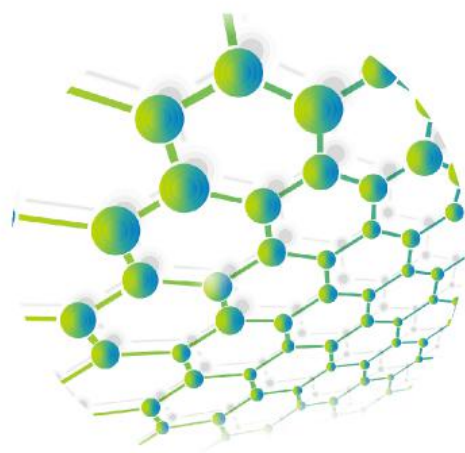




上海伯豪生物技术有限公司
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

全外显子组&转录组测序助力 肿瘤免疫治疗研究

服务科技创新，护航人类健康！



肿瘤免疫治疗概述

肿瘤免疫治疗是通过激活患者自身免疫系统对肿瘤细胞的识别和杀伤，恢复机体正常的抗肿瘤免疫反应，从而治疗肿瘤的一种治疗方法。相较于传统的肿瘤治疗方法，肿瘤免疫治疗具有反应快，疗效好，能有效防止复发的显著优势。近年来，研究人员对免疫系统在肿瘤发生发展中的作用和认识有了很大进展，新的免疫疗法也在不断发展，引起广泛关注的有免疫药物疗法，免疫细胞疗法，个性化肿瘤疫苗。



伯豪生物通过全外显子组和转录组测序，结合生物信息学算法，为肿瘤免疫治疗提供如下服务：

（1）预测肿瘤新生抗原的肽段序列，为构建个性化肿瘤疫苗提供理论基础。

（2）全面分析肿瘤基因组的突变、插入缺失、拷贝数等变异，以及差异表达基因的调控网络，评估肿瘤状态，提示免疫治疗的效果。

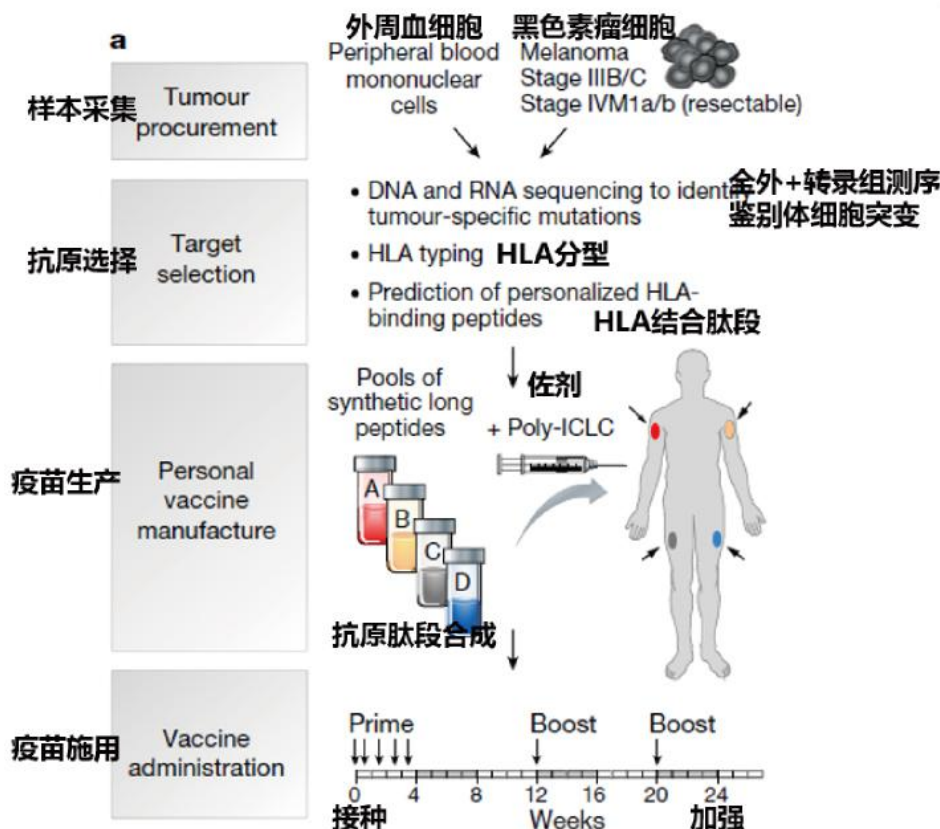
个性化肿瘤疫苗

1、原理

肿瘤疫苗 (Tumor Vaccine) 通过表达特异性的、具有免疫原性的肿瘤抗原 (如: 多肽、DNA和RNA等), 在细胞因子、趋化因子等佐剂的辅助下, 激活或加强机体自身抗肿瘤免疫, 进而杀伤和清除肿瘤细胞。

