

NSCLC: Možnosti prediktivního testování imunoterapie

Pavel Dundr

Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



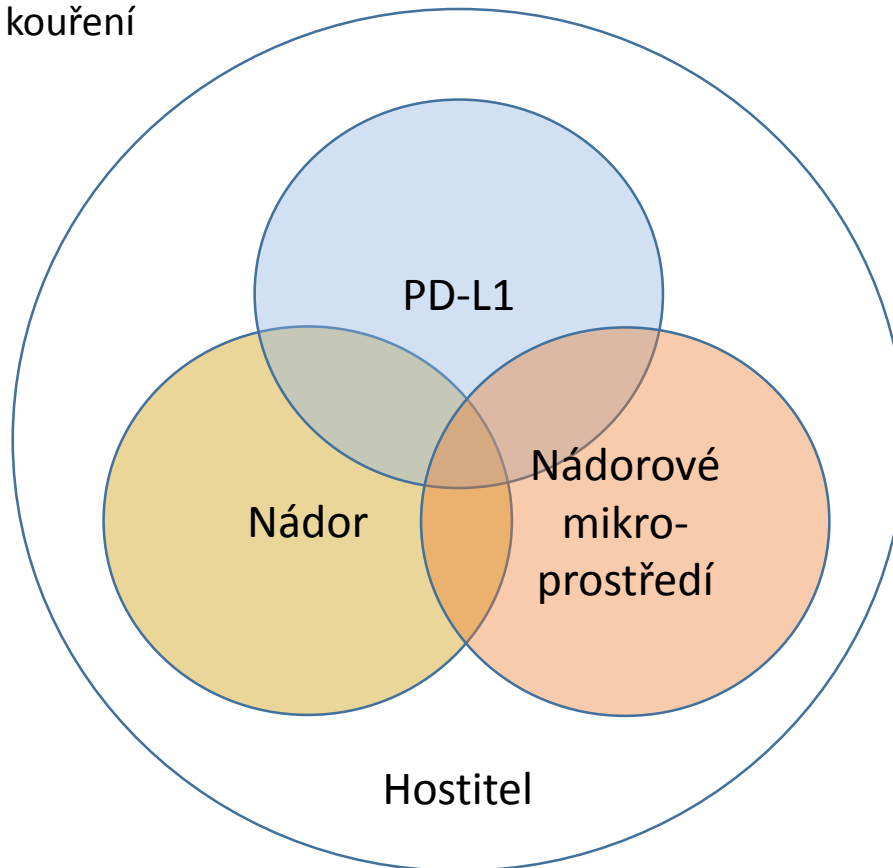
Stávajíc a potenciální biomarkery imunoterapie

Charakteristiky hostitele a prostředí

- věk, pohlaví, PS, kouření
- mikrobiom
- genom (SNP...)

Nádorové antigeny

- mutační load
- neoantigeny
- MSI
- mutace p53
- další mutace



PD-L1

- imunohistochemie
- nádor/zánětlivé elementy
- FISH (amplifikace)
- PD-L2

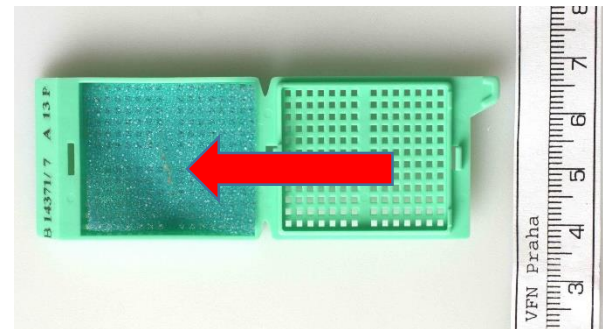
Nádorové mikroprostředí

- zánětlivé fenotypy
- klonalita TCR
- TIL (CD8+)
- Signatury imunitní odpovědi

Prediktivní testování NSCLC

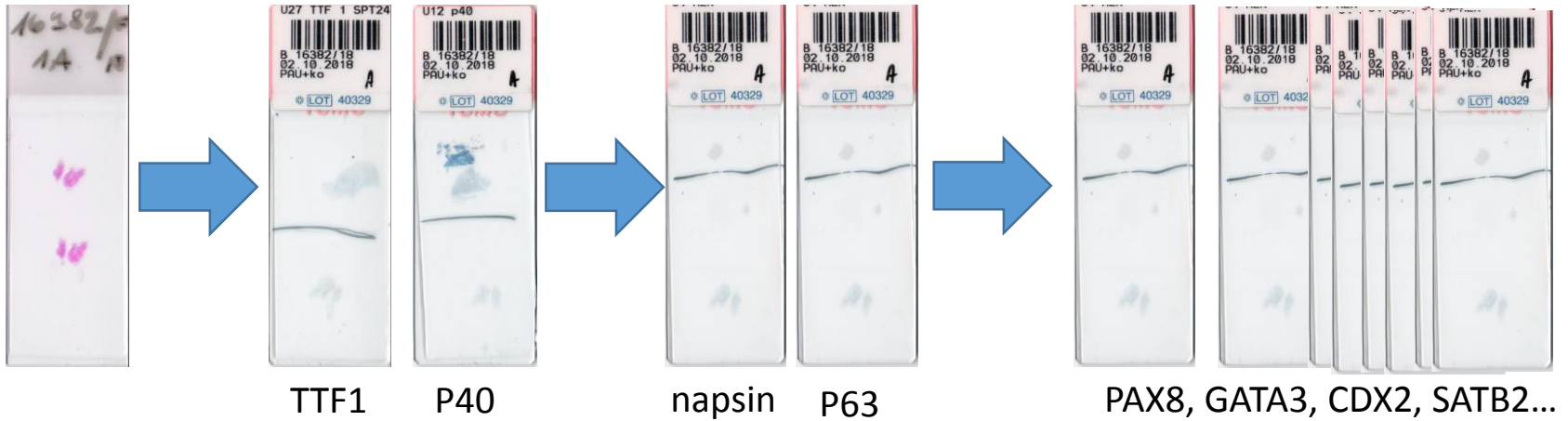
- HE
- Diagnostická IHC (TTF1/napsinA; p40/p63)
- Histochemie (alc. modř)
- Prediktivní IHC
 - - PD-L1
 - - ALK (+ FISH)
 - - ROS1 (+ FISH)
- Prediktivní FISH
 - - NTRK (3 sondy!)
 - - RET
 - - MET
- Izolace DNA pro molekulární analýzy (EGFR, BRAF) – 5(-10) řezů (po 5-7 μm)
- Izolace RNA – 5(-10) řezů (po 5-7 μm)
- HE

- U 25-30 % vzorků u pacientů s ca plic nelze provést molekulární testování (data z NL)



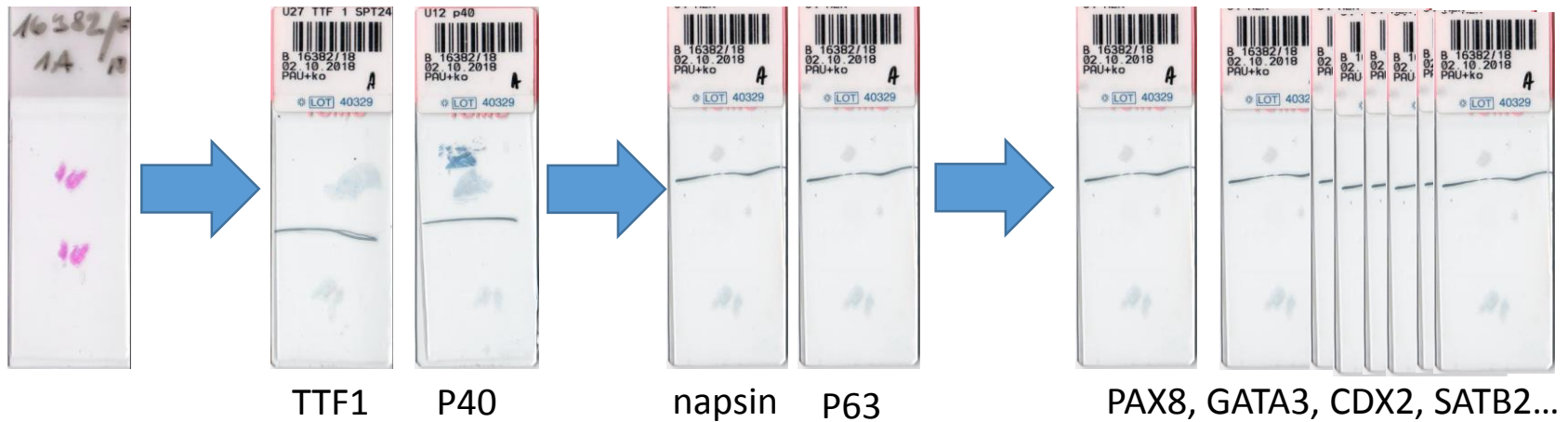
Prediktivní testování NSCLC

Dignostická fáze



Prediktivní testování NSCLC

Dignostická fáze



Prediktivní fáze




Současná situace testování prediktivních markerů u NSCLC v ČR

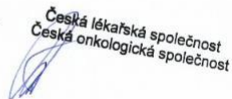
Pravidla pro prediktivní testování solidních nádorů – přehled indikací a metod

