

# Možnosti prediktivního testování u nádorů neznámého primárního zdroje

**Pavel Dundr**

Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

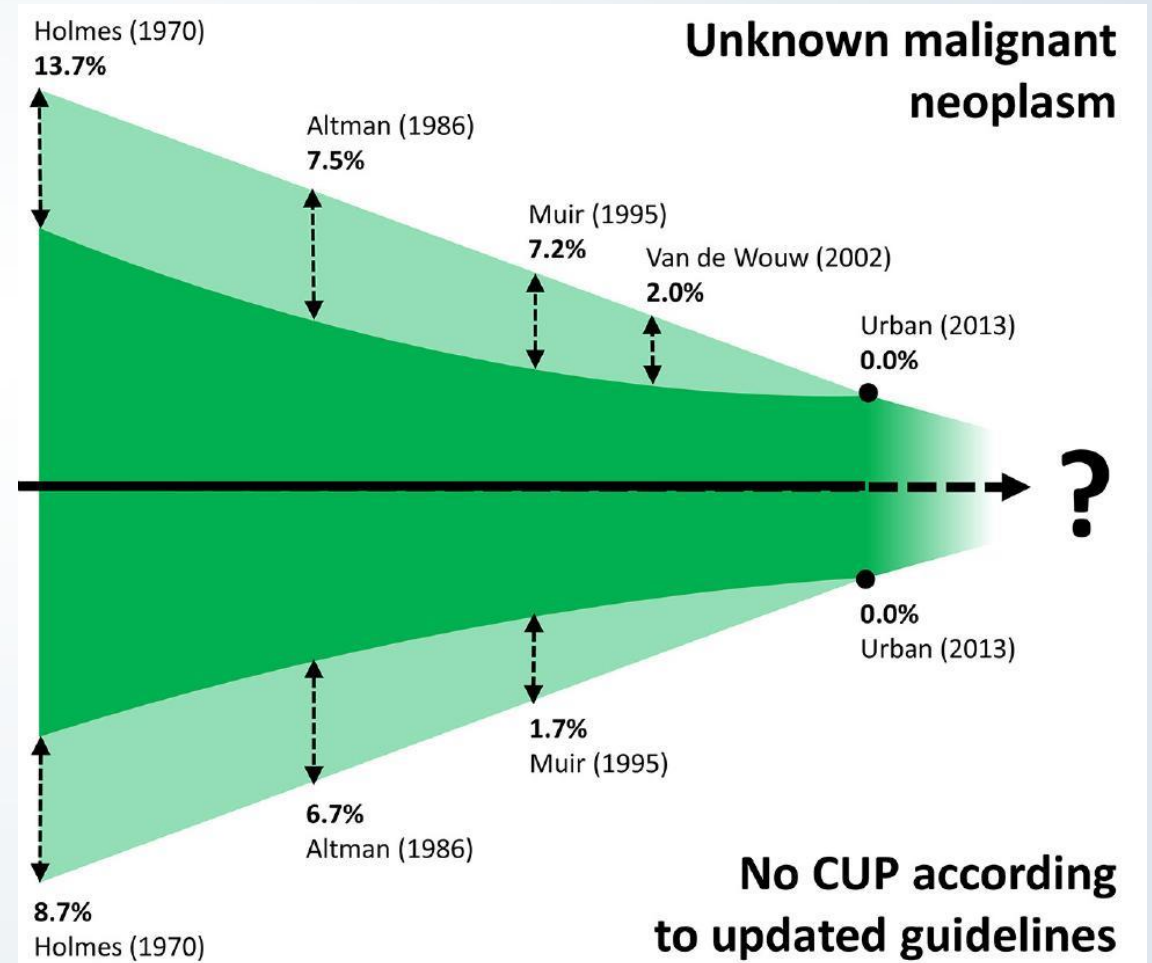


# Nádory neznámého primárního zdroje

- 2-3% pacientů s metastatickým nádorem
- nejčastěji postižení uzlin, jater, plic, kostní dřeně
- obvykle epitelové nádory
  - 50 % dobře-středně diferencované adenokarcinomy
  - 30 % málo diferencované-nediferencované adenokarcinomy
  - 15 % dlaždicobuněčné karcinomy
  - 5 % nediferencované nádory
- obvykle pacienti se špatnou prognózou, rychlé zhoršování příznaků

# Diagnostika

- současné guideline diagnostiky nádorů neznámého zdroje používají komplexní vyšetření na podkladě zobrazovacích metod, sérologických testů a bioptického (imunohistochemického) vyšetření
- molekulární klasifikace – diagnostický účel, obvykle testy genové exprese
- rozvoj IHC a změny v guideline:
  - sarkomy a melanom aktuálně nejsou nahlíženy jako NNPZ
  - srovnání v historických obdobích problematické



# Léčba (1) – „tkáňový původ“

- molekulární klasifikace „tkáňového původu“ na podkladě genových expresí
- stratifikace do skupiny s empirickou terapií vs. „tkáňově specifickou“ terapií na podkladě expresního profilování
- řada studií, 2 prospektivní, randomizované - klinický benefit žádný či minimální

2018 (Prospective, randomized)	Microarray assay	130	All patients had successful assays; 50 patients received site-specific therapy based on the assay and 51 received empiric therapy with carboplatin and paclitaxel	No survival difference between site-specific treatment versus empirical carboplatin/paclitaxel. Median OS and PFS were 9.8 and 5.1 months, respectively (site-specific treatment) versus 12.5 and 4.8 months (carboplatin/paclitaxel) ( $P = 0.9$ and $0.6$ , respectively)	[4] Clinical trial identification: UMIN000001919 <sup>ii</sup>
2019 (Prospective, randomized)	92-Gene RT-PCR assay	243	123 patients received site-specific therapy based on the assay and 120 received empiric therapy with cisplatin and gemcitabine.	No survival difference between site-specific treatment versus empirical cisplatin/gemcitabine. Median OS and PFS were 10.7 and 4.6 months, respectively (site-specific treatment) versus 9.99 and 5.3 months (cisplatin/gemcitabine) ( $P = 0.92$ and $0.95$ , respectively)	[28] Clinical trial identification: NCT01540058 <sup>iv</sup>

# Léčba (2) – targetabilní aberace

- nejednoznačné – nejsou prospektivní studie
- retrospektivní studie:
  - 85-91 % pacientů s NNPZ má  $\geq 1$  driver mutaci
- prospektivní studie II. fáze – CUPISCO (probíhá)
- chystané (NCT02721732) pembrolizumab, rameno NNPZ
- chystané (DART, NCT02834013) ipi/nivo
- DNA – mutace, amplifikace
- RNA – přestavby
- MSI
- exprese proteinů
  - PD-L1
  - HER2