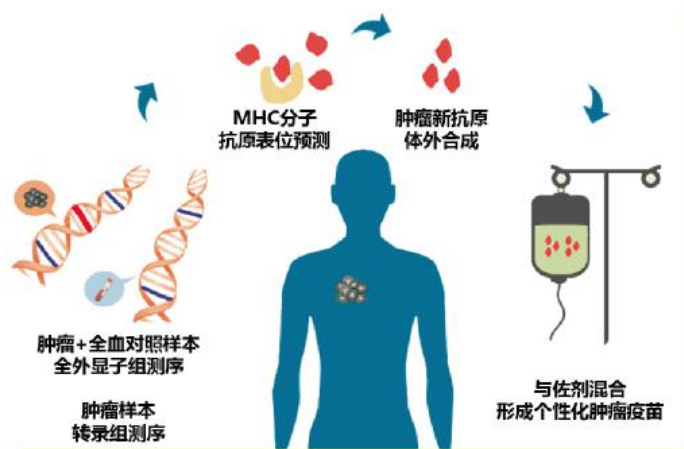
2010年4月, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准第一个自体主动免疫疗法药及第一个真正的治疗性癌症疫苗——Provenge/ sipuleucel-T用于治疗晚期前列腺癌, 但其产品成本和有效性欠佳, 原因在于其针对的抗原是肿瘤相关抗原 (TAA), TAA只是在癌症细胞大量表达, 机体自身也同时存在这些蛋白, 从而产生了中枢耐受。所以基于TAA研发的肿瘤疫苗副作用大且免疫效果差, 这些TAA并不是理想的抗原。

随着分子生物学的发展, 人们认识到肿瘤普遍存在异质性, 每个人的肿瘤都携带不同的特异蛋白, 称为肿瘤特异性抗原 (TSA) 或肿瘤新抗原 (Neoantigen)。由于它们是体细胞突变而产生的新蛋白, 并不存在于正常细胞中。这系统性解决了之前疫苗存在的问题。可以预期, 基于TSA研发的疫苗将特异性更强, 副作用更小。因此, 使用TSA定制“个性化”肿瘤疫苗势在必行。



个性化肿瘤疫苗原理 (Ott P A, 2017)

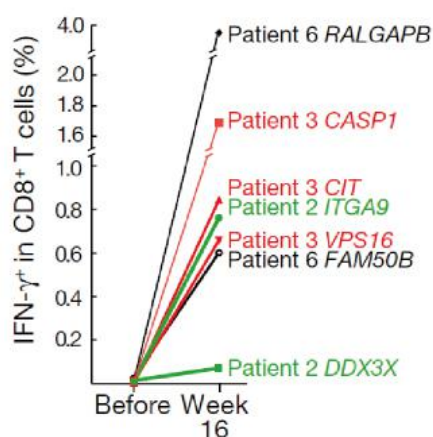
2、如何定制个性化肿瘤疫苗？



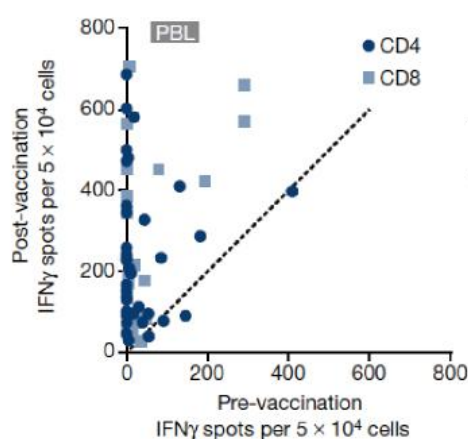
- 通过肿瘤-正常组织的配对全外显子组测序，寻找可引起蛋白编码改变的体细胞突变；
- 通过转录组测序确认该突变所在的蛋白在肿瘤中有一定量的表达，确保可产生肿瘤特异性蛋白；
- 预测突变肽与MHC分子结合的能力，选择结合能力强的肽；
- 合成突变肽，或者突变mRNA作为抗原，与佐剂（可激发免疫应答的一类辅助物）混合并注入患者体内。

3、个性化肿瘤疫苗治疗的成功案例

2017年7月，Nature杂志接连发表了两篇个性化肿瘤疫苗成功治疗黑色素瘤患者的案例。一篇是德国 Johannes Gutenberg大学医学中心的研究人员对13位III期和IV期患者的试验。接种疫苗后，所有患者均出现强烈的免疫应答，8名在接下来的1-2年随访期内没有出现复发，其它复发患者在接种后出现明显的肿瘤缩小，或结合抗PD-1治疗后肿瘤完全消退。另一篇是美国Dana-Farber癌症研究所的研究人员公布的，试验囊括了6名患者，其中4位在2年时间内无复发，另外两名复发患者结合抗PD-1治疗后肿瘤完全消除。

