

肿瘤突变负荷检测及临床应用中国专家共识(2020 年版)

中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会遗传性肿瘤标志物协作组,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组

【摘要】肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)作为一个新兴的生物标志物,在预测肿瘤免疫治疗疗效中的作用越来越受到重视。目前 TMB 的检测方法主要是基于高通量测序平台的全外显子测序和靶向 Panel 测序的拟合算法,但检测方法、阈值和报告格式缺乏统一标准。此外, TMB 值在不同癌种中存在显著差异,也为该标志物在临床中规范应用带来困难。本共识围绕 TMB 的定义、临床意义、检测标准化及与其他免疫标志物如 PD-L1、dMMR/MSI-H 的关系等要点,结合中国实践,为临床提供 8 条 TMB 检测及应用共识推荐。希望本专家共识可以提高临床医师及检测人员对 TMB 临床意义及检测规范的认识,从而更加准确地解读检测结果,为患者提供更优质的临床服务。

【关键词】生物标志物;肿瘤免疫治疗;肿瘤突变负荷;靶向 Panel 测序

【中图分类号】R730.4

【文献标识码】A

【文章编号】1674-5671(2020)05-0485-10

DOI:10.3969/j.issn.1674-5671.2020.05.01

以免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 为主的免疫治疗显著提高了晚期恶性肿瘤患者的客观缓解率 (objective mitigation rate, ORR) 和总生存期 (overall survival, OS), 然而整体单药有效率不足 20%, 且费用普遍较高, 也常伴随不同程度的免疫相关不良反应。因此, 亟需寻找准确可靠的生物标志物筛选免疫治疗的潜在获益患者。以肿瘤基因变异数目为特征的肿瘤突变负荷 (tumor mutational burden, TMB) 显示出与 ICIs 疗效的相关性, 但在临床研究和实践过程中 TMB 评估尚缺乏统一标准。为促进 TMB 检测和临床应用的统一认识及检测规范化, 中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会分子病理协作组和肿瘤标志专业委员会遗传性肿瘤标志物协作组组织相关专家, 综合国内外 TMB 检测和临床应用共识推荐、重要文献及临床实践, 编写本专家共识, 对 TMB 检测的临床意义、检测过程中样本类型、检测方法、包含基因、生物信息学分析方法以及参考值设定等给出指导性建议, 并对肿瘤免疫治疗过程中包括 TMB 在内的不同疗效预测生物标志物选择给出专家组意见, 以期最大可能提高 ICIs 治疗疗效预测的准确性和可靠性。

1 TMB 的定义

TMB 一般指特定基因组区域内每兆碱基对 (Mb) 体细胞非同义突变的个数, 可以间接反映肿

瘤产生新抗原的能力和程度, 已被证实可预测多种肿瘤的免疫治疗疗效^[1-2]。肿瘤特异性突变基因可产生新的蛋白, 这些蛋白或其降解产物被主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 递呈至肿瘤细胞表面形成肿瘤新抗原, 然后被活化的 CD8⁺ T 细胞识别, 从而触发靶向肿瘤的免疫反应, 因此肿瘤基因突变被认为是抗肿瘤免疫治疗的前提^[3]。ICIs 如 PD-1 抗体、PD-L1 抗体和 CTLA-4 抗体等可通过拮抗 T 细胞活化的抑制分子, 促进 T 细胞对肿瘤识别, 从而恢复抗肿瘤免疫反应^[4]。近年来, 越来越多的数据证实 TMB 越高的肿瘤新抗原负荷越高, 更有可能从 ICIs 治疗中获益^[5]。在一定程度上, TMB 水平反映的是肿瘤细胞内 DNA 的修复损伤情况, 与产生肿瘤新抗原能力密切相关。DNA 错配修复基因 (mismatch repair genes, MMR) 负责修正 DNA 复制错误, 若 MMR 存在突变往往会导致微卫星不稳定 (microsatellite instability, MSI), 因此高微卫星不稳定 (MSI high, MSI-H) 常作为 MMR 功能缺陷 (mismatch repair deficient, dMMR) 的替代指标^[6]。此外, DNA 聚合酶 ϵ (DNA polymerase ϵ , POLE) 和 DNA 聚合酶 $\delta 1$ (polymerase delta 1, POLD1) 对 DNA 复制的校对和保真至关重要, POLE/POLD1 基因突变 (特别是外切酶活性域突变) 也会导致肿瘤的高突变或超突变 (TMB > 100 个突变/Mb)^[7]。在 TMB 实际检测中, 多种因素会影响其评估流程、实验结

果及其解释,如样本类型、样本质量和数量、基因组覆盖率、测序平台、生物信息分析流程以及阈值设定等^[5]。此外,不同器官来源和组织类型的肿瘤 TMB 数目和类型也存在显著差异^[8]。因此,明确 TMB 的使用前提和范围对临床正确应用 TMB 作为肿瘤免疫治疗疗效预测生物标志物尤为重要。

专家共识:TMB 一般是指特定区域内体细胞非同义突变的个数,通常用每兆碱基有多少个突变表示(XX 个突变/Mb)。TMB 评估受样本质量和数量、检测基因组大小、生信分析方法等多种因素影响,临床应用前应了解 TMB 的适用范围。不同检测方法获得的 TMB 应进行系统评估,判断是否具有可比性。TMB 数值可反映肿瘤内产生肿瘤新抗原的潜力,与 DNA 修复缺陷密切相关,在多种肿瘤中 dMMR 和 MSI-H 患者具有较高的 TMB。

2 TMB 的临床意义

2.1 组织 TMB 可作为免疫治疗独立的疗效预测生物标志物

2014 年,TMB 首次被证实与 CTLA-4 抗体治疗恶性黑色素瘤疗效存在相关性^[9]。2015 年发现组织 TMB(tTMB)与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者接受 PD-1 抗体治疗效果相关^[10]。CheckMate 026、027、012 研究发现,TMB 或 PD-L1 可独立预测晚期 NSCLC 的 ICI 疗效,且与仅表现为高 TMB 或 PD-L1 高表达患者相比,同时具有高 TMB 和高 PD-L1 表达的患者无进展生存期(progression free survival, PFS)更长,说明 TMB 单独或联合检测均具有较好的疗效预测效能^[11-12]。基于 CheckMate 227、568、032 研究数据^[12-14],2018 年发布的 NCCN NSCLC 临床实践指南(2019.v1)首次将 tTMB 作为免疫治疗疗效预测标志物,为 NSCLC 患者接受免疫治疗提供参考依据。后续在尿路上皮癌、小细胞肺癌、子宫内膜癌、乳腺癌、结直肠癌等更多研究中也发现高 tTMB 与免疫治疗效果存在相关性^[15-16]。

