

Anna Grenda<sup>1</sup>, Ewelina Iwan<sup>2</sup>, Paweł Krawczyk<sup>1</sup>, Izabela Chmielewska<sup>1</sup>, Bożena Jarosz<sup>3</sup>, Katarzyna Reszka<sup>1</sup>, Tomasz Kucharczyk<sup>1</sup>, Kamila Wojas-Krawczyk<sup>1</sup>, Michał Gil<sup>1</sup>, Magdalena Słomiany-Szwarc<sup>2</sup>, Arkadiusz Bomba<sup>2</sup>, Dariusz Wasyl<sup>2</sup>, Janusz Milanowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>2</sup>Zakład Analiz Omicznych, Państwowy Instytut Weterynaryjny — Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurochirurgii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

# Poszukiwanie przyczyn oporności na immunoterapię pembrolizumabem u chorej na gruczolowego raka płuca z ekspresją PD-L1 — mikrobiom jelitowy „pod lupą”

The search for causes of resistance to pembrolizumab in lung adenocarcinoma with PD-L1 expression — focus on intestinal microbiome

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Grenda A, Iwan E, Krawczyk P, et al. The search for causes of resistance to pembrolizumab in lung adenocarcinoma with PD-L1 expression — focus on intestinal microbiome. *Oncol Clin Pract.* 2020; 16. DOI: 10.5603/OCP.2020.0031.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Adres do korespondencji:

Dr n. med. Anna Grenda  
 Katedra i Klinika Pneumonologii,  
 Onkologii i Alergologii  
 Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
 ul. Jaczewskiego 8, 20-054 Lublin  
 Tel.: 81 724 42 93  
 e-mail: an.grenda@gmail.com

## STRESZCZENIE

Immunoterapia anty-PD-1 lub PD-L1 u niektórych chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) może okazać się nieskuteczna, pomimo wysokiego odsetka komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 ( $\geq 50\%$ ). TMB (*tumor mutation burden*), status palenia tytoniu oraz niskie zróżnicowanie mikrobiomu jelitowego mogą wiązać się z brakiem skuteczności leczenia inhibitorami immunologicznych punktów kontroli u chorych na NDRP. Prezentowany w niniejszej pracy przypadek dotyczy niepalącej chorej na gruczolowego raka płuca, u której pomimo wysokiego odsetka komórek nowotworowych PD-L1 pozytywnych (50%) terapia pembrolizumabem okazała się nieskuteczna. U pacjentki wykonano sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) z zastosowaniem panelu FOCUS pozwalającego na analizę 52 genów, których uszkodzenia są związane z różnymi typami guzów łitych, w tym z rakiem płuca. Zaobserwowano zmiany genetyczne o statusie *benign*, co oznacza, że nie mają one w chwili obecnej znaczenia klinicznego dla chorych na NDRP. W międzyczasie wykonano profilowanie mikrobiomu jelitowego chorej, ze względu na to, że jego skład może być decydującym czynnikiem braku odpowiedzi na immunoterapię u chorych z wysoką ekspresją PD-L1 i bez mutacji kierujących (*driver mutations*). U opisywanej chorej zaobserwowano niskie zróżnicowanie bakterii występujących w jelitach z zauważalnym stanem dysbiozy (dysbakteriozy). Obecność bakterii *Akkermansia*, *Enterococcaceae*, *Bifidobacteriaceae* czy *Coriobacteriaceae*, zwłaszcza obecność *Akkermansia mucinifila*, wydaje się być czynnikiem korzystnym w odniesieniu do możliwości uzyskania odpowiedzi na immunoterapię oraz wydłużenia czasu wolnego od progresji (PFS, *progression-free survival*). W mikrobiomie jelitowym opisywanej chorej nie stwierdzono obecności bakterii z gromady *Verrucomicrobia*, do której należy *A. mucinifila*. Ponadto stwierdzono jedynie 0,011% bakterii z rodziny *Enterococcaceae*. Badania nad mikrobiomem jelitowym u chorych na nowotwory otrzymujących immunoterapię wydają się niezbędne w celu prawidłowego zrozumienia wpływu składu mikrobiomu na skuteczność tej metody leczenia.

