

PD-1单抗联合化疗用于食管癌围手术期 新辅助治疗项目预实验分析报告

医学大数据中心

2020-04-16

目录 / CONTENTS

01 患者样本信息

02 WES相关分析

03 小结

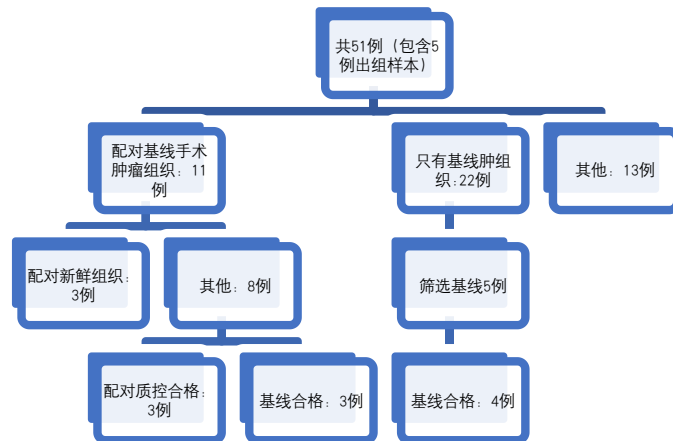
01

患者样本信息

收样信息

北京301医院食管癌新辅助免疫治疗项目										
序号	姓名	是否检测	是否出组	是否手术	手术时间	基线血液	基线组织	术前血液	术中组织	术后血液
1	郝卫群	✓	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	○ (术后病理在301医院)	● (术后一个月)
2	陈全文	基线DNA不合格E类	是	是	2018/10/21	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
3	吴正路	✓	是	是	2018/10/31	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
4	张存国	是	是	是	7月22日	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
5	曹海和	基线DNA不合格E类	是	是	8月15日	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
6	李洪朋	✓	是	是	8月14日	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
7	许光亮	是	是	是	8月22日	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
8	李家平	✓	是	否		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
9	惠成生	✓	是	否		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
10	李春超	✓ 术中DNA不合格	否	否		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
11	初万益	基线HE染色不合格	否	否		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
12	吴瑞根	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
13	代广仁	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
14	郝秀生	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
15	孔凡青	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
16	李庭善	✓	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
17	李长义	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
18	马洪昌	✓ 术中HE不合格	否	否		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
19	马晓萍	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
20	牛喜红	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
21	王世荣	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
22	沃学善	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
23	赵晶	✓ 术中HE不合格	否	否		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
24	赵相林	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
25	任志林	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
26	张莹芬	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
27	付士国	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
28	于才	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
29	田海平	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
30	贺振刚	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
31	褚志民	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
32	李发	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
33	韩继力	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
34	王洪亮	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
35	郑宏鑫	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
36	张高菊	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
37	郝宜平	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
38	时晓宇	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
39	夏长军	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
40	何志清	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
41	曹德贵	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
42	于才	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
43	董恩民	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
44	程广俊	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
45	关义忠	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
46	于洪波	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
47	李德宇	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
48	傅德强	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
49	赵建豪	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
50	赵恒利	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
51	张立和	是	是	是		● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (剩5张切片)	● (术后一个月)
备注: ● 表示实验室已收样 ○ 表示未收样										

共收样51例:
出组: 5例
筛选10例进行外显子预实验





Patient	ID	残留肿瘤细胞比例	坏死有无	多核巨细胞有无	纤维化/钙化	淋巴细胞浸润	临床疗效评价	基线WES	手术WES
李*朋	LHP	80%	有	有	纤维化	淋巴细胞	PR	✓	✓
栗*生	LCS	80%	有	有	纤维化	淋巴细胞	PR	✓	✓
马*昌	MHC	<1%	有	有	纤维化	淋巴细胞	PR	✓	术中HE不合格
吴*稳	WZW	>90%	无	无	纤维化	淋巴细胞	PR	✓	✓
赵*	ZJ	40%	无	有	纤维化、钙化	淋巴细胞	SD	✓	术中HE不合格
郝*星	HWX	<1%	无	无	纤维化	淋巴细胞	SD	✓	
李*平	LJP	未手术					PR	✓	
李*起	LCQ						PR	✓	
代*仁	DGR	0	无	无	纤维化	淋巴细胞	PR	✓	
李*暴	LCB	60%	无	泡沫细胞	纤维化	淋巴细胞	SD	✓	

- 该项目目前收集了10例食管鳞癌患者的治疗前基线肿瘤组织，其中患者LHP、LCS和WZW取到了新辅助治疗后的肿瘤组织。
- 我们分别进行DNA提取、构建WES文库和测序。
- 后续分析中，基线样本用（-B）表示，术后样本用（-S）表示。

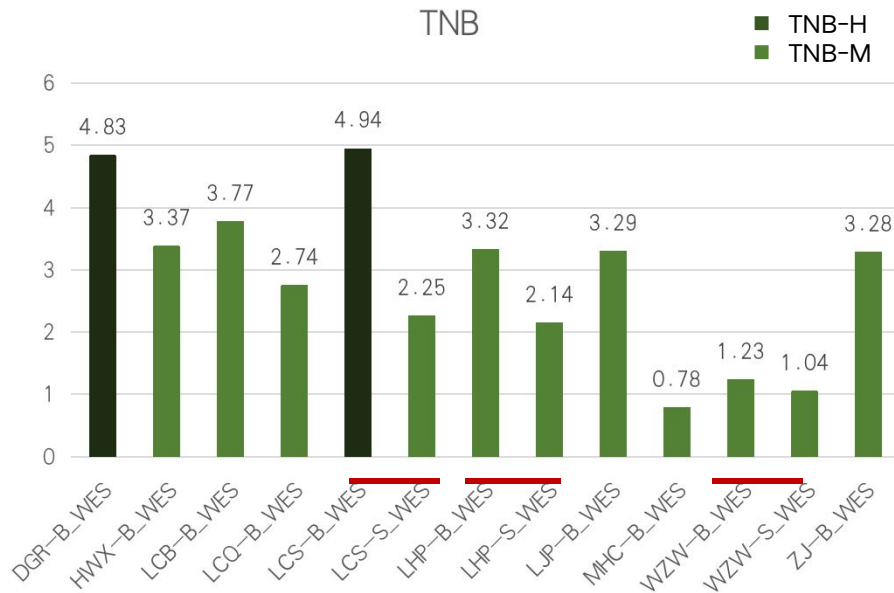
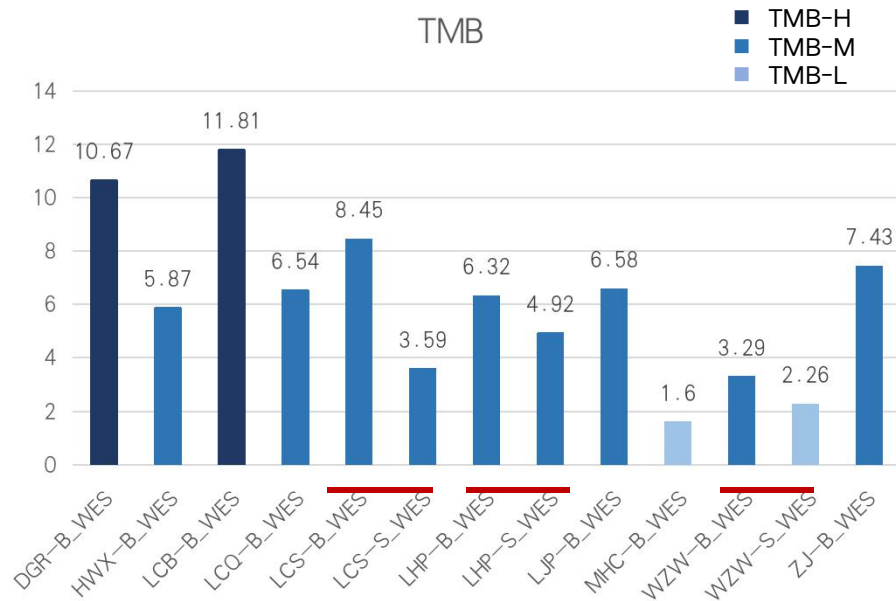
02

