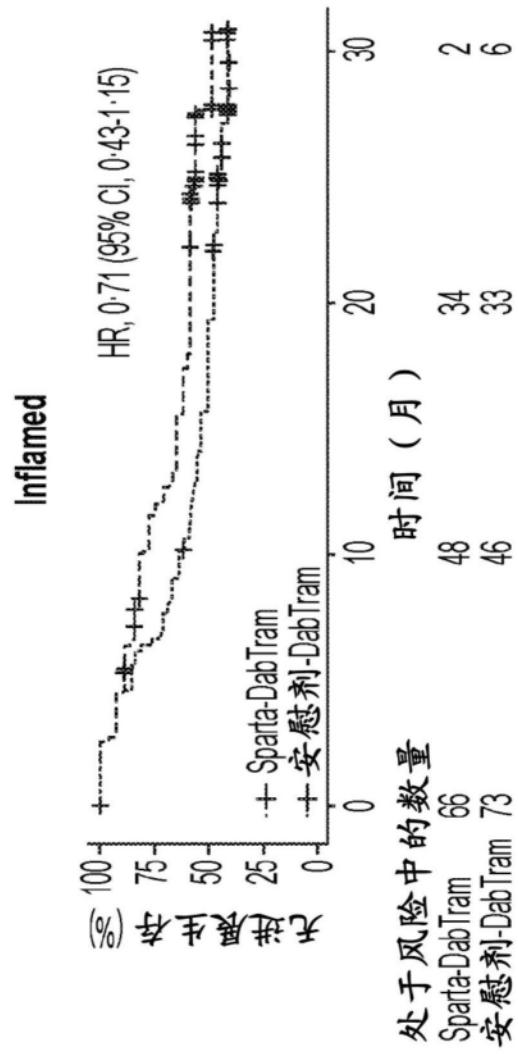


图16A

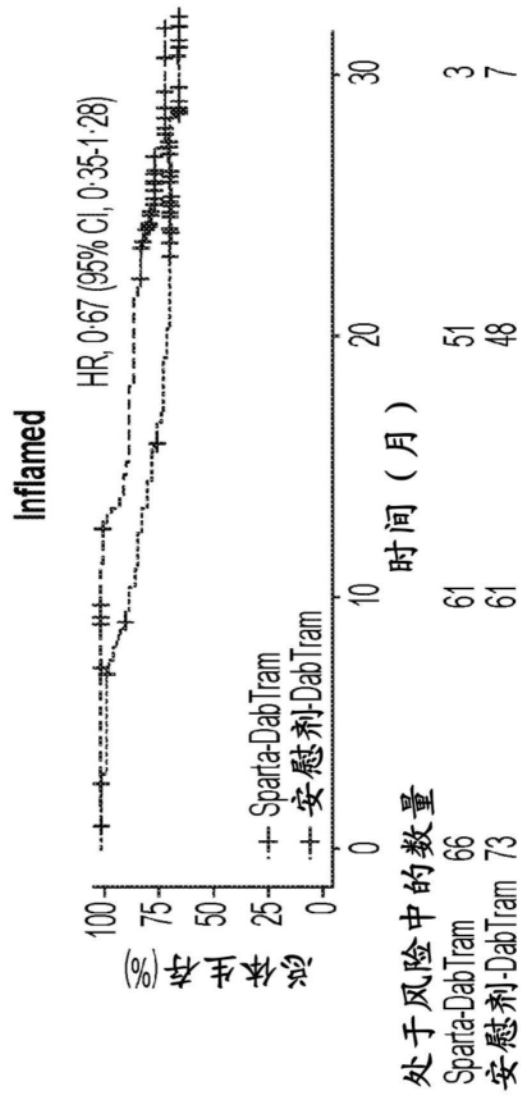


图16A(续)