**Słowa kluczowe:** immunoterapia, mikrobiom jelitowy, NGS, NDRP

## ABSTRACT

Anti-PD-1 or PD-L1 immunotherapy in some patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) may not be effective, despite the high percentage of cancer cells with PD-L1 expression ( $\geq 50\%$ ). TMB (*tumor mutation burden*), smoking status and low intestinal microbiome diversity may be associated with lack of efficacy of immune checkpoints

inhibitors treatment in NSCLC patients. The case presented here concerns a non-smoking female patient with lung adenocarcinoma, in whom, despite the high percentage of PD-L1 positive tumor cells (50%), pembrolizumab therapy was ineffective. Next generation sequencing (NGS) was performed using the FOCUS panel allowing the analysis of 52 genes whose damage is associated with various types of solid tumors, including lung cancer. Benign genetic changes clinically irrelevant for patients with non-small cell lung cancer have been observed. In the meantime, profiling of the patient's intestinal microbiome was performed, due to the fact that the composition of the intestinal microbiome may be a decisive factor in the lack of response to immunotherapy in patients with high PD-L1 expression and no driver mutations. Low diversity of bacteria in the intestines, with a noticeable dysbiosis (dysbacteriosis), was observed. The presence of bacteria *Akkermansia*, *Enterococcaceae*, *Bifidobacteriaceae* or *Coriobacteriaceae*, especially the presence of *Akkermansia mucinifila* seems to be a favourable factor of the possibility of obtaining response to immunotherapy and prolongation of progression-free survival (PFS). In the intestinal microbiome of the presented case, no bacteria from the *Verrucomicrobia* phylum, to which *A. mucinifila* belongs, were found. In addition, only 0.011% of *Enterococcaceae* were found. Studies on the intestinal microbiome in cancer patients receiving immunotherapy appear to be necessary to correctly understand the effect of microbiome composition on the effectiveness of this treatment method.

**Key words:** immunotherapy, intestinal microbiome, NGS, NSCLC

Copyright © 2020 Via Medica

ISSN 2450-1646

Onkol Prakt Klin Edu 2020; 6, 6: 479-483

## Opis przypadku

W sierpniu 2019 roku do Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii w Lublinie zgłosiła się 48-letnia chora z powodu znacznego nasilenia duszności, dużego spadku tolerancji wysiłku fizycznego oraz suchego, uporczywego kaszlu. Chora nigdy nie paliła tytoniu. W badaniu rentgenograficznym (RTG) klatki piersiowej ujawniono dużą ilość płynu w lewej jamie opłucnej z niedodmą ponad poziomem płynu oraz poszerzenie wnęki lewego płuca. W trakcie hospitalizacji kilkakrotnie wykonano torakocentezę, ale badanie patomorfologiczne płynu z jamy opłucnej nie pozwoliło na ustalenie ostatecznego rozpoznania. W tomografii komputerowej uwidocznił guz płuca lewego o wymiarach 13 × 10 cm, który zamykał oskrzele górnopłatowe i dolnopłatowe lewe, płyn w lewej jamie opłucnej oraz znaczne pogrubienie opłucnej. W zachowanym powietrznym płacie dolnym płuca lewego widoczne były bardzo liczne i drobne guzki przerzutowe. W jamie brzusznej stwierdzono liczne powiększone węzły chłonne wnęki wątroby i przyaortalne. W badaniu rezonansu magnetycznego kręgosłupa uwidocznił ponadto liczne przerzuty ze złamaniami patologicznymi w trzonach kręgów piersiowych (Th3-Th4 i Th8-Th10). We wrześniu u chorej wykonano bronchofiberoskopię z biopsją przezoskrzelową węzłów chłonnych śródpiersia. Pobrano wycinki z nacieczonej ostrogi głównej i oskrzela głównego prawego oraz przeprowadzono biopsję cienkoigłową przezoskrzelową i przezprzełykową guza oraz lewych węzłów chłonnych śródpiersia grupy 7.