Souhrn závěrů z jednání zástupců ČOS a VZP – 3. 5. 2017, 13. 6. 2017, 31. 10. 2017 a 8. 6. 2018

Účastníci: ČOS: doc. Prausová, prof. Petruželka, doc. Svoboda, prof. Ryška,
SČP: prof. Dundr
VZP: dr. Bartíšková, dr. Šustková

Aktualizace k 1.7. 2018


MUDr. Emília Bartíšková
ředitelka Odboru kontroly
a revize zdravotní péče VZP ČR


Česká lékařská společnost
Česká onkologická společnost

Testování PD-L1 NSCLC

Primární biopsie:

Standardní IHC + kód morfometrie (kvantifikace % zastoupení pozitivních buněk (TPS skóre)) v RL u NSCLC v momentě stanovení dg – reflexně.

Rebiopsie: na vyžádání onkologa

Testování PD-L1 u ostatních diagnóz – indikace onkologem za předpokladu existence dostupné léčby

Výšetřování poruchy systému MMR proteinů

V současné době je/bude toto vyšetření hrazeno na základě indikace onkologa. Nezbytnou podmínkou je dořešení navazujících vyšetření u pacientů s prokázanou mutací. Potvrzení diagnózy Lynchova syndromu provádí pracoviště genetiky.

kód standardní IHC 87231 dle počtu vyšetřených markerů

Dále diskutována problematika vykazování vyšetření RL při přeoslání vzorku z nereferenční laboratoře. Jako indikující PZS se uvádí PZS primárně požadující patologické vyšetření. Pokud z konkrétního důvodu indikující PZS nepožaduje provedení vyšetření, které se jinak stanovuje automaticky, uvede tento požadavek na žádanku (např. celkově špatný zdravotní stav neumožňující další terapii apod.). Vzhledem k různé praxi bude toto pravidlo důsledně uplatňováno až od 1. 1. 2019. V rámci případné regulace lze změnu vykazování zohlednit.

Nemalobuněčný ca plic

Mutace EGFR

Z malých vzorků, kde je předpoklad nemožnosti vyšetření doplnit v budoucnu vzhledem k jeho malému rozměru (bronchoskopické odběry, transparietální biopsie, apod.) automaticky v RL u definovaných morfologických subtypů (adenokarcinom, NSCLC spíše adenokarcinom, NSCLC NOS) v momentě stanovení dg.

EGFR v resekátech nebo ostatních histologických typech je testováno na vyžádání onkologem.

kód kvantitativní PCR 94200

ALK

Standardní IHC v RL u definovaných morfologických subtypů (adenokarcinom a spol.) v momentě stanovení dg – automaticky

případy 3+ jsou pozitivní, dále se neověřují FISH

případy 0 jsou negativní, dále se neověřují FISH

případy 1+ a 2+ jsou nejisté (cca 5% všech testovaných), dále se ověřují FISH, pokud je vyžádáno onkologem

kód standardní IHC 87231 u všech indikovaných

kód prediktivní FISH 94201 u cca 5% testovaných

ALK v resekátech nebo u jiných histologických typů je testováno na vyžádání onkologem

jiné metody pro stanovení ALK (např. RT-PCR) nejsou t.č. indikovány

ROS1

Standardní IHC v RL na vyžádání onkologa v případě, že pro pacienta je dostupná cílená léčba případy s jakoukoli pozitivitou 1+, 2+, 3+ se dále ověřují FISH, jen FISH pozitivní případy jsou považovány za definitivně pozitivní.

kód standardní IHC 87231

Současná situace testování prediktivních markerů u NSCLC v ČR

Pravidla pro prediktivní testování solidních nádorů – přehled indikací a metod

Souhrn závěrů z jednání zástupců ČOS a VZP – 3. 5. 2017, 13. 6. 2017, 31. 10. 2017 a 8. 6. 2018

Účastníci: ČOS: doc. Prausová, prof. Petruželka, doc. Svoboda, prof. Ryška, Česká lékařská společnost

Nemalobuněčný ca plic

Mutace EGFR

Z malých vzorků, kde je předpoklad nemožnosti vyšetření doplnit v budoucnu vzhledem k jeho malému rozměru (bronchoskopické odběry, transprietální biopsie, apod.) automaticky v RL u

Testování PD-L1 NSCLC

Primární biopsie:

Standardní IHC + kód morfometrie (kvantifikace % zastoupení pozitivních buněk (TPS skóre)) v RL u

NSCLC v momentě stanovení dg – reflexně.

Rebiopsie: na vyžádání onkologa

Testování PD-L1 u ostatních diagnóz – indikace onkologem za předpokladu existence dostupné léčby

Potvrzení diagnózy Lynchova syndromu provádí pracoviště genetiky.

kód standardní IHC 87231 dle počtu vyšetřených markerů

Dále diskutována problematika vykazování vyšetření RL při přeposlání vzorku z nereferenční laboratoře. Jako indikující PZS se uvádí PZS primárně požadující patologické vyšetření. Pokud z konkrétního důvodu indikující PZS nepožaduje provedení vyšetření, které se jinak stanovuje automaticky, uvede tento požadavek na žádanku (např. celkově špatný zdravotní stav neumožňující další terapii apod.). Vzhledem k různé praxi bude toto pravidlo důsledně uplatňováno až od 1. 1. 2019. V rámci případné regulace lze změnu vykazování zohlednit.

kód prediktivní FISH 94201 u cca 5% testovaných

ALK v resekatéchno u jiných histologických typů je testován na vyžádání onkologem

jiné metody pro stanovení ALK (např. RT-PCR) nejsou t.č. indikovány

ROS1

Standardní IHC v RL na vyžádání onkologa v případě, že pro pacienta je dostupná cílená léčba případy s jakoukoli pozitivitou 1+, 2+, 3+ se dále ověřují FISH, jen FISH pozitivní případy jsou považovány za definitivně pozitivní.

kód standardní IHC 87231

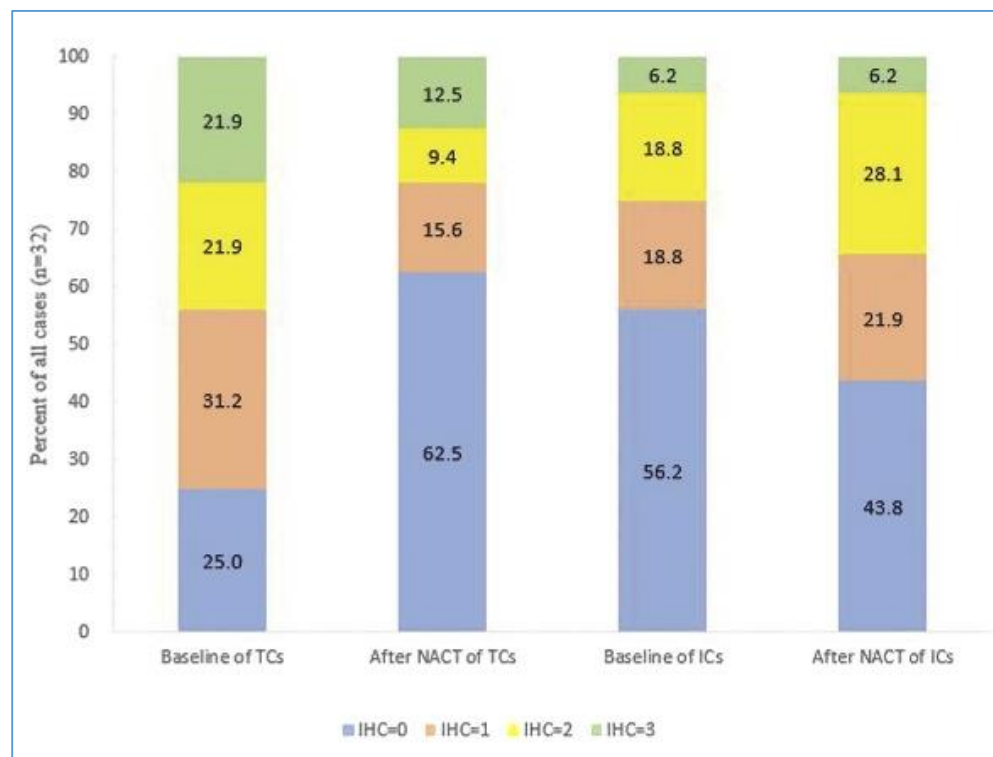
PD-L1

Testování exprese PD-L1 (současný stav)

- Companion vs. complementary diagnostics
- Biologie exprese PD-L1:
 - - časová i místní heterogenita
 - - mnohotné a komplexní regulační mechanismy, vliv další léčby včetně chemo a radioterapie
- IHC: preanalytická a analytická fáze (fixace, typ a reprezentativnost vzorku, kity vs. LDT, protilátka, platforma)
- IHC: interpretace (intra a interpersonální variabilita; způsob skórování, prahové hodnoty..)