WES相关分析



肿瘤突变负荷和肿瘤新生抗原负荷情况

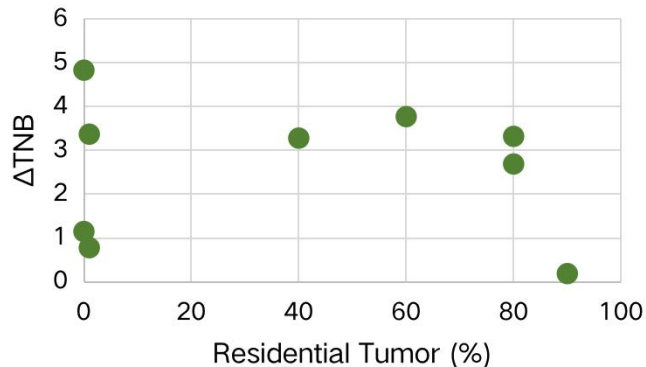
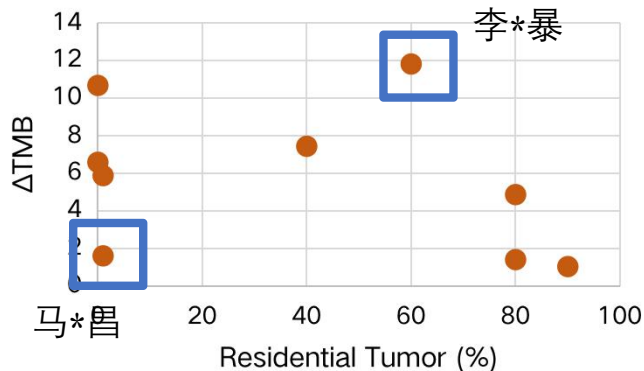
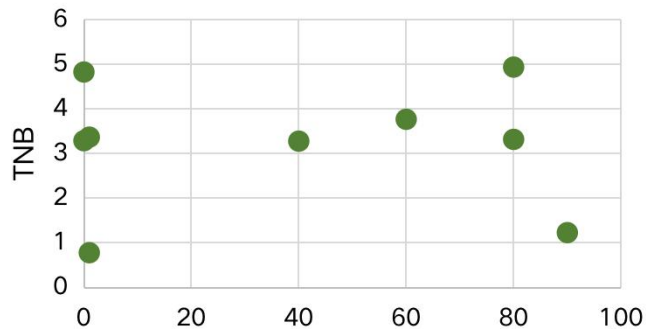
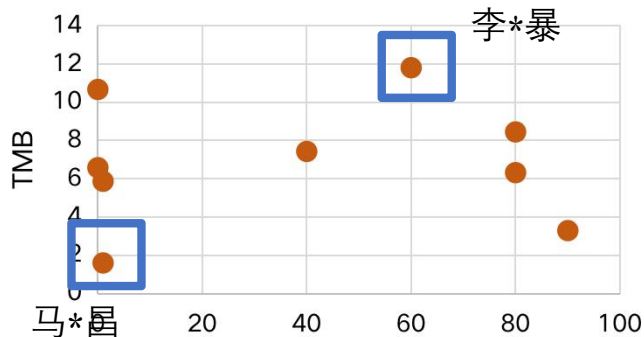
YUEN BIO



- 通过对样本进行肿瘤突变负荷（TMB）和肿瘤新生抗原负荷（TNB）的检测，患者DGR和LCB为TMB-H，其余患者为TMB-M或TMB-L的状态。并且除了患者DGR和LCS的基线样本的TNB为TNB-H，其余患者的样本都为TNB-M。
- 对于患者LHP、LCS和WZW，对比基线的TMB和TNB水平，手术样本检测出有不同程度的降低。



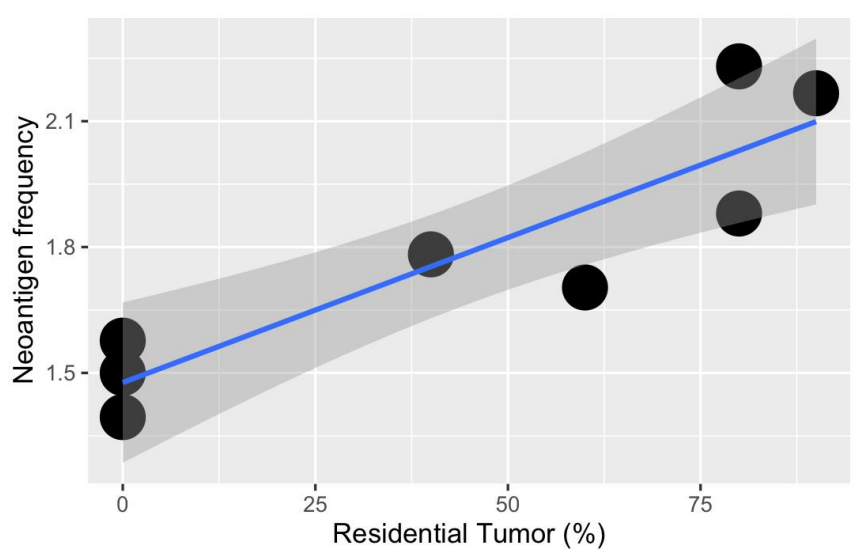
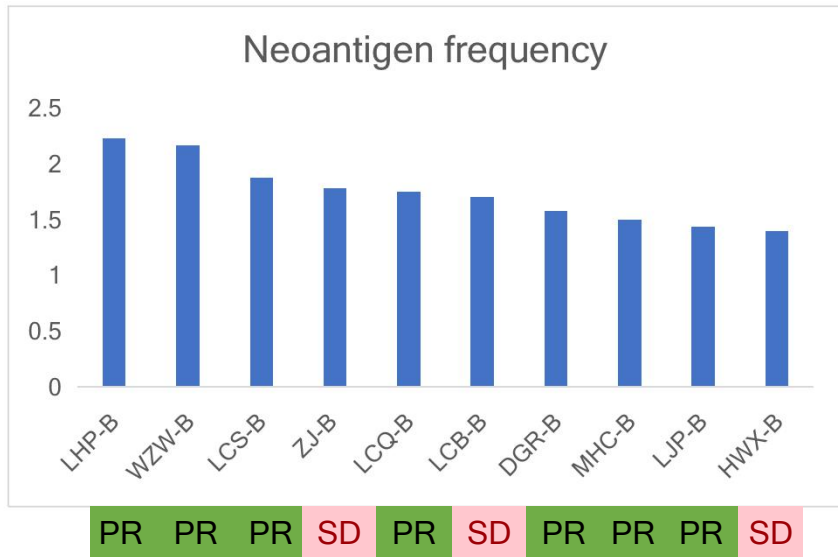
TMB/TNB变化与残留肿瘤比例关系