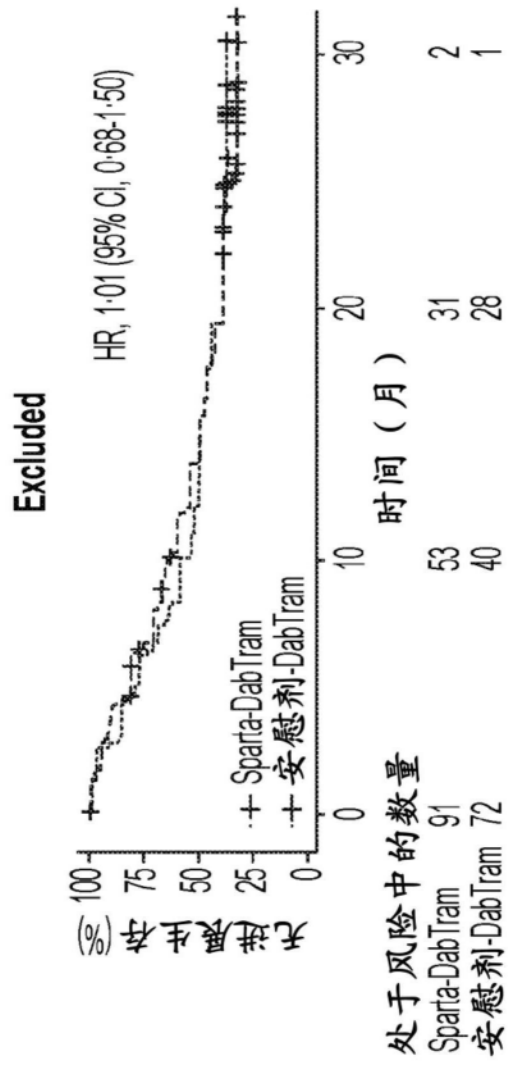


图16B

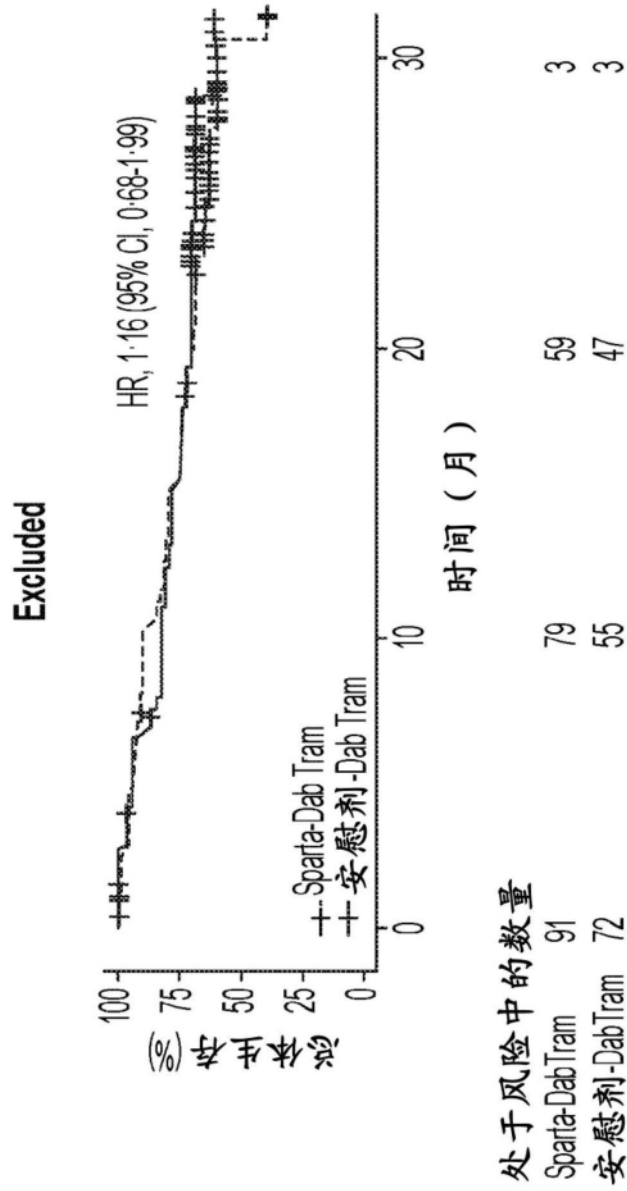


图16B(续)

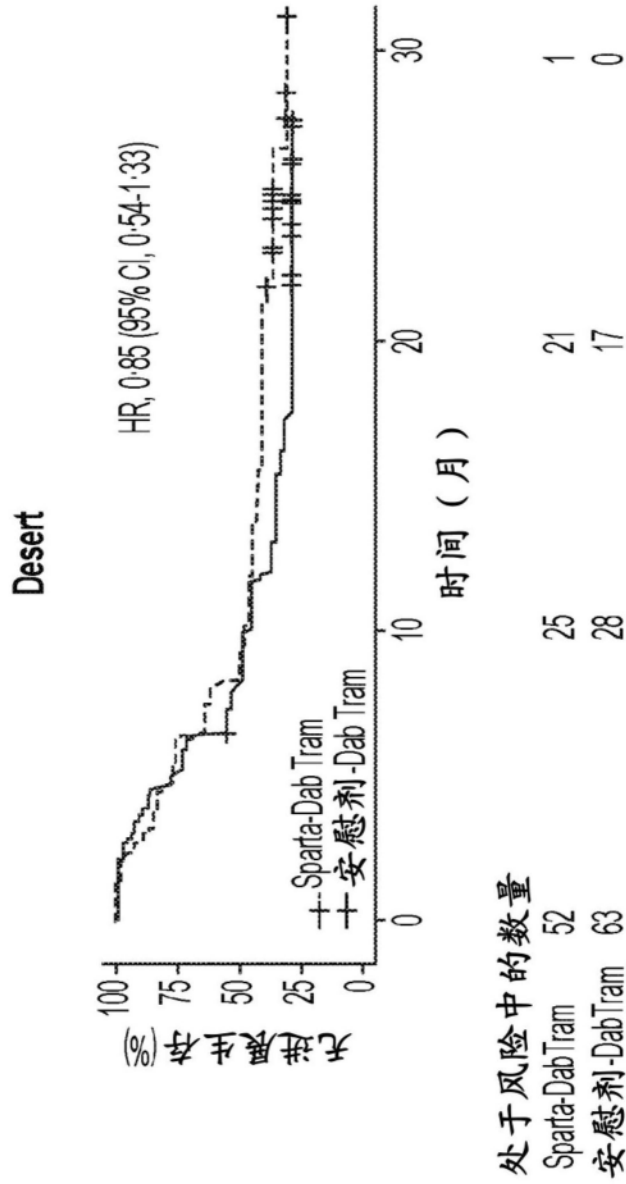


图16C

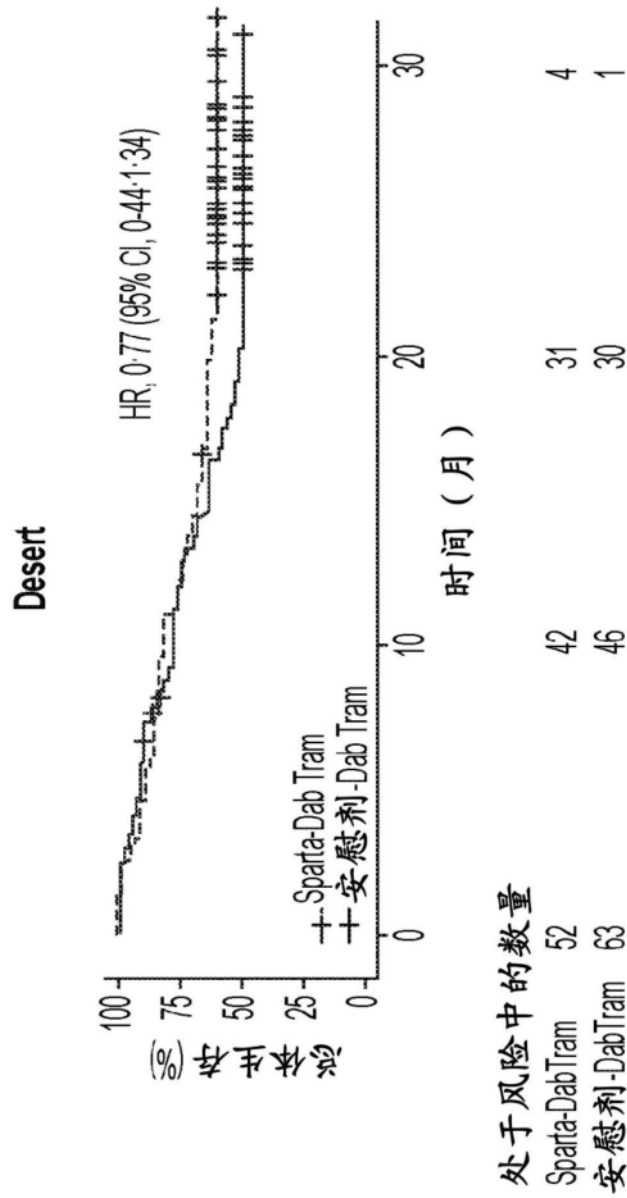


图16C(续)

