



Prediktívne markery imunoterapie – čo ponúka molekulová patológia

Lucia Fröhlichová

Oddelenie patológie UNLP Košice

Vyhlásenie o konflikte záujmov autora

- Nemám potenciálny konflikt záujmov
- Deklarujem nasledujúci konflikt záujmov

Forma finančného prepojenia	Spoločnosť
Participácia na klinických štúdiách/firemnom grante	
Nepeňažné plnenie (v zmysle zákona)	
Prednášajúci	
Akcionár	
Konzultant/odborný poradca	
Ostatné príjmy (špecifikovať)	

Podľa UEMS (upravené v zmysle slovenskej legislatívy)

Prezentáciu podporila agentúra

We Make Media Slovakia s.r.o.



we make media

1990 → 2019

- Existuje protinádorový imunitný dozor
- Objasnená molekulová podstata kontrolného mechanizmu
- Možnosti zasiahnuť terapeuticky na báze kontrolných bodov imunity (CTLA4, PD I, PD-LI)
- Možnosť liečiť široké spektrum nádorových ochorení



James P. Allison

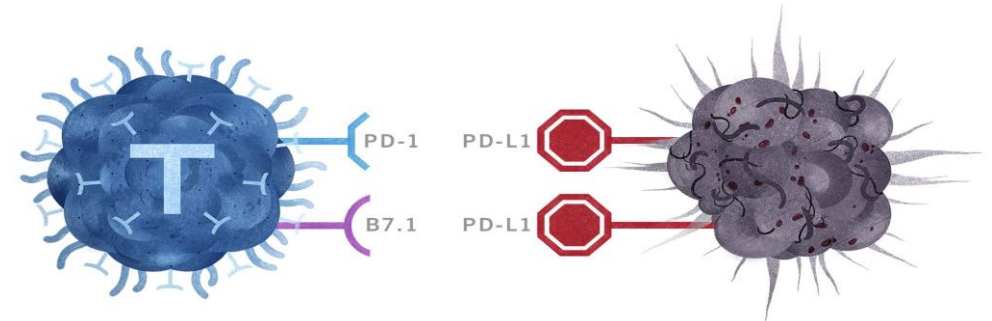
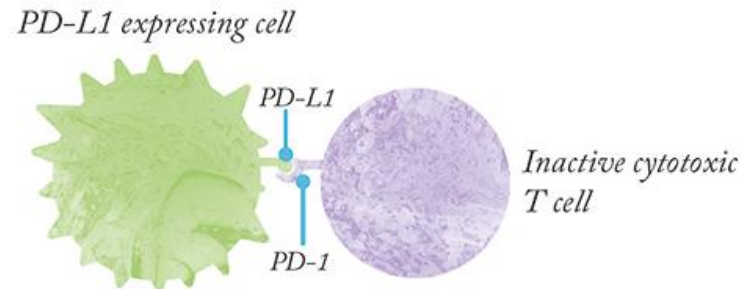


Tasuku Honjo

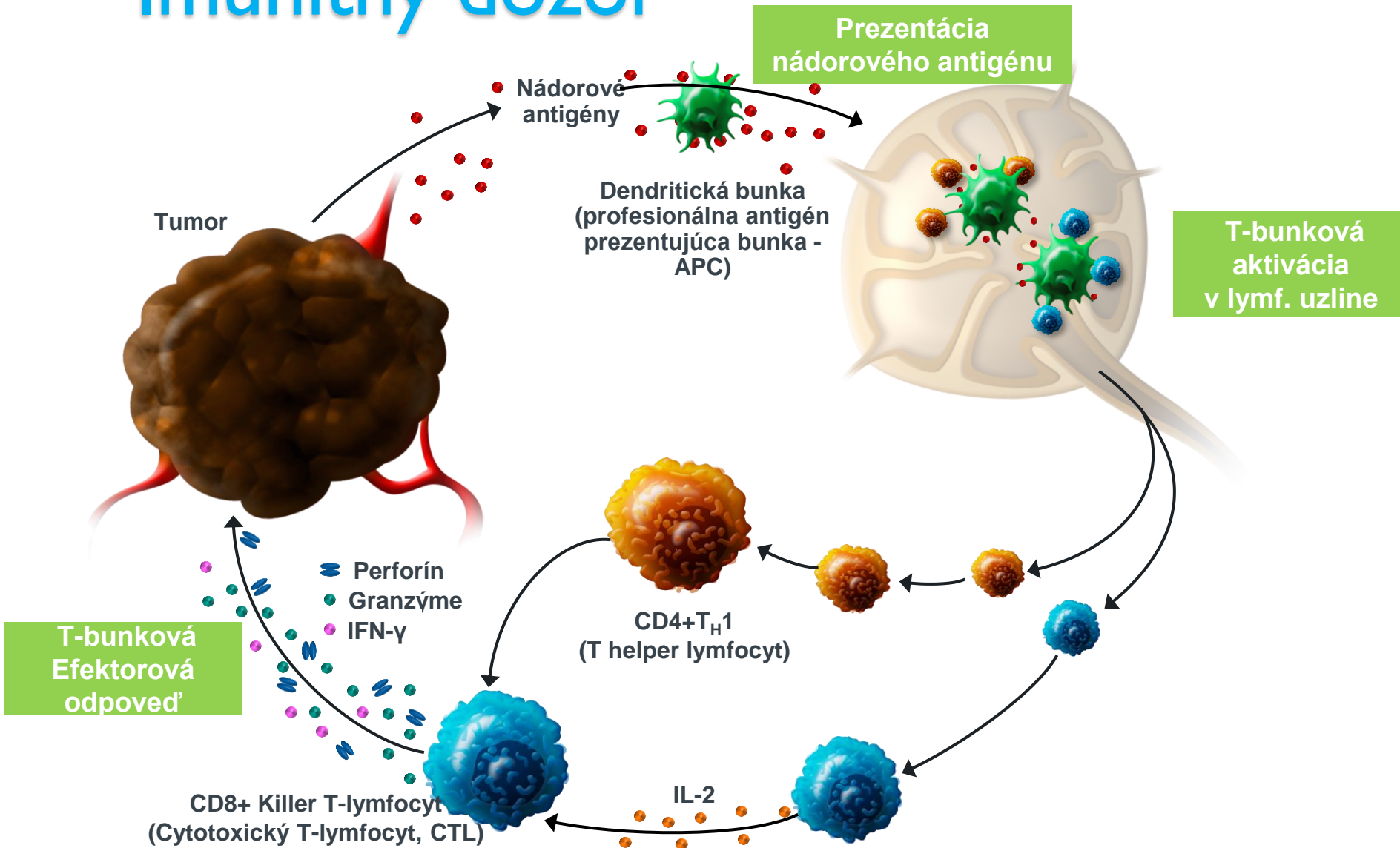
r. **2018** dostali **Nobelovú cenu**
Medicína/ protinádorová imunita

PD-L1

- **PD-L1** (*programmed death-ligand 1*, B7-H1, CD274) je transmembránový proteín, viaže sa na **PD-1** (*programmed cell death protein -1*)
- „Normálne“ bunky chránené pred deštrukciou rôznymi mechanizmami
- Aby neboli rozoznané ako cudzie – expresia PD-L1
- Ochrana pred autoimunitou
- Fyziologicky prítomné na imunokompetentných bunkách
- Proteíny tzv. kontrolných bodov imunity