# Léčba (3) – targetabilní aberace

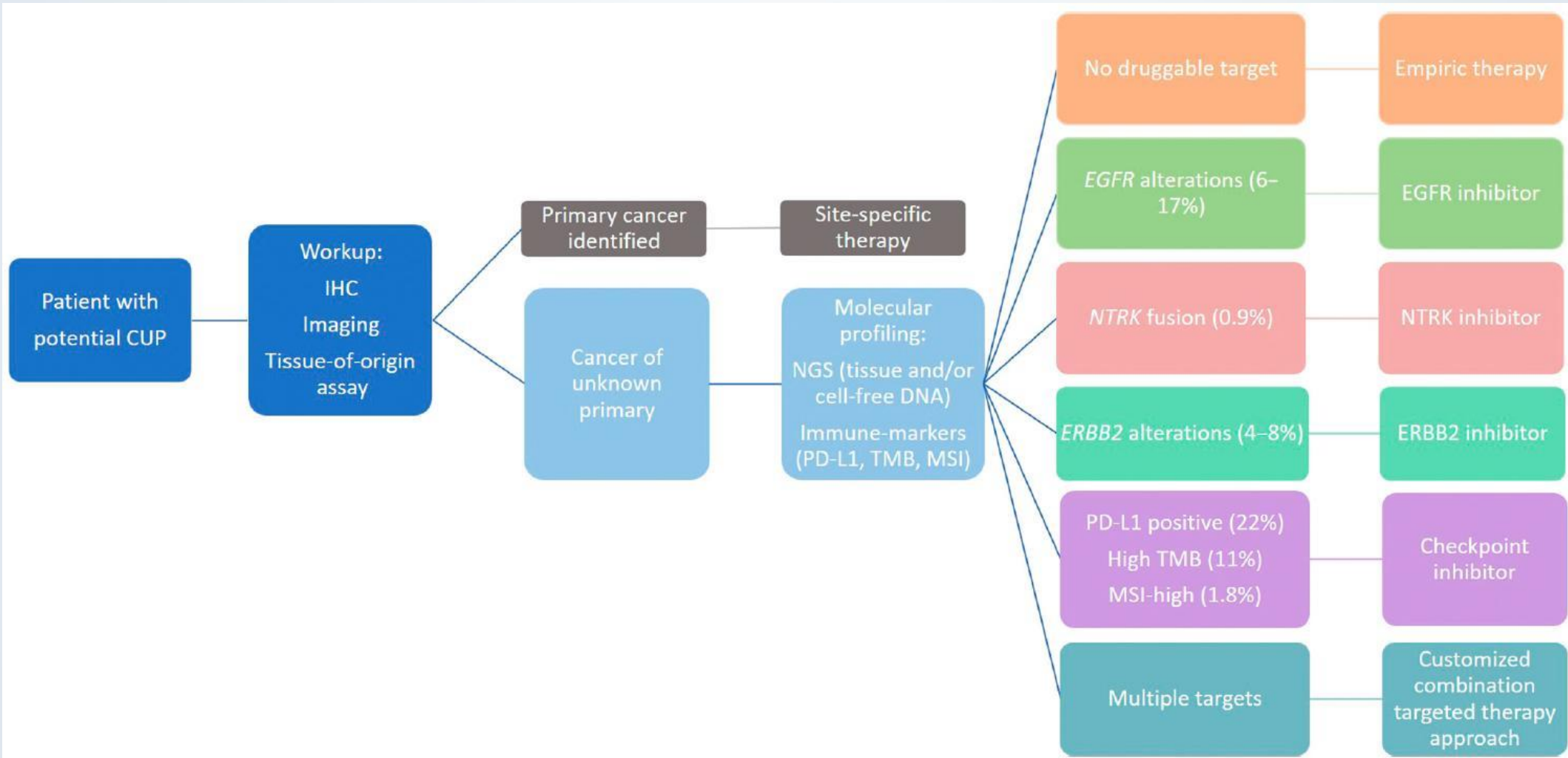
## Nejčastější aberace:

- TP53 (37-55 %)
- KRAS (18-20 %)
- PIK3CA (9-15 %)
- EGFR (6-17 %)
- BRAF 7,5 %
- HER 4-8 %
- vzácně fúze (ALK, ROS1, RET, FGFR, NTRK)
- 22 % vysoká exprese PD-L1
- 11.8 % > TMB
- 1.8 % MSI-H

## Metodika

- komplexní molekulární testování metodou NGS
- FISH (konfirmace amplifikací detekovaných NGS či overexpresí detekovaných IHC)
- PCR a další molekulární metody nevhodné (úzké spektrum markerů)
- IHC

# Navrhovaný algoritmus



# Molekulární testování



# Komplexní molekulární testování metodou NGS: situace v ČR

- **Možnosti prediktivního testování metodou NGS u NSCLC v rutinní praxi**
- **Schváleno** na úrovni odborných společností
- **Schváleno** na jednáních s plátcí
- Proběhlo nasmlouvání vybraným pracovištím
- kódy uveřejněny v seznamu výkonů VZP s platností od 1.3.2021
- [https://media.vzpstatic.cz/media/Default/dokumenty/ciselniky/vykony\\_01279.pdf](https://media.vzpstatic.cz/media/Default/dokumenty/ciselniky/vykony_01279.pdf)
- <https://www.vzp.cz/poskytovatele/ciselniky/zdravotni-vykony>
- Vyšetření (v současné době) **NENAHRAZUJE** stávající algoritmy prediktivního testování
- nejedná se (v současné době) o vyšetření určené pro plošné vyšetřování všech nádorů
- neznamená automatickou možnost testování každého jednotlivého markeru v přímé vazbě na konkrétní lék
- jedná se o **komplexní** vyšetření somatických aberací **na úrovni DNA a RNA**
- indikace definovány v Krycím listu příslušných kódů

# Somatický NGS panel (neznámý zdroj, další solidní nádory)

Mutace			Fúze
EGFR	MTOR	BRCA1	ALK
KRAS	NF1	BRCA2	ROS1
BRAF	ATM	ARID1A	NTRK1
MET	HER2	ARID1B	NTRK2
RET	PIK3CA	ATR	NTRK3
PTEN	STK11	CHK1	RET
ARAF	KEAP1	PALB2	MET
MAP2K1	DDR2	PIK3R1	FGFR1
ALK	NTRK1	IDH1	FGFR2
CDK12	NTRK2	IDH2	FGFR3
CDKN2A	NTRK3		NRG1
FGFR1	NRAS		NUTM1
FGFR2	TP53		
FGFR3	RB1		
ESR1	FAT1		
AKT1			

- Mutace (DNA) – 41 genů
- Fúze (RNA) – 12 genů

## Algoritmus / indikace

1. Výkon bude prováděn výhradně na základě indikce multidisciplinárního indikačního semináře KOC (rozhodnutí o dalším terapeutickém postupu v individuálním případě).
  - s vyčerpanými standardními možnostmi léčby
  - u kterých dle klinické úvahy výsledky testování mohou být relevantní i v průběhu léčby
2. U pacientů bude souběžně provedeno testování DNA i RNA panelem.