- 各样本TMB/TNB与残留肿瘤比例，各样本前后TMB/TNB变化与残留肿瘤比例分析，没有发现明显的相关性。



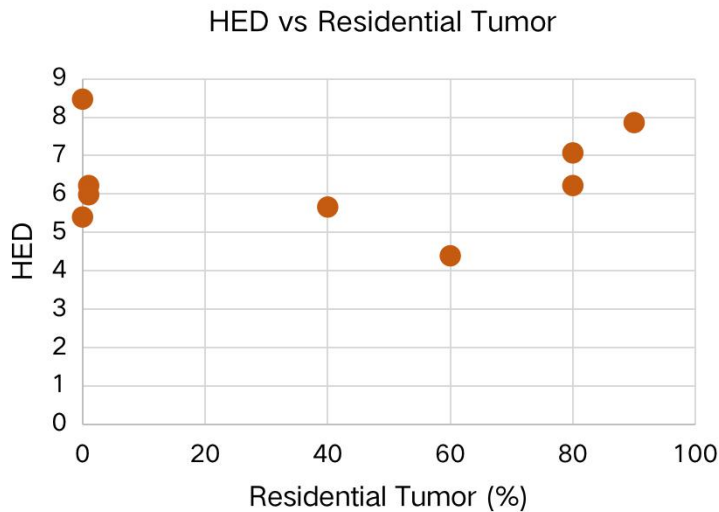
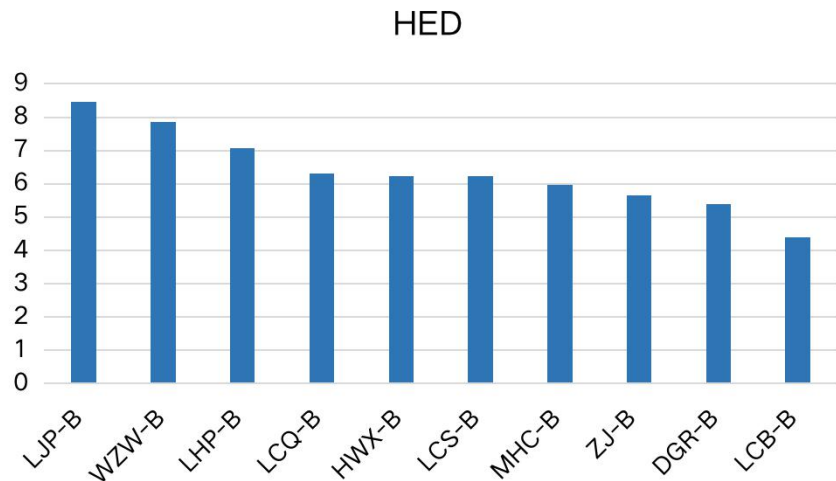
新生抗原频率与肿瘤残留率相关



■ 新生抗原频率与肿瘤残留率相关 $p = 0.002311$; $R^2 = 0.8101$ 。



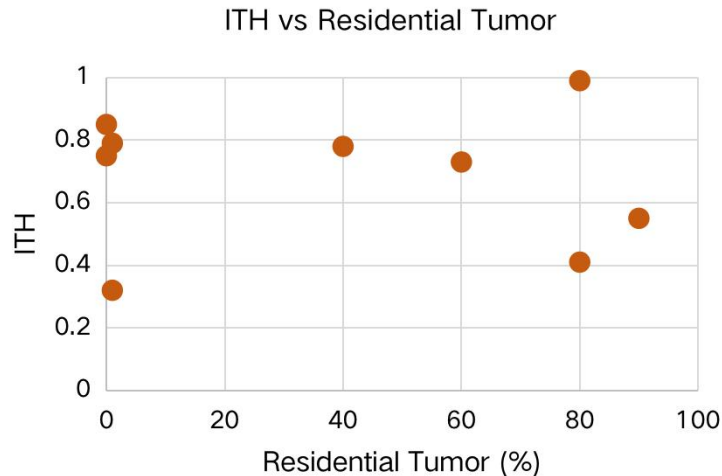
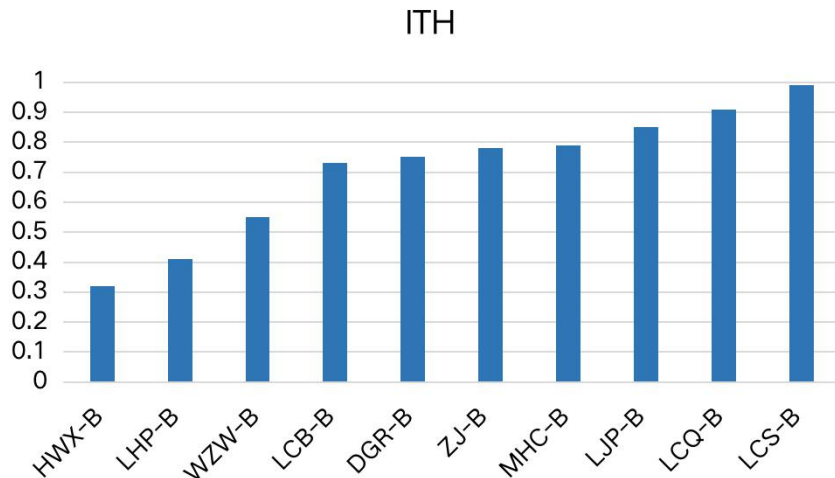
I 型HLA进化差异（HED）与残留肿瘤比例关系