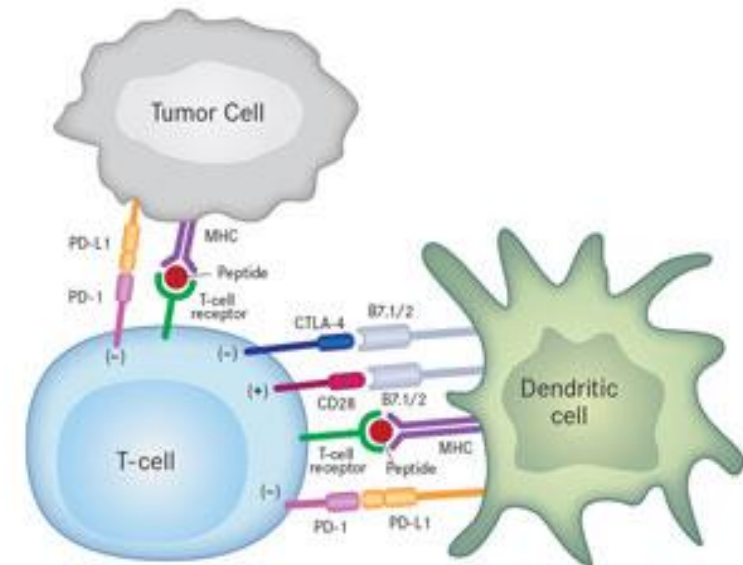


Imunitný dozor

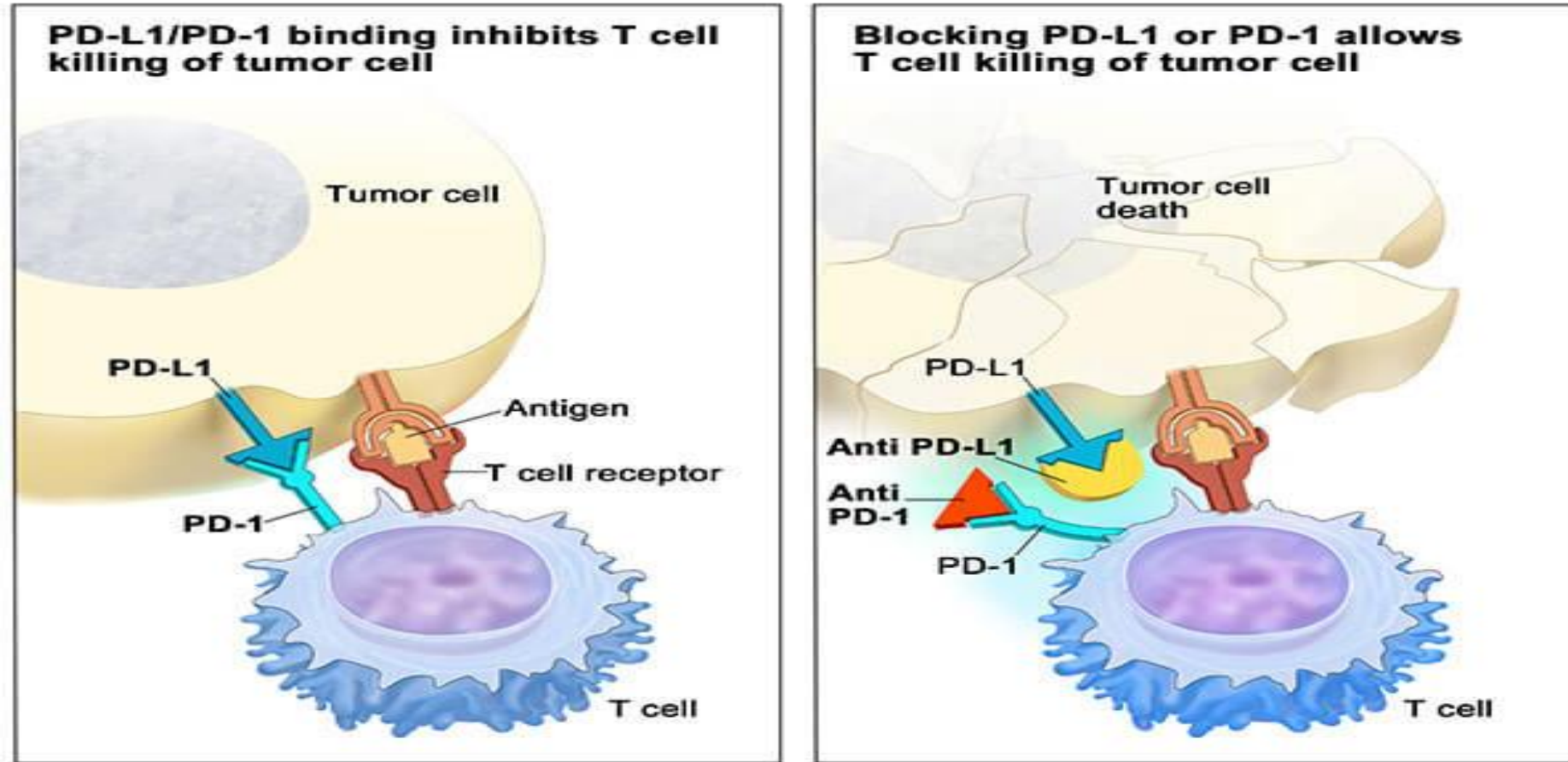


Nádorová bunka a imunitný dozor

- **Nádorová bunka** – schopná vymaniť sa spod kontroly IS
- exprimuje inhibičné ligandy **PD-L1** pre receptory na imunokompetentných bunkách
- neexprimuje MHC I
- znižuje expresiu kostimulačných molekúl na APC, sekrécia imunosupresívnych cytokínov



