

# Klinicko-patologická analýza dôkazu ligandy proteínu 1 programovanej smrti v nádorových bunkách 325 pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc: Prediktívny a potenciálny prognostický význam

Anna Farkašová<sup>1</sup>, Vladimír Tancoš<sup>2</sup>, Zuzana Kviatková<sup>1</sup>, Zdenko Huťka<sup>1,2</sup>, Jozef Mičák<sup>2</sup>, Karla Scheerová<sup>1</sup>, Peter Szépe<sup>1,2</sup>, Lukáš Plank<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Martinské bioptické centrum, s.r.o. v Martine

<sup>2</sup> Ústav patologickej anatómie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Martine

## SŮHRN

**Úvod:** Vzhľadom k liečbe inhibítormi imunitných strážnych bodov, ktorá zlepšuje prognózu pacientov s pokročilým nemalobunkovým karcinómom pľúc, začína stúpať význam imunohistochemickej analýzy na dôkaz proteínového receptora programovanej smrti a jeho liganda, tzv. PD-L1 proteínu.

**Materiál a metódy:** V našej práci prezentujeme výsledky analýzy imunohistochemickej expresie proteínu PD-L1 s použitím klónu 22C3 (na imunostaineri DAKO Link 48) na nádorových bunkách biopsií 325 pacientov s pľúcnym karcinómom. Hodnotenie expresie pomocou tzv. TPS skóre umožnilo rozdeliť súbor na negatívne prípady (žiadna pozitívita alebo menej ako 1 % pozitívnych buniek nádoru) verzus pozitívne, a to v kategóriách 1-9 %, 10-49 % a  $\geq 50$  % nádorových buniek.

**Výsledky:** Pri porovnaní klinicko-patologických charakteristík podľa stupňa expresie sme zistili porovnateľnú pozitívnu expresiu u pacientov s adenokarcinómom (47,4 % prípadov) a so skvamocelulárnym karcinómom (44,4 %), pričom expresia sa nelíšila v závislosti od veľkosti vzorky pri delení na tzv. malé verzus veľké biopsie. U pacientov s adenokarcinómom sme pozorovali rozdiely expresie PD-L1 proteínu v podskupinách podľa predominantného histopatologického typu. V prípadoch s prevahou lepidického rastu sa pozitívna expresia vyskytla v 18,8 % prípadov, pri prevahe acinárneho a papilárneho rastu v 40,8 % a pri prevahe mikropapilárneho a solidného rastu až v 74,1 % prípadov. Rohovatejúce skvamocelulárne karcinómy boli pozitívne v 38,5 % a nerohovatejúce v 53,8 % prípadov. Najčastejšia pozitívita vysokého stupňa bola pozorovaná v podskupine pacientov so sarkomatoidným karcinómom.

**Diskusia a záver:** Imunohistochemicky verifikovaná expresia PD-L1 proteínu sa stala akceptovaným prediktívnym biomarkerom pre imunoterapiu pacientov s NSCLC. Naznačené rozdiely expresie podľa jednotlivých podtypov NSCLC vyžadujú verifikáciu vo väčších súboroch v korelácii s klinickými parametrami ochorenia v zmysle overenia jej použiteľnosti aj ako potenciálneho negatívneho prognostického faktora.

**Kľúčové slová:** liganda proteínu 1 programovanej smrti – nemalobunkový karcinóm pľúc – imunoterapia – prognostický ukazovateľ

## Clinicopathological analysis of programmed death-ligand 1 testing in tumor cells of 325 patients with non-small cell lung cancer: Its predictive and potential prognostic value

### SUMMARY

**Introduction:** Recent studies on check-point inhibitor therapy, which seems to improve the prognosis of patients with advanced non-small cell lung carcinoma increase the importance of immunohistochemical analyses of the programmed-death receptor and of its ligand, PD-L1 protein.

**Material and methods:** In our study we present results of PD-L1 immunohistochemical tumor cell expression in a series of 325 lung carcinoma patients biopsies, using the clone 22C3 (and DAKO Link 48 immunostainer). Evaluation of the expression using tissue proportion scoring system allowed to distinguish negative cases (either 0 % or < 1 % of positive tumor cells) versus positive cases in the categories 1-9 %, 10-49 % and  $\geq 50$  % of positive tumor cells.

**Results:** In association to histopathologic parameters we observed similar rates of positive expression in patients with adenocarcinoma types (47,8 % of all the cases) as well as with squamous cell carcinomas (44,4 %). Within these histological categories, the rates of positivity were similar also in patients with small versus large (resectional) biopsies. In the biopsies of patients with adenocarcinoma we identified differences in the PD-L1 protein expression associated with its histological subtype. In the cases with predominant lepidic pattern the PD-L1 positivity was present in 18,8 %, with predominant acinar or papillary pattern in 40,8 % and in cases with predominant solid or micropapillary component in 74,1 % of the cases resp. Keratinizing squamous cell carcinomas were positive in 38,5 % and non-keratinizing in 53,8 % of all the cases. The highest incidence of an extensive positivity was observed in sarcomatoid carcinoma type.