2017 年一项荟萃分析发现 tTMB 对 27 种肿瘤的免疫治疗有显著的疗效预测作用,tTMB 与 ORR 存在显著相关性($P < 0.001$),提示 tTMB 与 PD-1/PD-L1 抗体疗效存在强相关性,这一结论为其泛癌种治疗探索奠定了基础^[17]。2019 年纪念斯隆凯瑟琳癌症研究中心发表的研究采用 MSK-IMPACT 二代测序分析 1 662 例接受 ICI 治疗共包含 10 种晚期

癌症患者,结果显示较高的 tTMB 与更好的 OS 相关;且在大多数患者中,tTMB 越高对 ICIs 的应答反应越好^[18]。这项研究也是迄今为止规模最大、最全面的关于 tTMB 预测肿瘤免疫治疗疗效的研究,为 tTMB 作为潜在的泛癌种生物标志物提供了有力证据。2020 年 6 月,FDA 批准 Pembrolizumab 单药用于治疗不可切除或转移性的高 tTMB(TMB-H ≥ 10 个突变/Mb)成人及儿童实体瘤患者(既往治疗后疾病进展且没有更好的替代疗法),其中 Foundation One CDx 为共同获批的伴随诊断检测方法^[19]。虽然 tTMB 作为 ICIs 疗效预测标志物尚存争议,但日益受重视^[20],已成为继 MSI-H/dMMR 后的第二个肿瘤免疫治疗泛癌种伴随诊断标志物。

专家共识:tTMB 是一个新兴的独立 ICIs 治疗疗效预测标志物,与多种肿瘤类型 ICIs 单药或两种 ICIs 联合治疗的疗效相关,已证实可作为泛癌种免疫治疗疗效的预测标志物。推荐既往标准治疗后疾病进展且没有更好替代疗法的实体瘤患者,尤其是高 TMB 的患者进行 TMB 检测,有助于扩大免疫治疗获益人群。中国人群 TMB 的独立预测价值仍需更多前瞻性研究验证。

2.2 血液 TMB 与 tTMB 具有显著相关性

随着液体活检技术的发展,组织标本获取困难的患者通过评估血液 TMB(bTMB)预测免疫治疗疗效和动态监测治疗变化成为可能。一项回顾性研究^[21]分析超过 1 000 份接受 Atezolizumab 治疗的 NSCLC 患者治疗前的 bTMB,发现 bTMB ≥ 16 个突变/Mb 的患者接受 Atezolizumab 治疗可获得更长的 PFS;联合 PD-L1 表达分析可更好地筛选从 Atezolizumab 治疗中获得更长 PFS 和 OS 的患者。该研究还发现 bTMB 与 tTMB 具有相关性,但检出的突变大部分不一致,且组织与血液样本收集时间间隔越大异质性越高。有研究^[22]发现,bTMB ≥ 20 个突变/Mb 的患者 Durvalumab 单药或联合曲妥珠单抗均较传统化疗具有更好的 ORR、PFS 和 OS。另一项基于中国人群的回顾性研究^[23]也发现,bTMB ≥ 6 个突变/Mb 的 NSCLC 患者 PFS 和 ORR 较 bTMB < 6 个突变/Mb 患者显著改善(mPFS: NR vs 2.9 m; ORR: 39.3% vs 9.1%),治疗应答组的 bTMB 水平也显著高于未应答组,且 NCC-CGP150 与采用全外显子组测序(whole exome sequencing, WES)检测的组织 TMB 有相关性($r = 0.91$)。一项基于 bTMB 对 NSCLC 患者进行分层管理的前

瞻性 B-FIRST 研究^[24]显示, bTMB ≥ 16 个突变/Mb 的患者单药 Atezolizumab 治疗 ORR 更优, PFS 亦呈获益趋势, 但 OS 尚未知, 有待数据更新。

专家共识: 目前研究证据显示在 NSCLC 中 bTMB 与 tTMB 具有显著相关性, 但 bTMB 检测无统一标准。多项回顾性研究发现高 bTMB 与 NSCLC 患者接受单药 ICI 治疗获益显著相关, 但尚未获得高级别前瞻性临床研究证实。

3 TMB 检测的标准化

3.1 样本收集、处理原则

目前临床实践中以 tTMB 检测最为常见, 大多数研究认为 bTMB 检测准确性有待进一步验证^[25], 故本共识依据国内已经发布的 NGS 检测指南及共识意见^[26-27], 重点规范 tTMB 的样本收集和处理原则。

3.1.1 tTMB 检测标本类型和推荐要求 (1) 福尔马林固定石蜡包埋肿瘤组织: 建议送检近期蜡块 (原则上不超过 3 年, 1 年内较好) 或 6~8 周以内的石蜡切片, 切片厚度 4~5 μm ; 手术样本 (较大样本) ≥ 5 张; 穿刺样本或小标本至少 10 张以上。要求肿瘤细胞数能够满足检测和质控要求, 如果肿瘤细胞不足, 患者知情后仍愿意进行 tTMB 检测, 必要时可采用显微切割等方法对肿瘤细胞进行富集或去除坏死细胞, 以提高 tTMB 检测敏感性。(2) 新鲜肿瘤组织 (因评估肿瘤细胞比例困难, 不推荐作为常规检测标本类型): 手术样本 (较大样本) ≥ 10 mg (米粒大小), 穿刺样本或小标本至少为肉眼可见的 1 条以上肿瘤组织。tTMB 检测与计算受肿瘤细胞占比影响, FDA 批准的 tTMB 检测产品对肿瘤纯度要求均 $\geq 20\%$ 。(3) 正常对照: 大部分 TMB 检测需要正常对照, 为检测提供胚系变异信息。可采用全血标本、唾液或石蜡包埋正常组织。全血标本: 若用全血样本作为对照, 以 2~5 mL EDTA 抗凝外周血, 轻微颠倒混匀 8~10 次, 避免凝固, 常温运送至检测实验室, 并在 2 h 内处理, 注意防止溶血现象。如不能在 2 h 内处理或需要长途运输, 建议用游离 DNA 专用采血管常温保存或运输。(4) 病灶选取: 肿瘤原发灶与远处转移灶组织均可用于 tTMB 评估。