基线 LDH 水平 vs ctDNA 脱落  
斯皮尔曼相关系数 = 0.676;  $p < 0.0001$

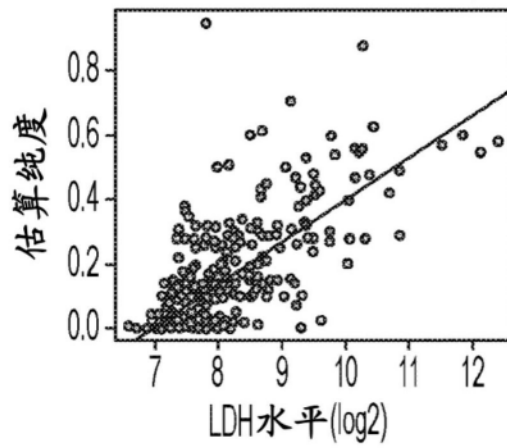


图17A

损伤直径的基线总和  
vs ctDNA 脱落  
斯皮尔曼相关系数 = 0.461;  $p < 0.0001$

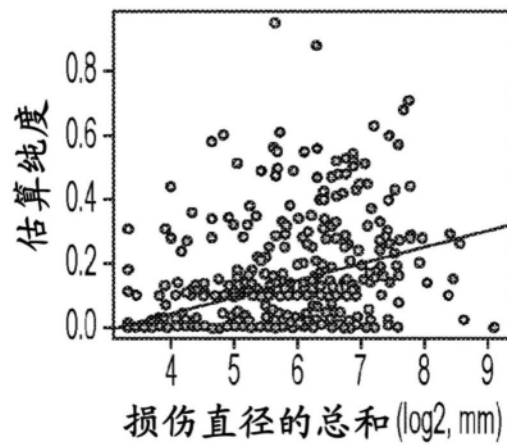


图17B

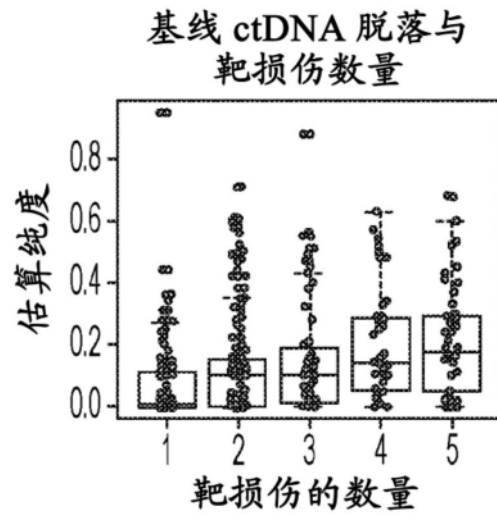