- HED为种系HLA-1进化差异，通常高HED患者表现出更好的免疫治疗疗效。通过比较各样本HED数值与残留肿瘤比例关系，没有发现明显的相关性。



肿瘤内异质性（ITH）与残留肿瘤比例关系



- ITH为肿瘤内异质性，通常低ITH的患者会表现出更好的免疫治疗疗效。通过比较各样本ITH数值与残留肿瘤比例关系，没有发现明显的相关性。



免疫治疗正向和负向相关biomarker情况

	DGR-B_WES	HWX-B_WES	LCB-B_WES	LCQ-B_WES	LCS-B_WES	LCS-S_WES	LHP-B_WES	LHP-S_WES	LJP-B_WES	MHC-B_WES	WZW-B_WES	WZW-S_WES	ZJ-B_WES
dMMR	—	—	—	—	POLD1,p.Arg195*,0.0134	—	—	—	—	—	—	—	BRCA2,p.Ala2185Val,0.2791
DDR	—	ATR,p.Gln1926His,0.0952	—	—	—	—	—	BRIP1,p.Ile319Asn,0.0851	—	—	—	—	BRCA2,p.Ala2185Val,0.2791
MSI	3.31	2.31	0.87	3.16	0.71	3.47	5.88	1.79	3.33	1.15	4.94	4.6	4.03
HLA突变	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B2M突变	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ALK融合	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EGFR突变	EGFR,p.Ser687Ile,0.0367	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
JAK1/2突变	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PTEN突变	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
STK11突变	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MDM2扩增	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MDM4扩增	—	—	—	—	MDM4,amp8	—	—	—	—	—	—	—	—
DNMT3A突变	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

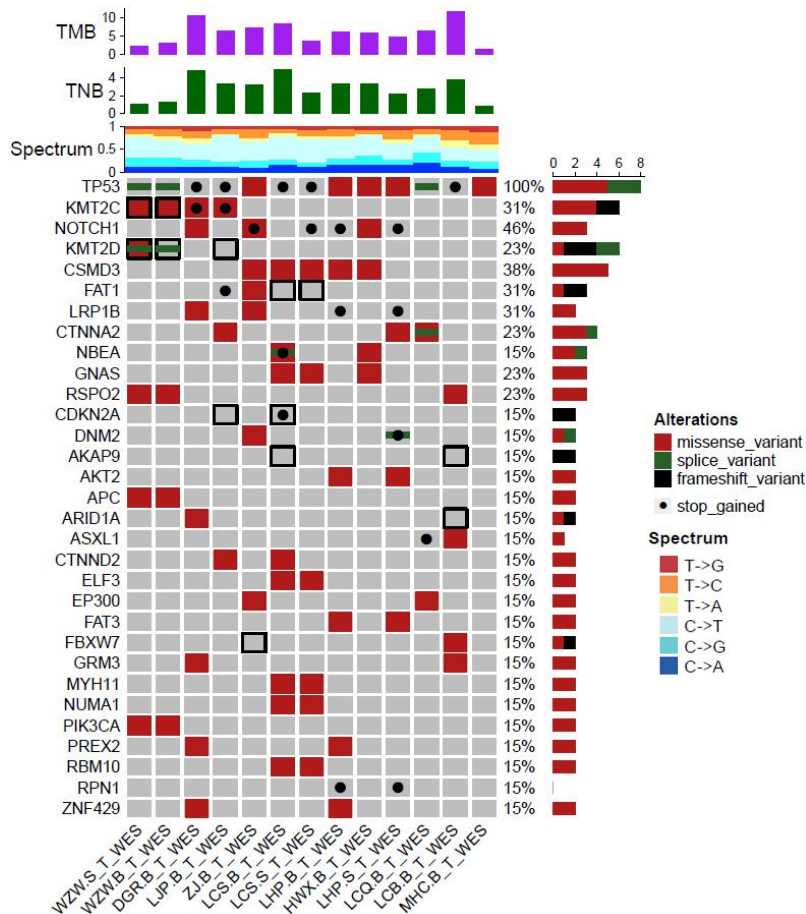
- 在与免疫治疗相关的biomarker分析中，发现患者HWX、LCS、ZJ的基线样本和LHP的手术样本携带dMMR或DDR相关的突变。所有患者的MSI都处于较低的水平。
- 患者DGR的绩效样本检测到较低频的EGFR突变。
- 患者LCS的基线样本检测到与免疫治疗负向相关的MDM4基因高拷贝数扩增。





