

Paweł Krawczyk

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Molekularne prognostyczne i predykcyjne czynniki kwalifikacji chorych do immunoterapii

Prognostic and predictive molecular factors in qualification of patients to immunotherapy

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Paweł Krawczyk
 Pracownia Immunologii i Genetyki
 Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii
 Uniwersytet Medyczny w Lublinie
 ul. Jaczewskiego 8
 20-950 Lublin
 tel. 081 724 42 93
 e-mail: pawel.krawczyk@umlub.pl

STRESZCZENIE

Immunoterapia niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) jest obecnie szeroko stosowana w Polsce i na świecie. Leczenie za pomocą inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych — najczęściej przeciwciał monoklonalnych anty-PD-1 (*programmed death 1*) lub anty-PD-L1 (*programmed death ligand 1*) — można zaplanować na podstawie badania czynników predykcyjnych. Pembrolizumab w monoterapii pierwszej linii stosuje się u chorych na przerzutowego NDRP po wykluczeniu obecności w komórkach nowotworowych mutacji w genie *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) i rearanżacji genów *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) i *ROS1* oraz po potwierdzeniu obecności ponad 50% komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1 w guzie. Chemoimmunoterapię z udziałem pembrolizumabu można wykorzystać w leczeniu takich chorych, ale w przypadku wykrycia ekspresji PD-L1 na mniej niż 50% komórek nowotworowych. Planowanie leczenia drugiej linii za pomocą atezolizumabu lub niwolumabu (leczenie dostępne w Polsce) nie wymaga oceny ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych. Ponieważ ekspresja PD-L1 nie jest idealnym markerem predykcyjnym dla immunoterapii, trwają poszukiwania innych czynników związanych z wyższą efektywnością tej metody leczenia. Wśród nich można wymienić wysokie obciążenie mutacyjne nowotworów (TMB, *tumor mutation burden*), obecność niestabilności mikrosatelitarnej (MSI, *microsatellite instability*), immunoprofil odpowiadający tzw. „guzom gorącym”, obecność mutacji genetycznych, np. w genie *KRAS* (*Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog*) i wiele innych.

Słowa kluczowe: niedrobnokomórkowy raka płuca, inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, czynniki predykcyjne, ligand dla cząsteczki programowej śmierci typu 1

ABSTRACT

Immunotherapy for non-small cell lung cancer (NSCLC) is now widely used in Poland and in the world. Treatment with immune checkpoint inhibitors — most often anti-PD-1 (programmed death 1) or anti-PD-L1 (programmed death ligand 1) (monoclonal antibodies) — may be planned based on predictive markers examination. Pembrolizumab monotherapy in first-line treatment is used in patients with metastatic NSCLC without *EGFR* (epidermal growth factor receptor) mutations and rearrangements of *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) and *ROS1* genes, and with the presence of more than 50% of tumor cells expressing PD-L1 molecule. Chemoimmunotherapy with pembrolizumab can be used in the treatment of such patients, but when PD-L1 expression is detected in less than 50% of tumor cells. Qualification of NSCLC patients to second-line treatment with atezolizumab or nivolumab (treatment available in Poland) does not require the assessment of PD-L1 expression on tumor cells. PD-L1 expression is not an ideal predictive marker for immunotherapy. Therefore, research on other predictive factors related to the higher effectiveness of immunotherapy are ongoing. These positive predictive markers could include the high tumor mutation burden (TMB), the presence of microsatellite instability (MSI), an immunoprofile corresponding to "hot tumors", the presence of different genetic mutations (e.g. in the *KRAS* gene) and much more.