Imunoterapia – inhibitory „check point“

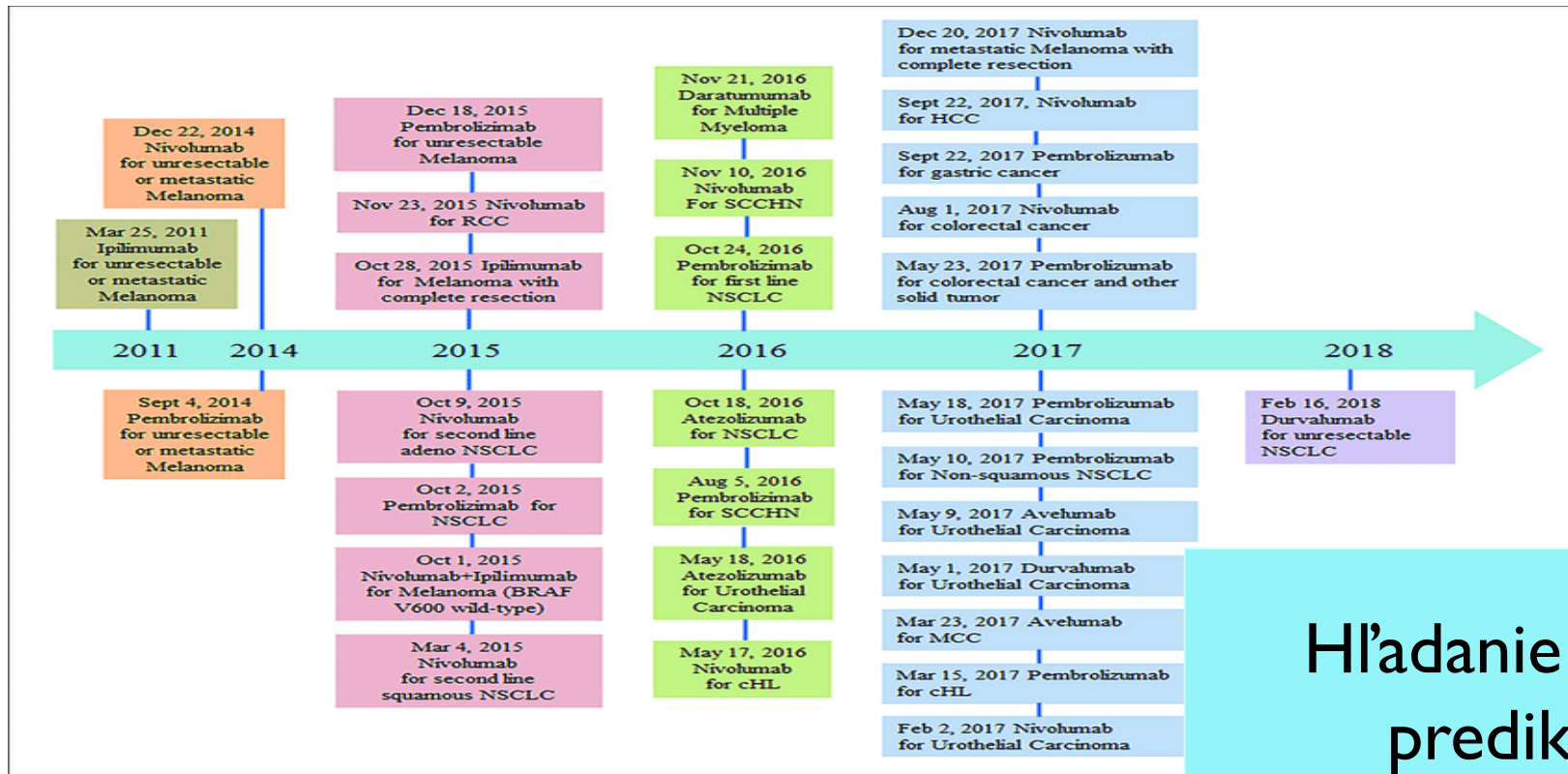


© 2015 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

Figure 2 Tumor cell capable of resisting the immune system by expressing ligands PD-L1/PD-L2 which interact with their co-inhibitory receptor PD-1 in order to suppress tumor immunity with a consequent tumor growth (A). Pembrolizumab action mechanism, according to which this anti-PD-1 antibody blocks the interaction between PD-1 and its ligands PD-L1 and PD-L2 by binding to PD-1 receptor with a consequent anti-tumor growth (B).

Abbreviations: MHC, major histocompatibility complex; PD-1, programmed cell death-1; TCR, T-cell receptor.

Imunoterapia „check point inhibítormi“



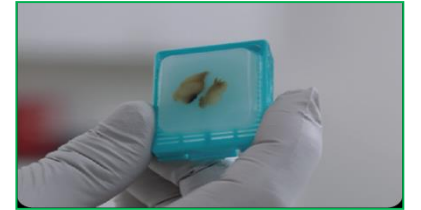
Hľadanie vhodného prediktívneho BIOMARKERU pre liečbu

Prediktívne biomarkery IT

- **IHC** stanovenie **PD-L1** – rýchle, lacné, zvalidované (Cdx, pharma Dx) – mol. patológia
- **IHC** stanovenie deficitu **MMR proteínov**.....
- **MSI** – mikrosatelitová instabilita – genetická metóda (rtPCR, sekvenácie.... rôzne markery)
- TMB - **TMB/L** (tumor mutation burden/load) -NGS
- Neoantigen burden...komplex metodík
- Infiltrácia nádoru „immune cells“
- Iné.... POLE, JAK I/2 mutácie

IHC expresia PD-L1 ako biomarker

- IHC stanovenie expresie PD-L1
- Hodnotenie na nádorových bunkách, ale aj imunokompetentných, tumor infiltrujúcich
- Problém!!!!
- variabilita diagnostických **IHC protilátok (rôzne klony)**
- Použité rôzne **platformy** (farbiace automaty)
- Pre **rôzne lieky** indikované rôzne systémy
- Pre rôzne protilátky a systémy používané **rozdielne hodnotiace systémy**
- Pre **rôzne nádory** rôzne diagnostické, hodnotiace prístupy



Variabilita diagnostických IHC protilátok (rôzne kl

Klon diag. protilátky	platf
22C3 DAKO	Autostainer Li
28-8 DAKO	Autostainer Li
SPI42 Ventana	Ventana Ultra
SP263 Ventana	Ventana Ultra
73-10 DAKO	Autostainer Li

Table 3. Assessment marks for IHC assays and antibodies run C5, PD-L1 (lung) IHC

CE-IVD / FDA approved PD-L1 assays	n	Vendor	Optimal	Good	Borderline	Poor	Suff. ¹	Suff. OPS ²
rmAb clone SP263, 740-4907 ³	16	Ventana/Roche	12	2	2	-	88%	93%
rmAb clone SP263, 740-4907 ⁴	1	Ventana/Roche	-	-	-	1	-	-
rmAb clone SP263, 741-4905 ⁵	4	Ventana/Roche	2	2	-	-	-	-
rmAb clone SP263, 790-4905	48	Ventana/Roche	34	10	4	-	92%	92%
mAb clone 22C3 pharmDX, SK006 ⁶	24	Dako/Agilent	17	5	-	2	92%	92%
mAb clone 22C3 pharmDX, SK006 ⁷	9	Dako/Agilent	2	2	1	4	44%	-
mAb clone 22C3 pharmDX, GE006 ⁸	3	Dako/Agilent	3	-	-	-	-	-
rmAb clone 28-8 pharmDX, SK005 ⁹	3	Dako/Agilent	2	1	-	-	-	-
Antibodies ¹⁰ for laboratory developed PD-L1 assays, concentrated antibodies	n	Vendor	Optimal	Good	Borderline	Poor	Suff. ¹	Suff. OPS ²
mAb clone 22C3	42	Dako/Agilent	11	20	9	2	74%	74%
mAb clone E1L3N	5	Cell Signaling	1	4	-	-	100%	100%
rmAb CAL10	3	Biocare	3	1	-	2	67%	100%
rmAb clone 28-8	3	Zytomed Systems	3	1	-	2	67%	100%
rmAb clone 28-8	4	Abcam	1	2	-	1	-	-
rmAb clone ZR3	1	Cell Marque	1	-	-	3	-	-
	1	Zeta Corporation	1	-	-	3	-	-
	1	Nordic Biosite	1	-	-	3	-	-
	1	Gene Tech	1	-	-	3	-	-
rmAb clone QR1	1	Quartett	1	-	-	1	-	-
	1	Diagomics	1	-	-	1	-	-
rmAb BSR90	1	Nordic Biosite	1	-	-	-	-	-
rmAb clone SP142	1	Spring Biosystems	-	1	-	-	-	-
Ready-To-Use antibodies	n	Vendor	Optimal	Good	Borderline	Poor	Suff. ¹	Suff. OPS ²
rmAb CAL10, API3171	1	Biocare	-	-	1	-	-	-
rmAb QR1, 2-PR292-13	1	Biocyc	-	1	-	-	-	-
rmAb clone MXR003, RMA-0732	1	Maixin	-	-	-	1	-	-
Total	176		91	51	17	17		
Proportion			51%	29%	10%	10%	80%	

www.nordiqc.org (optimal or good)

Metodika stanovenia PD-L1

- Imunohistochemický dôkaz expresie PD-L1
- Použitie výlučne pharmDx/CDx kity na výrobcom validovanej platforme
- Dostupné aj protilátky neviazané na platformu a systém