# Způsob vyhodnocení somatického NGS

## Klasifikace molekulárních nálezů

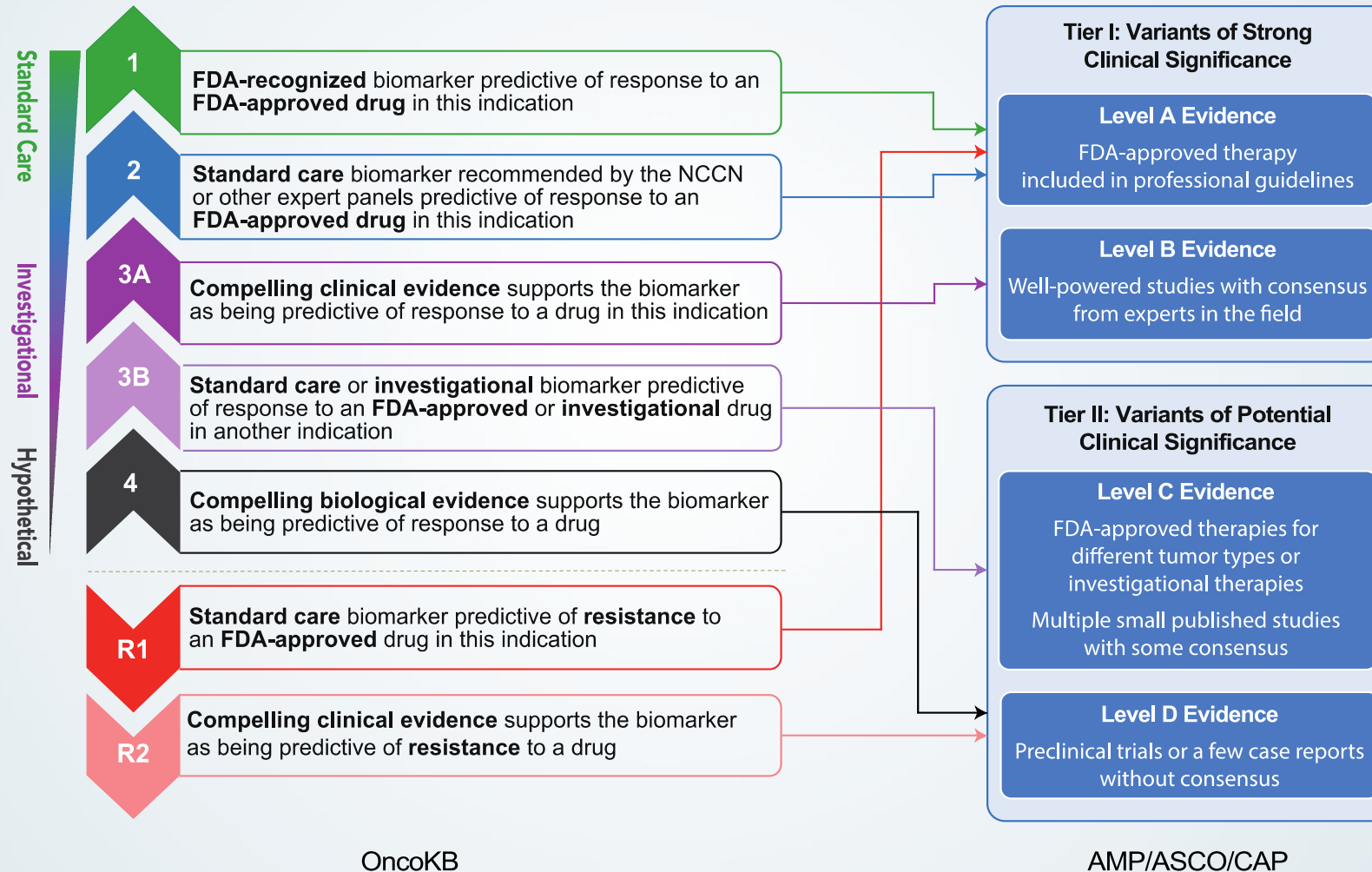
- JCR
  - Joint consensus recommendation – Association for Molecular Pathology / American College of Medical / Genetics / ASCO / CAP)
- ESCAT
  - ESMO scale for clinical actionability of molecular targets
- OncoKB
  - Memorial Sloan Kettering Cancer Center

# ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT)

<b>Třída I</b>	dostupná léčba na základě klinických studií	
IA	prospektivní, randomizované, survival endpoint	ERBB2 amplifikace, germinální BRCA1/2, PIK3CA
IB	prospektivní, jednoramenné, specifický nádorový typ, klinický benefit (ESMO MCBS1.1)	
IC	prospektivní, vícečetné histologické typy, klinický benefit (ESMO MCBS1.1)	NTRK, MSI
<b>Třída II</b>	dostupná léčba, avšak nejsou prospektivní data o klinickém benefitu	
IIA	retrospektivní analýzy prospektivních studií	PTEN (ztráta), ESR1 (mutace)
IIB	prospektivní studie, prokázaná odpověď (OR), bez jednoznačných dat na outcome	AKT1 mutace, ERBB2 mutace
<b>Třída III</b>	dostupná léčba pro stejnou aberaci u jiného typu nádoru či aberace genu z třídy I	
IIIA	jiný typ nádoru	somatické BRCA1/2 mutace, MDM2 amplifikace
IIIB	aberrace genu ve třídě I	ERBB2 mutace, ERBB3 mutace
<b>Třída IV</b>	preklinická data	
IVA	preklinická data in vivo a in vitro modely	ARID1A/B, ATR/ATM/PALB2, MT4, MYC, NF1, PIK3R1
IVB	preklinická data in silico analýzy	
<b>Třída X</b>	alterace u kterých klinická data svědčí pro neúčinnost léčby	CCND1 a FGFR1 amplifikace

- Klasifikace do 5 tříd
- Vyhodnocení klinického významu

# Mapping between the **OncoKB** and AMP/ASCO/CAP Levels of Evidence



# Report molekulárního vyšetření (naše pracoviště)

## Molekulárně biologické vyšetření (NGS):

Genomová DNA a celková RNA byla izolována z celých řezů parafinového bločku č. xxxxx/21 (70 % nádorových buněk).

Výsledek vyšetření mutačního stavu vybraných genů pomocí metody NGS v rozsahu akreditace dle SOP-PAT-23. Vyšetření s uplatněním flexibility jsou uvedena v příloze č. 2 SM-PAT-02 Laboratorní příručka.

Podstatou metody je masivní paralelní sekvenování nabohacených vybraných oblastí genomu na úrovni DNA a RNA na platformě NextSeq (Illumina). Metodou lze detekovat somatické varianty zastoupené alespoň u 5 % buněčné populace ve vzorku, kdy pro zachování robustnosti detekce genových variant je vhodný vzorek obsahující >20 % nádorových buněk. Stanovení TMB a CNV je obvykle možné u vzorků s >40 % nádorových buněk. Vyšetření rozsáhlých přestaveb >40 bp a CNV je u parafinových vzorků limitováno a takové varianty nemusí být detekovány. Mutace hluboko v intronových a regulačních sekvencích nejsou zachyceny. Reportovány jsou pouze pravděpodobně patogenní či patogenní varianty (class 4-5), dle aktuálních kritérií v době vydání této zprávy.

Vzorek DNA byl analyzován pomocí sequence capture NGS. Metoda umožňuje vyšetření mikrosatelitové instability (MSI), tumor mutační nálože (TMB), změny počtu kopií (CNV) a somatických variant vybraných oblastí (300 genů). Mutační analýza byla provedena se zaměřením na geny: AKT1, ALK, ARAF, ARID1A, ARID1B, ATM, ATR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDK12, CDKN2A, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, CHEK1, IDH1, IDH2, KEAP1, KRAS, MAP2K1, MET, MTOR, NF1, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PALB2, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RB1, RET, STK11, TP53  
Průměrné pokrytí cílových oblastí v NGS runu 988x.

MSI: Hodnoceno 17 vybraných mikrosatelitových oblastí přítomných v NGS panelu.

TMB: TMB - High (>10 mut/mb dle databáze OncoKB) je prediktivní biomarker k imunoléčbě.

CNV: Identifikuje genové/chromozomální duplikace či delecce. Vzhledem k charakteru analýzy nelze rozlišit mezi amplifikací a duplikací.

Vzorek RNA byl analyzován pomocí sequence capture NGS. Spektrum transkripčních variant a fúzí zahrnuje 21 genů: ALK, BRAF, CCND1, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, KRAS, MDM2, MET, MYC, NRAS, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, RET, ROS1.

Potencionální cílená léčba asociována s nalezenými variantami je reportována na základě databáze OncoKB a to pouze v rozsahu level of evidence 1-3 (1 - FDA-recognized biomarker predictive of response to an FDA-approved drug in this indication; 2 - Standard care biomarker recommended by the NCCN or other expert panels predictive of response to an FDA-approved drug in this indication; 3A - Compelling clinical evidence supports the biomarker as being predictive of response to a drug in this indication, 3B - Standard care or investigational biomarker predictive of response to an FDA-approved or investigational drug in another indication)

## Výsledky:

### DNA capture NGS:

Ve vzorku BYLY nalezeny pravděpodobně patogenní či patogenní varianty (class 4-5) v genech: TP53: NM\_001126112.2:c.1024C>T, p.(Arg342Ter), frekvence mutované alely 63% (coverage 776x).

Dále NEBYLA nalezena žádná varianta class 4-5 ve vybraných genech: AKT1, ALK, ARAF, ARID1A, ARID1B, ATM, ATR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDK12, CDKN2A, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, CHEK1, IDH1, IDH2, KEAP1, MAP2K1, MET, MTOR, NF1, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PALB2, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, RB1, RET, STK1.