Nejasnosti v testování PD-L1

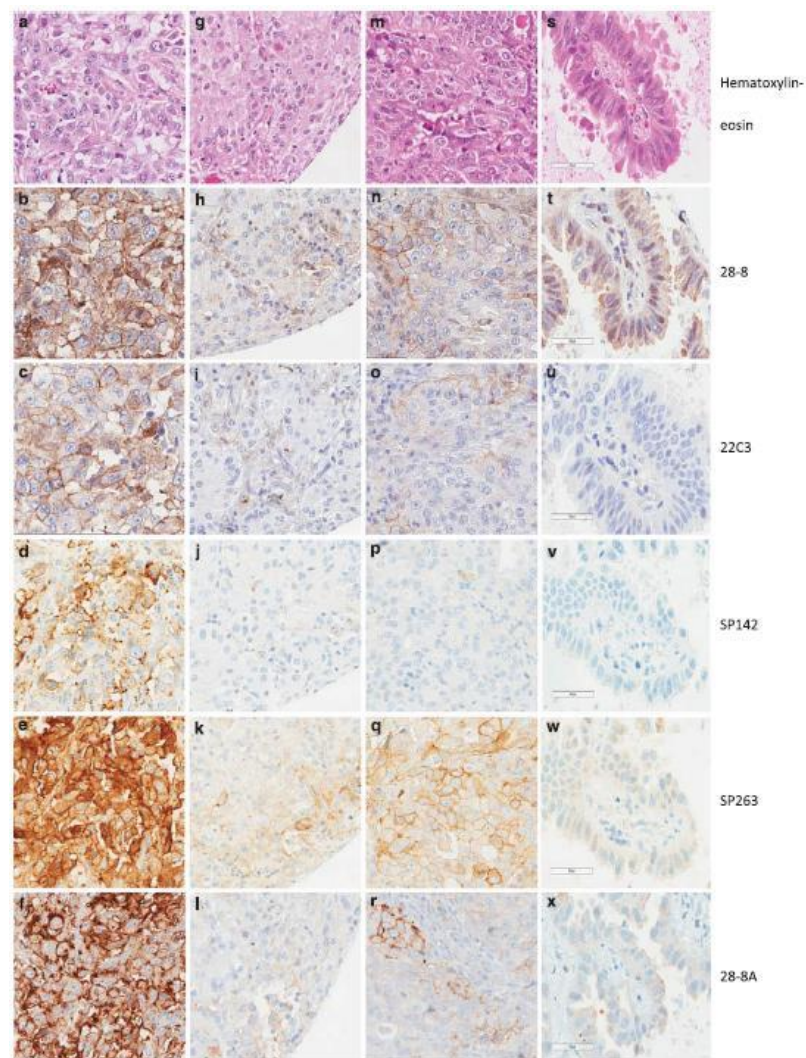
- z jaké tkáně testovat - změna exprese PD-L1 po NACT
- heterogenita exprese
- - primární nádor
- - metastázy
- stanovení cut-off
- ...



Protilátky, platformy, hodnocení...

- Množství srovnávacích projektů:

- Blueprint 2
- Frech harmonization study
- Scheel AH et al. study
- Ratcliffe MJ et al. study
- Skov comparative study
- Rimm et al. study
- Batenchuk et al. study
- Brunnström et al. study



Protilátky, platformy, hodnocení...

MODERN PATHOLOGY (2017) 30, 1411–1421

© 2017 USCAP, Inc All rights reserved 0893-3952/17 \$32.00

1411

PD-L1 immunohistochemistry in clinical diagnostics of lung cancer: inter-pathologist variability is higher than assay variability

Hans Brunnström^{1,2,5}, Anna Johansson^{1,2,5}, Sofia Westbom-Fremer¹, Max Backman³, Dijana Djureinovic³, Annika Patthey⁴, Martin Isaksson-Mettävainio⁴, Miklos Gulyas³ and Patrick Micke³

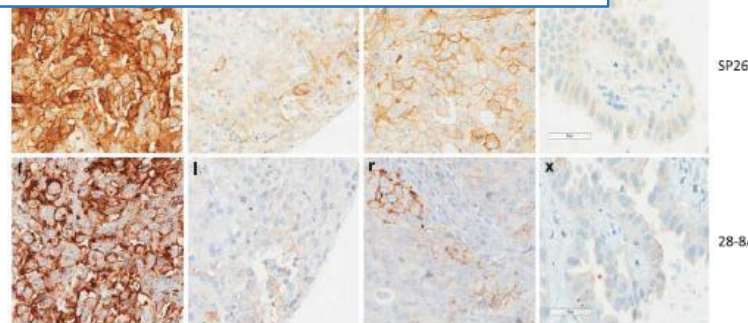
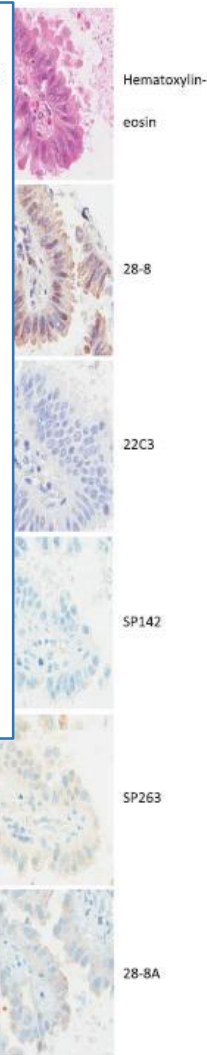
¹Department of Pathology, Regional Laboratories Region Skåne, Lund, Sweden; ²Department of Clinical Sciences Lund, Division of Oncology and Pathology, Lund University, Lund, Sweden; ³Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Sweden and ⁴Department of Pathology, Umeå University Hospital, Umeå, Sweden

Jednotlivé protilátky: kappa 0.45–0.91

- nejvyšší 22C3 a 28-8;
- nejnižší SP142

Interpersonální shoda: kappa 0.71–0.96

- 20% neshodných při cut-off $\geq 1\%$
- 0-5% neshodných při cut-off $\geq 50\%$



Protilátky, platformy, hodnocení...