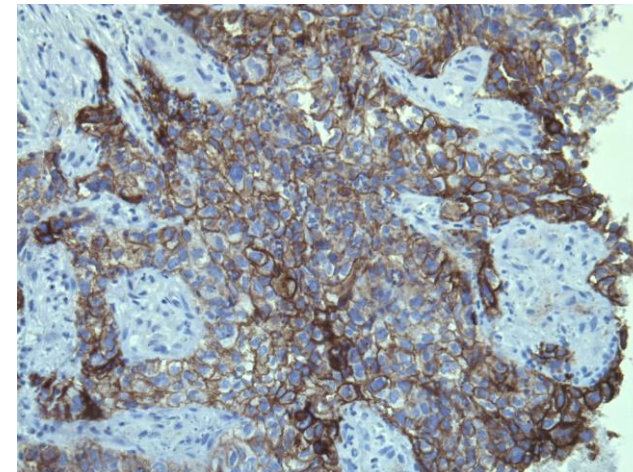
PD-L1 IHC 22C3, DAKO



PD-L1 IHC SP263 Ventana
PD-L1 IHC SP142 Ventana

Pre rôzne terapeutiká indikované rôzne systémy

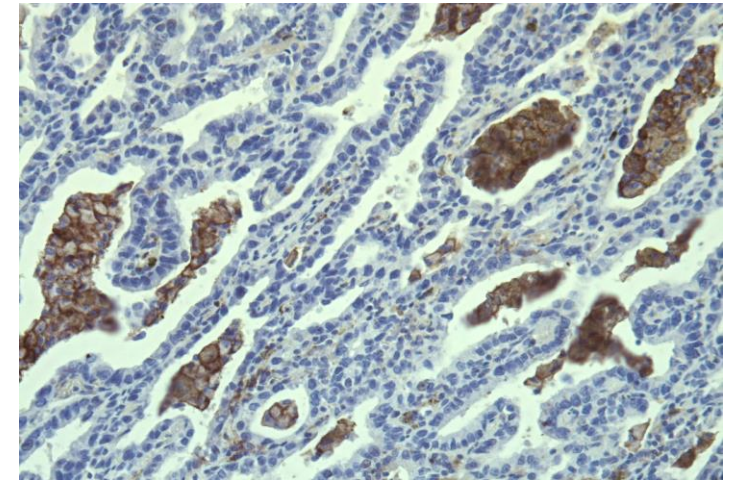
- Aktuálne – 1600 klinických štúdií PD-1 a PD-L1
- Cca 350 z nich používa **IHC expresiu PD-L1** ako určujúcu pre voľbu terapie „check point“ inhibítormi
- **! Pre rôzne fázy ochorenia a liečby!**
- Stále nie je „definitívny marker“
- Testy nie sú uniformné



Liek Generický názov, fy	Terapeutický cieľ	Prvé schválené	Schválený diagnostický systém
Keytruda (pembrolizumab), Merck	PD-I	December 2014, Melanoma	22C3 (Dako) IHC scoring: Tumor cell membrane
Opdivo (nivolumab), Bristol-Myers Squibb	PD-I	Júl 2014, Melanoma	28-8 (Dako) IHC scoring: Tumor cell membrane
Tecentriq (atezolizumab), Genentech/Roche	PD-LI	Júl 2016, Urothelial carcinoma	SPI42 (Ventana) IHC scoring: Tumor cell membrane, infiltrating immune cells
Imfinzi (durvalumab), AstraZeneca	PD-LI	Máj 2018, Urothelial carcinoma	SP263 (Ventana) IHC scoring: Tumor cell membrane
Bavencio (avelumab), Merck KgAa/Pfizer	PD-LI	September 2018, Merkel cell carcinoma, RCC * 2020 Urotelial ca	SP263,73-10 (Dako) [Research Use Only] IHC scoring: Tumor cell membrane
Libtayo (cemiplimab-rwlc), Sanofi/Regeneron	PD-I	2018 Lokálne pokročilý SCC kože	neurčený

Snaha o zjednotenie

- Porovnávacie štúdie základných diagnostických IHC esejí testovania expresie PD-L1 proteínu - **projekt Blueprint 1, 2A a 2B** (2017,2018)
- Tím odborníkov IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) testovanie vzoriek, rôzne typy nádorov, ako sa líši IHC expresia/farbenie v jednotlivých systémoch
- Hodnotenie nádorových aj imunokompetentných buniek
- **VÝSLEDOK**
- Zhoda v 3 z 5 esejí – 22C3, 28-8, SP263
- 73-10 ↑senzitivita a naopak SPI42↓senzitivita



Klon diag. protilátky	platforma	liek	nádor
22C3 DAKO	Autostainer Link48, DAKO	pembrolizumab	NSCLC, Uroteliálny ca, ca žalúdka, GEJ, melanóm, ca cervixu, Hodgkin ly, skv.ca hlavy a krku, TNB ca
28-8 DAKO	Autostainer Link48, DAKO	nivolumab	NSCLC, Uroteliálny ca, Hodgkin ly, skv.ca hlavy a krku, ca oblička, pečeň, KRC MSI-H, melanóm
SP142 Ventana	Ventana Ultra	atezolizumab	NSCLC, Uroteliálny ca, TNB ca
SP263 Ventana	Ventana Ultra	durvalumab nivolumab pembrolizumab	NSCLC, Uroteliálny ca, skv.ca pľúc
73-10 DAKO	Autostainer Link48, DAKO	avelumab	Merkel cell ca, RCC v kombo, Phase III žalúdok ca

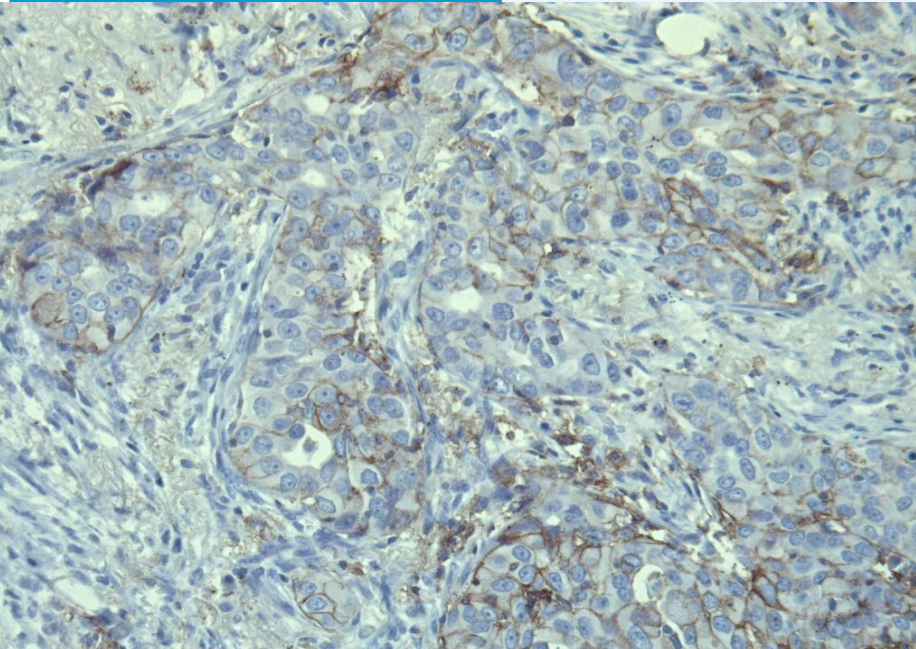
Aké sú možnosti u UC

TABLE 3 Updated summary of immunotherapy trials in metastatic urothelial cancer

Setting	ICI	Phase	n	ORR (%)	PFS (mo)	OS (mo)	PD-L1 biomarker analysis			SAEs	HrQOL
							Assay	Cells	Cut-off		
Metastatic second-line therapy	Atezolizumab vs chemotherapy	III	931	22	2.1	11.1 vs. 10.6	Ventana SP142	IC	5%	20	Improved fatigue and physical function
	Pembrolizumab vs chemotherapy ^a	III	542	21.0	2.1	10.3 vs. 7.4	Dako IHC22C3	TC and IC	10%	15	-
	Nivolumab	II	270	20	2.0	8.74	Ventana SP142	TC and IC	1%, 5%	18	Stable or improved
	Avelumab	I	249	17	1.58	6.5	Dako IHC73-10	TC	5%	8	-
	Durvalumab	I/II	191	17.8	1.5	18.2	Ventana SP263	TC or IC	25%	4.9	-
Metastatic firstline ^b	Atezolizumab	II	119	23	2.7	15.9	Ventana SP142	TC	<1%, 1%-4%, ≥5%	16	-
	Pembrolizumab	II	370	29	2.0	11.0	Dako IHC22C3	TC and IC	<1%, 1-9%, ≥10%	16	-

Jiang DM, Sridhar SS. Prime time for immunotherapy in advanced urothelial cancer. Asia-Pac J Clin Oncol.2018;14:24–32.