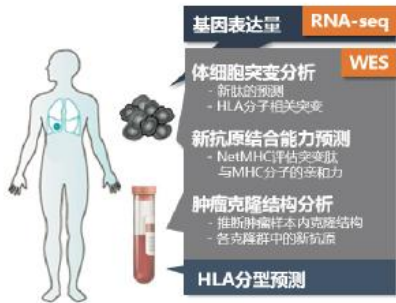


Sahin U (2017) 研究中，6例病人注射疫苗16周后均有明显免疫反应；



Ott P A (2017) 研究中的10例患者在接种疫苗后出现明显免疫反应。

4、肿瘤新抗原预测：伯豪帮您完成前期抗原筛选



伯豪整合了已有分析资源，推出了新抗原预测解决方案。使用全外显子组和转录组测序方法，计算出体细胞突变和相关基因的表达量。通过NetMHC软件预测与MHC分子具有结合能力的突变肽；并通过肿瘤克隆结构分析推断这些突变所在的克隆，以衡量抗原选择的主次关系。

全外显子组测序（肿瘤+全血对照）

HLA基因型预测

- 根据全外数据对MHC Class I和Class II等位基因进行预测，是NetMHC抗原亲和力预测的前提体细胞突变分析
- 寻找可以导致蛋白功能变异的体细胞突变，并翻译出新肽
- 分析HLA位点上的变异，评估是否影响NetMHC功能

新抗原结合能力预测

- 使用NetMHC软件分析体细胞突变带来的新肽与MHC分子的结合能力。较强的结合能力是MHC分子将抗原呈递至T细胞的前提。

转录组测序（肿瘤样本）

- 检测体细胞突变cSNP，与全外显子组测序的结果共同验证
- 计算体细胞突变所在基因表达量，优先选择肿瘤内表达高的基因作为新抗原

NetMHC表位预测结果示例

pos	Allele (HLA-A)	peptide	ID	1-log50k (aff)	Affinity (nM)	%Rank	Binding Level
14	02:06	AMLPAIEEDQLGPWV	snp_1	0.823	6.79	0.25	<=SB
7	02:06	QQIQWENNRQVFSL	snp_2	0.655	42.02	2	<=SB
11	02:06	IQACQGEQRDPGETV	snp_3	0.612	66.92	3	<=WB
12	02:06	KQDIILPGALTRVAL	snp_4	0.574	100.95	3	<=WB

pos：肽段残基编号；Allele：HLA分型；peptide：肽段残基；ID：突变编号；1-log50K(aff)：结合亲和力的对数转换，取以50K为底；Affinity：结合亲和力；Rank：随机肽段预测中的排名；Binding Level：SB为强结合，WB为弱结合。

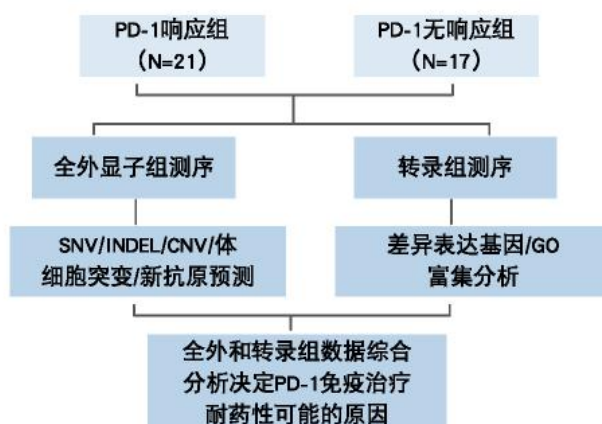
肿瘤免疫检查点抑制剂PD-1耐药性的机理研究

研究背景

PD-1免疫检查点抑制剂 (PD-1 immune checkpoint blockade) 治疗黑色素瘤 (melanoma) 具有显著的临床效果，但肿瘤耐药现象也很突出 (60-70%)。具体来说，有些病人的肿瘤组织对PD-1疗法很敏感，治疗后肿瘤会得到有效的控制 (reponding)；而有些病人却未能得到控制 (non-responding)，即存在肿瘤先天性PD-1免疫治疗耐药性 (IPRES, innate anti-PD-1 resistance)。