Nad rámec vybraných genů BYLY ve vyšetřovaném panelu identifikovány další varianty (class 4-5): KIF5B: NM\_004521.2:c.297\_298del, p.(His100fs), frekvence mutované alely 17 % (coverage 298x)

APC: NM\_001127510.2:c.2413C>T, p.(His100fs, frekvence mutované alely 12 % (coverage 530x) a druhá mutace c.4473dup, p.(Ala1492fs), frekvence mutované alely 9 % (coverage 410x).

DPYD: NM\_000110.3:c.1905+1G>A, p.? ; frekvence mutované alely 43 % (coverage 521x). Pozn.: U pacientů s germinální variantou c.1905+1G>A genu DPYD existuje zvýšené riziko závažné nebo fatální toxicity při léčbě 5-FU, analýza nádorové DNA však neumožňuje rozlišení mezi germinální a somatickou variantou a v tomto ohledu je tedy v případě klinické relevance nutná konzultace klinickým genetikem.

CHEK2: NM\_001005735.1:c.277del, p.(Trp93fs), frekvence mutované alely 54 % (coverage 700x). Dle databáze OncoKB jsou mutace genu CHEK2 asociovány s cílenou léčbou pomocí olaparibu u nádorů prostaty v rozsahu level of evidence 1, pro ostatní solidní nádory v rozsahu level of evidence 3B. Odlišení mezi somatickou a zárodečnou mutací není z našeho vyšetření možné. Detekovaná mutace v genu CHEK2 může být zárodečného původu a doporučujeme zvážit konzultaci pacientky klinickým genetikem.

CNV: CNV analýzu nelze u tohoto vzorku spolehlivě hodnotit.

TMB = 4 mut/mb

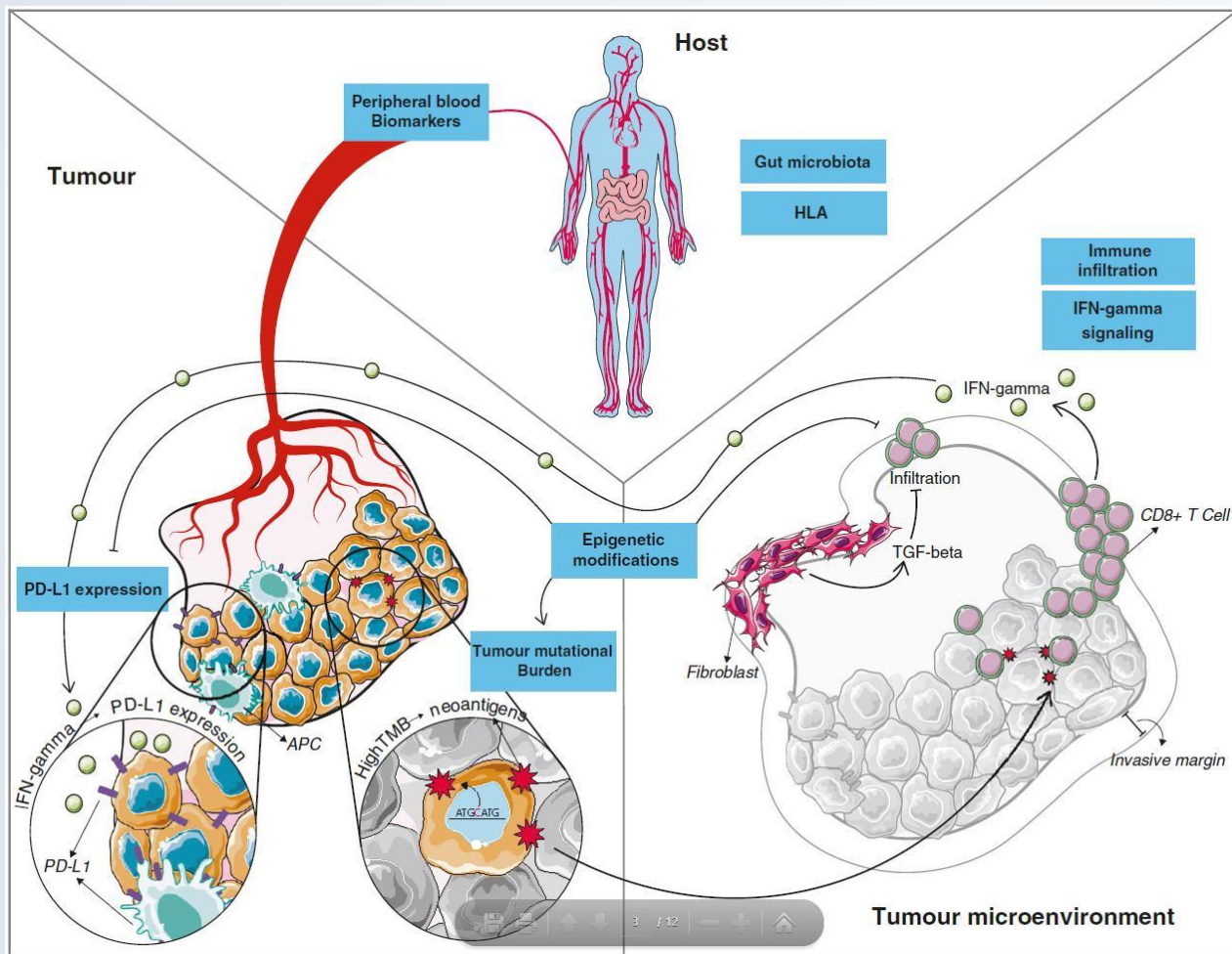
Analýza mikrosatelitové instability: mikrosatelitně stabilní (MS-S / MS-Stable)

### RNA NGS:

Ve vzorku NEBYLA detekována klinicky relevantní fúze vyšetřovaných genů (ALK, BRAF, EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET, ROS1).

# Predikování odpovědi na imunoterapii

# Predikování odpovědi na imunoterapii




- **Nádor**
  - PD-L1
  - TMB
  - MSI
  - epigenetické modifikace
- **Nádorové mikroprostředí**
  - imunitní infiltrace (TIL)
  - INF- $\gamma$  signalizační kaskáda
- **Hostitel**
  - mikrobiom
  - HLA
  - biomarkery periferní krve (LAG3+...)



# Testování PD-L1

## Aktuálně 3 různé způsoby hodnocení

- **TPS (tumor proportion score):** hodnotí se % pozitivních nádorových elementů
- **CPS (combined positive score):** způsob výpočtu je daný počtem všech pozitivních buněk (nádorových, lymfocytů, makrofágů) děleným počtem všech vitálních nádorových buněk (PD-L1 pozitivních i negativních) násobený 100. Maximální skóre je definováno jako 100, vyšší CPS se neuvádí.
- **IC (immune cells):** hodnotí se % plochy nádoru infiltrované PD-L1 pozitivními zánětlivými elementy



SPOLEČNÉ STANOVISKO VZP ČR, ČOS ČLS JEP A SČP  
ČLS JEP

PREDIKTIVNÍ TESTOVÁNÍ SOLIDNÍCH NÁDORŮ

ÚSTŘEDÍ VZP ČR  
5. 3. 2020

PREAMBULE

Zástupci Všeobecné zdravotní pojišťovny České republiky (dále jen „VZP ČR“), zástupci České onkologické společnosti ČLS JEP (dále také jen „ČOS“) a zástupci Společnosti českých patologů ČLS JEP (dále jen „SČP“) se shodují na potřebě stanovit doporučený postup a pravidla pro prediktivní testování solidních nádorů.

SPOLEČNÉ STANOVISKO

Za účelem potřeby upřesnění doporučeného postupu a pravidel pro prediktivní testování solidních nádorů vč. přehledu indikací a metod formulují VZP ČR, ČOS ČLS JEP a SČP SPOLEČNÉ STANOVISKO - DOPORUČENÝ POSTUP A PRAVIDLA PRO PREDIKTIVNÍ TESTOVÁNÍ. Společné stanovisko detailně specifikuje diagnostická kritéria pro testování pacientů s možným benefitem z cílené terapie nebo imunoterapie solidních nádorů.