**Discussion and conclusion:** Immunohistochemically verified PD-L1 protein expression represents a broadly accepted predictive biomarker for immunotherapy of NSCLC patients. The indicated differences of the expression among various NSCLC types and subtypes require to be verified in larger cohorts of patients in relation with clinical parameters to demonstrate whether it could be plausible to use the PD-L1 expression in a role of a negative prognostic parameter.

**Keywords:** programmed death-ligand 1 – non-small cell lung cancer – immunotherapy – prognostic marker

Cesk Patol 2018; 54(3): 137–142

Pľúcny karcinóm je v našej populácii aj celosvetovo jednou z najčastejších príčin úmrtia na nádorové ochorenie, pričom majoritnú

časť prípadov predstavujú jeho typy (NSCLC). Ochorenie je v čase stanovenia diagnózy väčšinou pokročilé, metastatické a prognóza pacienta ostáva zlá. Používanie konvenčnej platinovej chemoterapie je spojené so závažnými vedľajšími účinkami, selekciu rezistentných klonov a neúspechmi v liečbe metastatického ochorenia. Rozvoj poznania molekulovej karcinogenézy NSCLC otvoril nové možnosti tzv. cielenej liečby istej podskupine pacientov so špecifickými genetickými alteráciami. Napriek jej klinickým benefitom u väčšiny pacientov po čase vzniká rezistencia na tieto terapeutické postupy. Aj preto je dopyt po nových liečebných modalitách vysoký.

### ✉ Adresa pre korešpondenciu:

prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.

ÚPA JLF UK a UNM

Kollárova 2, 03659 Martin, Slovensko

tel.: +421-43-4133002,

e-mail: plank@jfm.uniba.sk

NSCLC patrí biologicky medzi najkomplexnejšie formy rakoviny, ktorej bunky podliehajú početným genetickým a epigenetickým zmenám. Tie vedú k tvorbe tumor-asociovaných antigénov, potenciálne rozpoznateľných imunitným systémom. Nádorové bunky si však dokážu osvojiť špecifické mechanizmy imunitnej rezistencie. Jedným z nich je ich interferencia s tzv. imunitnými strážnymi bodmi, ktoré sprostredkujú fyziologickú imunitnú toleranciu (1). V kontexte liečby inhibítorami imunitných strážnych bodov sú dnes predmetom záujmu najmä signálne dráhy sprostredkované proteínovým receptorom programovanej smrti (ďalej PD-1, z angl. programmed death protein 1) a jeho ligandom (ďalej PD-L1). PD-1 je jeden z najdôležitejších inhibičných koreceptorov exprimovaných na aktivovaných T-lymfocytoch. Interakcia PD-1 s jeho hlavným ligandom PD-L1 (tiež označovaný ako B7-H1) spúšťa v T-lymfocytoch defosforylačnú dráhu, ktorá vedie k zníženiu signalizácie cez T-bunkový receptor, redukuje produkciu cytokínov a cytolytickú aktivitu T-buniek (2). Aberantná expresia PD-L1, pozorovaná v mnohých malignitách, predstavuje zásadný krok vo vývoji a progresii nádorového ochorenia (3,4). Pochopenie zvýšenej expresie PD-1 v nádor infiltrujúcich lymfocytoch a zvýšenej expresie PD-L1 v nádorových bunkách sa stalo podkladom úspechov anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie v celom rade solídnych aj hematologických malignít (2).

Keďže aj NSCLC predstavuje imunologicky ovplyvniteľnú skupinu nádorov, podobné liečebné modalitty sa začali uplatňovať aj v liečbe pacientov s NSCLC (5,6). To viedlo k pátraniu po potenciálne prediktívnych biomarkerov použiteľných v dennej bioplickej praxi. Pre indikovanie anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie sa tak ukázalo byť najužitočnejšie imunohistochemické (IHC) stanovenie expresie PD-L1 proteínu na membráne nádorových buniek (7,8), aj keď je spojené s pestrým komplexom problémov (9,10). V našej pilotnej štúdií sme analyzovali expresiu PD-L1 proteínu v sérii biopsií pacientov s NSCLC v snahe overiť možnosti jeho detekcie pre klinickú onkologickú prax a zistiť prevalenciu jeho expresie v jednotlivých podtypoch NSCLC pacientov v našej populácii.