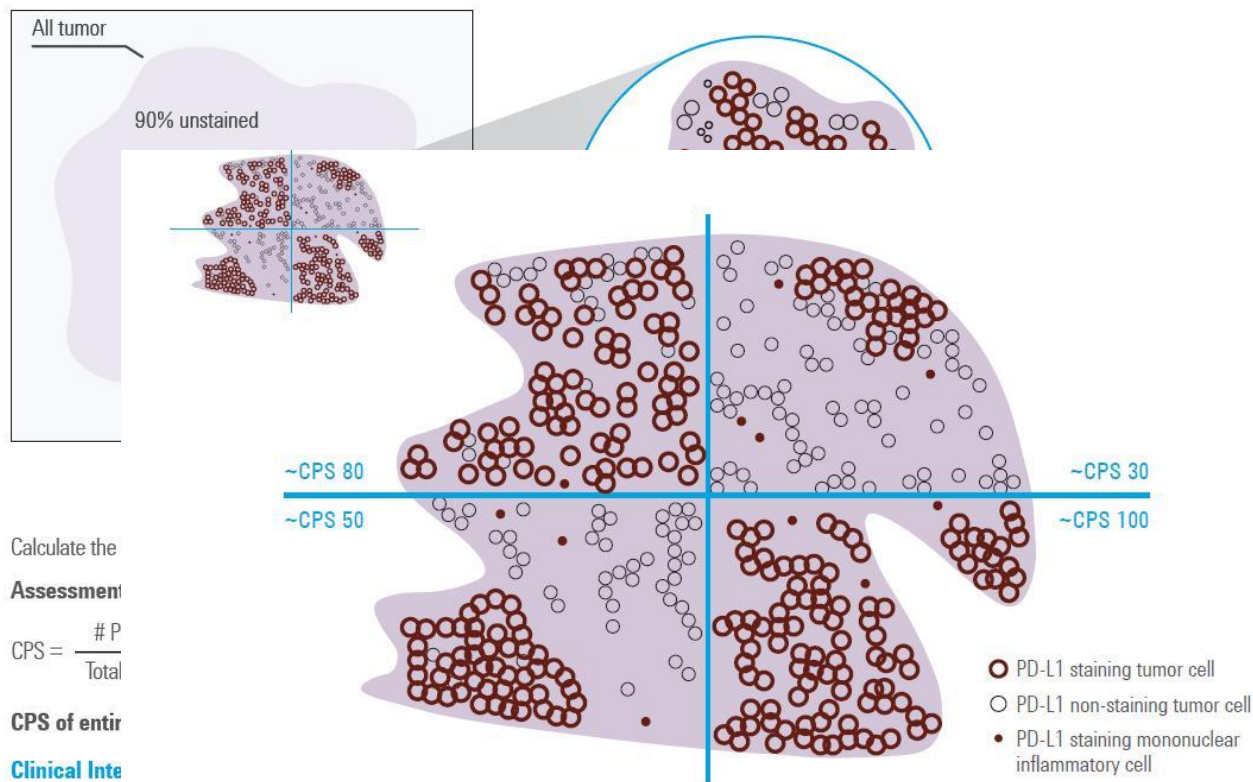
TPS

tumor proportion score

CPS

combined proportion score

IC/TC



Calculate the

Assessment

$$\text{CPS} = \frac{\# P}{\text{Total}}$$

CPS of entire

Clinical Inte

Calculate the Combined Positive Score of the entire tumor area:

Assessment: Combined Positive Score:

$$(80 + 30 + 50 + 100) / 4 = \sim\text{CPS } 65$$

Clinical Interpretation: PD-L1 expression

$$\text{CPS} = \frac{\# \text{ PD-L1 staining cells (tumor cells, lymphocytes, macrophages)}}{\text{Total \# viable tumor cells}} \times 100$$

Expres PD-L1 u NSCLC

Table 1. Clinical trials with PD-L1 protein expression as a biomarker by immunohistochemistry (IHC)

Reference	Drug	Phase	Tumor Type	Sample Size with PD-L1 Data	Antibody (IHC platform)	Cell Location	Cutoff	Prevalence %	Objective Response Rate (ORR)		Clinical Trial ID
									PD-L1 (+)	PD-L1 (-)	
Brahmer et al. ²	Nivolumab	III	Stage IIIB or IV squamous NSCLC	225 (total) 117 (nivolumab arm)	28-8 (Dako automated Link48)	TC membrane	≥ 1% ≥ 5% ≥ 10%	53% 36% 31%	17% 21% 19%	17% 15% 16%	NCT01642004 CheckMate017
Borghaei et al. ³	Nivolumab	III	Stage IIB or IV nonsquamous NSCLC	231	28-8 (Dako)	TC membrane	≥ 1% ≥ 5% ≥ 10%	54% 40% 36%	31% 36% 37%	9% 10% 11%	NCT01673867, Checkmate 057
Rizvi et al. ²⁰	Nivolumab	II	Stage IIIB or IV squamous-cell NSCLC	117 (treated);76 with PD-L1 data	28-8 (Dako)	TC membrane	≥ 1% ≥ 5% ≥ 10%	59% 33% 33%	20% ^a 24% ^a 24% ^a	13% ^a 14% ^a 14% ^a	NCT01721759 CheckMate063
Gettinger et al. ²¹	Nivolumab	I	Pretreated advanced NSCLC	68	28-8 (Dako)	TC membrane	≥ 5%	49%	15%	14%	NR
Gettinger et al. ²²	Nivolumab	I	Chemotherapy naïve advanced NSCLC	47	NR	TC	≥ 5%	55%	31%	10%	NCT01454102, Checkmate 012
Rizvi et al. ²³	Nivolumab	I	Chemotherapy naïve advanced NSCLC	17	28-8 (Dako)	TC	≥ 5%	59%	50%	0%	NR
Antonia et al. ²⁴	Nivolumab + Ipilimumab	I	Chemotherapy naïve advanced NSCLC	38	28-8 (Dako)	TC	≥ 5%	42%	19%	14%	NR
Ramalingam et al. ²⁵	Nivolumab	II, single-arm study	Advanced refractory squamous NSCLC	76	NR	NR	≥ 5%	33%	20%	10%	NR
Garon et al. ⁴	Pembrolizumab	I	Advanced NSCLC	824 screened; 325 treated	22C3 (Dako)	TC membrane	≥ 50% ≥ 1% ≥ 1%	23% 61% 66%	41% 26% NR	13% 10% NR	NCT01295827 KEYNOTE-001
Herbst et al. ²⁶	Pembrolizumab	II/III	Previously treated NSCLC	2222 screened; 1034 assigned to therapy; 980 treated with pembrolizumab	22C3 (Dako)	TC	≥ 1% 1%-49% ≥ 50%	66% 38% 28%	NR NR 30%	NR NR NR	NCT01905657; KEYNOTE-010
Herbst et al. ²⁷	Atezolizumab	I	Locally advanced or metastatic solid tumor	184	SP142 (Ventana)	TC IC	≥ 5% ≥ 5%	24% 26%	46%	18%	NCT01375842

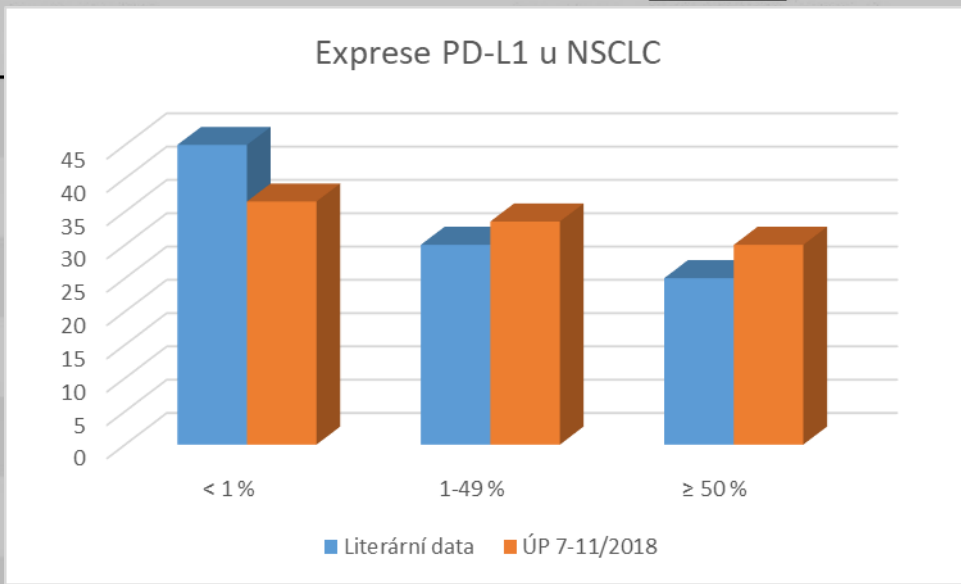
(continued)

Exprese PD-L1 u NSCLC

Table 1. Clinical trials with PD-L1 protein expression as a biomarker by immunohistochemistry (IHC)

Reference	Drug	Phase	Tumor Type	Sample Size with PD-L1 Data
Brahmer et al. ²	Nivolumab	III	Stage IIIB or IV squamous NSCLC	225 (total) 117 (nivolumab arm)
Borghaei et al. ³	Nivolumab	III	Stage IIB or IV nonsquamous NSCLC	231
Rizvi et al. ²⁰	Nivolumab	II	Stage IIIB or IV squamous-cell NSCLC	117 (treated); 76 with PD-L1 data
Gettinger et al. ²¹	Nivolumab	I	Pretreated advanced NSCLC	68

Objective Response Rate (ORR)



Testování PD-L1 ÚP 9-12/2018

Testováno: 75 pac.

Nehodnotitelné: 1 pac.