图17C

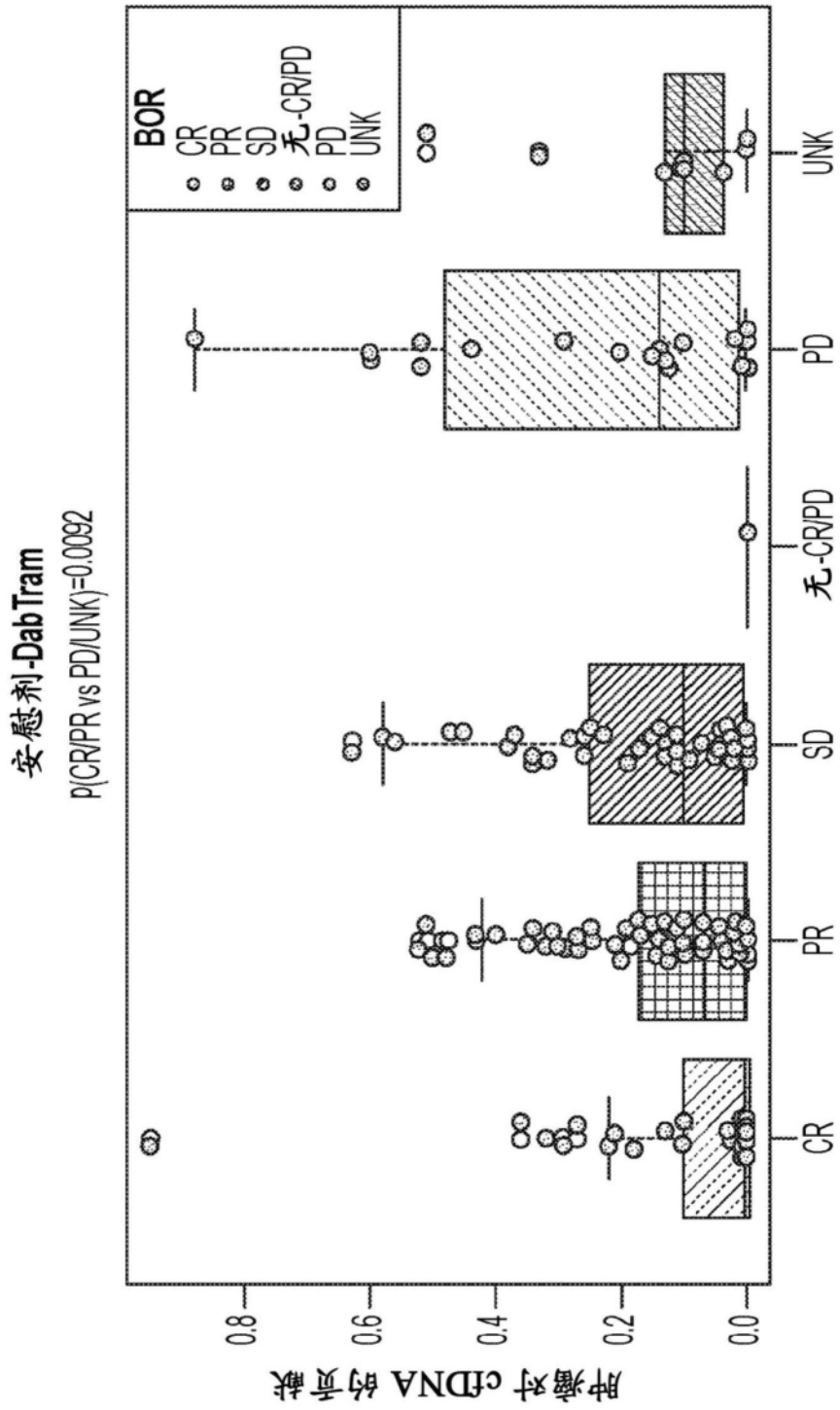


图18A

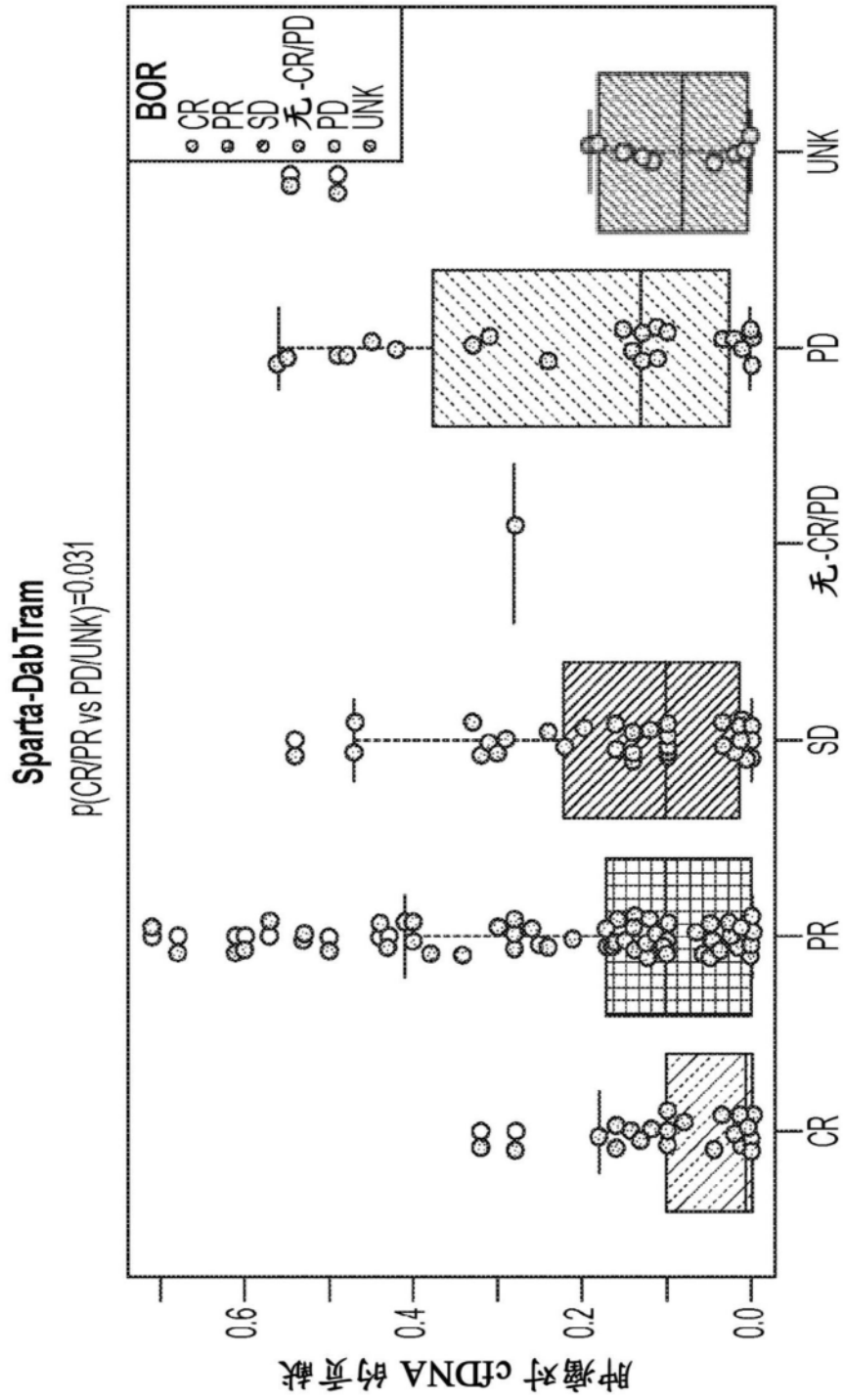


图18B

安慰剂-Dab Tram

Wald p<0.0001

在 W8 的无脱落 vs 缺失: HR, 2.40 (95% CI, 1.49-3.89)  
在 W8 的无脱落 vs 脱落: HR, 5.64 (95% CI, 3.14-10.13)