Skórovacie systémy a hodnotenie NSCLC

Klon diag. protilátky	platforma	nádor	Hodnotenie expresie PD-L1
22C3 DAKO pembrolizumab	Autostainer Link48, DAKO	NSCLC	TPS = počet pozit.TCs/ celkový počet „viabilných TCs X100%
			
7510 DAKO	Autostainer Link48, DAKO	NSCLC 1. a) 2.línia	= 50% TCs >1% TCs

Skórovacie systémy a hodnotenie UC

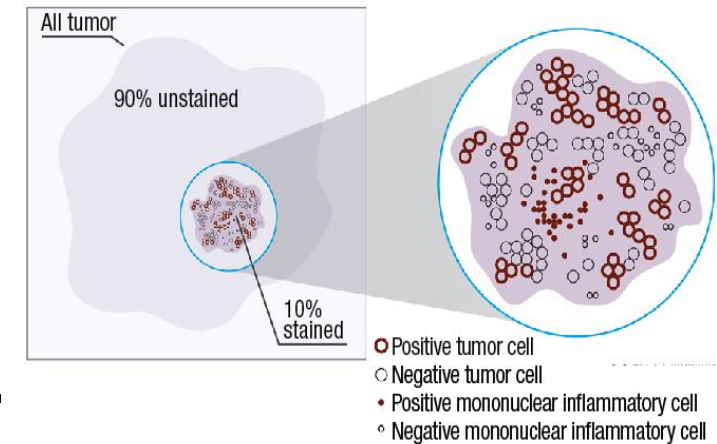
Klon diag. Protilátky/ liečivo	Platforma	Hodnotenie PD-L1 expresie	Schválené
22C3 DAKO Pembrolizumab	Autostainer Link48, DAKO	CPS ≥ 10	FDA EMA
SP142 Ventana Nivolumab	Ventana Ultra	IC aj TC ≥ 1% ≥ 5%	FDA EMA
SP142 Ventana Atezolizumab	Ventana Ultra	IC ≥ 5%	FDA EMA
SP263 Ventana Durvalumab	Ventana Ultra	TC or IC ≥ 25%	FDA
73-10 DAKO Avelumab	Autostainer Link48, DAKO	Na SK liečba bez testovania ,TC ≥ 5%	FDA

Stanovenie CPS skóre pre PD-L1

- Pre pembrolizumab – UC, aca žalúdok, cervix, GEJ.
- CPS = celkové pozitívne skóre

počet PD-L1 pozitívnych buniek
(TCs, makrofágy, tu.infiltr. lymf.)

$$\text{CPS} = \frac{\text{počet PD-L1 pozitívnych buniek (TCs, makrofágy, tu.infiltr. lymf.)}}{\text{celkový počet „viabilných“ TCs}}$$

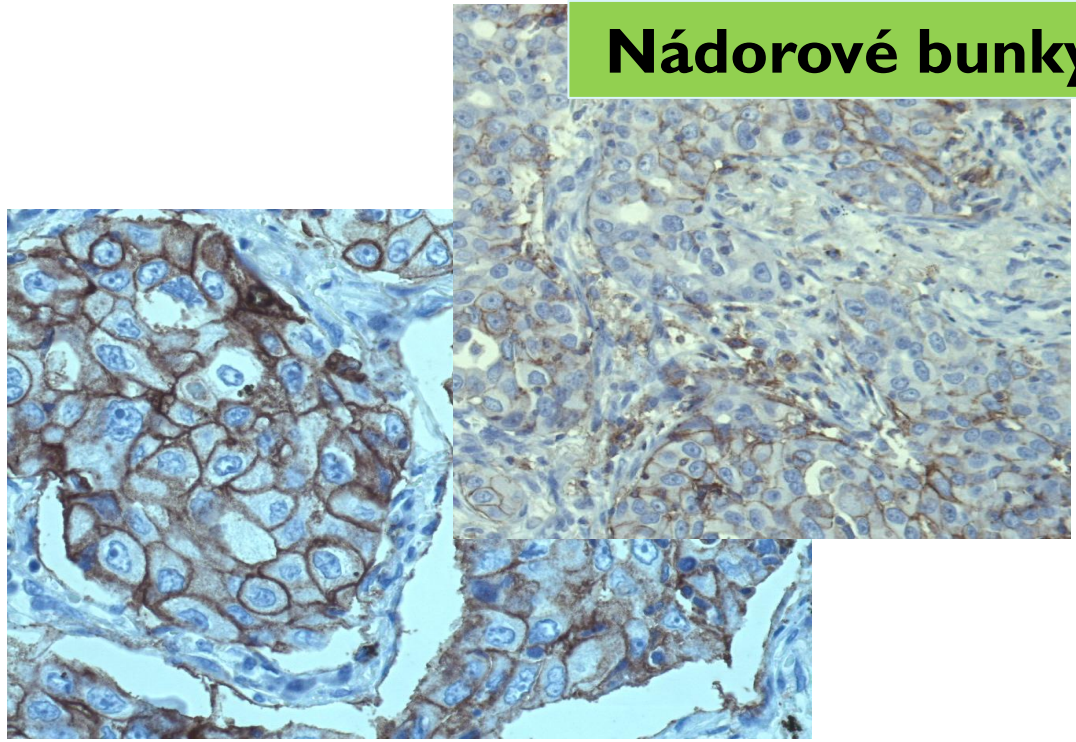


www.agilent.com/en-us/e-learning-dako-products

- Výsledok CPS 0 – 100 (cut-off ≥ 10)

