免疫治疗相关分子标志物

|  |
| --- |
| {{ pict.detectdetail\_tnb\_a }} |

图示：肿瘤细胞激活免疫反应的模式图

（via Bristol-Myers Squibb Company.）

Tumor cell肿瘤细胞；Dying tumor cell肿瘤细胞死亡；APC Antigen-presenting cells抗原递呈细胞；Mutated DNA突变DNA；Nucleus细胞核；Tumor proteins肿瘤蛋白；Neoantigens新生抗原；MHC Major Histocompatibility Complex主要组织相容性复合体；TCR T cell receptor T细胞（抗原）受体。

**肿瘤免疫疗法具有独特优势，近年来发展迅速**

传统的肿瘤治疗方法包括手术治疗、放疗、化疗以及靶向药疗法四类。然而这四种方法均有各自的局限性：手术切除无法解决微小病灶以及转移性病灶的问题，且手术效果取决于患者肿瘤组织形态以及医生经验；放疗、化疗对于身体正常组织器官有较大的毒副作用；靶向药容易产生耐药性等问题。

肿瘤免疫疗法是新一代的抗肿瘤疗法，其基本思路是通过解除肿瘤微环境的免疫抑制、提高树突状细胞的抗原呈递功能及促进产生保护性T细胞等方式激活人体自身的免疫系统，从而达到识别和杀伤癌细胞的目的。基于ICI药物以及嵌合抗原受体（CAR）修饰T细胞（CAR-T）的研究进展，2013年《科学》杂志将肿瘤免疫疗法列为年度十大科学突破首位。2016年，美国临床肿瘤学会（ASCO）年报将肿瘤免疫治疗选为“Advance of the Year”，肿瘤免疫疗法在理论上和临床上均进入全面加速发展的阶段。

|  |
| --- |
| {{ pict.detectdetail\_tnb\_b }} |

肿瘤免疫疗法相比于传统疗法，具有独特的优势。由于免疫疗法的机制在于激活自身的免疫系统，识别并清除肿瘤细胞，因此一旦起效，患者将有可能获得动态的、持续的抗肿瘤免疫反应，肿瘤复发率低，甚至对于晚期癌症可实现临床治愈。另一方面，已有的临床实验数据显示，免疫药物整体而言比较安全，不良反应率较低。

目前肿瘤免疫疗法相关科学或临床研究主要集中在四个领域：免疫检查点抑制剂、过继性细胞疗法、肿瘤疫苗和微生物组。微生物组对于肿瘤免疫的影响目前处于概念验证的阶段，另外三种疗法与免疫系统的关系如右图所示：

Immune Checkpoint inhibitors免疫检查点抑制剂ICIs

Adoptive cell therapy过继细胞疗法

Cancer vaccines癌症疫苗

目前已获批的ICIs主要为PD-1/PD-L1及CTLA-4两类。CTLA-4又名CD152，与T细胞表面的共刺激分子受体CD28具有高度的同源性。当T细胞被活化后，CTLA-4转位至细胞表面，与CD28竞争性结合抗原呈递细胞（APC）表面的B7（CD80、CD86）受体，从而介导T细胞抑制信号通路的激活。缺乏CTLA-4的小鼠模型表现为全身多个器官爆发式的淋巴细胞浸润致死，显示了CTLA-4信号通路的免疫抑ss能。T细胞表面的细胞程序性死亡1受体（PD-1）被证明是其抗肿瘤过程中更为显著的负调因子。T细胞通过通过表面受体TCR识别肿瘤抗原后会释放大量炎性细胞因子，包括干扰素γ（IFN-γ）。IFN-γ强烈地刺激肿瘤细胞表达PD-1的配体PD-L1，而PD-1/PD-L1的结合则会激活PD-1信号通路，造成T细胞耗竭。此外，PD-L1被证明还可与CD80互作，向T细胞传递抑制信号。因此，PD-1和PD-L1抗体通过阻遏抑制信号的产生、减少T细胞耗竭，从而达到治疗肿瘤的目的。