高频肿瘤样本驱动基因分析

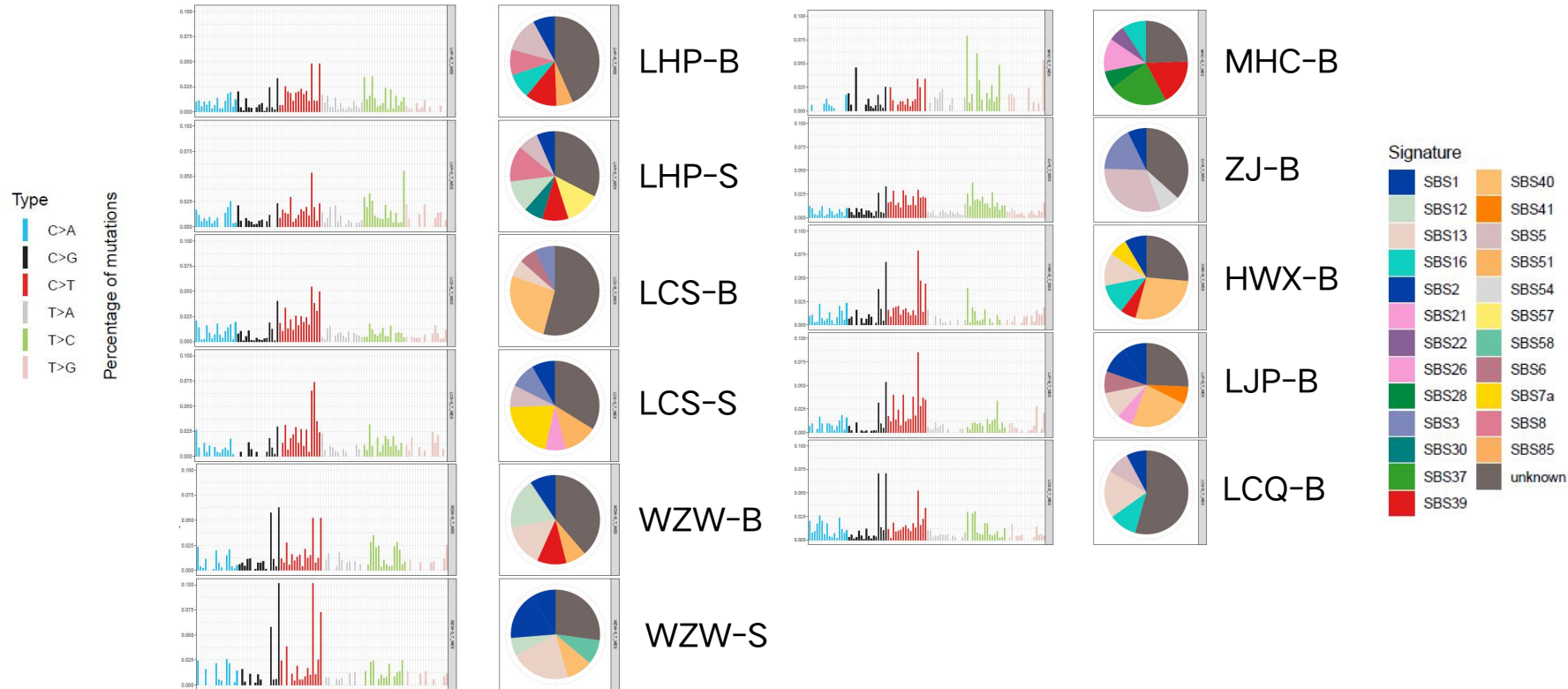
YU BIO



- 肿瘤驱动基因分析发现不同患者共享很多driver gene 相关的突变。
- TP53的突变在所有患者中均检测到，非常高频。
- 观察到基因KMT2C、KMT2D与基因NOTCH1、CSMD3、FAT1存在突变互斥现象。



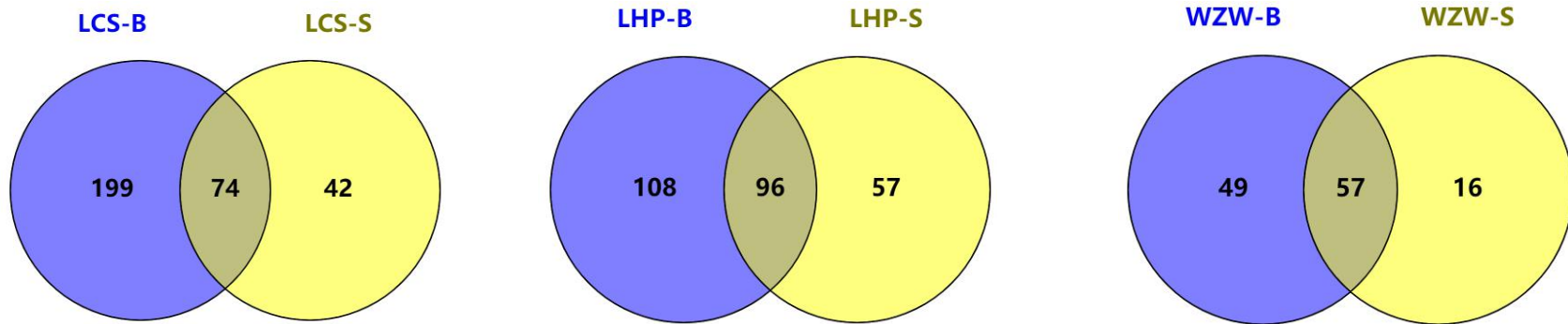
突变signature分析



- 对所有样本的突变进行Signature分析，发现不同患者的signature类型和比例呈现一定的差异。对比患者LHP、LCS和WZW在两次取同样本的Signature比较，发现它们共享同一些signature类型，但是比例发生了变化。