Materiał biopsyjny utrwalono w formalinie i zarchiwizowano w postaci bloczków parafinowych. Badania patomorfologiczne potwierdziły raka gruczołowego z ekspresją tarczycowego czynnika transkrypcyjnego (TTF1, *thyroid transcription factor*) na komórkach nowotworowych. W utrwalonym materiale cytologicznym wy-

konano badania wszystkich czynników predykcyjnych dla terapii zarejestrowanych w krajach Unii Europejskiej. Wykluczono obecność mutacji genów *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) i *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene*) techniką łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*, *polymerase chain reaction*), rearanżacji genu *ROS1* techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridization*) oraz ekspresji białka fuzyjnego kinazy chłoniaka anaplastycznego (*ALK*, *anaplastic lymphoma kinase*) techniką immunohistochemiczną (IHC, *immunohistochemistry*). Wykonano także badanie ekspresji białka liganda receptora programowanej śmierci 1 (PD-L1, *programmed cell-death ligand 1*, CD274) techniką IHC (klon przeciwciała SP263). Wykryto 50% komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 na powierzchni.

Na tej podstawie oraz na podstawie czynników klinicznych (IV stopień zaawansowania raka gruczołowego płuca) zdecydowano o zastosowaniu pembrolizumabu w pierwszej linii leczenia. Niestety po dwóch cyklach immunoterapii doszło do progresji choroby i pogorszenia stanu klinicznego chorej. Chora konsekwentnie nie zgadzała się na chemioterapię. Dlatego zastosowano w tym przypadku jedynie leczenie miejscowe zmiany obturującej oskrzela główne za pomocą brachyterapii oraz radioterapię i najlepsze leczenie wspomagające (BSC, *best supportive care*).

## Poszukiwanie przyczyn oporności na immunoterapię

Jest to jeden z przypadków, w którym pomimo wysokiego odsetka komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 immunoterapia okazała się nieskuteczna. Przyczyną takiej sytuacji mogło być występowanie rzadkiej,

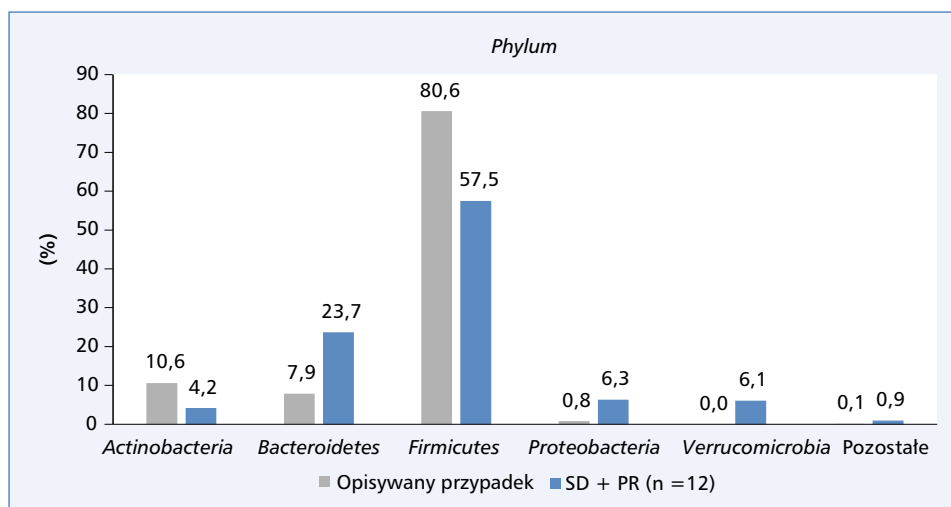
pojedynczej mutacji (*driver mutation*), która nie mogła zostać wykryta testami jednogennymi. Niska liczba mutacji somatycznych w komórkach nowotworowych (TMB, *tumor mutation burden*) może skutkować brakiem efektywności immunoterapii. Na niską wartość TMB wpływają historia palenia tytoniu oraz zdolność naprawy uszkodzeń DNA w komórce, uwarunkowana gremialnymi lub somatycznymi mutacjami albo polimorfizmami genów kodujących białka szlaków naprawy DNA. W związku z tym zdecydowano o wykonaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*) w celu poszukiwania mutacji kierujących, predysponujących do terapii ukierunkowanych molekularnie. Sekwencjonowanie przeprowadzono w technologii Ion Torrent w aparacie S5 (Thermo Fisher Scientific) z wykorzystaniem panelu FOCUS OncoPrint™ (Thermo Fisher Scientific), który pozwala na jednoczesną analizę polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, *single nucleotide polymorphism*), zmian liczby kopii genu (CNV, *copy number variation*), zmian typu INDEL (insercje/delecje) w DNA komórek nowotworowych, a także rearanżacji genowych w mRNA (w tym rearanżacji genów *ALK*, *ROS1*, *NTRK1-3*). Panel FOCUS pozwala na identyfikację nieprawidłowości w wybranych 52 genach, związanych z różnymi typami guzów litych, w tym raka płuca. Sekwencjonowanie pod względem technicznym przebiegło pomyślnie. Zaobserwowano zmiany genetyczne o statusie *benign*, co oznacza, że nie mają one w chwili obecnej znaczenia klinicznego dla chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Dla chorych z taką zmiennością genetyczną nie opracowano dotychczas terapii personalizowanych oraz nie udowodniono, że takie nieprawidłowości genetyczne mogą być przyczyną powstawania nowotworu. Były to substytucje w eksonie 29. genu *ALK*: c.4587C>G (p.Asp1529Glu) oraz c.4381A>G (p.Ile1461Val), występujące poza regionem kodującym domenę kinazy tyrozynowej. Ponadto stwierdzono zmianę w eksonie 4. genu *FGFR4* (*fibroblast growth factor receptor 4*): c.407C>T (p.Pro136Leu). Zmiany te nie predysponowały do leczenia ukierunkowanego molekularnie, zarejestrowanego w krajach Unii Europejskiej czy objętego badaniami klinicznymi.