尽管免疫检查点抑制剂具有多种优越性，但仍然面临较大的挑战

对于PD-(L)1单药的疗法，不同癌种响应率差别较大，整体有效率较低。对于霍奇金淋巴瘤和结缔组织增生恶性黑色素瘤，单药疗法的客观缓解率ORR保持在87%和70%，但对于非小细胞肺癌、肾癌、膀胱癌等癌种，ORR仅有15%-20%。究竟哪些患者能够从免疫治疗中更好的获益，还需要辅以体外诊断（IVD）从而进行用药指导；其次，还存在耐药性、超进展以及假性进展等问题。超进展是指肿瘤反常的加速生长现象。这一现象在ICI治疗中发生的比例约为9%，在大于65岁的老年患者中为19%，远大于化疗及靶向药。假性进展是指肿瘤在治疗过程中先增大后减小的现象，目前对于这一现象还没有很好的解释。

在这一背景下，为获得更理想的抗肿瘤应答率和持久性，以PD-(L)1抗体为“基石”的免疫组合疗法（I/O combo）应运而生，主要策略包括与其他肿瘤免疫疗法、靶向药、化疗或放疗等联合用药。由于免疫系统和肿瘤免疫机制的复杂性，组合效应叠加使得系统复杂度进一步提升，结果更难以预测。在药物开发阶段的临床患者入组以及药物上市后的药物选择方面，通过biomarker进行体外诊断，从而对患者筛选以及用药指导，同样是促使药物发挥疗效极其重要的影响因素。

伴随诊断的需求在肿瘤治疗的靶向药阶段就已经逐渐出现，但靶向药由于其作用机制较为明确，伴随诊断仅需对某一个/几个特定的基因类型进行检测，较为便捷因而相对成熟。肿瘤免疫疗法的伴随诊断涉及到免疫过程的多个阶段，其中的机制复杂交错，大多数情况下在科研上仍没有被充分解释，这对伴随诊断的准确性带来了极大的挑战。从概念上来说，肿瘤免疫治疗的核心在于帮助免疫系统更好地识别肿瘤这一异于自体正常情况的组织，解除肿瘤微环境的免疫抑制、加强肿瘤杀伤能力。因此，对不同分子标志物的全局检测，和对不同标志物所代表的分子机制，以及相互作用的理解，是免疫疗法体外诊断的核心。目前，对于ICIs，主流的分子标志物（FDA批准或NCCN指南推荐）包括：PD-L1蛋白表达水平，肿瘤突变负荷（TMB），微卫星状态（MS status）；获得较多研究支持、有潜力的分子标志物有：肿瘤新生抗原负荷（TNB），I型HLA杂合性，以及一系列基因变异等。

**肿瘤新抗原，I型HLA与新抗原负荷：个性化的肿瘤疫苗，和ICIs新型标志物**

肿瘤的发生与免疫系统的功能密切相关。在免疫系统中，MHC (主要组织相容性复合体, major histocompatibility complex) 是所有生物相容复合体抗原的一种统称。HLA (human leucocyte antigen) 就是人类的 MHC 基因，即人类白细胞抗原，位于 6号染色体，它所在的区域是人类基因组中多态性最高的区域之一，有高达上千个等位基因。HLA基因主要分为 HLA I类基因和II类基因，HLA I类基因包括 HLA-A、HLA-B、HLA-C，II 类基因包括HLA-DR、HLA-DM、HLA-DP等。HLA 基因编码产物在细胞毒性T细胞反应中作用至关重要，可以在细胞表面呈递可被T细胞受体识别的肽段。HLA I类分子主要与内源性的抗原结合，在内质网中形成抗原肽-HLA-I 类分子复合物，被转运到细胞表面，供 CD8+ T 细胞识别；HLA II 类分子主要与外源性抗原结合，通过内吞、吞噬作用将抗原摄取到抗原呈递细胞（APC）内，在内质网中形成抗原肽-HLA-II 类分子复合物，转运到细胞表面，供CD4+T 细胞识别。已经证实，HLA复合体中存在控制免疫应答的基因以及HLA参与约束免疫细胞间相互作用，这表示HLA涉及生命活动的各个水平与多个方面。研究表明，HLA分型可能影响对免疫疗法的响应。

癌细胞的蛋白编码基因中存在的突变是新抗原的潜在来源，这种新抗原可以成为肿瘤免疫治疗的生物标志物，帮助T细胞有效识别肿瘤细胞，促进免疫系统特异性靶向癌症，防止宿主癌症发展。MHC分子可以将肿瘤细胞特异的新抗原递呈到肿瘤细胞膜外，进而被细胞毒性T细胞识别并杀伤。通过评估肿瘤样本中所有突变基因与MHC分子的亲和力，可以获得肿瘤样本中候选的新抗原，从而制备安全有效的肿瘤