有研究在肺腺癌配对的原发灶、远处转移灶和淋巴结转移灶进行 tTMB 检测, 发现淋巴结 tTMB 显著低于原发灶, 但远处转移灶与原发灶差异并不明显; 同一瘤灶不同部位也可能存在明显的瘤内

基因突变异质性, 致使 tTMB 值存在较大差异^[5]。目前尚未见 TMB 样本异质性与相应临床疗效的相关研究。

3.1.2 核酸提取与质控 建议优先采用国家药品监督管理局 (national medical products administration, NMPA) 批准上市的核酸提取试剂盒, 并在满足高通量测序要求的实验室内完成核酸提取。tTMB 检测前需评估核酸纯度、浓度和核酸片段化程度。肿瘤组织 DNA 文库质量至关重要, 当浓度低于 5 nmol/L 时, tTMB 值会虚高而出现假阳性。临床基因检测实验室可以选择合适的平台对核酸进行质控。核酸浓度建议采用微量核酸荧光定量计测定, 片段化程度建议采用琼脂糖凝胶电泳或核酸生物分析仪等方法评估。基于大 Panel 基因检测完成的 tTMB 所需核酸样本量, 根据测序方法不同所需核酸量为 20~200 ng 不等, 其中基于 WES 检测的 tTMB 所需的核酸量建议不少于 250 ng^[5,28]。

专家共识: 推荐使用近期石蜡包埋肿瘤组织样本进行 tTMB 检测, 待检测组织应首先完成病理质控并确保恶性肿瘤细胞数能够满足检测要求。为过滤胚系突变对后续 tTMB 评估的影响, 应采集患者外周血、唾液或正常组织作为对照样本。建议优先采用 NMPA 批准上市的核酸提取试剂盒进行基因组 DNA 提取, tTMB 检测实验室应根据实际需求建立合适的 DNA 样品质控标准和操作流程, 对待测 DNA 样品纯度、浓度及片段化程度进行严格质控。肿瘤原发灶与远处转移灶组织均可用于 tTMB 评估。

3.2 TMB 检测的 Panel 设计和平台选择

3.2.1 TMB 检测的 Panel 选择 WES 是进行 TMB 检测的“金标准”, 多项研究发现采用 WES 所得的 TMB 与免疫治疗临床获益相关^[29-30]。WES 覆盖了编码区大概 2.2 万个基因 (约 18 万个外显子, 30 Mb), 占整个基因组的 1%, 其中包括大多数已知致病突变^[31]。然而, WES 成本较高、样本需求量较大、数据分析较复杂, 因此在临床应用中受限^[2, 32-34]。靶向测序 Panel 聚焦于大量肿瘤相关基因, 可以结合生物信息学算法快速高效检测肿瘤靶基因组改变^[35-36]。因此, 采用靶向测序 Panel 进行肿瘤基因组分析已成为 WES 在临床检测的另一种选择。目前已有 1 款 WES 检测产品和 3 款靶向测序 Panel 获 FDA 批准, 其中靶向测序 Panel 通过计算机模拟及临床实践证实与 WES 具有较好一致性^[2, 36-39]。

3.2.2 TMB 检测的 Panel 大小 靶向测序 Panel 大小是影响 TMB 评估置信区间、阈值、检测灵敏度、特异度及阴性和阳性预测值的重要参数^[40]。不同测序 Panel 检测基因组区域的大小不同,所得 TMB 值也不同。Dana-Farber 癌症研究所通过建立大(300 个基因)、中(48 个基因)、小(15 个基因)Panel 模型,发现小 Panel 模型仅足以检测高突变负荷和超高突变负荷肿瘤,而大 Panel 模型检测的数据相对更准确^[41]。多个研究机构也通过建立随机突变模型,对真实世界癌症基因组的非随机突变及来自公共数据库的瘤内异质性进行模拟,发现靶向测序 Panel 评估的 TMB (Panel sequencing TMB, psTMB) 变异系数 (coefficient of variation, CV), 与 Panel 大小的平方根及 TMB 水平的平方根成反比,其中当肿瘤 TMB 阈值为 10 个突变/Mb 时,随着 Panel 覆盖范围减小(4、2、1、0.5 和 0.25 Mb), CV 不断上升(22%、26%、32%、45% 和 63%); 当 Panel < 0.5 Mb 时, CV 急剧升高,但 Panel < 1.0 Mb 时评估 TMB 的准确性显著降低,不能有效区分免疫治疗获益人群^[42-45]。美国癌症研究协会(American Association for Cancer Research, AACR)发起的肿瘤基因组学证据信息交换研究(Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange, GENIE),对来自 8 个研究中心约 19 000 例肿瘤患者的真实 TMB 数据的研究也得出相似结论:TMB 介于 0~5 个突变/Mb 时,约三分之二的样本无法通过小 Panel 准确评估,Panel 覆盖范围 > 1 Mb 才可准确评估 TMB^[46]。全方位癌症基因分析开展的万人 TMB 检测结果及纪念斯隆凯瑟琳癌症研究中心进行的靶向测序 Panel 评估 TMB 结果均表明,对几百个基因进行靶向测序可以有效识别 TMB-H 肿瘤,而高于几百个基因的靶向测序 Panel 准确率并不会显著提高^[2,47]。因此,建议评估 TMB 的靶向测序 Panel 理想覆盖范围介于 1.5~3.0 Mb^[42]。通过分析 FDA 批准的 3 款靶向测序 Panel,发现评估 TMB 的靶向测序 Panel 也覆盖范围 ≥ 0.8 Mb 时能满足临床需求^[36,38-39]。此外,靶向测序 Panel 也可能因覆盖的基因组区域不同而引起不必要的偏倚。为了分析所选基因对 psTMB CV 的影响,德国、英国及瑞士多个研究机构模拟了以下 3 种不同 Panel:(1)专由癌基因和抑癌基因组成的 Panel A;(2)随机选择的基因 Panel B;(3)排除癌基因和抑癌基因后随机选择的基因 Panel C。结果发现,Panel B 和 Panel C 评估 TCGA 数据库