W międzyczasie wykonano profilowanie mikrobiomu jelitowego chorej w ramach badań naukowych (zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie nr KE-0254/58/2019). Badanie przeprowadzono w aparacie Illumina MiSeq (Illumina) z użyciem zestawów Nextera (Illumina), przeznaczonych do genomów małych, w tym bakteryjnych. Skład mikrobiomu jelitowego może być decydującym czynnikiem braku odpowiedzi na immunoterapię u chorych z z wysokim odsetkiem komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 i bez mutacji kierujących. U opisywanej chorej zaobserwowano niskie zróżnicowanie rodzajów bakterii

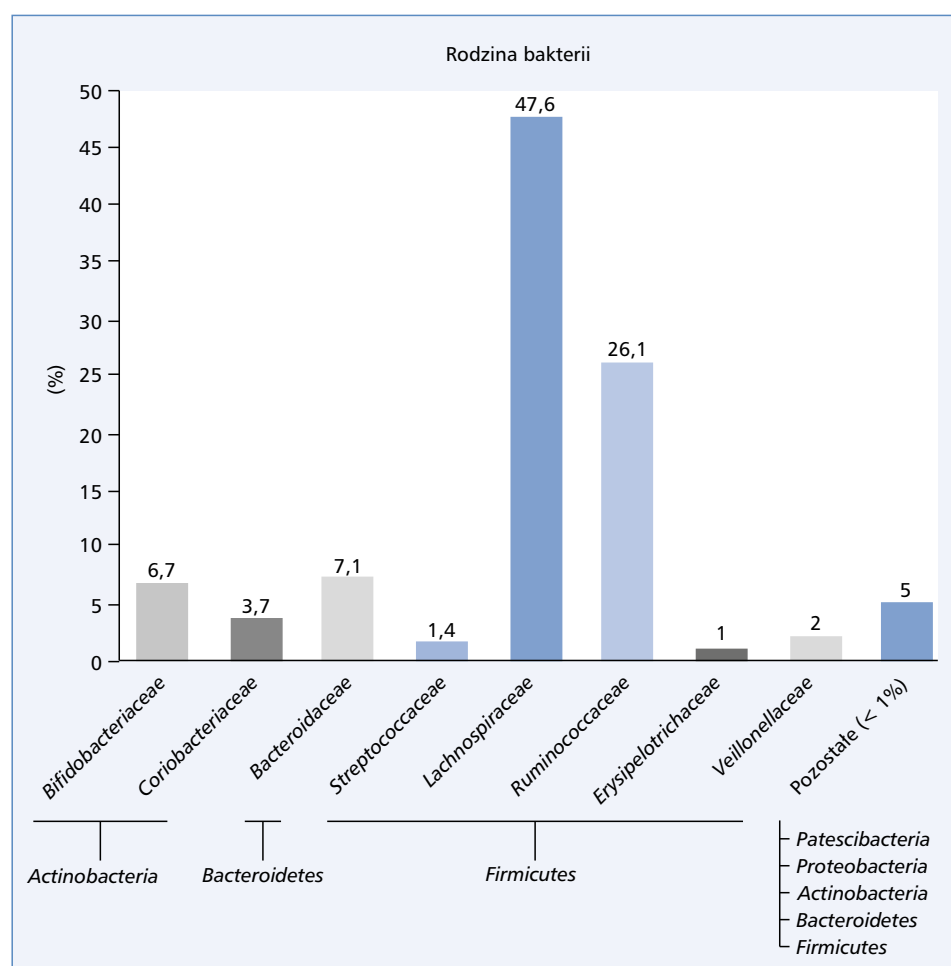
występujących w jelitach z zauważalnym stanem dysbiozy (dysbakteriozy). Przeważający odsetek, bo aż 80,6% całej populacji mikrobiomu jelitowego przebadanej próbki stolca chorej, stanowił typ bakterii *Firmicutes*. Należą do niego rodzaje *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Enterococcus* i *Ruminococcus* [1]. U zdrowych osób odsetek tej grupy bakterii wśród innych bakterii mikrobiomu wynosi ok. 45–60% [1]. *Firmicutes* i *Bacteroidetes* łącznie powinny stanowić ok. 90% mikrobiomu jelitowego [1]. U opisywanej chorej było to 88,5%, widoczna była duża dysproporcja pomiędzy tymi dwiema grupami bakterii, ponieważ *Bacteroidetes* w próbce stanowiły tylko 7,9%. W prawidłowym stanie biotycznym *Bacteroidetes* powinny stanowić 25–45% składu mikrobiomu. Do *Bacteroidetes* należą przede wszystkim *Bacteroides* i *Prevotella* [1–4]. Graficzne przedstawienie składu procentowego mikrobiomu (na poziomie *Phylum* — gromady bakterii) u prezentowanej chorej w porównaniu z chorymi, u których stwierdzono kontrolę choroby w trakcie immunoterapii, przedstawia rycina 1.