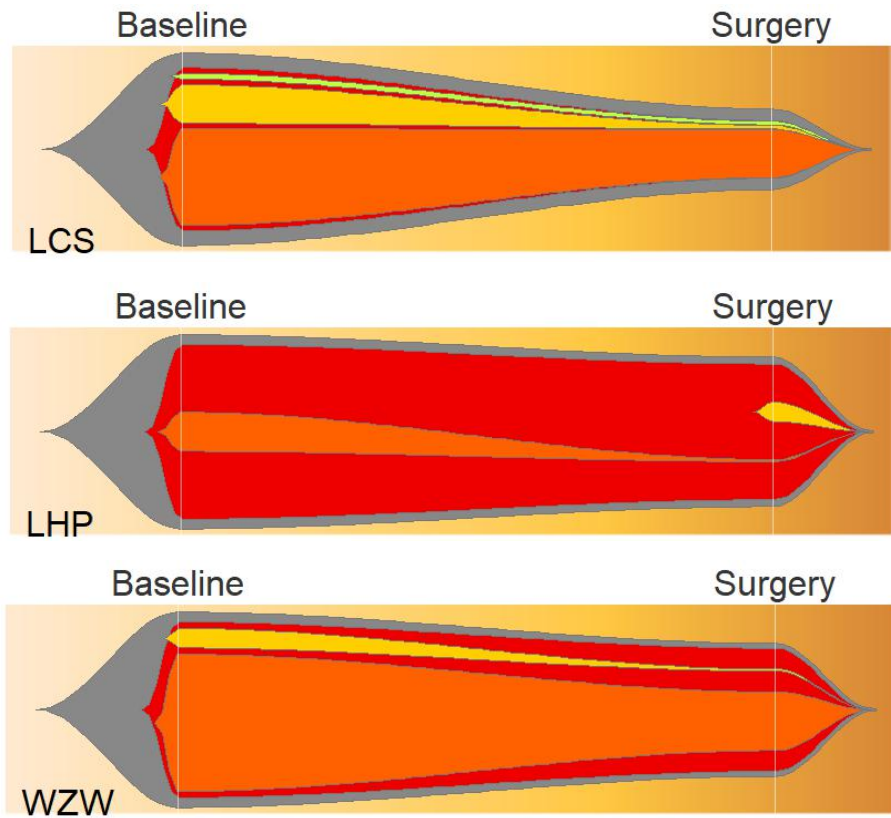
两次取样共同突变位点数量



- 对比患者LCS、LHP和WZW两次取样的突变位点，发现有大量共有的突变位点，而手术样本的特有突变，也表明肿瘤克隆发生的变化。



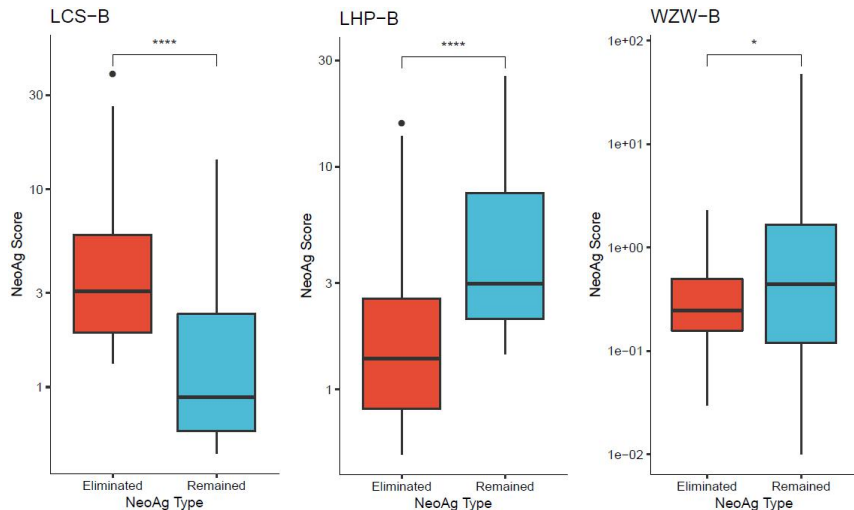
治疗前后肿瘤克隆进化分析



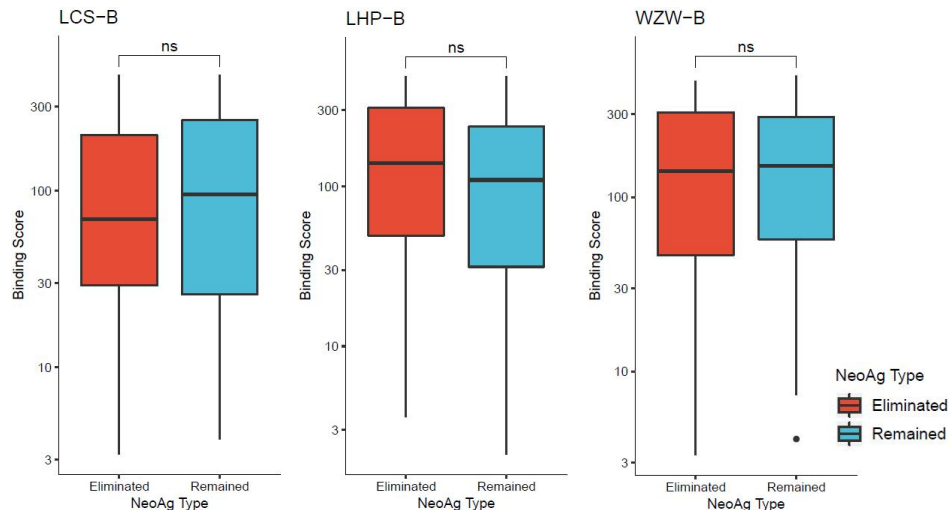
- 进一步对比患者LHP、LCS和WZW两次取样的样本进行肿瘤克隆进化分析，发现主要的肿瘤克隆在两次取样中均检测到。并且对比主克隆，发现一些较小的亚克隆在新辅助治疗后缩少的幅度更大。



Neoantigen Score



MHC Binding Score



- 肿瘤新生抗原评分代表肿瘤新生抗原的质量，分数越高越有可能被免疫识别。通过对比患者两次取样前后的肿瘤新生抗原变化，发现患者LCS被清除突变的新生抗原评分高于保留的，而患者LHP和WZW被清除突变的新生抗原评分低于保留的。结合前面克隆进化分析的结论，患者LHP和WZW的主克隆突变预测肿瘤新生抗原更多地被保留下来，提示存在不同程度的免疫耐药。
- MHC结合评分代表肿瘤新生抗原被MHC识别和呈递的能力，分数越低结合能力越强，从结果上看，患者LHP、LCS和WZW被清除和被保留下来突变的肿瘤新生抗原在MHC识别能力上没有明显差异。

03

小结



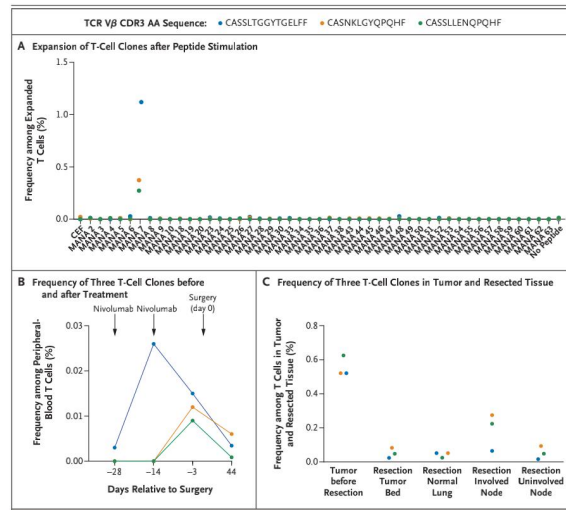
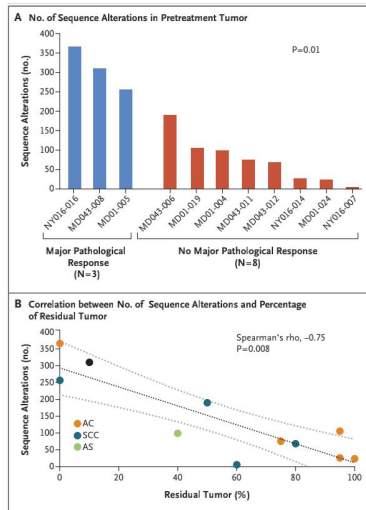
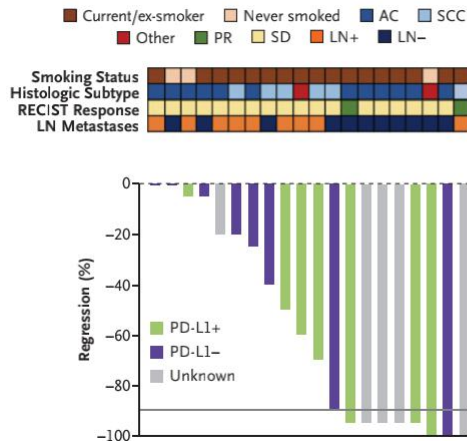
新辅助免疫治疗疗效相关的标记物