特异T细胞。

“Neoantigens（新抗原）”就是肿瘤中的突变多肽，在正常组织中不存在。通常情况下，抗原性越强，免疫治疗效果越好。

肿瘤新生抗原负荷 (TNB，Tumor Neoantigen Burden)是反应肿瘤细胞中总的新生抗原数量的一个指标，通常以每百万碱基(Mb)的肿瘤基因组区域中包含的肿瘤新生抗原数量来表示，TNB指标基于肿瘤新生抗原预测软件流程结果提出，现阶段可作为TMB指标的一个辅助指标。TNB水平高的肿瘤患者，代表其肿瘤细胞表面的肿瘤新生抗原数量越多，免疫细胞能对肿瘤细胞产生更有效的杀伤作用，预示着TNB水平高的肿瘤患者，能对免疫检查点抑制剂药物有更好的治疗响应。

**肿瘤突变负荷（TMB）**

|  |
| --- |
| {{ pict.detectdetail\_tnb\_c }} |

肿瘤突变负荷（Tumor mutational load，TMB）的定义为每个癌症组织全外显子测序或靶向测序每百万碱基（Mb）中的体细胞突变数目。新的突变产生的肿瘤特异性抗原，是激活肿瘤特异性T细胞反应的重要因素。很多研究都发现不同肿瘤及不同患者中，突变负荷和肿瘤特异性抗原与免疫检查点抑制剂治疗效果之间存在相关性。

多项临床研究发现，在不同肿瘤类型的患者中，突变负荷和肿瘤特异性抗原与免疫治疗效果之间存在相关性。CheckMate-026研究比较PD-L1表达阳性的IV期或复发性非小细胞肺癌患者中纳武利尤单抗单药治疗与含铂化疗的疗效，结果显示纳武单抗用于PD-L1表达≥5％的患者无进展生存期与化疗相比没有改善。后期探索性分析发现，按照TMB的三分位数将患者分为TMB高、中、低三组，在高TMB组，纳武利尤单抗与含铂化疗相比，客观缓解率升高（46.8％ vs 28.3％），PFS明显延长（中位PFS为9.7对5.8个月）。

在另一项针对非小细胞肺癌的临床研究中，研究者以中位TMB为分界，将患者分为高TMB组和低TMB组，在发现队列中，高TMB与低TMB组接受帕博利珠单抗治疗的可持续临床获益率分别为73%和13%，在验证队列中，高TMB与低TMB组的可持续临床获益率分别为83%和22%21。 Checkmate-227研究结果提示，TMB≥10的非小细胞肺癌患者一线接受纳武利尤单抗和Ipilimumab联合治疗，无论PD-L1表达状态如何，联合治疗组的客观缓解率和PFS均优于化疗组（客观缓解率 45.3％ vs 26.9％；PFS 7.2个月vs 5.5个月；HR 0.58，97.5% CI, 0.41 to 0.81；P＜0.001）。

一项临床研究以接受Atezolizumab作为二线治疗的非小细胞肺癌患者作为研究对象，通过检测循环肿瘤DNA（Circulating tumor DNA，ctDNA）计算bTMB，研究结果显示，bTMB≥16的患者中，Atezolizumab跟化疗相比PFS明显延长。

|  |
| --- |
| {{ pict.detectdetail\_tnb\_d }} |

一项针对黑色素患者的临床研究显示，接受Ipilimumab达到长期临床获益的患者，TMB明显高于未达到长期临床获益的患者。在发现队列中，高TMB（＞100 mutations）的患者OS延长，在验证队列中，高TMB（＞100 mutations）的患者OS有延长的趋势。

Atezolizumab 的一项II 期临床研究发现PD-L1表达水平、膀胱癌亚型和突变负荷可独立预测患者对Atezolizumab 的敏感性。Atezolizumab有响应组的TMB平均为12.4/Mb，显著高于非响应组6.4/Mb （p＜0.0001＝。在该临床试验中，经一线铂类化疗后进展的患者队列中，TMB最高的前四分之一的患者经Atezolizumab治疗后生存率显著高于其它患者，这一发现在顺铂不耐受而接受Atezolizumab作为一线治疗的队列中得到验证（p<0.01）。