Cut-off	< 1 %	1-49 %	≥ 50 %
Literární data	45%	30%	25%
ÚP 7-11/2018	36,5%	33,5%	30%

et al. ²⁴	Ipilimumab	naïve advanced NSCLC	≥ 5%	33%	20%	10%	NR
ane			≥ 50%	23%	41%	13%	NCT01295827
			≥ 1%	61%	26%	10%	KEYNOTE-001
			≥ 1%	66%	18%	NR	NCT01905657;
			1%-49%	38%	NR	NR	KEYNOTE-010
			≥ 50%	28%	30%	NR	
			≥ 5%	24%			NCT01375842
			≥ 5%	26%	46%	18%	

(continued)

Výsledky NordiQC 2017-2018


Table 1. Assessment ma

CE-IVD / FDA approved PD-L1 assays	
22C3 pharmDX, SK006	1
22C3 pharmDX, SK006 ⁴	
28-8 pharmDX, SK005	
SP263, 790-4905	1
SP142, 740-4859	
Antibodies ³ for laboratory developed PD-L1 assays, conc. antibody	
mAb clone 22C3	1
mAb clone E1L3N	
mAb CAL10	
rmAb clone 28-8	
rmAb clone ZR3	
Antibodies for laboratory developed PD-L1 assays, RTU	
rmAb clone SP142	
Total	6
Proportion	

Table 2. I

Participa
Sufficient

CERTIFICATE OF PARTICIPATION
IN THE 2017 ESP EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT SCHEME
FOR PD-L1 TESTING IN NSCLC

The ESP Lung EQA scheme is coordinated by the Biomedical Quality Assurance Research Unit of KU Leuven, Leuven, Belgium
 The BQA Research Unit is an ISO 17043 accredited EQA provider

Laboratory of Molecular Pathology
 Department of Pathology
 General University Hospital in Prague, and First Faculty of Medicine, Charles University in Prague
 Prague, Czech republic

Analytical score PD-LI: 22/24 (12/12 samples tested)
 Score PD-LI IHC microscopic assessment (educational): 4/5

Reporting score PD-LI (educational): 4/4

Please consult the performance letter for information about your performance and read the general report for more details about scoring

Medical expert: Dr N.'t Hart	06/06/2018
Technical expert: Prof Dr P. Pauwels	06/06/2018
EQA coordinator: Prof Dr E. Dequeker	06/06/2018

Suff. ¹	Suff. OPS ²
90%	92%
-	-
93%	100%
75%	-
100%	100%
-	-
Suff. ¹	Suff. OPS ²
97%	100%
100%	100%
60%	100%
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
-	-
91%	-

formed
8

Prediktivní význam exprese PD-L1

Není binární biomarker (!)

Prediktivní význam ve 2. linii NSCLC diskutabilní

- i PD-L1 neg. pacienti mohou profitovat z léčby více než z chemoterapie
- pokud reagují, výrazně delší odpověď než chemoterapie

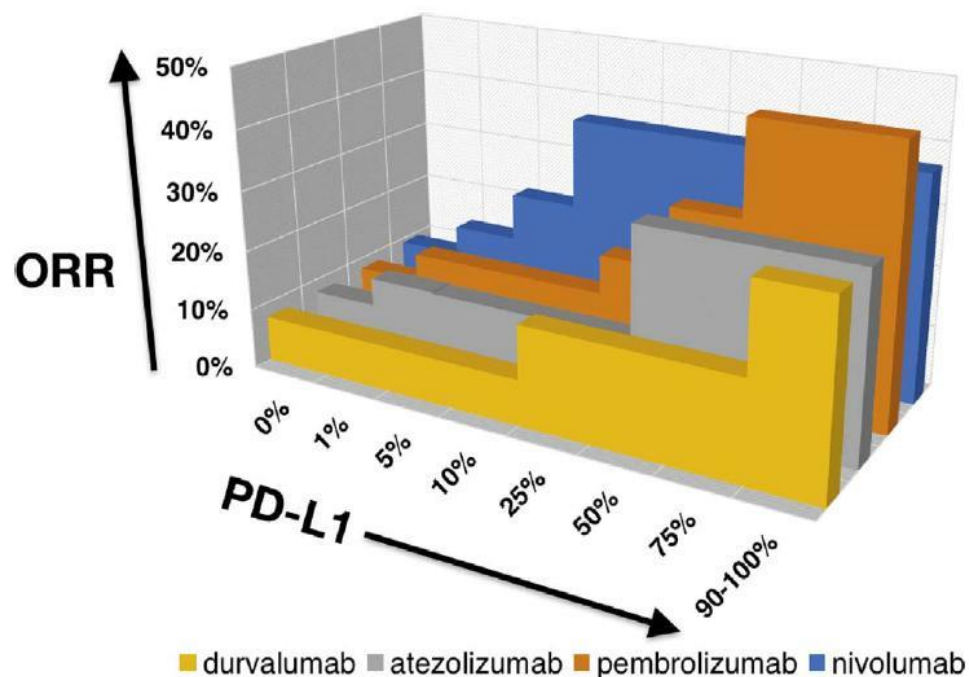
Množství faktorů ovlivňujících expresi PD-L1

PD-L1 negativita diskutabilní

- sampling
- heterogenita..

U části pacientů nelze stanovit (dle literárních údajů až 20 %)

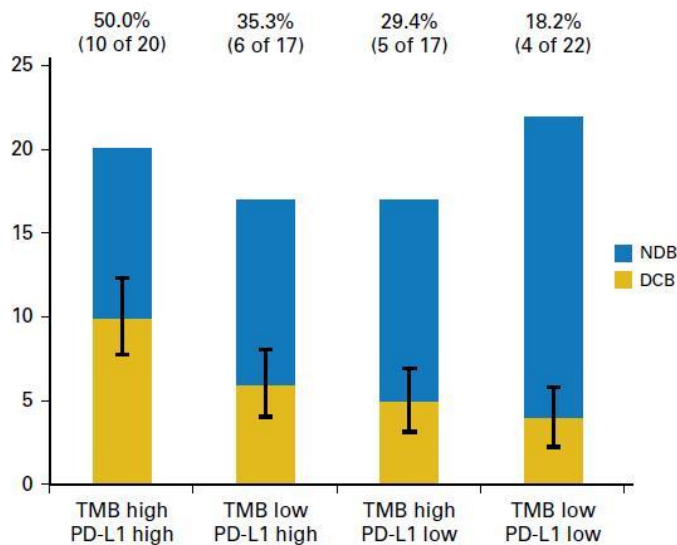
- cytologické vzorky (dosud nevalidováno)
- malé množství tkáně



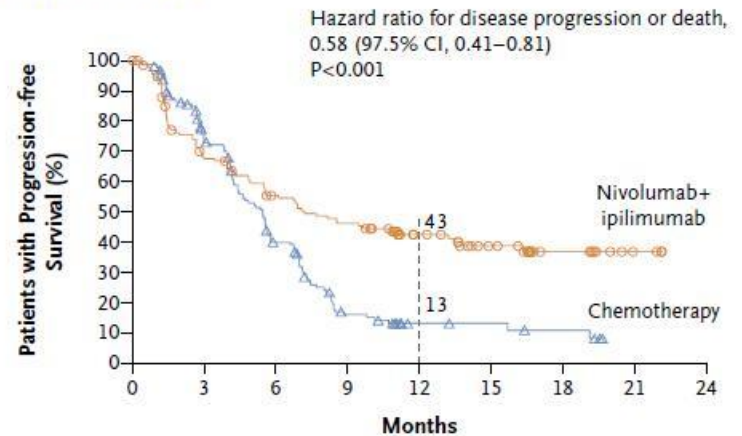
Mutační load (TMB)

Mutační load – TMB (tumor mutation burden)

- TMB jako prediktor
- - 3 studie 3 fáze (PFS)
- CheckMate 227
- CheckMate 026
- IMvigor 211