经典的标志物PD-L1在大部分的新辅助免疫治疗临床试验都与疗效不相关，TMB在部分的研究里相关。

No.	Biomarker	Correlation	Drug	Cancer	Patients	Key points	Reference
1	tumor-resident T-cell clones and a favorable IFNg gene signature	Relapse	ipilimumab plus nivolumab	melanoma	10	Neoadjuvant VS adjuvant	Blank CU, Rozeman EA, Fanchi LF, Sikorska K, van de Wiel B, Kvistborg P, et al. Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma. Nat Med 2018;24:1655–61.
2	lymphocyte infiltration & clonal and diverse T cell infiltrate	Response	ipilimumab plus nivolumab/nivolumab	melanoma	23	combine VS single	Amaria RN, Reddy SM, Tawbi HA, Davies MA, Rossi MI, Glitza IC, et al. Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma. Nat Med 2018;24:1649–54.
3	anti-tumor response at 3 weeks	DFS	pembrolizumab	melanoma	27	time	Huang AC, Orlowski RJ, Xu X, Mick R, George SM, Yan PK, et al. A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma. Nat Med 2019;25:454–61.
4	dMMR	mPR	ipilimumab plus nivolumab	colon cancer	14		Chalabi M, Fanchi L, Van den Berg J, Beets G, Lopez-Yurda M, Aalbers A, et al. LBA37_PR neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in early stage colon cancer. Annal Oncol 2018;29 Suppl 8:mdy424.047.
5	TMB/TNB	MPR	nivolumab	NSCLC	12	neoantigen-specific T-cell clones	Forde PM, Chaft JE, Smith KN, Anagnostou V, Cottrell TR, Hellmann MD, et al. Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer. N Engl J Med 2018;378:1976–86.
6	CD8+ T-cells, late-activated NK-cells, memory CD4+ and memory CD8+ T-cells; changes in PB NK- cells, a decrease in M-MDSCs and a Th-2 and Th-17- response related DC subpopulation	MPR	atezolizumab	NSCLC	180		OezkanF, HeK, OwenD, et al. Comprehensive peripheral blood immunophenotyping and T-cell clonal analysis during neoadjuvant immunotherapy with atezolizumab in NSCLC[J]. Thorac Oncol, 2018 13 (10Suppl): S369. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.347 .



A Percentage of Pathological Regression, According to Subgroup



结果

1. 新辅助治疗副作用低，在21个切除的肿瘤中，20个完全切除切除。20例肿瘤中9例（45%）出现主要病理改变。
2. PD-L1与疗效无关，TMB有关在
3. 有效的新辅助免疫治疗与外周血中肿瘤特异性CD8+T细胞的快速扩张有关

结论

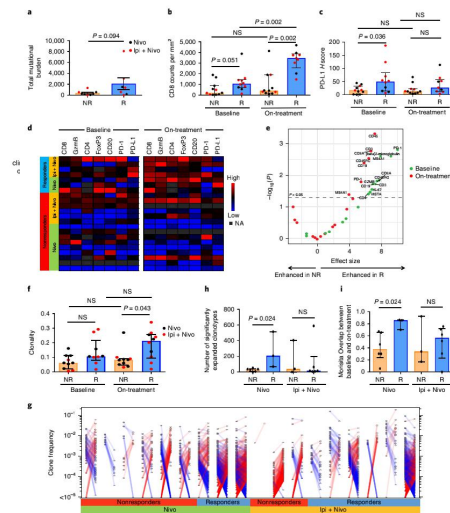
新佐剂nivolumab的副作用很少，不会延迟手术，在45%的切除肿瘤中引起了主要的病理反应。肿瘤突变负荷预测PD-1阻断的病理反应。治疗诱导突变相关的新抗原特异性T细胞克隆的扩增在外周血中。



三篇Nature medicine黑色素瘤新辅助治疗

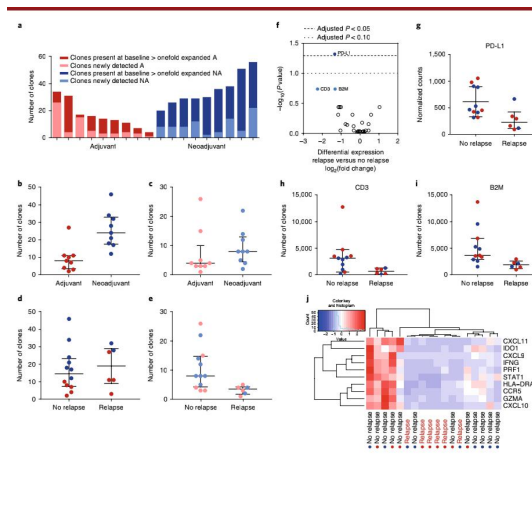
YU BIO

Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma



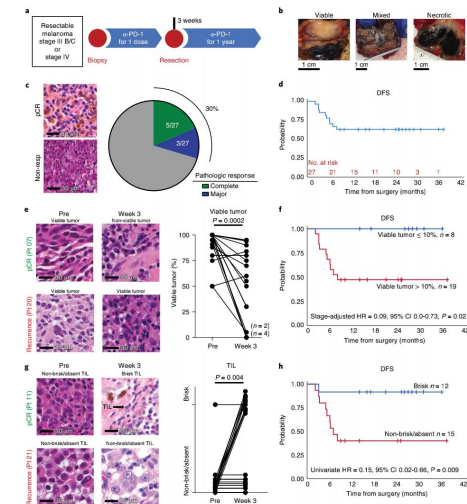
联合 VS 单药：高ORR以牺牲副作用为代价
疗效标记物：T细胞克隆数与应答相关。

Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma



新辅助 VS 辅助
疗效标记物：TCR/GEP与复发相关

A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma



3周的病理评价与DFS相关
疗效标记物：GEP与复发有相关性相反；疾病复发的病人抵抗机制包括免疫抑制，突变逃逸和/或肿瘤进化



RESEARCH ARTICLE

Open Access



Paired whole exome and transcriptome analyses for the Immunogenomic changes during concurrent chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma

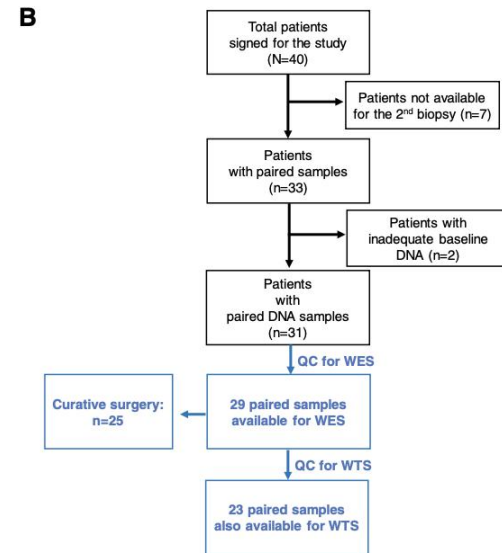
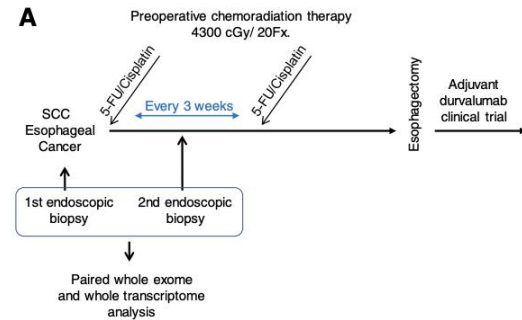
Sehhoon Park^{1†}, Je-Gun Jo^{2†}, Yang Won Min^{3†}, Jae-Yong Nam², Daeun Ryu², Dongryul Oh⁴, Woong-Yang Park², Se-Hoon Lee¹, Yoon La Choi⁵, Jin Seok Ahn¹, Myung-Ju Ahn¹, Keunchil Park¹ and Jong-Mu Sun^{1*}