**7. Testování PD-L1 NSCLC**  
Primární biopsie:  
Standardní IHC + kód morfometrie (kvantifikace % zastoupení pozitivních buněk (TPS skóre) v RI. u NSCLC v momentě stanovení dg – reflexně.  
Rebiopsie: na vyžádání onkologa  
od 1. 1. 2021 kód 99798 Expres PD-L1

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

# Doporučení pro testování PD-L1: metodika testování a reportování výsledků (verze\_1 (17. 5. 2021))

## 1) hodnocení TPS (protilátky 22C3, 28-8, SP263), NSCLC

- PD-L1 negativní: exprese PD-L1 zastižena v < 1 % nádorových buněk
- PD-L1 pozitivní: exprese PD-L1 zastižena ve  $\geq 1$  % NEBO  $\geq 50$  % nádorových buněk (v závorce uvést absolutní hodnotu TPS v %)

## 2) hodnocení IC, protilátka SP142

- PD-L1 negativní: imunitní skóre (IC) negativní: < uvést cut-off pro příslušnou diagnózu
- PD-L1 pozitivní: imunitní skóre (IC) pozitivní:  $\geq$  uvést cut-off pro příslušnou diagnózu (v závorce uvést absolutní hodnotu)
- aktuálně platné hranice positivity IC:
  - karcinom prsu:  $\geq 1$  %
  - uroteliální karcinom:  $\geq 5$  %

## 3) hodnocení CPS, protilátka 22C3

- PD-L1 negativní: kombinované pozitivní skóre (CPS) negativní: < uvést cut-off pro příslušnou diagnózu
- PD-L1 pozitivní: kombinované pozitivní skóre (CPS) pozitivní:  $\geq$  uvést cut-off pro příslušnou diagnózu (v závorce uvést absolutní hodnotu CPS)
- aktuálně platné hranice positivity CPS:
  - uroteliální karcinom:  $\geq 10$
  - karcinom žaludku a gastroesofageální junkce:  $\geq 1$
  - dlaždicobuněčný karcinom jícnu:  $\geq 10$
  - karcinom děložního hrdla:  $\geq 1$
  - dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku:  $\geq 1$

# Mikrosatelitová instabilita

- MSI-H/dMMR byl první prediktor imunoterapie schválený FDA bez ohledu na typ nádoru (pembrolizumab)
- analýza asi 9000 nádorů (23 typů)
  - častý výskyt pouze u minority nádorů
  - limitace pro praktické využití jako univerzálního prediktoru
  - POLE-ultramutované nádory častější (asi 5-10 %)
- asi 18% MSI-H/dMMR nádorů nemá vysoký TMB

**Table 1 | Tumour samples utilized to profile MSI**

Tumour type	Abbreviation	Samples	MSI-Hs (frequency)
Uterine corpus endometrial carcinoma	UCEC	265	75 (28.3%)
Stomach adenocarcinoma	STAD	292	64 (21.9%)
Colon adenocarcinoma	COAD	271	45 (16.6%)
Rectal adenocarcinoma	READ	76	3; 4* (9.2%)
Adrenal cortical carcinoma	ACC	92	5* (5.4%)
Oesophageal carcinoma	ESCA	183	3; 3* (3.3%)
Ovarian cancer	OV	436	14* (3.2%)
Liver hepatocellular carcinoma	LIHC	375	11* (2.9%)
Cervical squamous cell carcinoma	CESC	305	7* (2.3%)
Breast cancer	BRCA	922	16* (1.7%)
Glioblastoma multiforme	GBM	316	4* (1.3%)
Head and neck squamous cell carcinoma	HNSC	505	6* (1.2%)
Lung squamous cell carcinoma	LUSC	407	5* (1.2%)
Kidney renal clear cell carcinoma	KIRC	377	4* (1.1%)
Pancreatic cancer	PAC	171	2* (1.1%)
Urothelial bladder cancer	BLCA	368	2* (0.8%)
Papillary kidney carcinoma	KIRP	286	2* (0.7%)
Low grade glioma	LGG	514	3* (0.6%)
Prostate adenocarcinoma	PRAD	497	3* (0.6%)
Lung adenocarcinoma	LUAD	482	1* (0.2%)
Cutaneous melanoma	SKCM	109	0* (0%)
Pheochromocytoma and paraganglioma	PHCA	176	0* (0%)
Thyroid cancer	THCA	493	0* (0%)
Total		7,919	281

The Abbreviation column indicates the cancer type abbreviations used throughout the manuscript. The number of cases predicted as MSI-H at a confidence level of 0.75 is indicated with '\*' (see subsection 'Prediction of MSI status from exome-sequencing data').

# Tumor mutation burden

- nadále nedořešené problémy (včetně cut-offs, velikosti panelů, nádorové heterogenity, bioinformatické algoritmy atd.)
- 18.6.2020 – TMB-H schválen jako prediktor indikace léčby pembrolizumabem pro solidní nádory
- TMB-H ( $\geq 10$  mutací / megabázi)

FoundationOne®CDx Receives FDA Approval as the First Companion Diagnostic to Identify Advanced Cancer Patients with Solid Tumors that are Tumor Mutational Burden-High (TMB-H) and Appropriate for Immunotherapy Treatment with KEYTRUDA® (pembrolizumab)

June 18, 2020



FOUNDATION  
MEDICINE®



Foundation Medicine, Inc., has announced that the U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved FoundationOne®CDx as a companion diagnostic for KEYTRUDA® (pembrolizumab), Merck's anti-PD-1 therapy, which was also approved under accelerated approval for the treatment of adult and pediatric patients with unresectable or metastatic tumor mutational burden-high (TMB-H) [ $\geq 10$  mutations/megabase (mut/Mb)] solid tumors, as determined by an FDA-approved test, that have progressed following prior treatment and who have no satisfactory alternative treatment options. FoundationOne CDx is the first and only FDA-approved companion diagnostic to measure TMB and help identify patients who may be appropriate for treatment with KEYTRUDA, regardless of solid tumor type.

TMB is a measure of the number of somatic mutations per coding region within a tumor's genome.<sup>1</sup> This genomic signature can help determine a patient's likelihood to respond to immunotherapies. FoundationOne CDx, Foundation Medicine's comprehensive genomic profiling (CGP) assay approved for all solid tumors, enables oncologists to identify TMB-H patients ( $\geq 10$  mutations/megabase) with unresectable or metastatic solid tumors across all tumor types who could potentially benefit from KEYTRUDA.

<https://www.thejournalofprecisionmedicine.com/foundationonecdx-receives-fda-approval-as-the-first-companion-diagnostic-to-identify-advanced-cancer-patients-with-solid-tumors-that-are-tumor-mutational-burden-high-tmb-h-and-appropriate-for/>