Key words: non-small cell lung cancer, immune checkpoints inhibitors, predictive factors, programmed death ligand 1

Diagnostyka czynników predykcyjnych w ramach Programu Lekowego Leczenia Niedrobnokomórkowego Raka Płuca

Kwalifikacja do immunoterapii chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) w myśl programu lekowego B.6 opiera się między innymi na oznaczaniu molekularnych i immunologicznych czynników predykcyjnych. W pierwszej linii leczenia od 1 stycznia 2021 roku refundacją została objęta terapia skojarzona z udziałem chemioterapii dwulekowej opartej na związkach platyny w połączeniu z pembrolizumabem u chorych na przerzutowego NDRP. Podtrzymano refundację pembrolizumabu w monoterapii w pierwszej linii leczenia u chorych na zaawansowanego NDRP. Obie te metody leczenia mogą być zastosowane na podstawie wyników badań immunohistochemicznych i molekularnych. W pierwszej kolejności obowiązuje u chorych z rozpoznaniem NDRP o typie innym niż płaskonabłonkowy konieczność wykluczenia obecności mutacji w genie *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) oraz rearanżacji genów *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) i *ROS1*. Według programu lekowego Narodowego Funduszu Zdrowia (NFZ) status mutacji w genie *EGFR* należy zbadać za pomocą „zwalidowanego testu”. W polskich warunkach nieprawidłowości te bada się najczęściej za pomocą techniki *real-time PCR* (*polymerase chain reaction*). Do badania rearanżacji genu *ALK* można wykorzystywać techniki immunohistochemiczne (IHC), fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH, *fluorescent in situ hybridisation*) oraz sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, *next generation sequencing*). W praktyce najprostszą, najszybszą i najtańszą metodą jest technika IHC, a tylko wyniki niemiarodajne uzyskane tą metodą muszą być poddane weryfikacji techniką FISH. Rearanżację genu *ROS1* można zbadać techniką FISH lub NGS, przy czym ta pierwsza metoda jest w Polsce w powszechnym użyciu. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości w wymienionych genach należy chorych leczyć odpowiednimi lekami ukierunkowanymi molekularnie i nie powinno się w tej populacji chorych stosować immunoterapii [1].

Wybór metody immunoterapii w pierwszej linii leczenia zależy od statusu ekspresji liganda cząsteczki programowanej śmierci 1 (PD-L1, *programmed death ligand 1*) na komórkach nowotworowych. Monoterapię pembrolizumabem należy stosować u chorych z ekspresją PD-L1 na $\geq 50\%$ komórek nowotworowych. Tego typu ekspresję stwierdza się u około 25% chorych na zaawansowanego NDRP. Natomiast u chorych, u których ekspresja PD-L1 występuje na mniej niż 50% komórek nowotworowych, powinno rozważyć się zastosowanie skojarzenia chemioterapii i pembrolizumabu. Terapię skojarzoną można też stosować u chorych bez ekspresji PD-L1 (0% komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1). Istotne jest, żeby na wyniku badania

immunohistochemicznego wpisywać precyzyjnie odsetek komórek z ekspresją PD-L1, a nie tylko konkluzję: wynik pozytywny lub negatywny (stwierdzenie ekspresji PD-L1 na 1% komórek nowotworowych można uznać za wynik pozytywny) [1–4].

W drugiej linii leczenia, jeśli w pierwszej zastosowano chemioterapię, nadal można stosować u chorych na miejscowo zaawansowanego lub zaawansowanego NDRP immunoterapię atezolizumabem lub niwolumabem. Nie jest w tym przypadku wymagana ocena statusu ekspresji PD-L1, ale należy wykluczyć obecność mutacji w genie *EGFR* oraz rearanżację genu *ALK*. Niemniej jednak nieprzeprowadzenie diagnostyki tych nieprawidłowości genetycznych przed planowaniem pierwszej linii terapii należy uznać za nieprawidłowe postępowanie diagnostyczne. Planowanie terapii konsolidującej durwalumabem po zakończeniu jednoczesnej chemioradioterapii u chorych na miejscowo zaawansowanego NDRP nie wymaga badania czynników predykcyjnych [1, 5–9].