从全外显子测序和转录组数据入手，有助于探讨这种耐药性 (IPRES) 背后的机理。

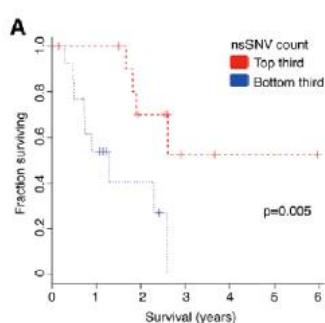
技术路线



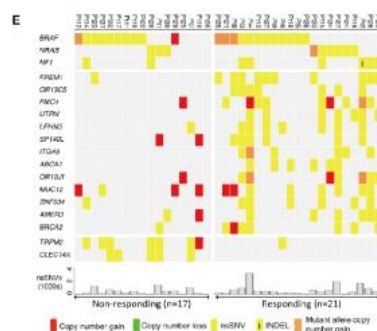
研究结果

1 通过对全外显子测序分析体细胞突变

结果显示，细胞突变量 (overall mutation load) 和患者的存活率显著相关 ($p=0.005$)，非同义突变多的患者存活率也高。PD-1响应组中DNA修复基因BRCA2的突变频率高，突变频率为28% (6/21)，但在PD-1无响应组中只有一例发生突变(6%，1/17)。



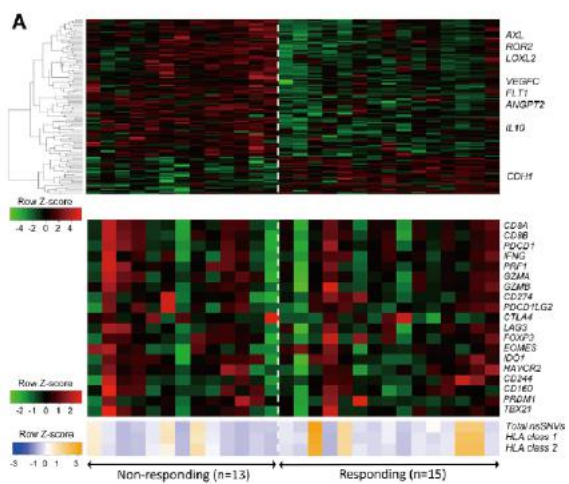
不同肿瘤体细胞突变负荷
(nsSNV) 情况的患者生存曲线



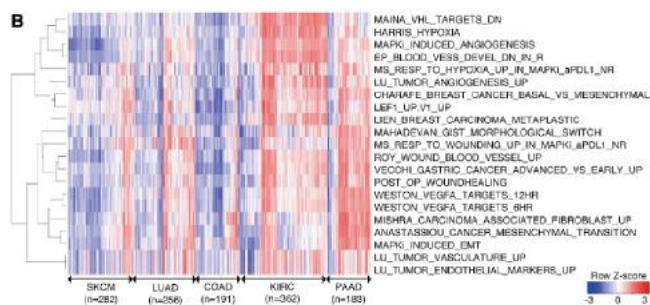
肿瘤患者体细胞突变总览

通过转录组测序分析基因表达

基因差异表达分析 (DSGs) 找到一个包含间充质细胞和T细胞抑制炎症性或血管瘤的表型。进一步分析这一表型对应的生物学过程, PD-1响应组的GO分析未能找到显著富集的结果, 但PD-1无响应组找到了一个与细胞粘附、间充质转化、创伤愈合以及血管生成有关的过程, 进而找到一个包含了26个基因的集合 (IPRES, 先天性PD-1抵抗特性), 与间质转移、血管生成、缺氧和创面愈合相关, 对PD-1的疗效有负影响作用。特别值得注意的是, MAPK靶向疗法能够在黑色素瘤中诱导类似的转录特征出现, 这也就意味着MAPK抑制剂疗法可能与anti-PD-1疗法存在交叉抵抗的情况。利用TCGA数据分析发现其他3个黑色素瘤研究中IPRES特征基因也具有显著的表达差异; 同时包括胰腺癌PAAD、肾小球透明细胞癌KIRC、结肠腺癌COAD、肺腺癌LUAD和皮肤皮肤黑色素瘤SKCM其他的肿瘤中也存在显著差异。



PD-1响应组和PD-1无响应组基因表达情况及nsSNVs和新抗原数目统计

TCGA来源RNA-seq数据集
分析IPRIM特征热图

参考文献

- [1] Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer.[J]. Nature, 2017, 547(7662):222-226.
- [2] Ott P A, Hu Z, Keskin D B, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma[J]. Nature, 2017, 547(7662):217
- [3] FDA News Release. FDA approval brings first gene therapy to the United States. 2017.
- [4] Ledford H. Personalized cancer vaccines show glimmers of success. Nature News & Comment, 2017.
- [5] Hugo W, Zaretsky J M, Sun L, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma.[J]. Cell, 2016, 165(1):35-44.



服务科技创新, 护航人类健康!

咨询热线: 800-820-5086/400-880-5086

电话: 021-58955370
网址: www.shbio.com

邮箱: market@shbio.com
地址: 上海张江高科技园李冰路151号