## MATERIÁL A METODIKA

### Populácia vyšetrených pacientov

Analýza zahŕňa konzekutívnu sériu bioplických vyšetrení malých a veľkých biopsií 325 pacientov s NSCLC vyšetrených v období približne 11 mesiacov (1.9.2016-15.7.2017), pričom počas hodnoteného obdobia sa nevyskytol žiadny prípad opakovaného bioplického vyšetrenia toho istého pacienta. Biopsie fixované vo formalíne nám boli poslané buď priamo klinickým pracoviskom, alebo nepriamo (vo forme parafínových blokov) regionálnym patológom na diagnostické riešenie zahrňujúce molekulo-ge-netické analýzy. Počas implementácie metodiky sme vyšetrovali expresiu PD-L1 v biopsiách pacientov s NSCLC typu adenokarcinómu (AC) reflexne súbežne s verifikáciou typizácie a s testovaním tzv. driver genetických alterácií na dôkaz mutácie génu *EGFR*, ako aj alterácie *ALK*, resp. *ROS1* génov, vrátane IHC dôkazu im zodpovedajúcich proteínov. Po skončení implementácie sme v súlade s požiadavkou klinickej praxe reflexne vyšetrovali IHC expresiou PD-L1 proteínu len v prípadoch s diagnostikovaným AC, v ktorých sme nedokázali tzv. driver genetickú alteráciu. Na požiadanie klinického (pneumo-)onkológa sme potom vyšetrovali expresiu PD-L1 aj v prípadoch NSCLC typu skvamocelulárneho karcinómu (SCC), ojedinele aj s testovaním genetických alterácií.

### Verifikácia histologického (pod-)typu a „grading“ NSCLC

Histopatologický typ a podtyp NSCLC bol určovaný v súlade s klasifikáciou pľúcnych nádorov podľa SZO (11), resp. s klasifikáciou podľa IASLC/ATS/ERS z r. 2011 (12), čo umožňuje aj rozdelenie

nádorov do prognosticky rozdielnych skupín (11). Podľa uvedených princípov nádor diagnostikovaný vo veľkej biopsii ako predominantne lepidický AC zodpovedá G1, predominantne acinárny alebo predominantne papilárny podtyp AC G2, zatiaľčo predominantne solídny alebo predominantne mikropapilárny AC zodpovedajú G3. V prípade SCC sme v súlade s klasifikáciou SZO (11) použili rozdelenie prípadov na keratinizujúce verus nekeratinizujúce. V prípadoch tzv. malých biopsií sme používali len skupinovú diagnózu NSCLC typu AC verus SCC, resp. najskôr AC verus najskôr SCC.

### IHC dôkaz expresie PD-L1 proteínu

Na IHC analýzu expresie PD-L1 proteínu sme použili parafínové rezy bioplického materiálu a na revitalizáciu PT Link a roztok LpH (low pH) pri 96 °C po dobu 20 minút. IHC reakcia prebiehala v automate Autostainer Link 48 s použitím kitu PD-L1 IHC 22C3 PharmDx (RTU) v súlade s protokolom kitu a po laboratórnej validácii od 1.12.2016 aj monoklonálnu protilátku anti-PD-L1 (klon 22C3) v riedení 1:50 s inkubáciou cez noc. Prevažná časť vyšetrení expresie PD-L1 proteínu nášho súboru (n=302) bola robená s použitím kitu a menšia (n=23) s použitím monoklonálnej protilátky. Vo vyššie uvedenom procese validácie boli súčasne obidvomi postupmi vyšetrené vzorky 20 pacientov s rôznou už známou expresiou PD-L1, pričom pri hodnotení oboch postupov každej zo vzoriek boli zistené identické výsledky. Detekcia reakcie prebehla pomocou detekčného kitu EnVision Flex. Všetky uvedené reagenty a platformy boli zakúpené od spoločnosti (Dako/Agilent, Dánsko). Iné anti-PD-L1 protilátky v rámci tejto štúdie neboli použité. Každý beh v staineri prebiehal súčasne s použitím pozitívnej bunkovej kultúry (súčasť kitu), ako aj pozitívnej a negatívnej kontroly vlastného predtým verifikovaného a validovaného prípadu z nášho registra, a to aj pri vyšetreniach s protilátkou anti-PD-L1.

### Hodnotenie expresie PD-L1 proteínu

Hodnotenie výsledku sme vyjadrovali binárne (negatívny výsledok verus pozitívny), s využitím skórovacieho systému podľa tzv. TPS („tumor proportion score“). Za pozitívny výsledok expresie bola považovaná prítomnosť membránového farbenia akejkoľvek intenzity vo viac ako 1 % nádorových buniek. Absencia tohto nálezu alebo pozitívita v menej ako 1 % nádorových buniek boli klasifikované ako negatívny nález. V skupine prípadov s pozitívnym výsledkom expresie PD-L1 proteínu sme rozlišovali podskupiny s expresiou PD-L1 proteínu v 1-9 %, 10-49 % nádorových buniek a s expresiou PD-L1 proteínu v  $\geq 50$  % nádorových buniek. Príklady IHC expresie podľa jednotlivých kategórií sú uvedené v obr. 1-10.