# Frekvence somatických mutací

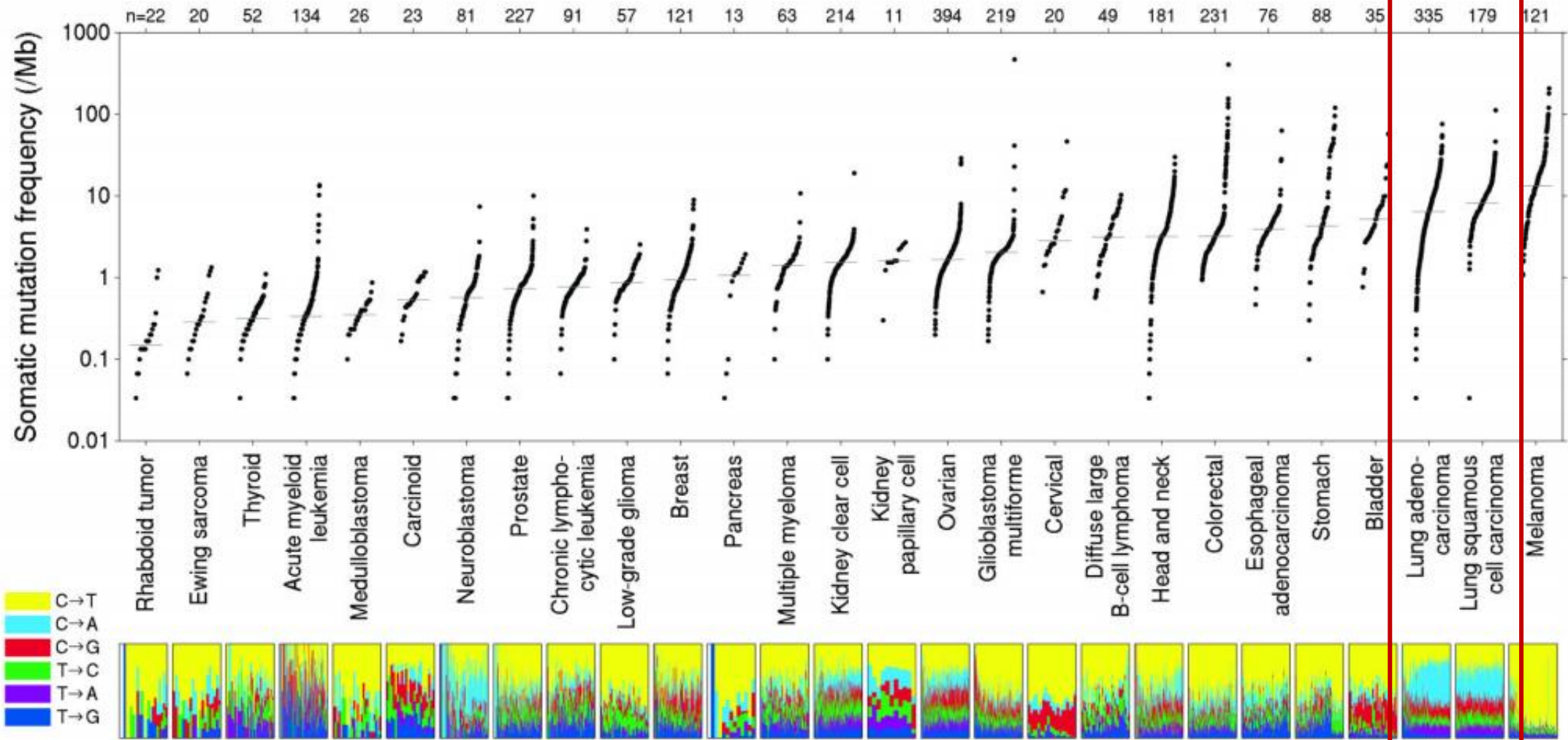


Table 1  
Evidence of TMB as a biomarker in clinical trial.

Tumour type	Testing drug	TMB method	TMB cutoff	Type of benefit	
NSCLC	Checkmate 026	Nivolumab	WES	>243 mut/exome	ORR, PFS
	Rozenblum et al, 2017	Nivolumab or pembrolizumab	FoundationOne	>9,6 mut/Mb	ORR
	KEYNOTE 001	Pembrolizumab	WES	>178 mut/exome	ORR, PFS
	POPLAR/OAK	Atezolizumab	Foundation bTMB	>10 mut/Mb	PFS, OS
	POPLAR/FIR/BIRCH	Atezolizumab	FoundationOne	1st line: >13,5 mut/Mb 2nd line: >17,1 mut/Mb	ORR, PFS, OS
	BFAST and BFIRST	Atezolizumab	Foundation bTMB	Unknown	ORR, PFS, OS
	MSKCC, Rizvi et al, 2018	Multiagent (alone or in combination)	WES	>8,5 mut/Mb	ORR, PFS
	Checkmate 227	Ipilimumab + nivolumab	FoundationOne	>10 mut/Mb	ORR, PFS
	Checkmate 568	Ipilimumab + nivolumab	FoundationOne	>10 mut/Mb	ORR, PFS
	Checkmate 012	Ipilimumab + nivolumab	WES	>158 mut/exome	ORR, PFS and clinical benefit
Melanoma	Checkmate 064	Nivolumab	WES	Unknown	ORR, OS
	Van Allen et al 2015	Ipilimumab	WES	197 mut/exome	Clinical benefit
	Snyder et al 2014	Ipilimumab	WES	>100 mut/exome	OS
	Johnson et al, 2016	Multiagent (alone or in combination)	FoundationOne	>23,1 mut/Mb	ORR, PFS, OS
	Hugo et al, 2016	Multiagent (alone or combination)	WES	>495 mut/exome	OS
Bladder	Checkmate 038	Nivolumab	WES	>100 mut/exome	OS
	Checkmate 275	Nivolumab	WES	>167 mut/exome	ORR, PFS, OS
	Invigor 210	Atezolizumab	FoundationOne	>16 mut/Mb	ORR, OS
	Invigor 211	Atezolizumab	FoundationOne	> median	OS
	Snyder et al, 2017	Atezolizumab	WES	> median	PFS
SCLC	Hellman et al, 2018	Nivolumab + ipilimumab	WES	>248 mut/exome	ORR, PFS, OS
CRC	KEYNOTE 012 - 028	Pembrolizumab	WES	Unknown	ORR, PFS
Multiple solid tumours	Goodman et al, 2017	Multiagent (alone or combination)	FoundationOne	>20 mut/Mb	ORR, PFS, OS
	Yarchoan et al, 2017	Multiagent (alone or combination)	Various	Various	ORR

# A very high tumor mutational load is associated with increased CD8+ and PD-1+ T-cell infiltration and improved clinical outcomes to PD-(L)1 blockade across different PD-L1 expression levels in non-small cell lung cancer

Biagio Ricciuti<sup>1</sup>, Kathryn C. Arbour<sup>2</sup>, Joao V. Alessi<sup>1</sup>, Navin R. Mahadevan<sup>3</sup>, James Lindsay<sup>4</sup>, Rileen Sinha<sup>5</sup>, Natalie I. Vokes<sup>1</sup>, Gonzalo Recondo<sup>1</sup>, Giuseppe Lamberti<sup>1</sup>, Hira Rizvi<sup>2</sup>, Giulia C. Leonardi<sup>1</sup>, Andrew J. Plodkowski<sup>6</sup>, Kristen Felt<sup>7</sup>, Michael Y. Tolstorukov<sup>5</sup>, Pasi A. Jänne<sup>1,8</sup>, Eliezer M. Van Allen<sup>9</sup>, Lynette M. Sholl<sup>3,10</sup>, Scott Rodig<sup>3,10</sup>, Matthew D. Hellmann<sup>2</sup>, Mark M. Awad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lowie Center for Thoracic Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <sup>2</sup>Department of Medicine, Well Cornell Medical College, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA; <sup>3</sup>Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA; <sup>4</sup>Knowledge Systems Group, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <sup>5</sup>Department of Informatics and Analytics, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA; <sup>6</sup>Department of Radiology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA; <sup>7</sup>ImmunoProfile, Brigham & Women's Hospital and Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <sup>8</sup>Better Center for Applied Cancer Science, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <sup>9</sup>Center for Cancer Precision Medicine, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <sup>10</sup>Center for Immuno-Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA

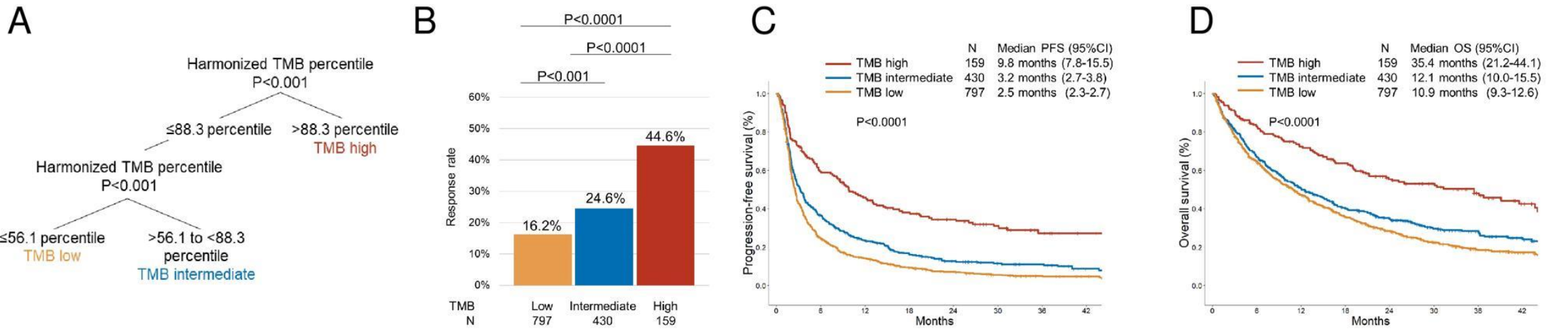
Introduction

Results

Unbiased recursive partitioning identified three optimal TMB groupings with respect to ORR, which correlate with progression-free and overall survival

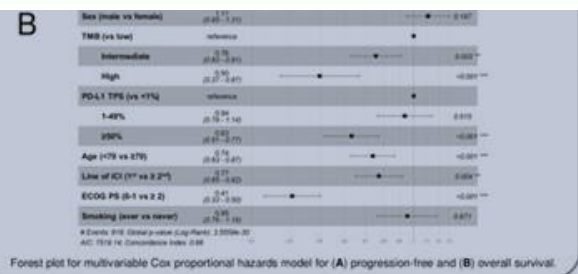
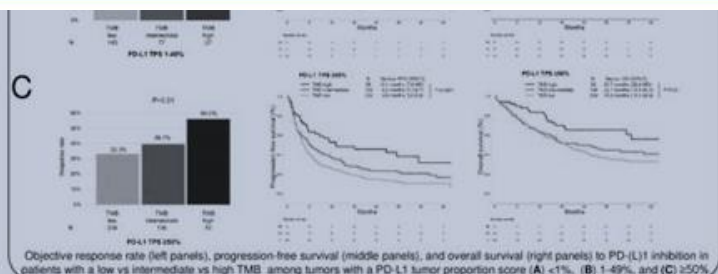
Association between increasing TMB levels and intratumoral, tumor-stroma interface, and total CD8+, PD1+, Foxp3+, and PD-L1+ cells

## Unbiased recursive partitioning identified three optimal TMB groupings with respect to ORR, which correlate with progression-free and overall survival



(A) Unbiased recursive partitioning for the objective response rate to immunotherapy identified three TMB groupings: TMB low ( $\leq 56$ th percentile), TMB intermediate (56-88th percentile), and TMB high ( $> 88$ th percentile). (B) Objective response rate, (C) progression-free survival, and (D) overall survival in patients with a low vs intermediate vs high TMB among 1386 NSCLCs treated with PD-(L)1 blockade at the DFCI and MSKCC.

Clinical Characteristics	Low	Intermediate	High
Age (years)	62 (20.5)	62 (20.5)	62 (20.5)
Sex			
Male	325 (46.5)	317 (47.2)	542 (48.3)
Female	389 (53.5)	333 (52.8)	574 (51.7)
Smoking status			
Current/Former	502 (69.7)	559 (84.7)	1174 (86.7)
Never	219 (30.3)	103 (15.3)	172 (13.3)
Adjuvant chemotherapy	579 (80.5)	546 (81.2)	1122 (81.5)
Recurrent and/or metastatic NSCLC	367 (51.0)	361 (54.6)	171 (12.0)
OS (months)	12.1	12.1	10.9
OS (95% CI)	10.0-15.5	10.0-15.5	9.3-12.6
PD-L1 TPS (n=14)	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)
1-49%	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)
50%	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)
Age (70 vs <70)	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)
Line of ICI (1 <sup>st</sup> vs >2 <sup>nd</sup> )	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)
ECOG PS (0-1 vs >2)	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)
Smoking (never vs never)	149 (20.8)	149 (20.8)	149 (20.8)



**Conclusion**  
 These findings suggest that increasing levels of non-synonymous mutations may promote immune cell infiltration and elicit inflammatory T-cell mediated response, resulting in increased sensitivity to PD-(L)1 blockade in NSCLC, particularly among tumors with elevated PD-L1 expression.

**References**

- Rick M, Rodriguez-Abeu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1872-1883.
- Agulnik EJ, Rizov B, Gerson JF, et al. Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression. *Ann Oncol*. 2019.
- Sarason RM, Lee CH, Shoushtarian AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*. 2019. doi:10.1038/s41588-019-0312-1
- Hellmann MD, Cuatrecasas TE, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N Engl J Med*. 2018;378(2):2093-2104. doi:10.1056/NEJMoa1801348

Introduction

Identifying biomarkers for immune checkpoint inhibition (ICI) response in non-small cell lung cancer (NSCLC) has been challenging. Although PD-L1 expression on tumor cells generally correlates with response to ICI in NSCLC [1-2], it does not fully predict benefit from these treatments. Tumor mutation burden (TMB) has also been explored as potential biomarker of immunotherapy efficacy in NSCLC [3-4]; however there still is a lack of agreement about what TMB levels identify patients with the greatest likelihood of responding to ICI, and TMB is not currently used as a biomarker for selecting which patients should receive ICI in NSCLC. Here we undertook an unbiased approach to determine which TMB categories are associated with ICI efficacy, and fitted a conditional inference tree with respect to objective response rate (ORR) in a large cohort of 1386 patients with NSCLC treated with ICI.

Methods

Patients at the Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) and Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) who consented to institutional review board-approved protocols were included. Event-time distributions were estimated using Kaplan-Meier methodology. Log-rank tests were used to test for differences in event-time distributions, and Cox proportional hazards models were fitted to obtain estimates of hazard ratios in univariate and multivariate models.

A conditional inference algorithm was used to investigate an optimal grouping of TMB levels with respect to response rate, using the partykit function in R. All P-values are 2-sided and confidence intervals are at the 95% level, with significance pre-defined to be at the 0.05-level.

RNA sequencing data from the LUAD TCGA cohort were deconvoluted to estimate cell subsets using the xCell package. Multiplexed immunofluorescence (ImmunoProfile) for PD-L1, PD-1, CD8, FOXP3 and CK7 was performed on 312 NSCLC samples at the DFCI to confirm the correlation between TMB and tumor-associated immune cells.

Results

Study population

Clinical Characteristics	MSKCC N = 714 (7%)	DFCI N = 672 (7%)	Combined N = 1386 (7%)
Age, median (range)	62 (20-85)	67 (20-85)	64 (20-85)
Sex			
Male	525 (46.5)	517 (47.2)	542 (46.3)
Female	389 (34.5)	155 (15.8)	544 (46.7)
Smoking status			
Current/former	802 (64.7)	559 (64.7)	1361 (64.7)
Never	138 (19.3)	113 (16.5)	251 (18.3)
Histology			
Adenocarcinoma	579 (68.7)	546 (69.2)	1125 (68.9)
Squamous cell carcinoma	105 (14.6)	96 (14.2)	201 (14.5)
NSCLC NOS	57 (7.6)	41 (6.0)	98 (7.0)
Organized driver mutation			
KRAS	245 (34.0)	224 (33.0)	469 (33.6)
EGFR	71 (9.9)	67 (9.9)	138 (9.9)
Other	48 (6.6)	47 (6.9)	95 (6.8)
None identified	338 (46.5)	323 (48.1)	661 (47.6)
ECOG performance status			
0-1	563 (78.6)	622 (92.6)	1185 (85.6)
2	144 (20.4)	35 (4.4)	179 (12.9)
Line of therapy			
1 <sup>st</sup>	244 (34.0)	276 (40.9)	520 (37.4)
2 <sup>nd</sup>	473 (66.0)	406 (60.0)	879 (62.6)
PD-L1 expression			
<1%	87 (12.0)	149 (21.8)	236 (17.0)
1-49%	171 (23.9)	102 (15.1)	273 (19.5)
≥50%	254 (35.6)	149 (21.9)	403 (28.9)
Not assessed	352	269	621