的 TMB 方差较评估随机突变模型的 TMB 方差增加了 6%,而 Panel A 增加了 15%,提示 Panel 设计应尽量避免只选择原癌基因和抑癌基因^[40]。总之,TMB 检测的 Panel 应尽可能包含患者更多的分子遗传信息,基线也要同步进行其他相关驱动基因检测,如可指导靶向治疗的驱动基因突变(EGFR、ALK、ROS1、RET、NTRK、BRAF、ERBB2、KRAS 和 MET 等),与基因变异产生相关的免疫治疗正向预测因子(dMMR/MSI、POLE、POLD1 和 BRCA1/2 等)以及可能的免疫治疗负向预测因子($\beta 2M$ 、PIK3CA、JAK1/2、PTEN 和 STK11/LKB1 等),尽可能避免重新活检及基因检测而导致治疗时机延误^[7,33,44,48-49]。

3.2.3 测序覆盖深度 WES 的标准测序深度只达到 100 \times 才能使检出的等位基因突变频率 > 15%, TMB 评估结果才可信。如果采用靶向测序 Panel,测序深度至少应 > 500 \times ,才能增加在特定位点检测低频变异的可能性^[40,50]。韩国研究者发现石蜡包埋样本中检测突变频率 $\geq 10\%$ 时,所需的最小测序深度为 200 \times ^[51]。FDA 批准的 MSK-IMPACT 测序 Panel 平均覆盖深度达 200 \times 。2019 年欧洲肿瘤内科学会(European Society for Medical Oncology, ESMO)推荐精确评估 TMB 所需最小覆盖深度 > 200 \times ^[5,28]。

3.2.4 测序平台的选择 目前主流的 NGS 测序平台有 illumina、ThermoFisher 和华大基因测序平台。不同实验室可以依据样本量、时效要求选择不同测序平台^[36,38,40]。

专家共识:采用靶向测序 Panel 进行 TMB 评估时,建议与 WES 评估的 TMB 进行一致性评价。靶向测序 Panel 覆盖范围原则上不应 < 1.0 Mb,最低有效测序深度应 $\geq 500\mathbf{x}$ 。建议进行 TMB 检测的靶向测序 Panel 尽可能涵盖患者更多的其他分子遗传信息,包括可指导靶向治疗的驱动基因突变、与基因变异产生相关的免疫治疗正向预测因子以及可能的免疫治疗负向预测因子。目前已有多款 NGS 测序仪获国家 NMPA 批准用于临床基因检测,不同实验室可依据样本量、时效要求选择不同测序平台。

3.3 TMB 算法的标准化要求

TMB 算法的核心要素是对能影响蛋白质编码的体细胞突变的探测及计算。为确保 TMB 计算结果的准确性,应从算法角度注意测序数据以及突变分析中可能出现的各类问题。

3.3.1 测序数据质控 从测序平台产生的原始数

据到体细胞突变的检出,通常经过质控、数据过滤、基因组比对和突变检出四个过程。原始数据通常存在低质量读长(reads)、接头污染和插入删除错误等,一定程度上影响后续分析过程。因此,下机数据必须经过严格的质量评估,制定有效的质控标准,包括数据有效率>99%、错误率<0.1、Q20>90%、Q30>85%、GC 含量 42%~55%、比对率>95%、目标区域平均测序深度、均一性和链偏移等评价参数。

3.3.2 TMB 算法与突变分析 原始测序数据过滤后需要用各种生物信息分析工具进行基因组序列比对和突变检出。目前 NGS 比对常用的软件有 BWA、Bowtie、SOAP、BFAST、ELAND、MAQ 和 SHRiMP 等,其中采用基于人参考基因组比对的 SMEM 算法 BWA 软件最常用。突变检出的常见算法有基于统计学方法的 Variant caller、VarScan2 和基于贝叶斯模型的 Strelka、Mutect2 等。基于人工智能的加速算法 GVC(genomic variant caller)可通过人工智能模型拟合各个平台数据,数据结果高效准确,且检测速度是常规软件的 4~8 倍,加快了 NGS 在临床转化中的应用进程。

3.3.3 TMB 算法准确性评估 以数百个基因的肿瘤靶向 Panel 检测是通过计算覆盖在产品外显子上的体细胞突变数目除以产品的外显子覆盖区域得到基于 Panel 的 TMB 结果,然而其计算得到的 TMB 值与 WES 检测得到的 TMB 值存在偏差^[16,52-54]。在计算 TMB 值时还应考虑肿瘤纯度带来的偏差。ANAGNOSTOU 等^[55]发现随着肿瘤纯度降低,体细胞突变位点频率也随之降低,经过肿瘤纯度校正参数校正的 TMB 值能更好地区分接受 ICI 治疗患者的疗效,当肿瘤纯度较低时,需要较大的肿瘤纯度校正参数,原则上要求细胞纯度不低于 25%。

目前的检测方法中,可依靠或不依靠对照样本(外周血或癌旁组织)去除遗传性突变。美国 FDA 批准的 4 个检测肿瘤 TMB 方法中,MSK-Impact、Omics Core 及 PGDx elio tissue complete 是通过检测患者白细胞对照过滤肿瘤样本中检测到的遗传性突变,以确保用于计算 TMB 的突变均为体细胞突变。Foundation One CDx 以及获得 FDA 突破性器械待遇的 TruSight Oncology 500 只检测癌组织,不对正常组织或白细胞进行测序,以去除测序数据中的遗传突变。其中,Foundation One CDx 通过人群数据库过滤和 SGZ(somatic-germline-zygosity)算法确定体细