A Progression-free Survival



No. at Risk

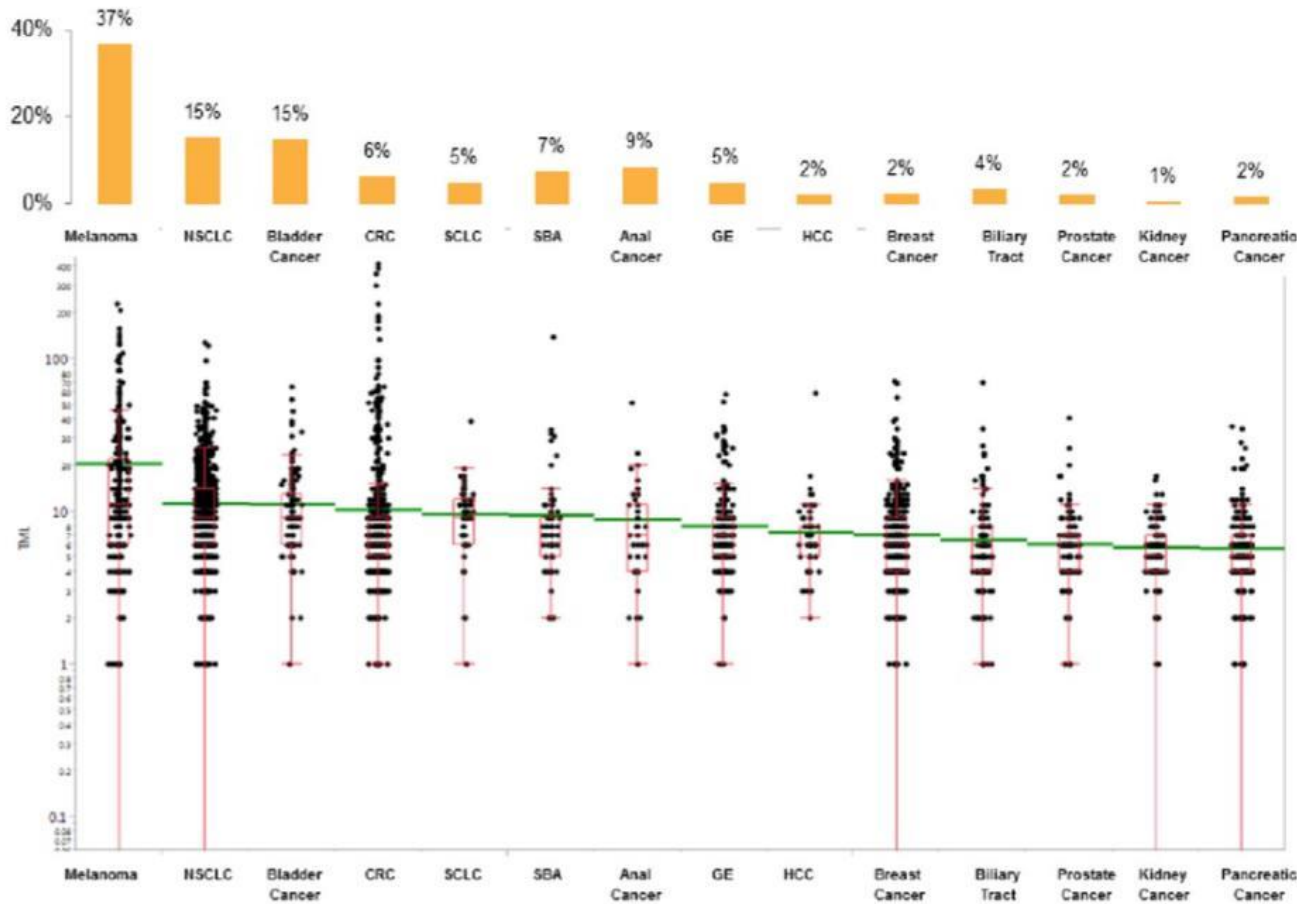
Nivolumab + ipilimumab	139	85	66	55	36	24	11	3	0
Chemotherapy	160	103	51	17	7	6	4	0	0

Hellmann MD et al. N Engl J Med 2018; 378:22

Powles T et al. Lancet 2017

Carbone DP et al. N Engl J Med 2017; 376:2415-2426

Mutační „load“



Percent of TML high in 14 cancer types

Mean & Median TML in 14 cancer types

Mutační load – TMB (tumor mutation burden)

- TMB jako prediktor
- - 3 studie 3 fáze (PFS?)

	TMB	Pacienti	Stanovitelný TMB	Stanovitelný TMB %
IMvigor 211	Foundation One	931	544	58
ChcekMate 026	WES	541	312	58
CheckMate 227	Foundation One	1649	1004	58

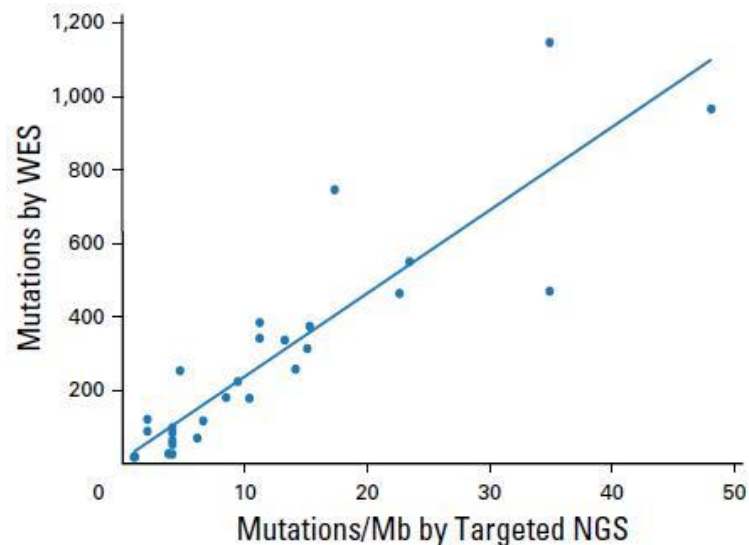
Hellmann MD et al. N Engl J Med 2018; 378:22

Powles T et al. Lancet 2017

Carbone DP et al. N Engl J Med 2017; 376:2415-2426

Mutační load – TMB (tumor mutation burden)

- Nejedná se o validovaný test
- Nejsou definovány postupy, platformy, testy...
- - preanalytická fáze
- - zvýšené požadavky na množství tkáně
- - platforma, velikost panelu (WGS?, WES?; > 1Mbp)
- - FoundationOne, Oncomine, MSK-IMPACT, WES..
- - bioinformatika (definování mutací, filtrování germinálních mutací, klonální vs. subklonální mutace, artefakty..)
- Momentálně neexistuje obecná možnost úhrady od ZP



MSK-IMPACT
49 vzorků WES
341 – 410 – 468 genů
0.98 – 1.06 – 1.22 Mbp

NGS – naše pracoviště

AKT1	CDK4	FGFR2	IDH1	MITF	PIK3R1
AKT3	CDKN2A	FH	IDH2	MLH1	PMS2
ARID1A	CTNNB1	FOXL2	JAK1	MLH3	POLE
ARID2	CYP19A1	GNA11	JAK2	MRE11A	POLQ
ATM	DDR2	GNAQ	KDR	MSH2	POT1
B2M	EGFR	GNAS	KIT	MSH6	PPM1D
BAP1	ELK1	GRB2	KRAS	mTOR	PPP6C
BARD1	ERBB2	H3F3A	MAP2K1	MYC	PTEN
BRAF	ERBB3	H3F3B	MAP2K2	NBN	RB1
BRCA1	ERBB4	H3F3C	MAP2K4	NF1	SF3B1
BRCA2	ERCC3	HDAC2	MAPK1	NOTCH1	SMAD4
BRIP1	ESR1	HIST1H3B	MAPK3	NRAS	SMARCA4
CCND2	ESR2	HNF1A	MDM2	PALB2	SMARCB1
CCND3	FAM175A	HNF1B	MDM4	PDGFRA	TP53
CDH1	FBXW7	HRAS	MET	PIK3CA	

AKT1	BRCA2	ESR1	MAP2K1	POLE
ARID1A	DDR2	FOXL2	MET	PTEN
BRAF	EGFR	HRAS	NRAS	SMAD4
BRCA1	ERBB2	KRAS	PIK3CA	TP53

- Používané knihovny („in-house“):
- „Výzkumná“ knihovna 1
- - 89 genů (**hotspoty**)
- - 257 kbp
- - 12 vzorků v běhu (MiSeq)
- - pokrytí ~300x
- „Diagnostická“ knihovna
- - 20 genů (**hotspoty**)
- - 56 kbp
- - 12-16 vzorků v běhu (MiSeq)
- - pokrytí 500-1000x