Inne czynniki predykcyjne i prognostyczne dla immunoterapii

Ocena ekspresji PD-L1 jest wymagana w kwalifikacji do innych metod immunoterapii, które w Polsce nie są refundowane, ale są zarejestrowane w Unii Europejskiej i/lub w USA. Chorzy z ekspresją PD-L1 na $\geq 1\%$ komórek nowotworowych mogą otrzymać immunoterapię skojarzoną z niwolumabem i ipilimumabem w pierwszej linii leczenia lub pembrolizumabem w monoterapii w pierwszej i drugiej linii leczenia. Natomiast kwalifikacja do terapii atezolizumabem w pierwszej linii leczenia wymaga stwierdzenia ekspresji PD-L1 na $\geq 50\%$ komórek nowotworowych. Zastosowanie terapii skojarzonej z udziałem niwolumabu, ipilimumabu i chemioterapii lub atezolizumabu, bewacyzumabu i chemioterapii w pierwszej linii leczenia może być zastosowane w populacji chorych ze statusem PD-L1 $< 50\%$ [10]. W badaniach klinicznych z atezolizumabem wykorzystywano jako marker predykcyjny ocenę ekspresji PD-L1 na komórkach immunologicznych naciekających tkankę nowotworową. Oceniano nie odsetek komórek immunologicznych, ale pole powierzchni guza nacieczone tymi komórkami. Marker ten w kombinacji z oceną ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych nie znalazł zastosowania w rutynowej diagnostyce w kwalifikacji do immunoterapii [7].

Ocena ekspresji PD-L1 nie jest idealnym markerem predykcyjnym w kwalifikacji do immunoterapii. Odpowiedź na immunoterapię obserwowana jest zarówno u chorych z ekspresją tego markera na komórkach nowotworowych, jak i jej pozbawionych. Z kolei nawet u chorych z wysoką ekspresją PD-L1 stwierdza się pierwotną oporność na immunoterapię. Dlatego poszu-

kiwane są inne markery predykcyjne w kwalifikacji do immunoterapii u chorych na NDRP.

Markerem, który znalazł zastosowanie w praktyce klinicznej, jest oznaczanie obciążenia guza mutacjami somatycznymi (TMB, *tumor mutation burden*) w kwalifikacji do terapii pembrolizumabem. Chorzy na guzy lite z wysokim TMB (≥ 10 mutacji na milion par zasad) mogą otrzymać takie leczenie w USA. Wysokie TMB wiąże się z powstawaniem dużej liczby nieprawidłowych białek, w tym neoantygenów (antygenów swoistych dla nowotworów). Wysokie TMB koreluje zazwyczaj z wieloletnim paleniem tytoniu i długotrwałym, agresywnym oddziaływaniem karcynogenów. Tego rodzaju guzy nowotworowe są wysoce immunogenne, a komórki nowotworowe łatwiej identyfikowane przez układ immunologiczny i usuwane przez limfocyty T cytotoksyczne. Immunoterapia wzmacnia tę aktywność niezależnie od ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych [11].

W badaniach klinicznych jako czynnik prognostyczny i predykcyjny immunoterapii wykonywano także immunoprofilowanie guzów nowotworowych. W badaniu POPLAR, w którym stosowano atezolizumab w drugiej linii leczenia, oceniano ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję czynników prozapalnych, w tym przede wszystkim białek związanych z produkcją interferonów. Ustalono, że zdolność do wysokiej produkcji czynników wzmacniających odpowiedź komórkową z udziałem limfocytów T pomocniczych typu 1 (Th1) i limfocytów T cytotoksycznych (CTLs, *cytotoxic T cells*), zwłaszcza komórek pamięci o fenotypie EOMES+ (*eomesodermin*), CD69+, CD45RO+, jest korzystnym czynnikiem predykcyjnym immunoterapii. Ponadto w grupie chorych odpowiadających na takie leczenie obserwowano na limfocytach niską ekspresję innych ujemnych punktów kontroli układu immunologicznego, w tym przede wszystkim TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), ICOS (*inducible T-cell costimulator*) i LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*). Znaczenie może mieć także udział różnych subpopulacji limfocytów T w naciekach tkanki nowotworowej: limfocytów T regulatorowych, CTLs o fenotypie komórek funkcjonalnie wyczerpanych (niekorzystne rokowniczo), końcowo zróżnicowanych CTLs o fenotypie aktywowanym (korzystne rokowniczo), CTLs na wczesnym etapie różnicowania oraz opornych na apoptozę, wędrujących CTLs, a także limfocytów Th1, Th2 i Th17. Obecność innych komórek immunologicznych o właściwościach immunosupresyjnych (mieloidalne komórki dendrytyczne, makrofagi M2) może obniżyć skuteczność immunoterapii [12].