胞突变^[56]。SGZ 算法通过对每个突变位点的突变频率进行建模,同时考虑肿瘤细胞含量、肿瘤细胞多倍体状态和局部拷贝数变异,预测准确性取决于序列测序深度的拷贝数模型拟合。但由于目前公开的人群数据库均以欧美人群为主,不适用于中国人群 TMB 检测,因此建议 TMB 的体细胞突变确定应使用对照样本(外周血或癌旁组织)去除患者的胚系变异,或使用中国人群大样本遗传性突变数据库构建背景库过滤胚系变异。

专家共识:基于靶向测序 Panel 的 TMB 检测应以 WES 检测为金标准,纳入影响蛋白质编码的体细胞突变,应保证检出突变频率 $\geq 5\%$ 的体细胞突变,以保证 TMB 检测值的准确性和稳定性;应依托 ICI 疗效随访数据库对基因组比对和突变检出算法开展标准化研究;Panel 检测区域可影响 TMB 值,应通过至少 1 000 例 WES 数据予以校正。同时建议使用对照样本过滤胚系变异。

3.4 TMB 阈值的探索与临床应用

3.4.1 TMB 在不同癌种间的分布情况 基于 TCGA 数据库的 27 种肿瘤类型 WES 分析结果显示,不同肿瘤类型的中位非同义突变频率差异超过 1 000 倍。儿童肿瘤的 TMB 最低约为 0.1 个突变/Mb,而部分恶性黑色素瘤和 NSCLC 患者的 TMB 超过了 100 个突变/Mb。且同癌种不同患者的 TMB 值也存在高度异质性,如恶性黑色素瘤和肺癌中,不同患者的 TMB 值介于 0.1~100 个突变/Mb^[57]。一项基于 10 000 例的泛癌种队列 DNA 靶向测序研究也显示类似结果^[37]。

3.4.2 TMB 阈值的确定策略 TMB 的中位值和分布范围在不同癌种中有所不同,其中 TMB 较高的肿瘤类型,统一阈值可筛选出较多 TMB-H 患者;相反,在 TMB 整体较低的癌种中,统一阈值则会筛选出较少的 TMB-H 患者。因此,在各个癌种中应使用相同的筛选策略,即选择排序在 20% 以上的病例定义为 TMB-H 组。但是筛选出的 TMB-H 阈值在不同癌种中还是显示了巨大差异,介于 4.4~52.2 个突变/Mb^[18]。因此在不同癌种中分别制定适宜的 TMB-H 阈值尤为必要。

3.4.3 TMB 阈值的临床效能验证 BUDCZIES 等^[43]以 TCGA 数据库中 WES TMB 结果为金标准,以 WES TMB=199 个突变/Mb 为临界值,与之匹配的 Panel 为基础的 TMB 阈值肺腺癌为 10%~12%,肺鳞癌为 17%~19%。FIR、BIRCH 和 POPLAR 系列回顾性研究

首次采用基于基因组 DNA 靶向测序的 Foundation One LDT 方法,分别以 9.9 个突变/Mb 或 >75% 群体为阈值,均能在一定程度上区分 ICI 治疗获益人群^[58]。而 CheckMate 568 和 CheckMate 227 两个前瞻性 III 期临床研究用经过平行验证的 Foundation One CDx 方法,发现 10 个突变/Mb 为 NSCLC 接受免疫治疗的最佳疗效预测 TMB 阈值^[59]。因此认为,ICI 临床疗效才是确定 TMB 阈值的最佳评价标准。

专家共识:TMB 值在不同癌种中存在显著差异,应依据 ICI 临床疗效确定阈值,才能最大可能筛选出 ICI 治疗的潜在获益人群。值得注意的是,不同靶向测序 Panel 的 TMB 检测体系之间 TMB 阈值不能通用。

3.5 TMB 报告模板的初步建议

3.5.1 TMB 报告应包含的内容 (1)基本信息:①受检者信息,包括姓名、性别、年龄、临床诊断、病理诊断、基因检测史、家族史和临床治疗史等;②样本信息,包括样本类型、样本采集时间、送检机构和送检日期等;③项目简介,包括检测方法、检测平台、检测内容(包括基因数量、Panel 大小等)、文库构建和参考基因组等。(2)检测结果:体细胞编码突变总数、TMB 值、肿瘤类型、TCGA 数据库排序和结果释义等。(3)检测结果解读:①TMB 评估,包括突变类型、最低检出频率及与 WES 对比一致性等;②结果解读,包括是否有明确的阈值说明,不同癌种、不同免疫治疗方案应列明不同阈值与用药相关性的临床试验证据支持。(4)签字:检测技术人员及审核人员签字,最终报告应由中级职称或硕士以上学历且具有病理学背景、经培训合格的本单位执业医师或授权签字人(高级职称或医学博士学位)审核。(5)局限性说明:根据肿瘤类型、受检样本类型、检测 Panel 以及相关临床研究结果等信息对 TMB 临床应用的局限性进行说明。

3.5.2 TMB 报告临床解读建议 SAMSTEIN 等^[18]证实不同癌种接受免疫治疗获益的 TMB 阈值不同。在 Atezolizumab 用于治疗膀胱癌的临床试验 IMvigor210 中,用 Foundation One 产品检测的 TMB 阈值 ≥ 16 个突变/Mb^[60]。而在治疗 NSCLC 的临床试验 BIRCH/FIR 中,Foundation One 产品检测一线患者的 TMB 阈值 ≥ 13.5 个突变/Mb,二线 ≥ 17.1 个突变/Mb^[58]。POPLAR 临床试验的 TMB 阈值 ≥ 15.8 个突变/Mb^[5]。在 Nivolumab 联合 Ipilimumab 治疗 NSCLC 患者的 CheckMate 012

研究^[11]、小细胞肺癌患者的 CheckMate 032 研究^[61]及恶性黑色素瘤患者的 CheckMate 038 研究^[62]中,用 WES 检测 TMB 阈值分别为 ≥ 307 个突变/Mb、 ≥ 248 个突变/Mb 和 ≥ 100 个突变/Mb。由此可见,TMB 作为 ICI 疗效预测的生物标志物,不同药物伴随诊断产品的 TMB 阈值参考价值相对有限,用统一的 TMB 阈值判断患者对不同 ICI 的疗效不妥。