Unbias

A

Harmonize

≥56.1 percentile

TMB low

Increase

A

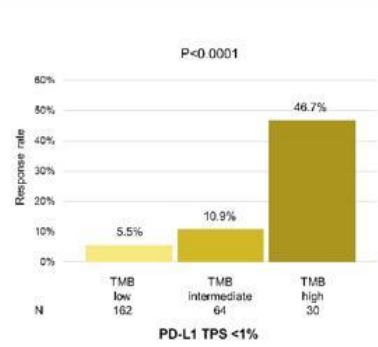
B

C

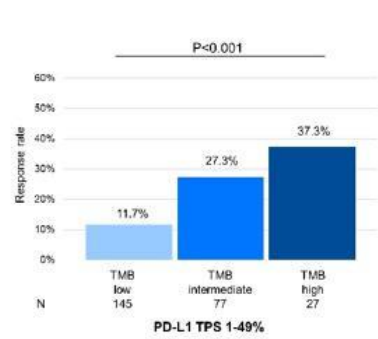
Objective response

# Increasing TMB levels are associated with improved PD-(L)1 blockade efficacy in NSCLCs with a PD-L1 TPS <1%, 1-49%, and ≥50%

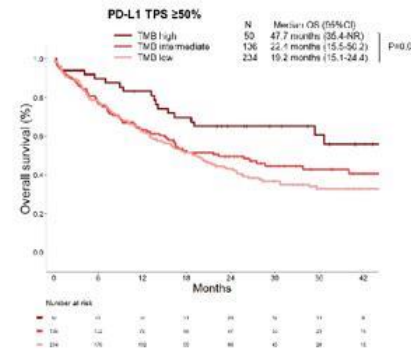
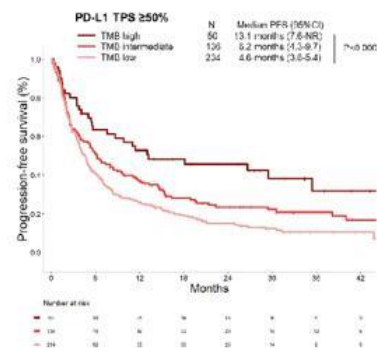
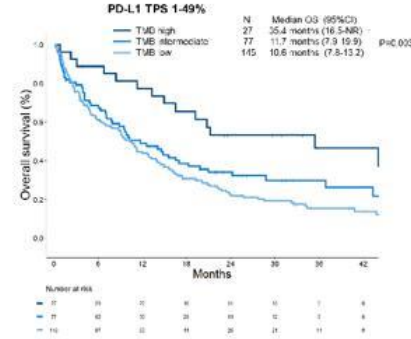
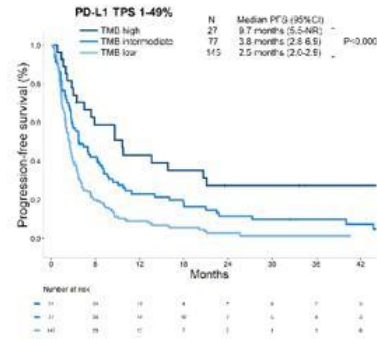
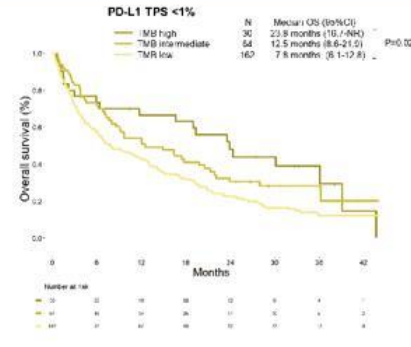
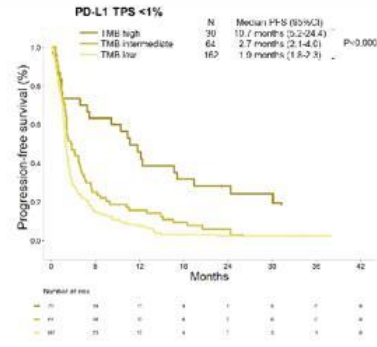
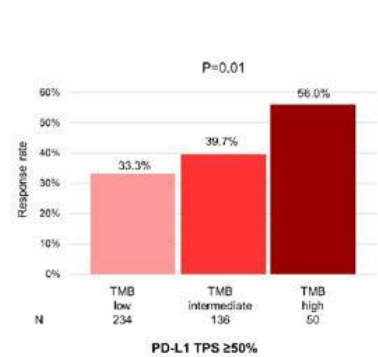
A



B

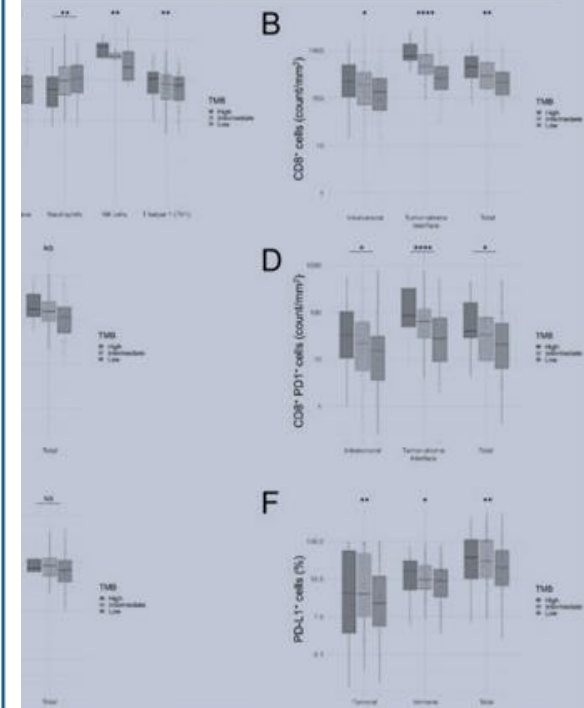


C



Objective response rate (left panels), progression-free survival (middle panels), and overall survival (right panels) to PD-(L)1 inhibition in patients with a low vs intermediate vs high TMB among tumors with a PD-L1 tumor proportion score (A) <1%, (B) 1-49%, and (C) ≥50%.

## between increasing TMB levels and intratumoral, tumor-face, and total CD8+, PD1+, Foxp3+, and PD-L1+ cells



Immunofluorescence data from the NSCLC TCGA dataset into tumor-associated immune cells, showing cell types that are NSCLCs with a low vs intermediate vs high TMB. Multiplexed immunofluorescence (ImmunoProfile) showing tumor face, and total (B) CD8+ cells, (C) PD1+ cells, (D) CD8+ PD1+ cells, (E) Foxp3+ cells, and (F) the percentage of tumor, immune, and total PD-L1+ cells.

ion

References

1. Rick M, Rodriguez-Arenu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1872-1883.
2. Aguilera EJ, Roca B, Giron J, et al. Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression. *Ann Oncol*. 2019.
3. Samson RM, Lee CH, Shouhan AN, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*. 2019. doi:10.1038/s41588-019-0312-1
4. Hellmann MD, Cuatrecasas TE, Plazanski A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N Engl J Med*. 2018;378(2):2093-2104. doi:10.1056/NEJMoa1801348



# Závěr

- Prediktivní testování u nádorů neznámého zdroje je v případě klinické indikace z větší části dostupné:
- K dořešení:
  - HER2 – IHC/amplifikace (v tuto chvíli lze pouze u karcinomu prsu a žaludku)
  - PD-L1