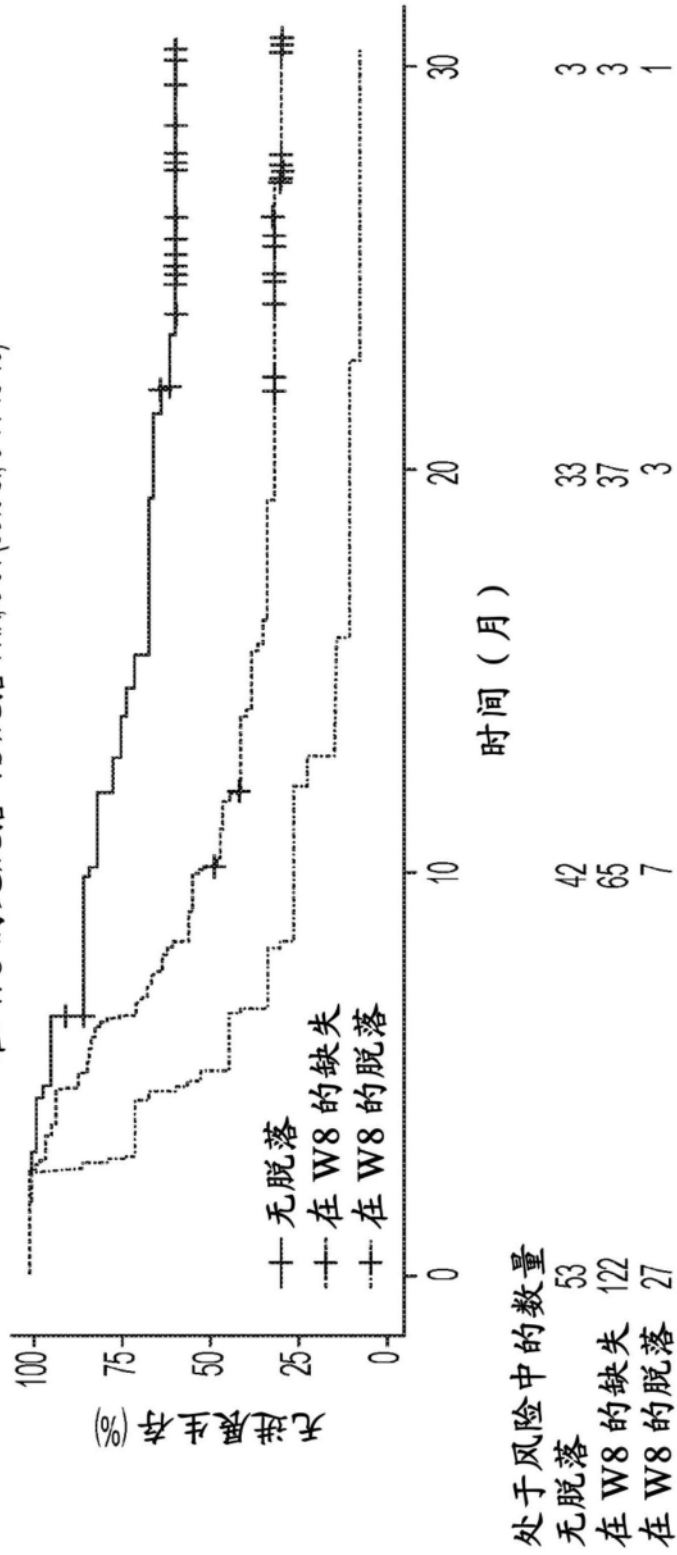


图19A

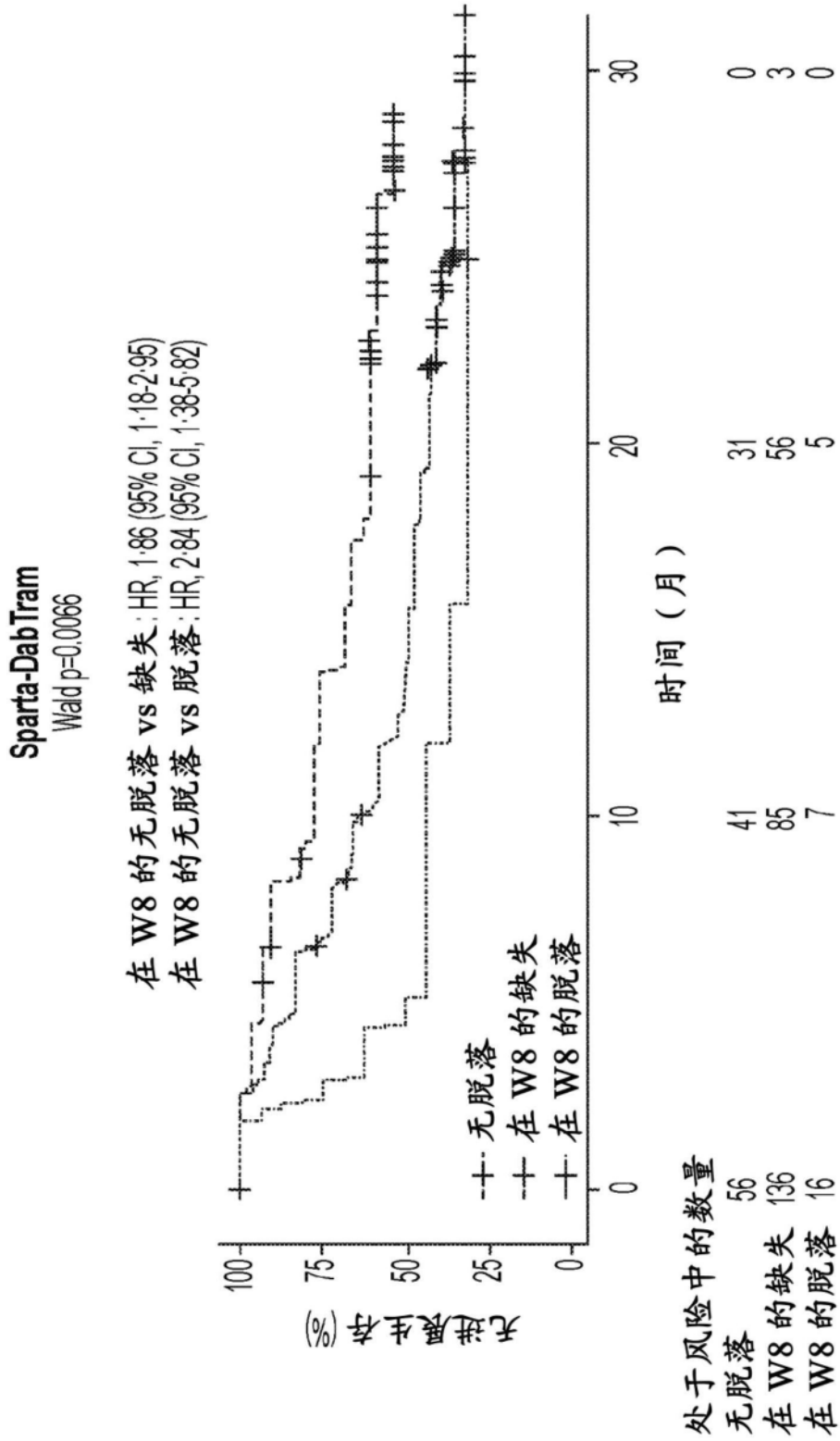


图19A(续)

安慰剂-Dab Tram

Wald  $p < 0.0001$

在 W8 的无脱落 vs 缺失: HR, 3.74 (95% CI, 1.78-7.86)  
在 W8 的无脱落 vs 脱落: HR, 7.15 (95% CI, 3.12-16.35)