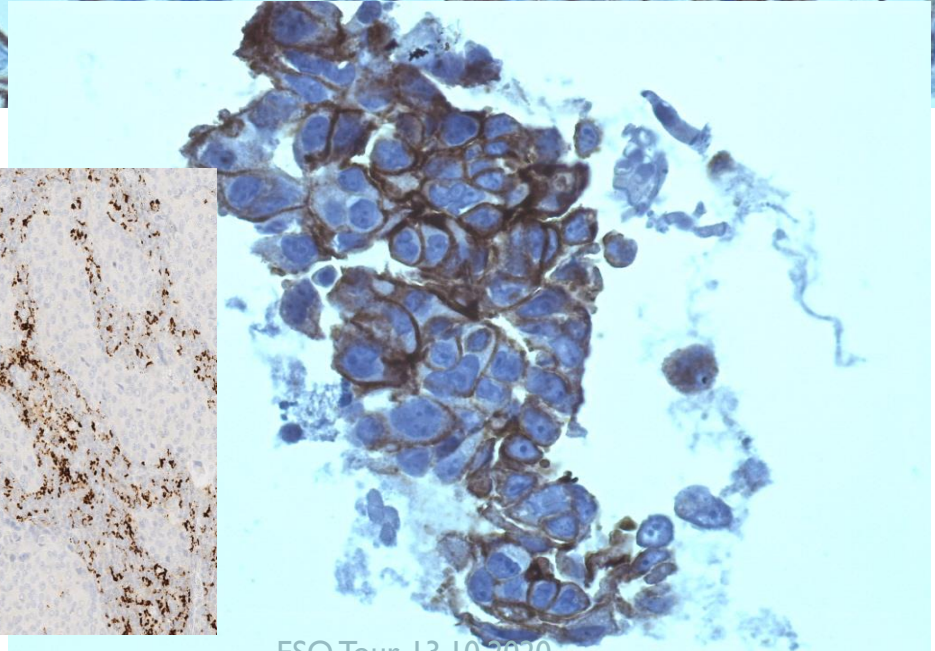
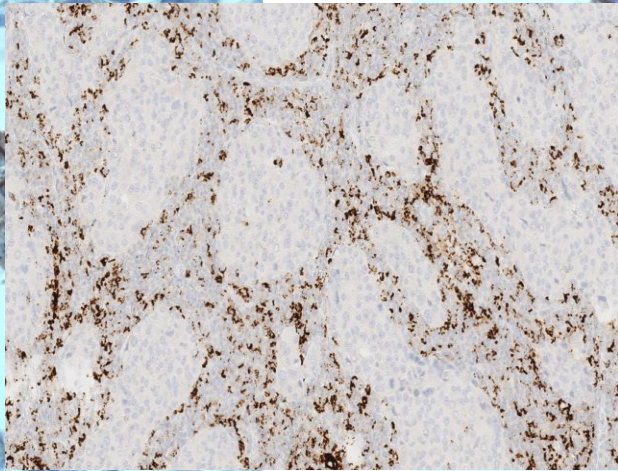
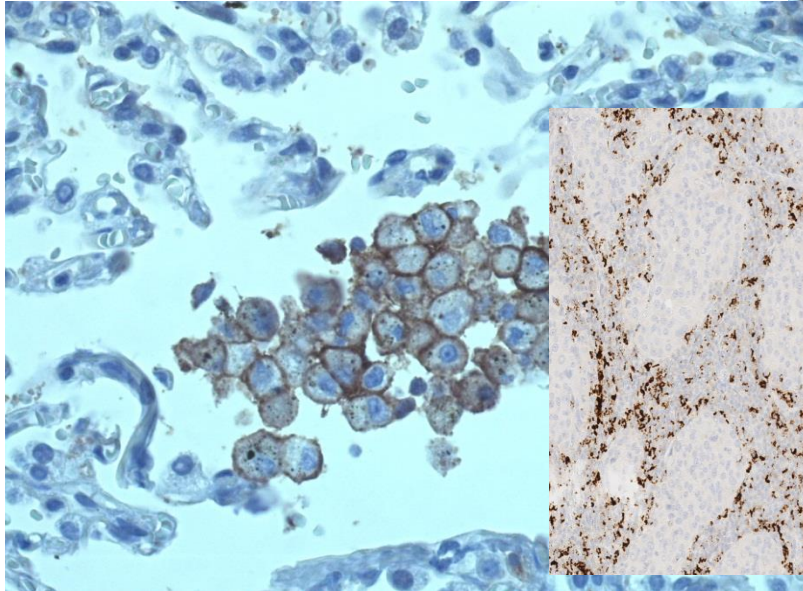
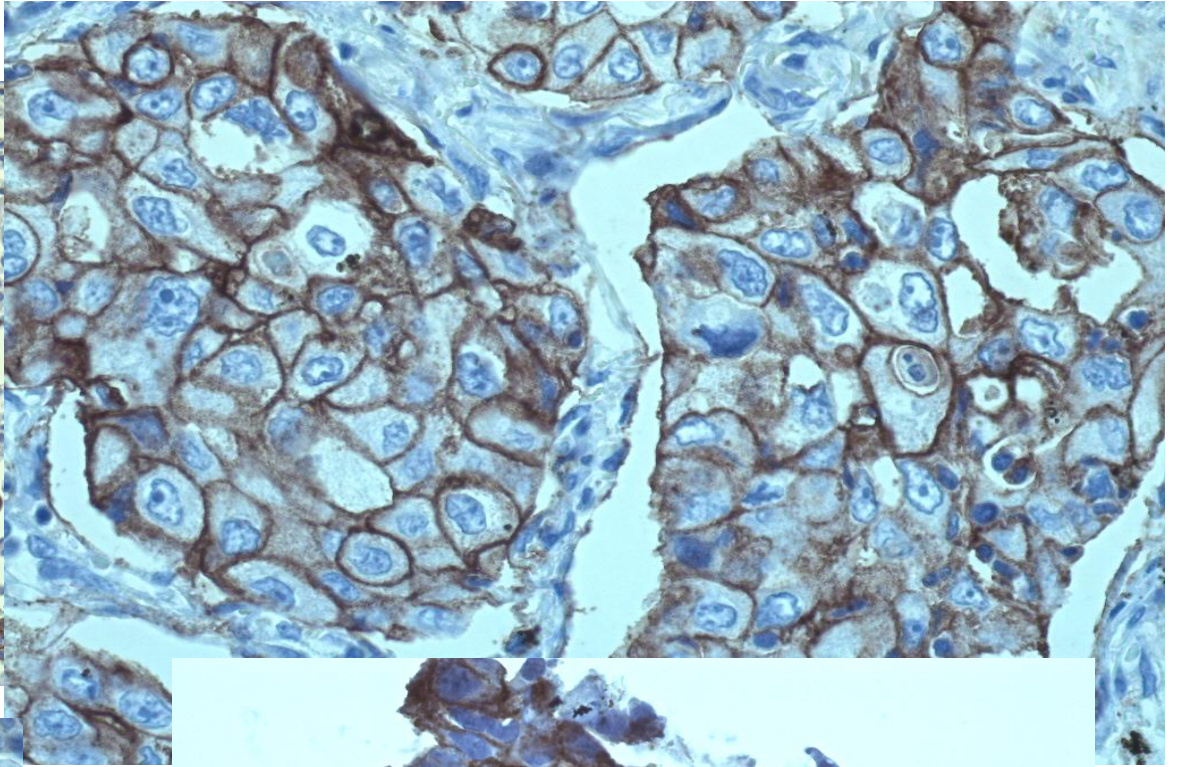
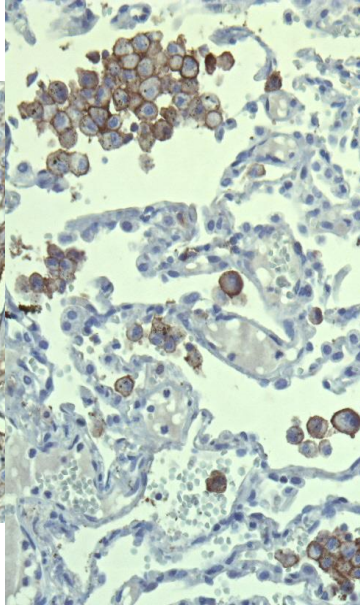
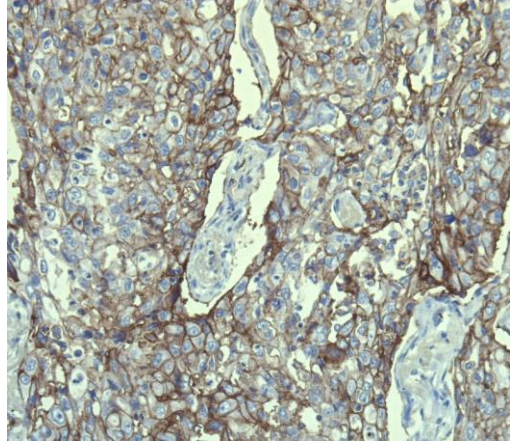
Hodnotenie expresie PD-L1