Poziom TMB oraz immunoprofil guzów nowotworowych przekładają się na ich immunofenotyp, który może być oceniany techniką IHC. Guzy tak zwane gorące, wysoce immunogenne, z wysokim TMB charakteryzują się intensywnymi naciekami ze strony komórek układu

immunologicznego i wiążą się z możliwością uzyskania odpowiedzi na immunoterapię. Guzy, które wytwarzają dużą ilość czynników immunosupresyjnych (np. indolodioxygenazę czy arginazę) z niskim TMB, charakteryzuje wykluczenie immunologiczne (nacieki z limfocytów na obwodzie guza) lub tak zwana pustynia immunologiczna (brak nacieków z komórek immunologicznych). Guzy „zimne”, mało immunogenne są najczęściej związane z brakiem odpowiedzi na immunoterapię. Zjawiska te mają wpływ na występowanie pierwotnej oporności na immunoterapię, ale także na ryzyko pojawienia się hiper- lub pseudoprogresji. W związku z tym mogą mieć duże znaczenie prognostyczne. Żadne z wymienionych badań nie weszło jednak do standardów diagnostyki NDRP w kwalifikacji do immunoterapii lub monitorowania skuteczności leczenia [12].

Metody badania czynników predykcyjnych dla immunoterapii

Metoda IHC jest powszechnie wykorzystywana do diagnostyki ekspresji PD-L1 u chorych na NDRP. Najczęściej wykorzystywane są dwa kłony przeciwciał monoklonalnych anti-PD-L1: 22C3 (wykorzystywany w badaniach klinicznych z pembrolizumabem) oraz SP263. Oba przeciwciała są stosowane z dedykowanymi do nich odczynnikami, a barwienie IHC przeprowadzane jest w automatycznych barwiarkach Autostainer lub Benchmark. Taki sposób przeprowadzenia reakcji IHC zapewnia wysoką wiarygodność oznaczeń, a odczynniki posiadają certyfikat CE-IVD (do diagnostyki *in vitro*). W wielu laboratoriach wykorzystywany jest koncentrat przeciwciała 22C3 i odczynniki dobierane z innych zestawów. Taka metoda nie posiada certyfikatu CE-IVD. Odpowiednio wybarwione preparaty (barwienie hematoksyliną i eoźną, kontrola negatywna, właściwe barwienie IHC), zawierające odpowiednią liczbę komórek nowotworowych, są oceniane w mikroskopie świetlnym przez doświadczonego patomorfologa [12].

Jak wspomniano na wstępie, w celu kwalifikacji do immunoterapii wymagane jest wykluczenie obecności mutacji w genie *EGFR* oraz rearanżacji genów *ALK* i *ROS1*. Obecność tych nieprawidłowości genetycznych po pierwsze kwalifikuje do skutecznego leczenia ukierunkowanego molekularnie, a po drugie niemal zawsze wiąże się z niską skutecznością immunoterapii. Wynika to z faktu, że pojedyncze mutacje kierujące występują najczęściej u osób niepalących i wiążą się z niskim TMB. Jednak pojedyncze mutacje i rearanżacje występują także w innych genach, takich jak *MET*, *NTRK 1-3*, *RET*. Te nieprawidłowości genetyczne także kwalifikują do terapii ukierunkowanych zarejestrowanych w Unii Europejskiej (UE), ale nierefundowanych