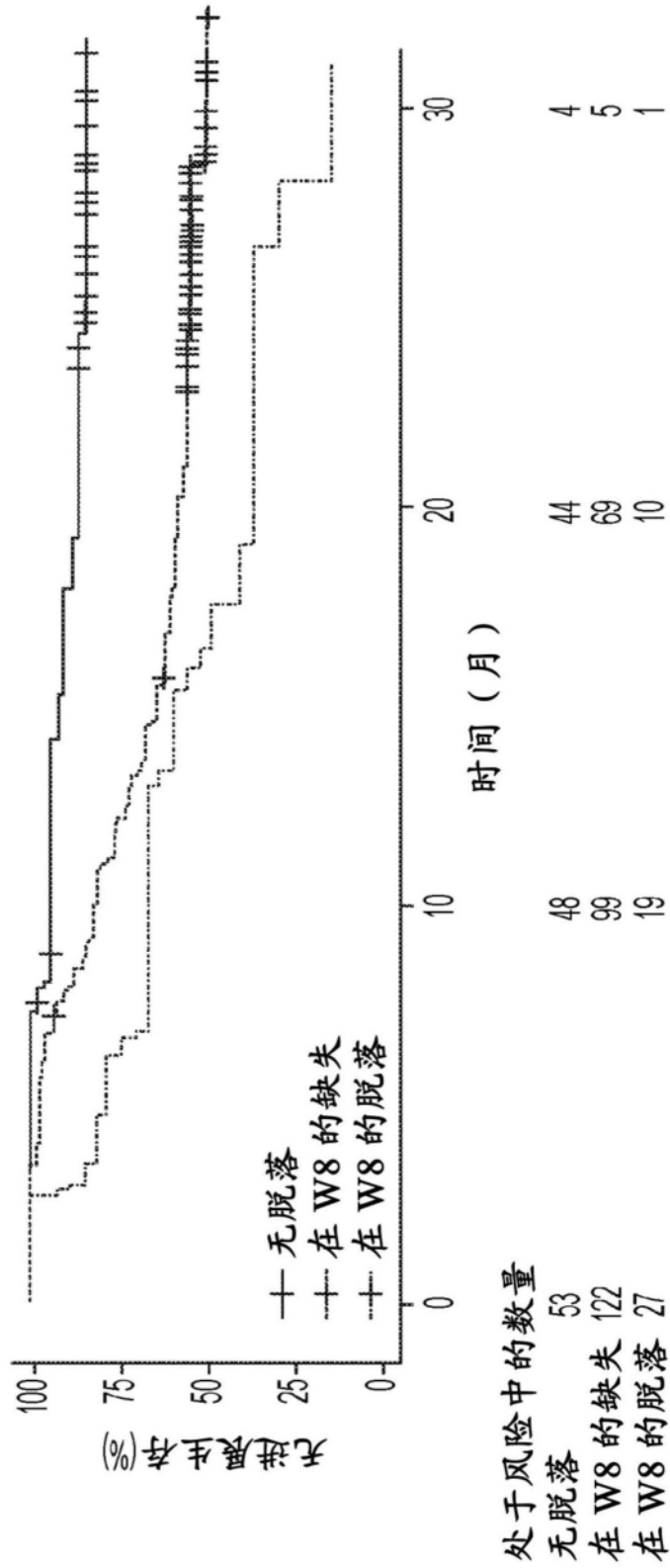


图19A (续)

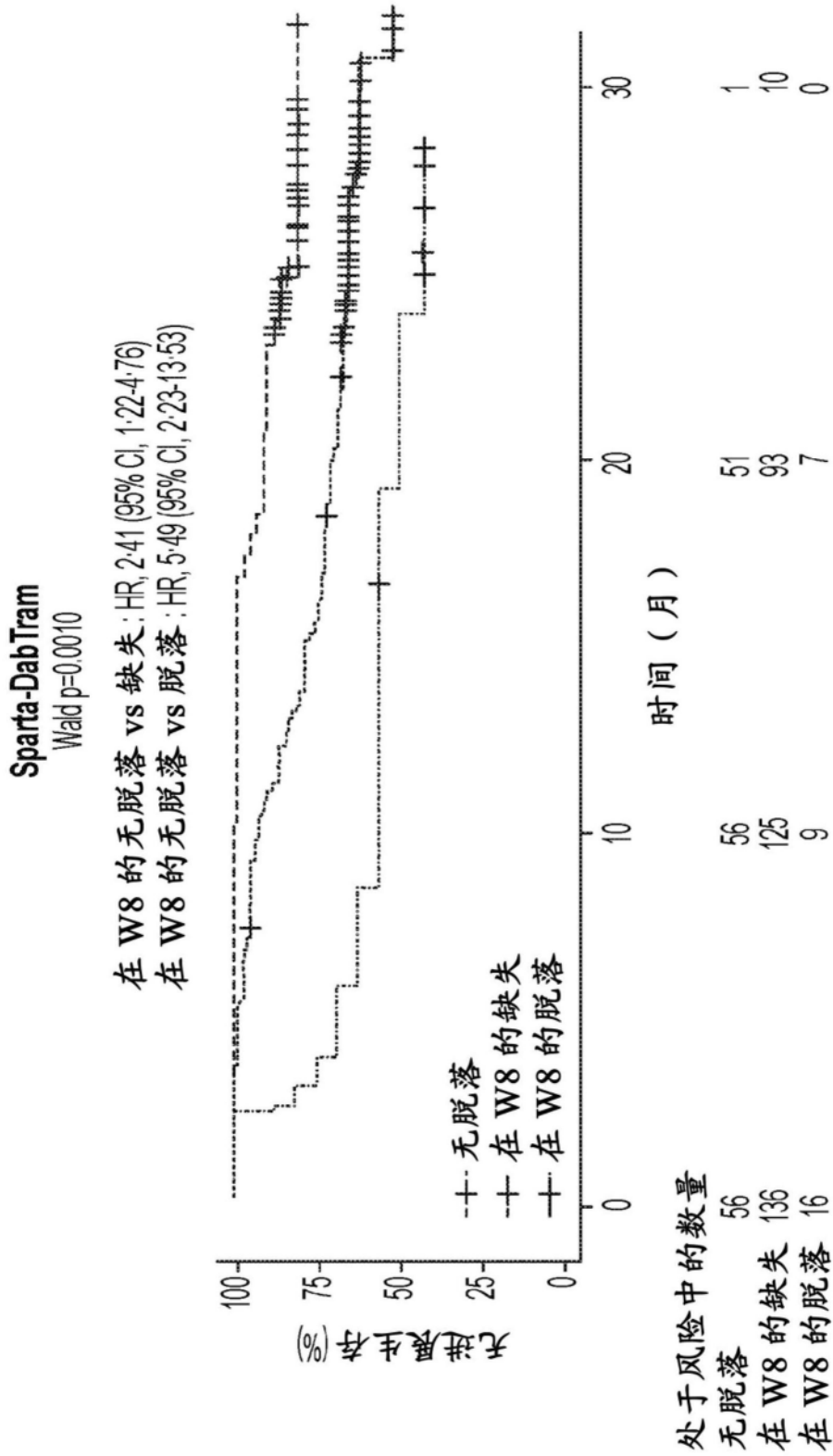


图19A(续)