NGS – naše pracoviště

ABL1	EMSY	EML4	FGFR2	CHEK1	MAP3K1	NPM1	RAD50	SUFU
ABL2	CCDC6	EPHA3	FGFR3	CHEK2	MAPK1	NRAS	RAD51	SYK
AKT1	CCND1	EPHA5	FGFR4	IDH1	MAPK3	NTRK1	RAF1	TAF1
AKT2	CCND2	EPHA7	FH	IDH2	MCL1	NTRK2	RARA	TBX3
AKT3	CCND3	EPHB1	FOXL2	IGF1R	MDM2	NTRK3	RB1	TERT p.
ALK	CCNE1	ERBB2	FOXP1	IGF2	MDM4	PAK3	RET	TET2
APC	PDL1	ERBB3	GATA1	IKZF1	MED12	PALB2	RICTOR	TGFBR2
AR	CD79A	ERBB4	GATA2	IRF2	MEN1	PAX5	RIT1	TOP1
ARAF	CD79B	ERCC3	GATA3	IRF4	MET	PDGFRA	ROS1	TOP2A
ARID1A	CDH1	ERG	GATA4	IRS2	MITF	PDGFRB	RUNX1	TP53
ARID1B	CDK12	ESR1	GATA6	JAK1	MLH1	PDK1	RUNX1T1	TPM3
ARID2	CDK4	ESR2	GNA11	JAK2	MLH3	PIK3C2B	SDHA	TSC1
ATM	CDK6	EZH2	GNA13	JAK3	MPL	PIK3CA	SDHB	TSC2
ATR	CDK8	FAM175A	GNAQ	JUN	MRE11A	PIK3CB	SDHC	U2AF1
ATRX	CDKN1A	FAM46C	GNAS	KAT6A	MSH2	PIK3CG	SDHD	UGT1A1
AURKA	CDKN1B	FANCA	GRB2	KDM5A	MSH6	PIK3R1	SF3B1	VEGFA
AURKB	CDKN2A	FANCC	GRIN2A	KDM5C	mTOR	PIK3R2	SMAD2	VHL
B2M	CDKN2B	FANCD2	GRM3	KDM6A	MUTYH	PMS2	SMAD3	WISP3
BAP1	CDKN2C	FANCE	GSK3B	KDR	MYC	POLD1	SMAD4	WT1
BARD1	CLTC	FANCF	H3F3A	KEAP1	MYCL1	POLE	SMARCA4	XPO1
BCL2	CREBBP	FANCG	H3F3B	KIF5B	MYCN	POLQ	SMARCB1	ZBTB2
BCL2L1	CTNNA1	FANCL	H3F3C	KIT	NACC2	POT1	SMO	ZNF217
BCL2L2	CTNNB1	FBXW7	HDAC2	KMT2A	NBN	PPM1D	SOX10	ZNF703
BCL6	CYP19A1	FGF10	HGF	KMT2C	NCOA4	PPP2R1A	SOX2	
BLM	DAXX	FGF14	HIST1H3B	KMT2D	NF1	PPP6C	SOX9	
BRAF	DDR2	FGF19	HMGA2	KRAS	NF2	PRKAR1A	SPEN	
BRCA1	DICER1	FGF23	HNF1A	LYN	NFKBIA	PRKCI	SPTA1	
BRCA2	DNMT3A	FGF3	HNF1B	LZTR1	NKX2-1	PRKDC	SRC	
BRD4	DPYD	FGF4	HRAS	MAP2K1	NOTCH1	PTEN	STAT3	
BRIP1	EGFR	FGF6	CHD2	MAP2K2	NOTCH2	PTCH1	STAT4	
BTK	ELK1	FGFR1	CHD4	MAP2K4	NOTCH3	QKI	STK11	

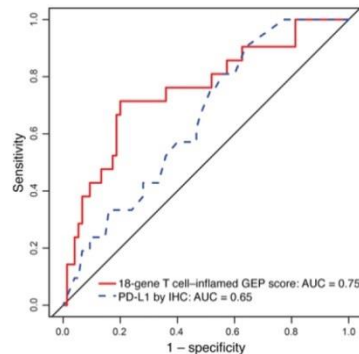
- Používané knihovny („in-house“):
- „Výzkumná“ knihovna 2
- - 271 genů
- - 1016 kbp
- - 12 vzorků v běhu (NextSeq)
- - pokrytí ~300x
- Mutační load (TMB)
- MSI
- Přestavby genů (z DNA)

Signatury imunitní odpovědi

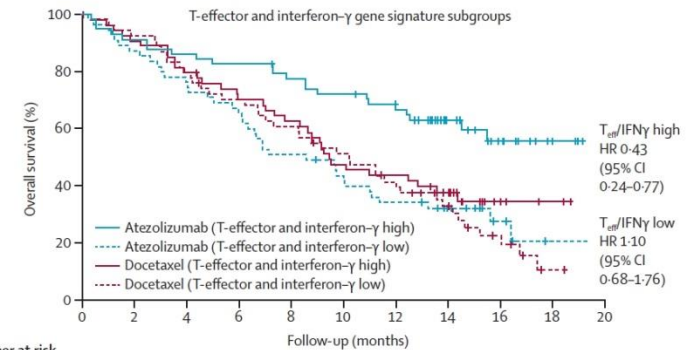
- analýza exprese genů (RNA) spojených se:
- signalizací IFN- γ
- Th8 lymfocyty (cytotoxická aktivita)
- exprese chemokinů
- získaná imunitní resistance
- prezentací antigenů (MHC I. a II.)

Table 2. IFN- γ and expanded immune gene signatures

IFN- γ	Expanded immune gene signature	
<i>IDO1</i>	<i>CD3D</i>	<i>IL2RG</i>
<i>CXCL10</i>	<i>IDO1</i>	<i>NGG7</i>
<i>CXCL9</i>	<i>CITTA</i>	<i>HLA-E</i>
<i>HLA-DRA</i>	<i>CD3E</i>	<i>CXCR6</i>
<i>STAT1</i>	<i>CCL5</i>	<i>LAG3</i>
<i>IFNG</i>	<i>GZMK</i>	<i>TAGAP</i>
	<i>CD2</i>	<i>CXCL10</i>
	<i>HLA-DRA</i>	<i>STAT1</i>
	<i>CXCL13</i>	<i>GZMB</i>



B



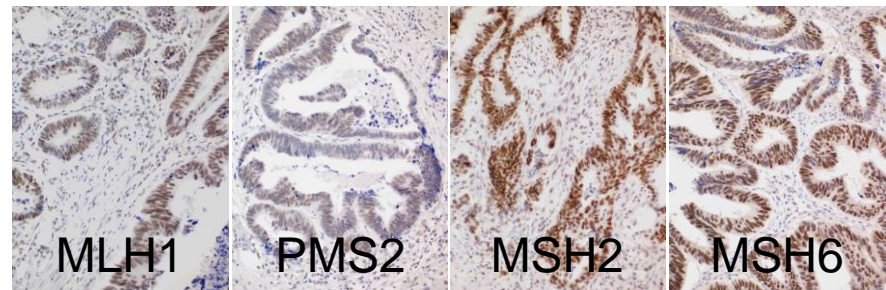
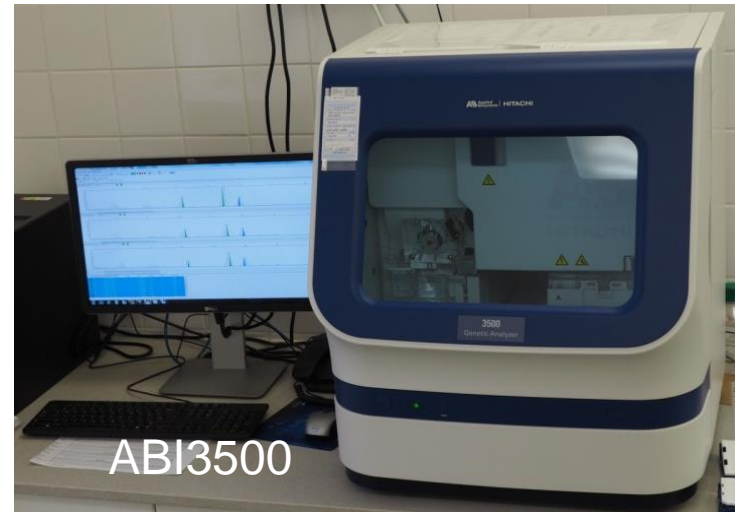
Number at risk	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Atezolizumab (T _{eff} /IFN γ high)	58	53	50	48	44	41	37	20	11	4	0
Atezolizumab (T _{eff} /IFN γ low)	55	48	42	37	28	23	18	12	5	1	0
Docetaxel (T _{eff} /IFN γ high)	54	49	43	37	33	25	22	16	4	2	0
Docetaxel (T _{eff} /IFN γ low)	57	50	43	37	32	26	21	14	7	1	0

data z POPLAR studie

- IFN- γ
- produkován aktivovanými NK a T-lymfocyty
- protinádorová odpověď
- zpětnovazebná inhibice tlumící imunitní odpověď
- upregulace PD-L1/PD-L2
- upregulace IDO1