## Dyskusja

Vetizou i Trinchieri wskazują na kilka czynników, które wpływają na skład mikrobiomu jelitowego: czynniki genetyczne, styl życia, stan układu immunologicznego czy stosowanie antybiotyków [5]. Wszystkie te czynniki oraz skład mikrobiomu jelitowego autorzy wiążą z możliwością uzyskania odpowiedzi na immunoterapię u chorych na nowotwory. Im bardziej zróżnicowany mikrobiom oraz wyższy odsetek „korzystnych” bakterii w jelitach, tym większe jest prawdopodobieństwo odpowiedzi na immunoterapię, związane z wyższym odsetkiem limfocytów T CD8+ infiltrujących podścielisko guza [6]. Wśród „korzystnych” bakterii wymienia się: *Akkermansia muciniphila* (*Verrucomicrobia*, rodzina *Akkermansiaceae*, rodzaj *Akkermansia*), *Enterococcus hirae* (*Firmicutes*, rodzina *Enterococcaceae*, rodzaj *Enterococcus*), *Bifidobacterium longum* (*Actinobacteria*, rodzina *Bifidobacteriaceae*, rodzaj *Bifidobacterium*), *Collinsella aerofaciens* (*Actinobacteria*, rodzina *Coriobacteriaceae*, rodzaj *Collinsella*), *Enterococcus faecium* (*Firmicutes*, rodzina *Enterococcaceae*, rodzaj *Enterococcus*) [5, 6]. Zwłaszcza obecność *Akkermansia muciniphila* wydaje się czynnikiem korzystnym w odniesieniu do możliwości uzyskania odpowiedzi na immunoterapię oraz wydłużenia czasu wolnego od progresji (PFS, *progression-free survival*), na co wskazują również Routy i wsp. [7]. W mikrobiomie jelitowym opisywanej chorej nie stwierdzono obecności bakterii z gromady *Verrucomicrobia*, do której należy *A. muciniphila* (0%). Ponadto stwierdzono jedynie 0,011% bakterii z rodziny *Enterococcaceae*, do której należą *E. hirae* oraz *E. faecium*.