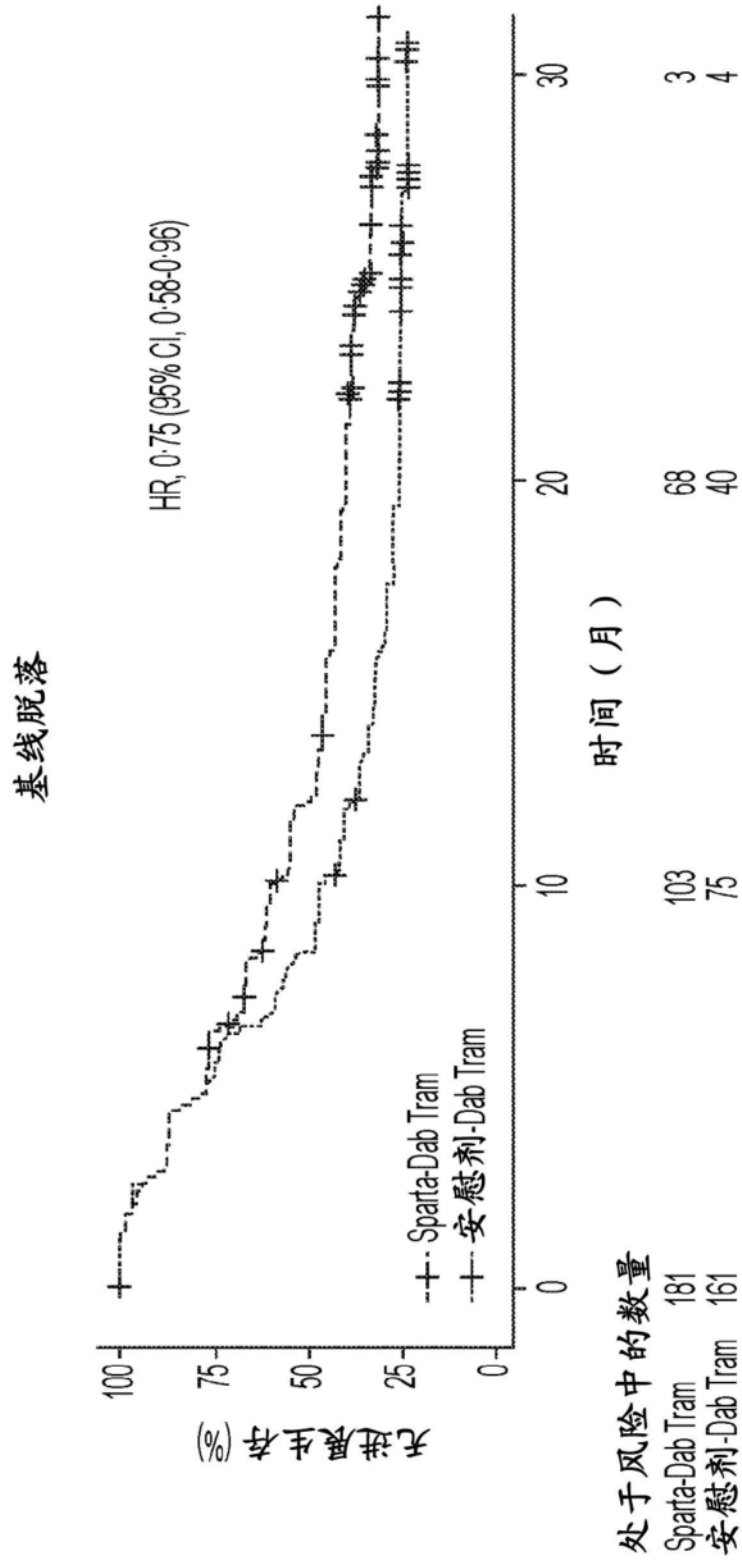


图19B

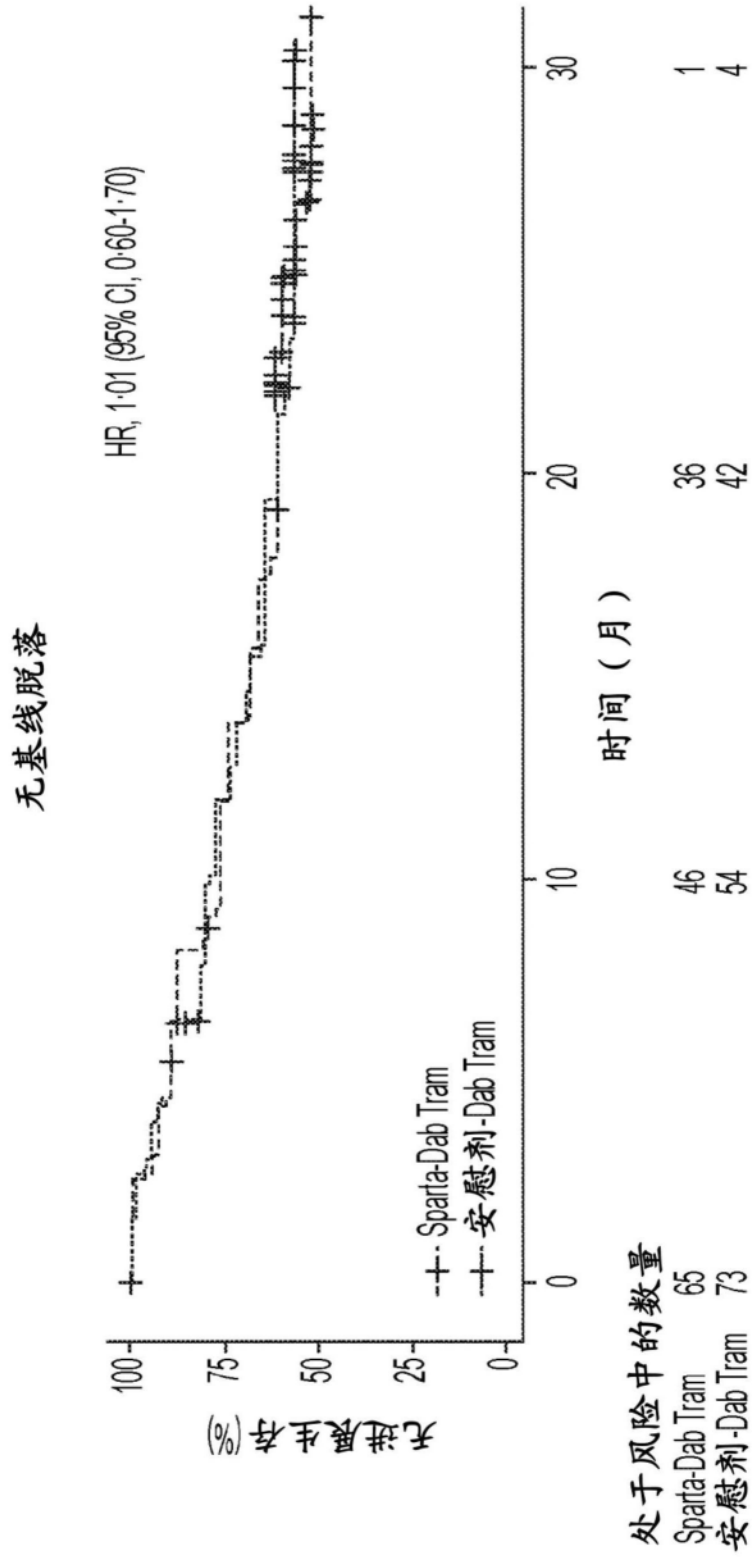


图19B(续)