Mikrosatelitová instabilita

- Nádory které jsou MSI vykazují zvýšenou pravděpodobnost vzniku neoantigenu
- Výskyt MSI u 20-77 % metastáz melanomů (2-30 % primárních melanomů)
- Výskyt u 12-15 % kolorektálních karcinomů
- testování:
 - - IHC (exprese MLH1, PMS2, MSH2, MSH6)
 - - PCR (5 mononukleotidů BAT-25, BAT-25, NR-21, NR-22, NR-24; sporné případy přidání 3 dinukleotidů D2S123, D5S346, D7S250)
 - - NGS (není cut-off)



Vysoký stupeň mikrosatelitové nestability	MSI-H (MSI-high)	při polymorfismu u 2 a více zkoumaných markerů
Nízký stupeň mikrosatelitové nestability	MSI-L (MSI-low)	polymorfismus u jednoho mikrosatelitového markeru
Stabilní mikrosatelity	MSS	všechny markery stabilní

Stávající a potenciální biomarkery imunoterapie

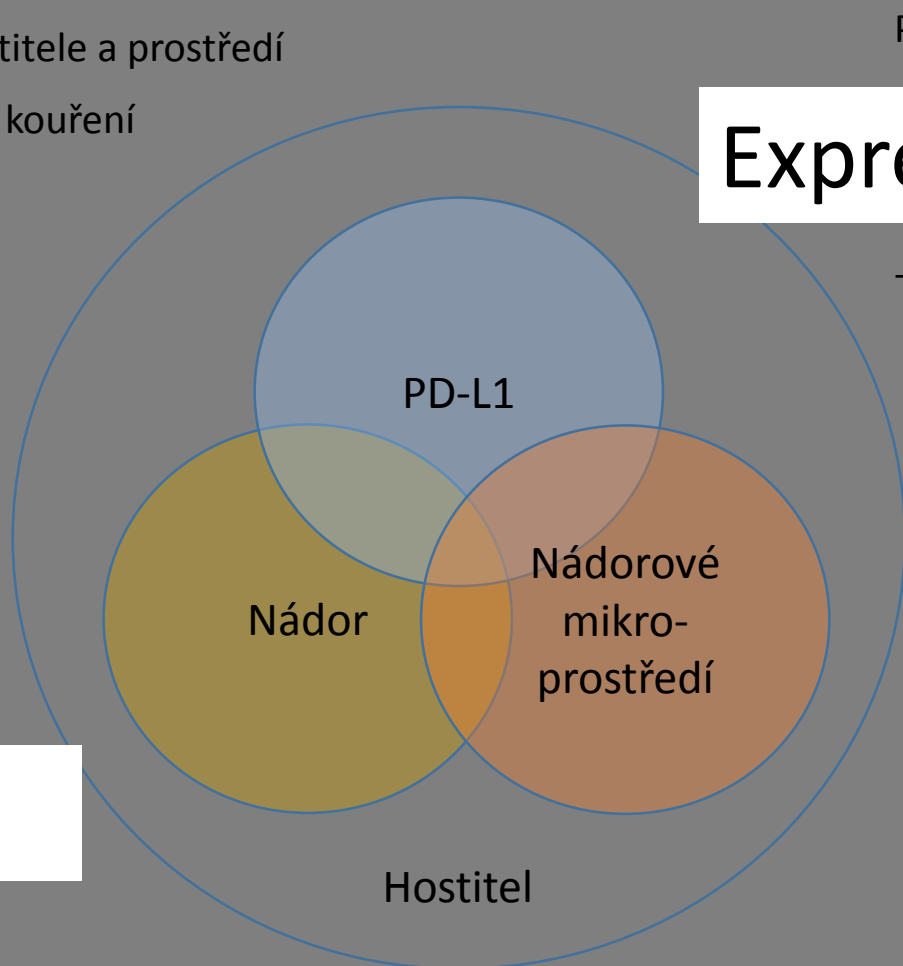
Charakteristiky hostitele a prostředí

- věk, pohlaví, PS, kouření
- mikrobiom
- genom (SNP...)

Nádorové antigeny

- mutační load
- neoantigeny
- MSI
- mutace
- další mutace

MSI



PD-L1

immunohistochemie

Exprese PD-L1

PCR (amplifikace)

- PD-L2

Nádorové mikroprostředí

- zánětlivé fenotypy
- kolinalita TCR
- TIL (CD8+)
- Signatury imunitní odpovědi

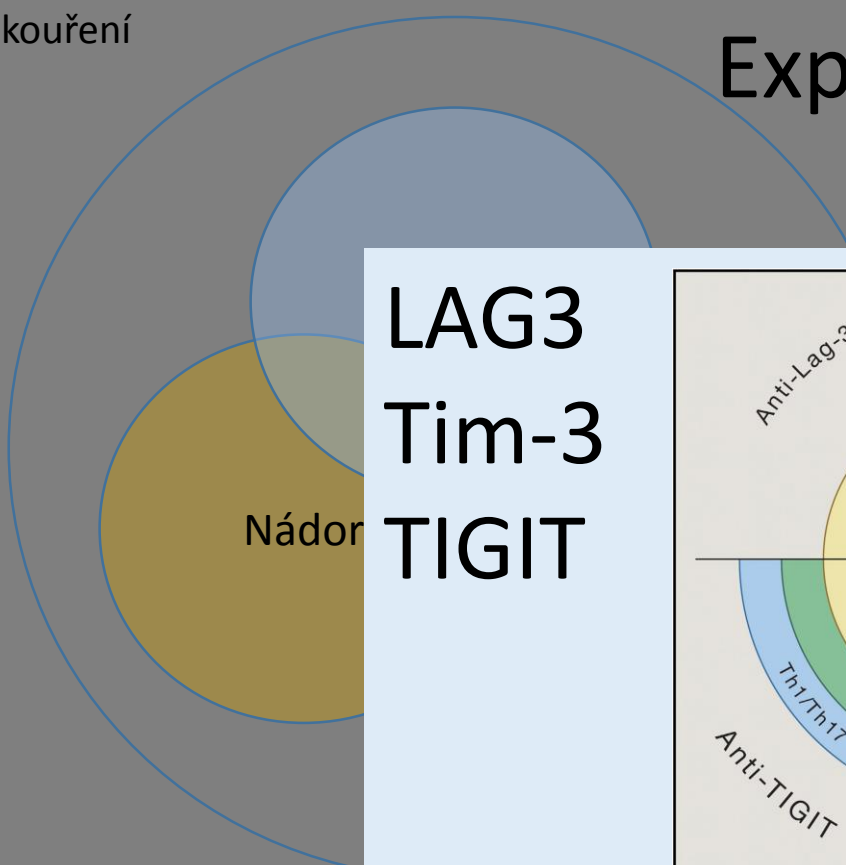
Stávající a potenciální biomarkery imunoterapie

Charakteristiky hostitele a prostředí

- věk, pohlaví, PS, kouření
- mikrobiom
- genom (SNP...)

Nádorové antigeny

- mutační load
- neoantigeny
- MSI **MSI**
- mutace p53
- další mutace

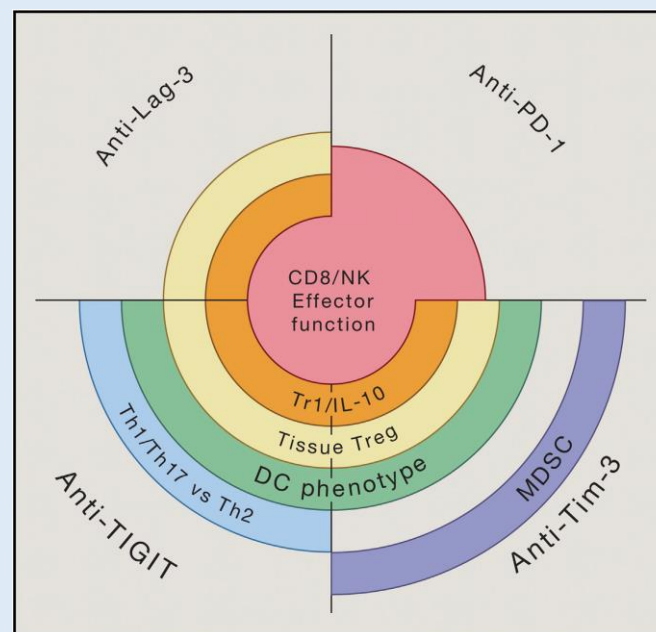


PD-L1

- imunohistochemie
- nádor/zánětlivé elementy
- FISH (amplifikace)
- PD-L2

Exprese PD-L1

LAG3
Tim-3
TIGIT



Anderson AC et al. Immunity 2016;44:989-1004