Nádorové bunky TCs



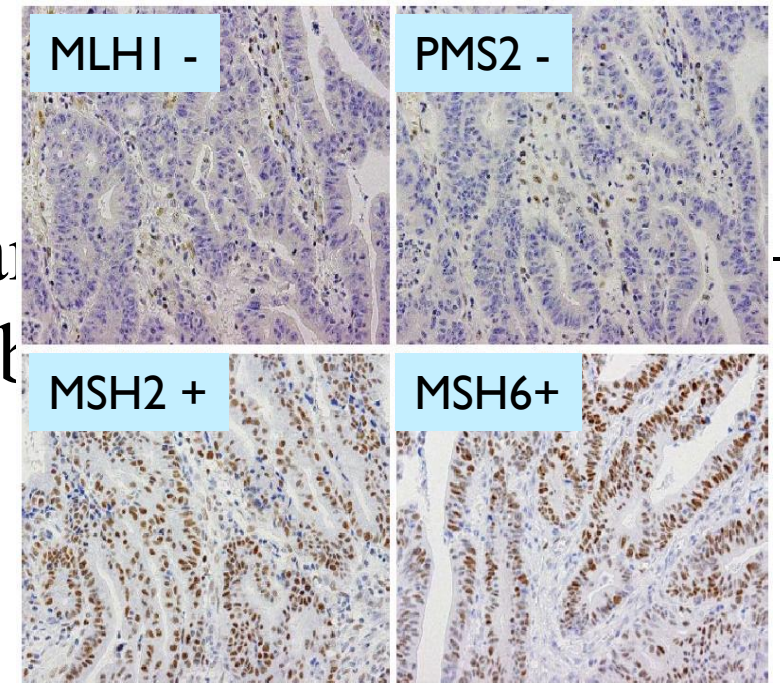
Imunitné bunky ICs





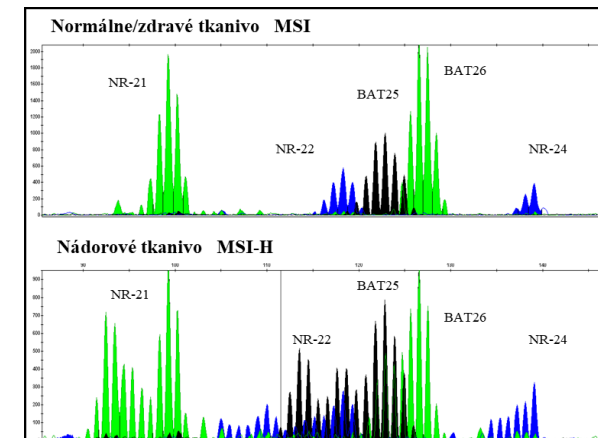
dMMRP a MSI

- strata expresie „*mismatch repair proteins*“ (dMMR)
- IHC stanovenie
- MLH1, PMS2, MSH6, MSH2
- Koloréktálny ca, endometriálny ka
benefit z liečby „check point“ inhib
- dMMRP /MSI-H zväčša aj ↑TMB
- dMMRP koreluje s MSI- H



MSI

- Mikrosatelitová instabilita vedie k dMMRP
- **MSS** alebo **MSI-H**
- Metódy PCR, sekvenačné
- Rôzne markery sledovania (NR21, NR22, NR24, BAT25, BAT26)
- **Idylla** (ACVR2A, BTBD7, DIDO1,
MRE11, RYR3, SEC31A, SULF2 - ≥ 2 mut pozit. MSI-H)