**Rycina 1.** Skład procentowy mikrobiomu jelitowego na poziomie *Phylum* (gromada bakterii) u chorej na gruczolakowego raka płuca z progresją po dwóch podaniach pembrolizumabu oraz u 12 chorych na NDRP, którzy wykazali stabilizację choroby w trakcie immunoterapii. Mikrobiom zbadany w materiale przed podaniem immunoterapii. SD (*stable disease*) — stabilizacja choroby; PR (*partial response*) — odpowiedź częściowa



**Rycina 2.** Skład procentowy mikrobiomu jelitowego na poziomie rodziny bakterii u chorej na gruczolakowego raka płuca z progresją po dwóch podaniach pembrolizumabu

Gopalakrishnan i wsp. wskazują na niekorzystny mikrobiom jelitowy, który może wpływać na brak skuteczności immunoterapii anty-PD-1 u chorych na czerniaka skóry [6]. Przede wszystkim wskazują na niską różnorodność bakterii jelitowych jako negatywny czynnik predykcijny odpowiedzi na leczenie przeciwciałami anty-PD-1. Stwierdzają ponadto, że wysoki procentowy udział bakterii z gromady *Bacteroidetes* może wpływać na upośledzenie ogólnoustrojowej i przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, z ograniczonym naciekaniami guza przez komórki układu immunologicznego oraz słabą zdolność do prezentacji antygeny przez komórki prezentujące antygen (APC, *antigen presenting cells*) [6]. Gopalakrishnan i wsp. wskazują na pozytywną korelację pomiędzy odsetkiem limfocytów TCD8+ infiltrujących podścielisko guza a udziałem bakterii z rodziny *Ruminococcaceae* w mikrobiomie jelitowym [6]. W mikrobiomie opisywanej chorej zaobserwowano, że mikroorganizmów z tej rodziny jest 26,1% (ryc. 2), co mogłoby być korzystnym czynnikiem predykcijnym dla immunoterapii.

Dalsze badania nad mikrobiomem jelitowym u chorych na nowotwory otrzymujących immunoterapię wydają się niezbędne w celu prawidłowego zrozumienia wpływu składu mikrobiomu na skuteczność tej metody leczenia. Należy pamiętać, że opisywana chora otrzymywała przed rozpoczęciem immunoterapii antybiotyki i steroidoterapię metyloprednizolonem, co zostało w literaturze opisane jako negatywny czynnik predykcijny dla immunoterapii. Antybiotykoterapia była prawdopodobnie odpowiedzialna za dysbiozę mikrobiomu jelitowego, a steroidoterapia mogła dodatkowo osłabić funkcjonowanie układu odpornościowego. Z drugiej strony nie można wykluczyć wielu innych przyczyn oporności na immunoterapię. Jedną z nich może stanowić przekształcenie się bakterii komensalnych w patogenne. Ponadto, mimo wykonania zaawansowanych badań genetycznych, w tym NGS, nie można wykluczyć, że u omawianej chorej występuje niska TMB, do której zbadania należy przeanalizować nieprawidłowości genetyczne w kilkuset genach, a nie w kilkudziesięciu. Takie badanie mogłoby potwierdzić występowanie bardzo rzadkiej nieprawidłowości genetycznej warunkującej rozwój nowotworu. Prawdopodobieństwo obecności takiej mutacji jest duże ze względu na młody wiek chorej i fakt niepalenia przez nią tytoniu. Chorzy na NDRP z wysoką TMB są to najczęściej osoby intensywnie palące papierosy. Rakotwórczy wpływ dymu tytoniowego sprzyja powstawaniu wielu mutacji somatycznych w komórkach nabłonka oskrzeli. Niska TMB występuje u chorych niepalących i wiąże się z występowaniem pojedynczych mutacji lub rearanżacji