jeszcze w Polsce. Dlatego przyszłość diagnostyki molekularnej u chorych na NDRP leży w zastosowaniu technologii NGS. Coraz powszechniej wykorzystuje się krótkie panele genetyczne do badania od kilkunastu do kilkudziesięciu genów (sekwencjonowanie typu *hot-spot*). Do najczęściej używanych należy Archer (badanie mRNA) i Avenio (badanie DNA) przeznaczone dla platform Illumina (np. miniSeq i miSeq) oraz OncoMine kierowany do platformy Ion Torrent (np. S5). Dzięki tej metodzie można w DNA (*deoxyribonucleic acid*) lub RNA (*ribonucleic acid*) komórek nowotworowych wykryć najczęstsze nieprawidłowości kwalifikujące do terapii ukierunkowanych molekularnie. Ponadto dzięki niektórym panelom NGS wykrywa się mutacje w genach *KRAS* oraz *STK11/LKB1*. Według ostatnich danych obecność mutacji w genie *KRAS*, która występuje najczęściej u chorych na raka gruczołowego, może być korzystnym czynnikiem predykcynym dla immunoterapii. Natomiast współistnienie mutacji *KRAS* i *STK11/LKB1* jest niekorzystnym czynnikiem predykcynym dla tej metody leczenia [13]. W celu zbadania TMB oraz niestabilności mikrosatelitarnej (MSI, *microsatellite instability*) konieczne jest wykorzystanie dłuższych paneli genetycznych obejmujących kilkaset genów (CGP, *comprehensive genomic profiling*). Najczęściej wykorzystywany do tego celu jest komercyjny test FoundationOne CDx wykonywany na platformach Illumina (nextSeq i wyższych). Za jego pomocą można jednocześnie zbadać nieprawidłowości genetyczne w ponad 320 genach, TMB i MSI zarówno w materiale tkankowym w bloczku parafinowym, jak i we krwi obwodowej (płynna biopsja) [11].

Konflikt interesów

Komitety doradcze i wykłady sponsorowane dla firm farmaceutycznych: Roche, Astra Zenecka, MSD, BMS, Boehringer-Ingelheim.

Piśmiennictwo

1. <https://www.gov.pl/web/zdrowie/choroby-onkologiczne>.
2. Reck M, Rodríguez-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, indexed in Pubmed: 27718847.
3. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. KEYNOTE-189 Investigators. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018; 378(22): 2078–2092, doi: 10.1056/NEJMoa1801005, indexed in Pubmed: 29658856.
4. Mazieres J, Kowalski D, Luft A, et al. KEYNOTE-407 Investigators. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018; 379(21): 2040–2051, doi: 10.1056/NEJMoa1810865, indexed in Pubmed: 30280635.
5. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373(2): 123–135, doi: 10.1056/NEJMoa1504627, indexed in Pubmed: 26028407.
6. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373(17): 1627–1639, doi: 10.1056/NEJMoa1507643, indexed in Pubmed: 26412456.
7. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. OAK Study Group. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017; 389(10066): 255–265, doi: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X, indexed in Pubmed: 27979383.
8. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387(10027): 1540–1550, doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7, indexed in Pubmed: 26712084.
9. Gray JE, Villegas A, Daniel D, et al. PACIFIC Investigators. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018; 379(24): 2342–2350, doi: 10.1056/NEJMoa1809697, indexed in Pubmed: 30280658.
10. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. ESMO Guidelines Committee, ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018; 29 Suppl 4(Suppl 4): iv192–iv237, doi: 10.1093/annonc/mdy275, indexed in Pubmed: 32169226.
11. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol*. 2020; 21(10): 1353–1365, doi: 10.1016/s1470-2045(20)30445-9.
12. Immunoterapia raka płuca – współczesne spojrzenia. In: Wojaś-Krawczyk K. ed. W gabinecie lekarza specjalisty. Wydanie 1. PZWL Wydawnictwo Lekarskie Sp. z o.o. Warszawa 2011.
13. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawald DM, et al. Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in -Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018; 8(7): 822–835, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0099, indexed in Pubmed: 29773717.