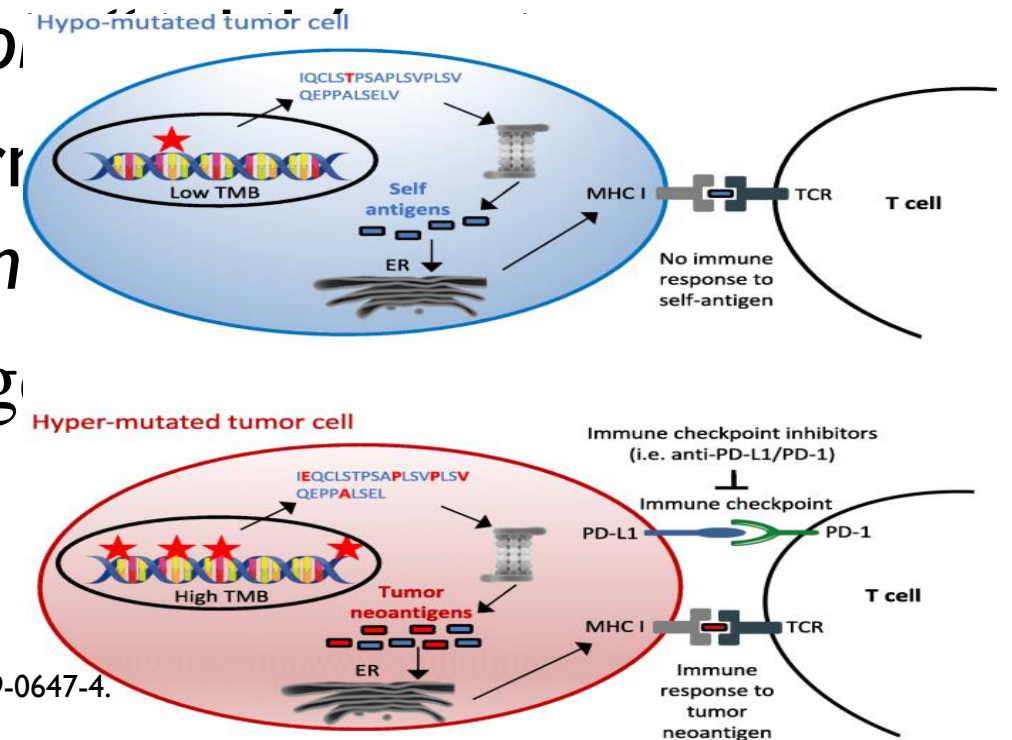
TMB - mutačná nálož

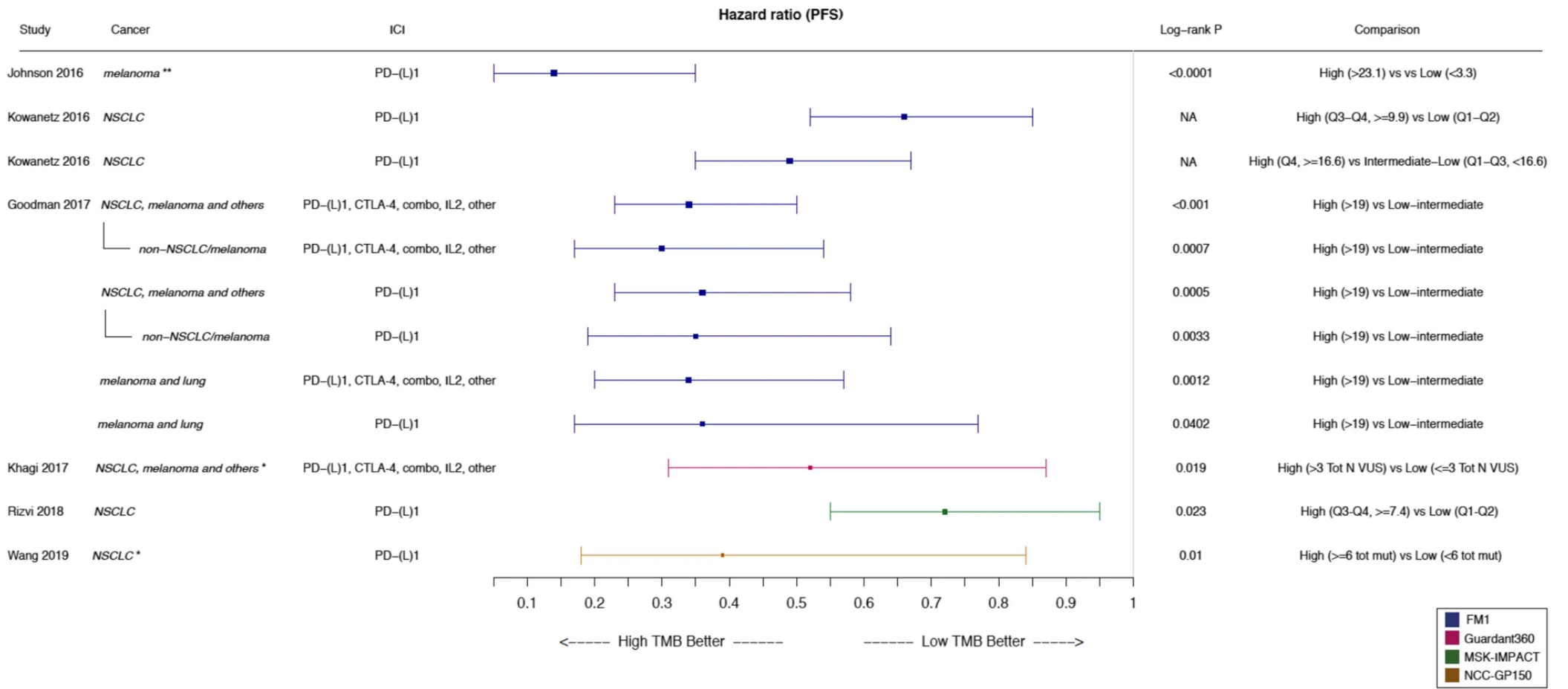
- **TMB** – množstvo/počet somatických mutácií v kódujúcich oblastiach nádoru (počet mutácií/Mb)
- počet mutácií/ 1 Mb..... 1 milión nukleotidov
- **NGS analýza** – celogenómová WGS
- celoexómová WES
- cielená na určité gény a oblasti (*panel based TMB*)

- Nevýhody: veľké množstvo dát – potreba selekcie relevantných, časovo náročné, vysoká cena analýzy, nejasné a neuniformné hodnotenie cut-off
- vysoká TMB je charakterizovaná >10 mut/Mb (>20 mut/Mb)
-

TMB a neoantigény

- TMB vysoko variabilná v rôznych typoch nádorov
- **Vysoká TMB** potvrdená v NSCLC, melanómoch, uroteliálnych ca, dMMRP/MSI-H kolorektálnych ca
- - benefit z terapie „check point“
- Všeobecne pacienti s nádorom **TMB** profitujú z terapie „check point“
- TMB - ↑ produkcia neoantigénov



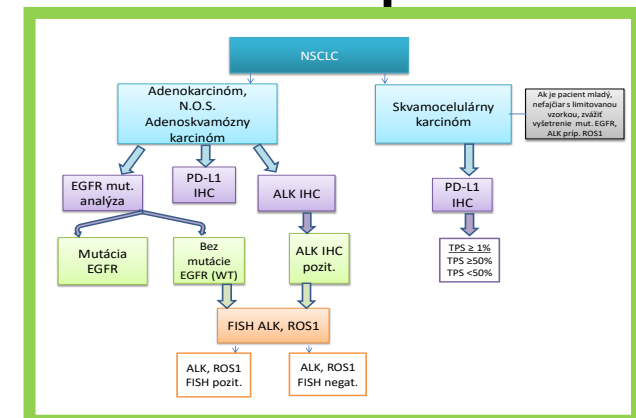
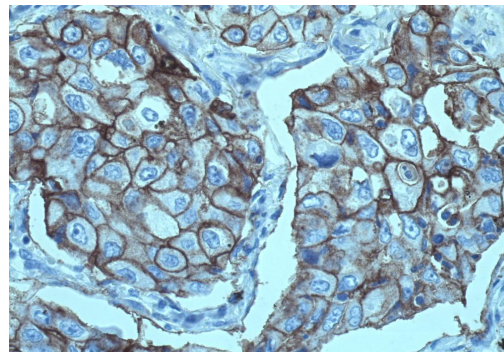
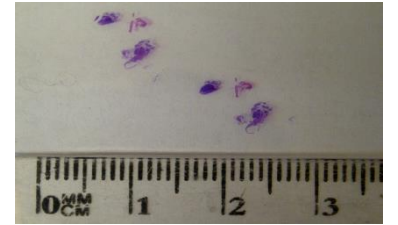


Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges

Encello, L., et al., J Immunother Cancer. 2019 Jul 15;7(1):183. doi: 10.1186/s40425-019-0647-4.

Limitácie testovania

- Sampling – problém malé biopsie (bs, core-cut)
- Dynamika PD-L1 expresie v rámci imunity
- Kvalita spracovania vzorky
- Informácia o vyšetrovanej vzorke a pacientovi
- Technické, prístrojové vybavenie, cena a dostupnosť vyšetrenia, čas



Záver pre laboratórium

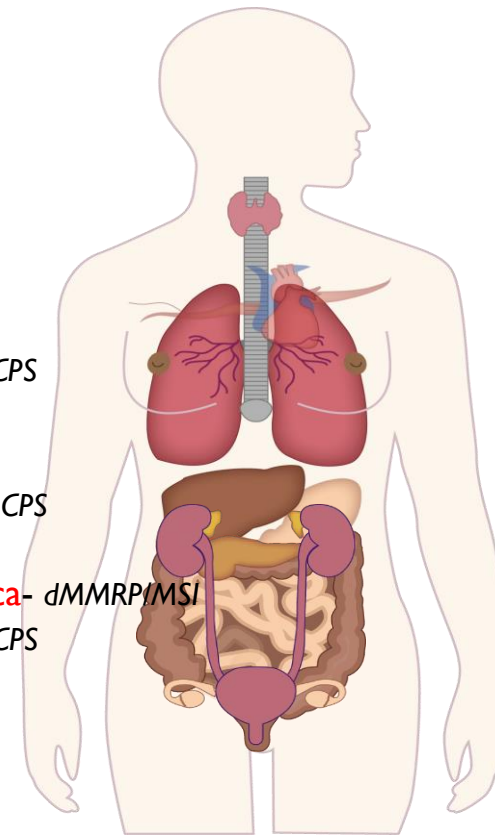
- Používať CompanionDx, Complementary, CE IVD testy
- Ak iné opatrne s hodnotením a indikáciou liečby
- Report – akú protilátku, test a platformu používame
 - aký skórovací systém používame
- Optimálny algoritmus – hlavne malé vzorky BS, core-cut
- Poznať pozadie testovania a liečby



Záver

- Imunoterapia- efektívna liečba širokého spektra agresívnych nádorov
- Optimálna a dostupná voľba metodiky, eseje, protilátky, platformy, správny hodnotiaci systém
- Report – akú metodiku, test a platformu používame
 - aký skórovací systém používame
- Multidisciplinárny prístup
- Medzinárodné kontroly kvality, centrá pre testovanie
- Aktuálne možnosti →
- Pan biomarker TMB??
- - perspektívny biomarker
- - „Treshold“?WGS, WES, panel?

HNSCC- PD-L1, CPS
Esofagus SCC- PD-L1, CPS
GEJ- PD-L1, CPS
Žalúdok- PD-L1, CPS
TNB ca prsník- PD-L1, CPS
NSCLC- PD-L1, TPS
CRC a Endometrialny ca- dMMRP/MSI
Uroteliálny ca- PD-L1, CPS
Cervix- PD-L1, CPS



ĎAKUJEM ZA POZORNOST



lucia.frohlich@gmail.sk