kierujących w takich genach, jak *EGFR*, *ALK*, *ERBB2*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *NTRK* [9, 10]. U chorych na NDRP wykazano wyższy odsetek odpowiedzi na leczenie inhibitorami PD-1 lub PD-L1 u obecnych lub byłych palaczy niż u osób niepalących [11–13]. Zatem niska TMB, status palenia tytoniu oraz niskie zróżnicowanie mikrobiomu jelitowego mogą się wiązać z brakiem skuteczności leczenia inhibitorami immunologicznych punktów kontroli u chorych na NDRP.

Różnorodność potencjalnych przyczyn pierwotnej oporności na immunoterapię uzmysławia nam, jak mało wiemy o tej metodzie leczenia.

## Piśmiennictwo

- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*. 2019; 7(1), doi: [10.3390/microorganisms7010014](https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014), indexed in Pubmed: [30634578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30634578/).
- Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, et al. Comparison of human gut microbiota in control subjects and patients with colorectal carcinoma in adenoma: Terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing analyses. *Oncol Rep*. 2016; 35(1): 325–333, doi: [10.3892/or.2015.4398](https://doi.org/10.3892/or.2015.4398), indexed in Pubmed: [26549775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26549775/).
- Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017; 46(1): 77–89, doi: [10.1016/j.gtc.2016.09.007](https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007), indexed in Pubmed: [28164854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28164854/).
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; 486(7402): 207–214, doi: [10.1038/nature11234](https://doi.org/10.1038/nature11234), indexed in Pubmed: [22699609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22699609/).
- Vetizou M, Trinchieri G. Anti-PD1 in the wonder-gut-land. *Cell Res*. 2018; 28(3): 263–264, doi: [10.1038/cr.2018.12](https://doi.org/10.1038/cr.2018.12), indexed in Pubmed: [29336431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29336431/).
- Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018; 359(6371): 97–103, doi: [10.1126/science.aan4236](https://doi.org/10.1126/science.aan4236), indexed in Pubmed: [29097493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097493/).
- Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018; 359(6371): 91–97, doi: [10.1126/science.aan3706](https://doi.org/10.1126/science.aan3706), indexed in Pubmed: [29097494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097494/).
- Derosa L, Hellmann MD, Spaziano M, et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2018; 29(6): 1437–1444, doi: [10.1093/annonc/mdy103](https://doi.org/10.1093/annonc/mdy103), indexed in Pubmed: [29617710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29617710/).
- Davis A, Chae Y, Agte S, et al. Association of tumor mutational burden with smoking and mutation status in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2017; 35(7\_suppl): 24, doi: [10.1200/jco.2017.35.7\\_suppl.24](https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.7_suppl.24).
- Nagahashi M, Sato S, Yuza K, et al. Common driver mutations and smoking history affect tumor mutation burden in lung adenocarcinoma. *J Surg Res*. 2018; 230: 181–185, doi: [10.1016/j.jss.2018.07.007](https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.07.007), indexed in Pubmed: [30072189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30072189/).
- Norum J, Nieder C. Tobacco smoking and cessation and PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): a review of the literature. *ESMO Open*. 2018; 3(6): e000406, doi: [10.1136/esmo-open-2018-000406](https://doi.org/10.1136/esmo-open-2018-000406), indexed in Pubmed: [30305940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30305940/).
- Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372(21): 2018–2028, doi: [10.1056/NEJMoa1501824](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824), indexed in Pubmed: [25891174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25891174/).
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375(19): 1823–1833, doi: [10.1056/NEJMoa1606774](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774), indexed in Pubmed: [27718847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27718847/).