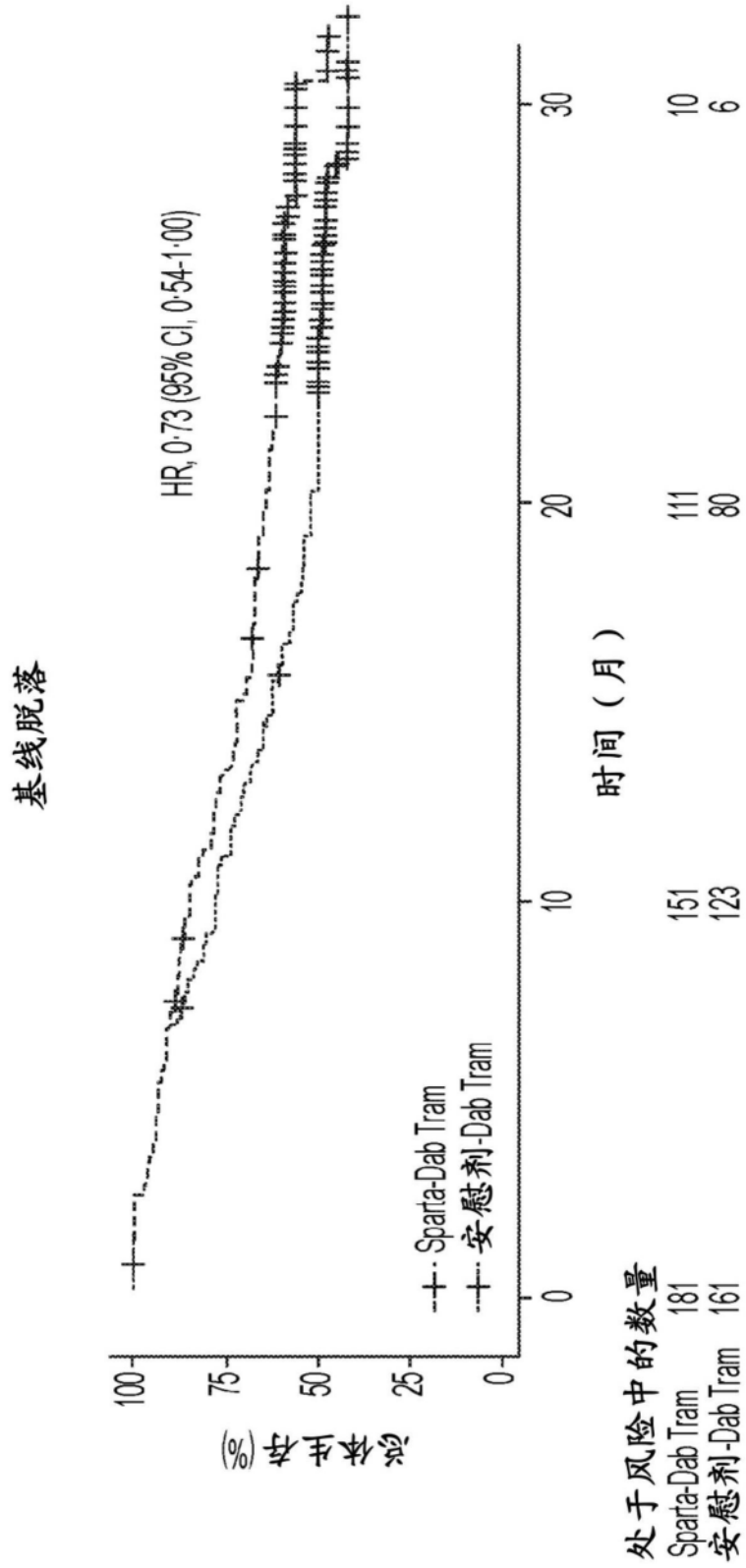


图19B(续)

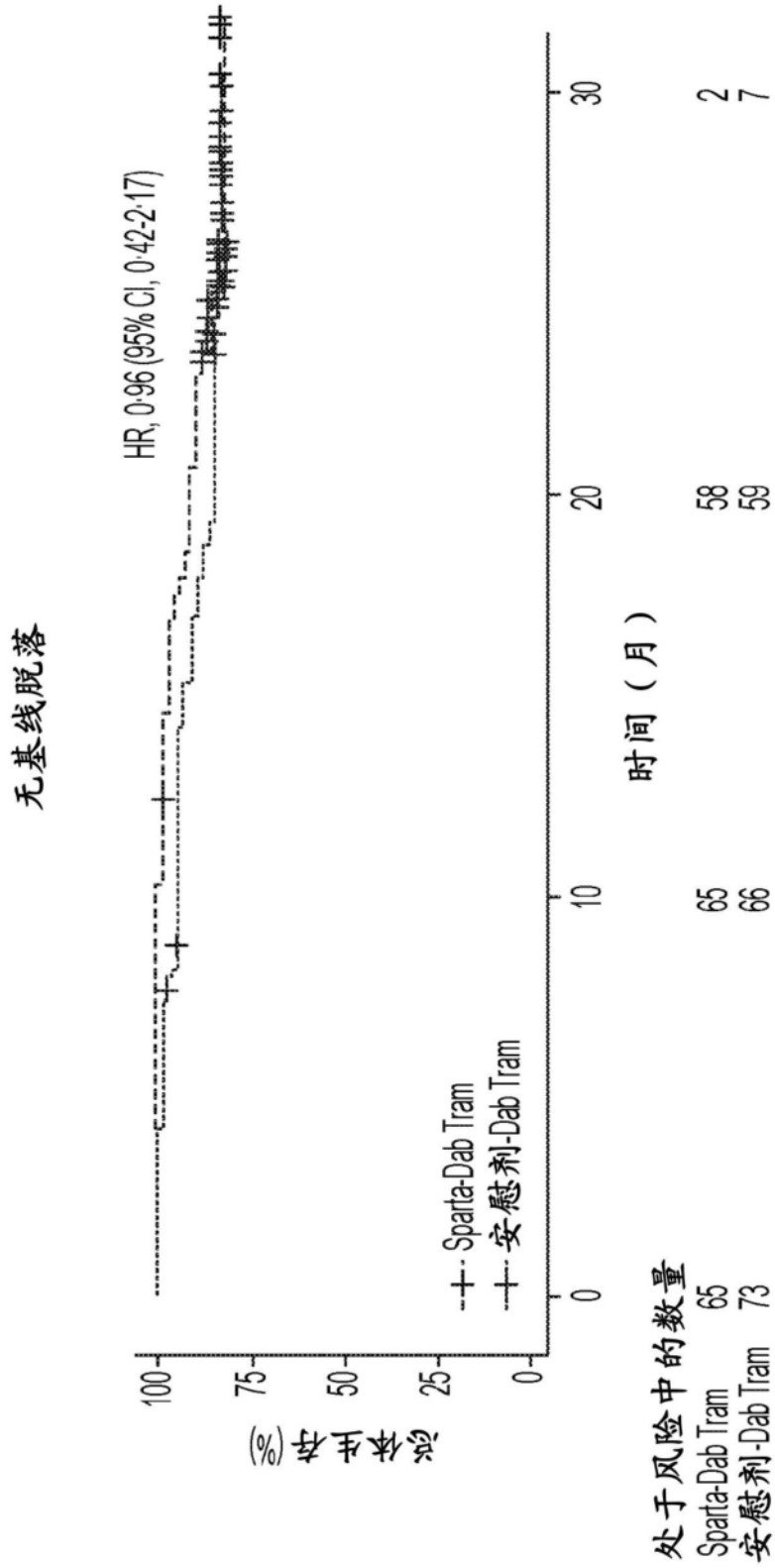


图19B(续)