专家共识:TMB 报告内容除重点描述 TMB 计算原则和数值外,还应针对癌种的免疫治疗意义进行解读;同时还需系统评估 Panel 检测的各种驱动基因突变情况,以全面解读患者的肿瘤生物学特征,建议应用分子肿瘤诊治专家组模式(MTB)进行临床辅助决策。

4 TMB 联合应用展望

作为一个新兴的 ICI 治疗疗效预测标志物,TMB 在临床应用中还处于初始阶段,检测技术还在不断完善,临床意义也在不断丰富。最近有研究发现,TMB 与其他肿瘤免疫治疗相关标志物(如 PD-L1、MSI)联合应用,或能提高免疫治疗疗效预测的准确性和精确性,但具体的联合策略还需要进一步探索。

4.1 TMB 与 PD-L1

PD-L1 是最早发现可以预测 ICI 疗效的生物标志物,但肿瘤内 PD-L1 具有异质性和表达不稳定性,且仍有约 20% 的 PD-L1 阴性患者可从 PD-1/PD-L1 抗体治疗中获益^[63],因此 PD-L1 作为 ICI 疗效预测生物标志物应用相对有限。临床实践证实,多种基因突变水平高的肿瘤如恶性黑色素瘤、膀胱癌、NSCLC 等经 PD-L1 抗体治疗均获得良好效果。然而,仅有部分患者同时表现为 TMB-H 和 PD-L1 表达阳性。但 TMB-H 人群中无论是否表达 PD-L1,免疫治疗疗效一般优于化疗;且相对于单一 TMB-H 或 PD-L1 阳性,TMB-H 且 PD-L1 表达阳性的患者免疫治疗疗效更优^[47]。

4.2 TMB 与 MSI

作为基因组不稳定性的重要标志物,MSI-H/dMMR 通常也伴随 TMB-H。MSI-H 肿瘤样本中有超过 80% 表现为 TMB-H,且有 97% 的样本 TMB ≥ 10 个突变/Mb^[2],存在 DNA 损伤修复基因突变的患者也较无突变患者获得更好的免疫治疗应答^[64]。然而,

dMMR/MSI-H 阳性比例在不同癌种间存在显著差异,此外虽绝大多数 dMMR/MSI-H 患者具有较高的 TMB,但仍有部分 TMB-H 患者表现为 MSS^[65],因此单独检测 dMMR/MSI-H 可能使部分 TMB-H 患者失去治疗机会。还有研究报道,在不同类型的肿瘤组织中 TMB、MSI 和 PD-L1 同时阳性的概率只有 0.6%^[6]。

4.3 TMB 与总新抗原负荷

总新抗原负荷(total neoantigen burden, TNB)与 TMB 类似。不同之处在于只有少数 TMB 中的突变会产生多肽,经过修饰加工并加载到 MHC 复合体上,且更少的突变能够被 T 细胞识别^[66-68]。通常情况下,肿瘤 TMB 越高,产生新抗原的可能性也越高。有研

究显示,TMB 与肿瘤细胞表面 HLA 分子上递呈的 TNB 高度相关^[69-71]。除点突变可产生新抗原外,插入和缺失(InDels)产生的移码突变也可使其产生多条新的肽链。每条新的肽链可能形成多个新抗原多肽,从而获得更高的免疫治疗应答率^[72]。此外,在接受过继 T 细胞治疗的恶性黑色素瘤患者中,TMB 和 TNB 水平也可以预测患者对 T 细胞免疫治疗的治疗效^[73]。

新抗原的产生和特异性识别是肿瘤免疫的基石,多项临床研究证实 TNB 在预测接受免疫治疗的肿瘤患者 PFS 和 OS 中具有重要作用^[10,29,71,73-74]。但是,新抗原的计算过程远比 TMB 复杂,因此尚未在临床上广泛应用^[75]。

编写专家组成员

专家组组长(按姓氏拼音排序)

犇伟奇 重庆大学附属肿瘤医院
 聂勇战 空军军医大学西京医院
 应建明 中国医学科学院肿瘤医院

执笔专家

应建明 中国医学科学院肿瘤医院
 张海伟 重庆大学附属肿瘤医院
 章必成 武汉大学人民医院
 申 鹏 南方医科大学南方医院
 王宏伟 解放军总医院第四医学中心

编写专家(按姓氏拼音排序)

蔡 明 华中科技大学武汉协和医院
 蔡修宇 中山大学肿瘤防治中心
 陈 锐 重庆大学附属肿瘤医院
 葛 闯 重庆大学附属肿瘤医院
 黄小平 重庆大学附属三峡医院
 李卫华 中国医学科学院肿瘤医院
 李亚卓 解放军总医院第四医学中心
 林春华 烟台毓璜顶医院
 刘华文 重庆大学附属三峡医院
 陆元志 暨南大学附属第一医院
 马 杰 河南省肿瘤医院分子诊断中心

米彦军 厦门大学附属第一医院
 犇伟奇 重庆大学附属肿瘤医院
 聂勇战 空军军医大学西京医院
 欧阳能太 中山大学孙逸仙纪念医院
 邱李辉 上海桐树生物科技有限公司
 申 鹏 南方医科大学南方医院
 唐万燕 重庆大学附属肿瘤医院
 王宏伟 解放军总医院第四医学中心
 王 玲 重庆大学附属肿瘤医院
 王秋实 陆军特色医学中心(大坪医院)
 王 燕 中国医学科学院肿瘤医院
 严令华 上海桐树生物科技有限公司
 杨海虹 广州医科大学附属第一医院
 杨镇洲 重庆医科大学附属第二医院
 姚 彪 贵州省铜仁市人民医院
 叶 丰 四川大学华西医院
 叶 凯 西安交通大学
 应建明 中国医学科学院肿瘤医院
 于津浦 天津大学肿瘤医院
 张海伟 重庆大学附属肿瘤医院
 张 洁 上海市肺科医院
 章必成 武汉大学人民医院
 赵伟鹏 天津医科大学肿瘤医院
 周晓燕 复旦大学附属肿瘤医院
 周一鸣 北京新抗原生物技术有限公司