结果:

- 23份WTS样本中有14份 (60.8%) 显示CCRT后免疫评分升高。免疫评分增加的患者无进展生存率高于其余患者 (83.1%对57.1%, $p=0.25$)。
- 肿瘤突变负荷和新抗原负荷显著增加CCRT后降低 ($p<0.001$)。我们没有观察到与非同义突变的特殊相关性, 也没有观察到变化在CCRT后的单核苷酸变异谱中。
- CCRT后的样本富含与免疫相关的基因集信号途径, 如干扰素- γ 信号和CD28共刺激。
- 多重IHC呈增量CCRT后细胞角蛋白阳性区CD4阳性细胞比例的变化趋势。但是, CD8、CD20、FOXP1、PD-L1没有明确的趋势。用CIBERSORT计算的免疫细胞比例显示CCRT后中性粒细胞。

结论:

我们对CCRT诱导的ESCC早期免疫原性改变进行了综合分析, 并对CCRT诱导的ESCC早期免疫原性改变进行了探讨与临床结果相关。我们的结果为免疫治疗和CCRT结合提供了潜在的基础用于ESCC的治疗。





下一步: ESMO(5/6), 年底投稿

1. 分析ASCO没中的原因

临床效果如何? 副作用?

2. 免疫微环境的分析:

RNA-seq: 3例配对基线/手术新鲜组织的WES+RNA已启动测序, 重点在免疫微环境的分析

mIHC: 10例样本均保留了5张切片, 多色组化, 风险较高

3. 确定研究目标

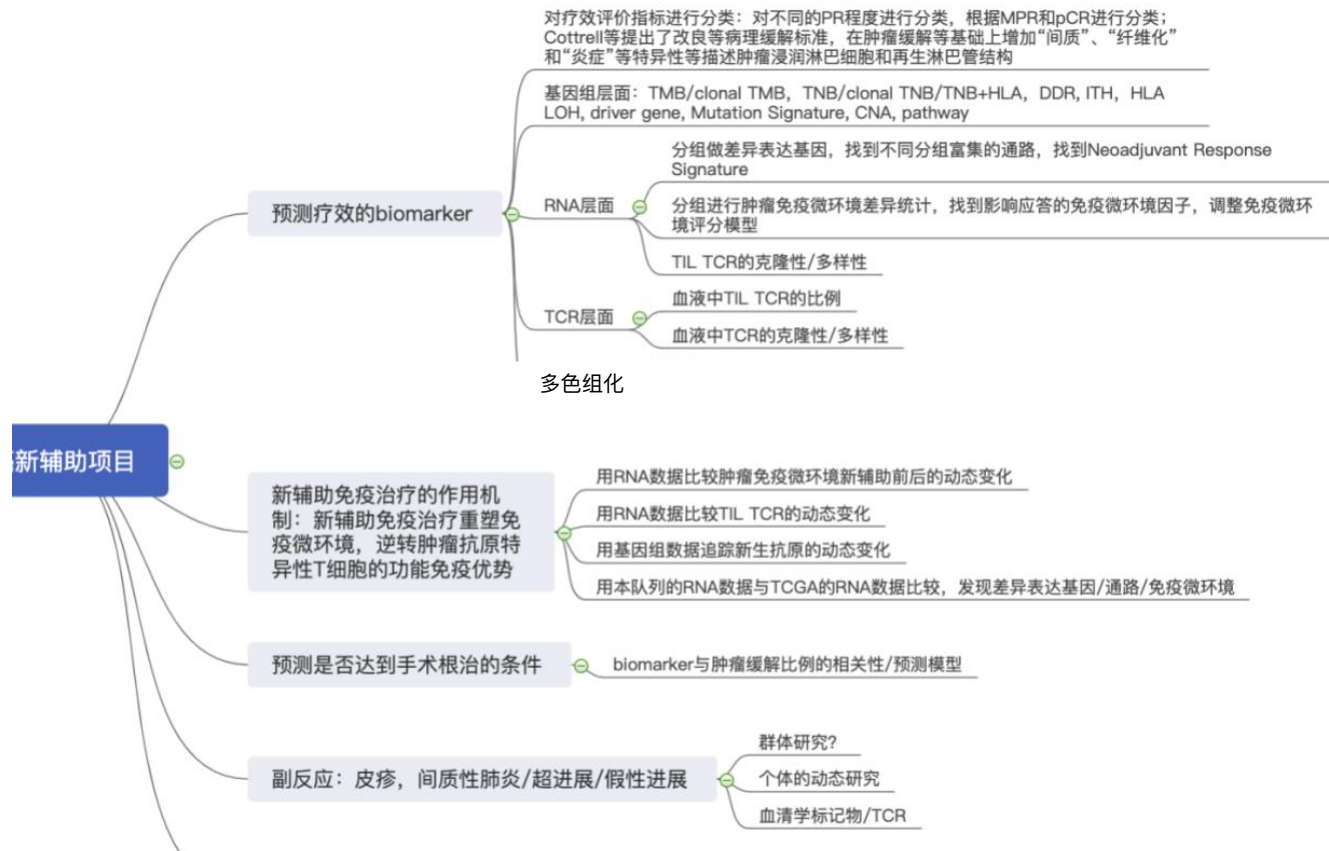
疗效标记物

新辅助免疫联合化疗的作用机制

Reference	Method	Result
Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma	IHC:CD4,CD8,FoxP3,granzyme B,CD20,PD-1 and PD-L1 DSP	CD4,CD8,FoxP3,granzyme B,CD20,PD-1 and PD-L1
Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma	DSP RNA-seq	PD-L1, CD3, B2M IFN- γ signature including ten genes
A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma	CD8xFoxP3xCD163 triplex RNA-seq	CD8, CD4, and FoxP3+ regulatory T cells (Tregs) in blood; CD8 in tumor GEP
Paired whole exome and transcriptome analyses for the Immunogenomic changes during concurrent chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma	mIHC:CD4, CD8, CD20, FOXP1,PD-L1 RNA-seq	CD4 IFN- γ signature



下一步: ESMO(5/6), 年底投稿



THANK YOU



裕策,
让肿瘤免疫更有效!

www.yucebio.com
400-836-8004