参 考 文 献

- [1] SCHUMACHER T N, SCHREIBER R D. Neoantigens in cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 69-74.
- [2] CHALMERS Z R, CONNELLY C F, FABRIZIO D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden[J]. *Genome Med*, 2017, 9(1): 34.
- [3] FUMET J D, TRUNTZER C, YARCHOAN M, et al. Tumour mutational burden as a biomarker for immunotherapy: Current data and emerging concepts[J]. *Eur J Cancer*, 2020, 131: 40-50.
- [4] CHABANON R M, PEDRERO M, LEFEBVRE C, et al. Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers[J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(17): 4309-4321.
- [5] BÜTTNER R, LONGSHORE J W, LOPEZ-RIOS F, et al. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements[J]. *ESMO Open*, 2019, 4(1): e000442.
- [6] LUCHINI C, BIBEAU F, LIGTENBERG M J L, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(8): 1232-1243.
- [7] CAMPBELL B B, LIGHT N, FABRIZIO D, et al. Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer[J]. *Cell*, 2017, 171(5): 1042-1056 e1010.
- [8] VILIMAS T. Measuring Tumor Mutational Burden Using Whole-Exome Sequencing[J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2055: 63-91.
- [9] SNYDER A, MAKAROV V, MERGHOUB T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(23): 2189-2199.
- [10] RIZVI N A, HELLMANN M D, SNYDER A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer[J]. *Science*, 2015, 348(6230): 124-128.
- [11] HELLMANN M D, NATHANSON T, RIZVI H, et al. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(5): 843-852.
- [12] HELLMANN M D, CIULEANU T E, PLUZANSKI A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(22): 2093-2104.
- [13] READY N, HELLMANN M D, AWAD M M, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(12): 992-1000.
- [14] ANTONIA S J, LOPEZ-MARTIN J A, BENDELL J, et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(7): 883-895.
- [15] ROSENBERG J E, HOFFMAN-CENSITS J, POWLES T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial[J]. *Lancet*, 2016, 387(10031): 1909-1920.
- [16] CHAN T A, YARCHOAN M, JAFFEE E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 44-56.
- [17] YARCHOAN M, HOPKINS A, JAFFEE E M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(25): 2500-2501.
- [18] SAMSTEIN R M, LEE C H, SHOUSHARI A N, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(2): 202-206.
- [19] U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors [EB/OL]. [2020-07-17]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors>.
- [20] 周彩存, 王洁, 步宏, 等. 中国非小细胞肺癌免疫检查点抑制剂治疗专家共识(2019年版)[J]. *中国肺癌杂志*, 2020, 23(2): 65-76.
- [21] GANDARA D R, PAUL S M, KOWANETZ M, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab[J]. *Nat Med*, 2018, 24(9): 1441-1448.
- [22] RIZVI N A, CHO B C, REINMUTH N, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: The MYSTIC Phase 3 Randomized Clinical Trial[J]. *JAMA Oncol*, 2020, 6(5): 661-674.
- [23] WANG Z, DUAN J, CAI S, et al. Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(5): 696-702.
- [24] Kim E S, Velcheti V, Mekhail T, et al. LBA55 Primary efficacy results from B-FIRST, a prospective phase II trial evaluating blood-based tumour mutational burden (bTMB) as a predictive biomarker for atezolizumab (atezo) in 1L non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *Annals of Oncology*, 2018, 29(Supple 8): viii744.
- [25] STENZINGER A, ALLEN J D, MAAS J, et al. Tumor mutational burden standardization initiatives: Recommendations for consistent tumor mutational burden assessment in clinical samples to guide immunotherapy treatment decisions[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(8): 578-588.
- [26] 叶丰, 吴焕文. 临床分子病理实验室二代基因测序检测专家共识[J]. *中华病理学杂志*, 2017, 46(3): 145-148.
- [27] 中国临床肿瘤学会肿瘤标志物专家委员会, 中国肿瘤驱动基因

- 分析联盟.二代测序技术在肿瘤精准医学诊断中的应用专家共识[J].中华医学杂志,2018,98(26):2057-2065.
- [28] BUTTNER R, LONGSHORE J W, LOPEZ-RIOS F, et al. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements[J]. ESMO Open, 2019, 4(1): e000442.
- [29] VAN ALLEN E M, MIAO D, SCHILLING B, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma[J]. Science, 2015, 350(6257): 207-211.
- [30] HUGO W, ZARETSKY J M, SUN L, et al. Genomic and Transcriptional Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma[J]. Cell, 2016, 165(1): 35-44.
- [31] NG S B, TURNER E H, ROBERTSON P D, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes[J]. Nature, 2009, 461(7261): 272-276.
- [32] VIALE G, TRAPANI D, CURIGLIANO G. Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 4719194.
- [33] FRAMPTON G M, FICHTENHOLTZ A, OTTO G A, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(11): 1023-1031.
- [34] CAMPESSATO L F, BARROSO-SOUSA R, JIMENEZ L, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice[J]. Oncotarget, 2015, 6(33): 34221-34227.
- [35] U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. FDA unveils a streamlined path for the authorization of tumor profiling tests alongside its latest product action [EB/OL]. [2020-07-17]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-unveils-streamlined-path-authorization-tumor-profiling-tests-alongside-its-latest-product-action>.
- [36] U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Foundation One CDx - P170019/S013; Summary of Safety and Effectiveness Data (SSED) [EB/OL]. (2020-05-12) [2020-07-17]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf.
- [37] ZEHIR A, BENAYED R, SHAH R H, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients[J]. Nat Med, 2017, 23(6): 703-713.
- [38] U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. EVALUATION OF AUTOMATIC CLASS III DESIGNATION FOR MSK-IMPACT (Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets) (EB/OL). [2020-07-17]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/DEN170058.pdf.
- [39] U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION. PGDx elio tissue complete: 510(k) SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY (EB/OL). [2020-07-17]. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K192063.pdf.
- [40] FELIUBADALO L, TONDA R, GAUSACHS M, et al. Benchmarking of Whole Exome Sequencing and Ad Hoc Designed Panels for Genetic Testing of Hereditary Cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7: 37984.
- [41] GAROFALO A, SHOLL L, REARDON B, et al. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine[J]. Genome Med, 2016, 8(1): 79.
- [42] BUCHHALTER I, REMPEL E, ENDRIS V, et al. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis[J]. Int J Cancer, 2019, 144(4): 848-858.
- [43] BUDCZIES J, ALLGAUER M, LITCHFIELD K, et al. Optimizing panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement [J]. Ann Oncol, 2019, 30(9): 1496-1506.
- [44] ALLG?UER M, BUDCZIES J, CHRISTOPOULOS P, et al. Implementing tumor mutational burden (TMB) analysis in routine diagnostics—a primer for molecular pathologists and clinicians[J]. Transl Lung Cancer Res, 2018, 7(6): 703-715.
- [45] ENDRIS V, BUCHHALTER I, ALLGAUER M, et al. Measurement of tumor mutational burden (TMB) in routine molecular diagnostics: in silico and real-life analysis of three larger gene panels[J]. Int J Cancer, 2019, 144(9): 2303-2312.
- [46] BARAS A, STRICKER T. Characterization of total mutational burden in the GENIE cohort: Small and large panels can provide TMB information but to varying degrees[J]. Cancer Research, 2017, 77-105.
- [47] RIZVI H, SANCHEZ-VEGA F, LA K, et al. Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(7): 633-641.
- [48] RAJENDRAN B K, DENG C X. Characterization of potential driver mutations involved in human breast cancer by computational approaches[J]. Oncotarget, 2017, 8(30): 50252-50272.
- [49] THOMAS S J, SNOWDEN J A, ZEIDLER M P, et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours[J]. Br J Cancer, 2015, 113(3): 365-371.
- [50] CHENG D T, MITCHELL T N, ZEHIR A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology[J]. J Mol Diagn, 2015, 17(3): 251-264.
- [51] LEE C, BAE J S, RYU G H, et al. A Method to Evaluate the Quality of Clinical Gene-Panel Sequencing Data for Single-Nucleotide Variant Detection[J]. J Mol Diagn, 2017, 19(5): 651-658.
- [52] WU H X, WANG Z X, ZHAO Q, et al. Designing gene panels for tumor mutational burden estimation: the need to shift from 'correlation' to 'accuracy'[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 206.
- [53] MERINO D M, MCSHANE L M, FABRIZIO D, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico

- assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project [J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1). DOI:10.1136/jitc-2019-000147.
- [54] STENZINGER A, ENDRIS V, BUDCZIES J, et al. Harmonization and Standardization of Panel-Based Tumor Mutational Burden Measurement: Real-World Results and Recommendations of the Quality in Pathology Study [J]. *J Thorac Oncol*, 2020, 15(7): 1177-1189.
- [55] ANAGOSTOU V, NIKNAFS N, MARRONE K, et al. Multimodal genomic features predict outcome of immune checkpoint blockade in non-small-cell lung cancer [J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(1): 99-111.
- [56] SUN J X, HE Y, SANFORD E, et al. A computational approach to distinguish somatic vs. germline origin of genomic alterations from deep sequencing of cancer specimens without a matched normal [J]. *PLoS Comput Biol*, 2018, 14(2): e1005965.
- [57] LAWRENCE M S, STOJANOV P, POLAK P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes [J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 214-218.
- [58] KOWANETZ M, ZOU W, SHAMES D, et al. OA20.01 Tumor Mutation Burden (TMB) is Associated with Improved Efficacy of Atezolizumab in 1L and 2L+ NSCLC Patients [J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 12(S321-S322).
- [59] RAMALINGAM S S, HELLMANN M D, AWAD M M, et al. Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker for clinical benefit from dual immune checkpoint blockade with nivolumab (nivo) plus ipilimumab (ipi) in first-line (1L) non-small cell lung cancer (NSCLC): identification of TMB cutoff from CheckMate 568 [J]. *Cancer Research*, 2018, 78(Suppl 13): ct078.
- [60] BALAR A V, GALSKY M D, ROSENBERG J E, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial [J]. *Lancet*, 2017, 389(10064): 67-76.
- [61] HELLMANN M D, CALLAHAN M K, AWAD M M, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(5): 853-861.
- [62] RIAZ N, HAVEL J J, MAKAROV V, et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab [J]. *Cell*, 2017, 171(4): 934-949.
- [63] WALK E E, YOHE S L, BECKMAN A, et al. The Cancer Immunotherapy Biomarker Testing Landscape [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2020, 144(6): 706-724.
- [64] RICCIUTI B, RECONDO G, SPURR L F, et al. Impact of DNA Damage Response and Repair (DDR) Gene Mutations on Efficacy of PD-(L)1 Immune Checkpoint Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(15): 4135-4142.
- [65] VANDERWALDE A, SPETZLER D, XIAO N, et al. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(3): 746-756.
- [66] COULIE P G, VAN DEN EYNDE B J, VAN DER BRUGGEN P, et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 135-146.
- [67] SNYDER A, CHAN T A. Immunogenic peptide discovery in cancer genomes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2015, 30: 7-16.
- [68] CARRENO B M, MAGRINI V, BECKER-HAPAK M, et al. Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells [J]. *Science*, 2015, 348(6236): 803-808.
- [69] PEGGS K S, SEGAL N H, ALLISON J P. Targeting immunosuppressive cancer therapies: accentuate the positive, eliminate the negative [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12(3): 192-199.
- [70] SEGAL N H, PARSONS D W, PEGGS K S, et al. Epitope landscape in breast and colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 889-892.
- [71] MILLER A, ASMANN Y, CATTANEO L, et al. High somatic mutation and neoantigen burden are correlated with decreased progression-free survival in multiple myeloma [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(9): e612.
- [72] TURAJLIC S, LITCHFIELD K, XU H, et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(8): 1009-1021.
- [73] LAUSS M, DONIA M, HARBST K, et al. Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1738.
- [74] RAJASAGI M, SHUKLA S A, FRITSCH E F, et al. Systematic identification of personal tumor-specific neoantigens in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2014, 124(3): 453-462.
- [75] HENDRIKS L E, ROULEAU E, BESSE B. Clinical utility of tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated with immunotherapy [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2018, 7(6): 647-660.

[2020-09-18 收稿] [2020-10-02 修回] [编辑 罗惠予/游雪梅]