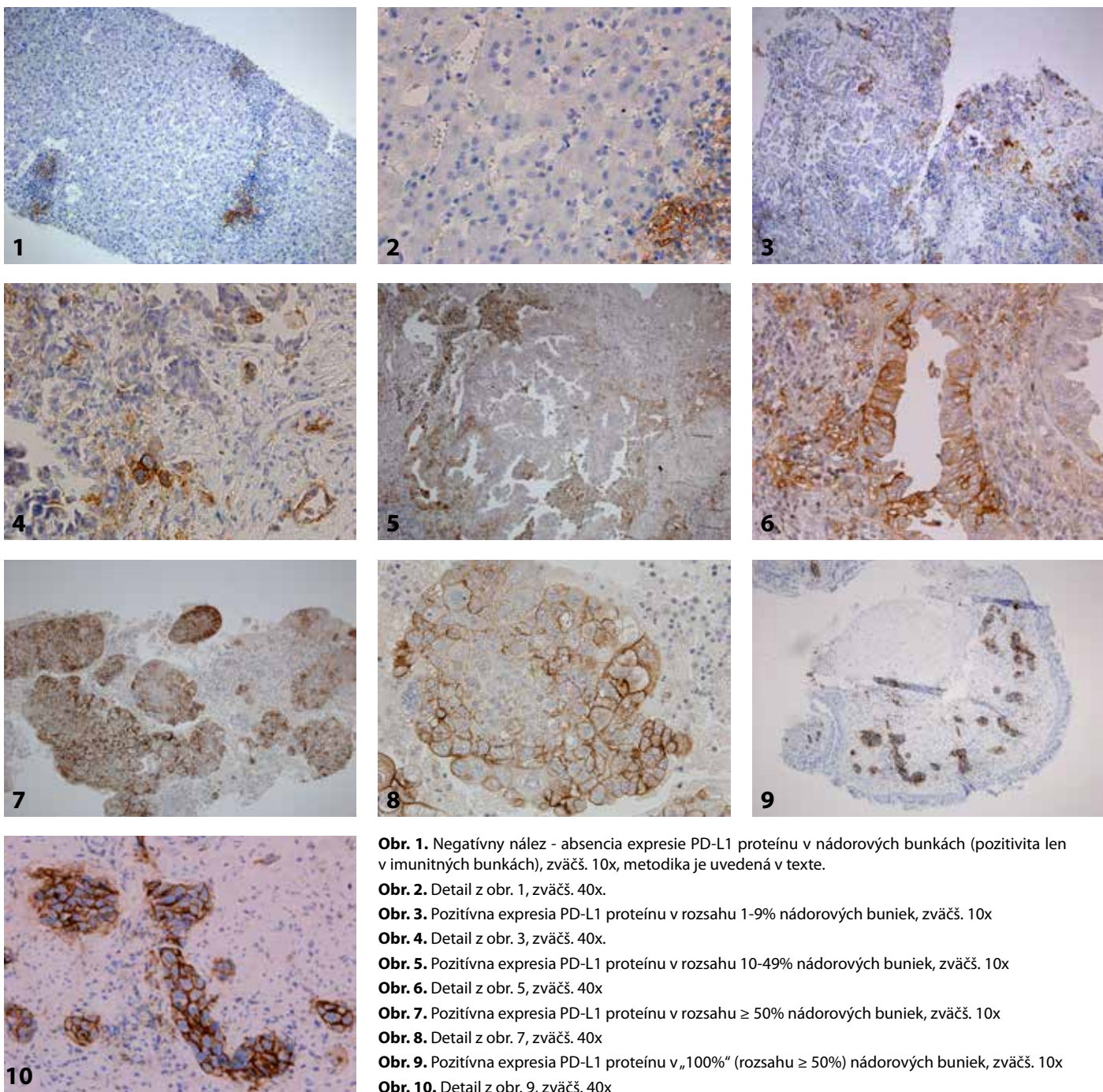
Pozn.: Za hodnotenie expresie každého prípadu zodpovedali AF a LP, na validácii expresie sa podieľal aj PS, pričom LP a PS získali európsky certifikát potvrdzujúci zaškolenie do uvedeného TPS hodnotenia expresie PD-L1 proteínu s klonom 22C3.

### Klinicko-patologická analýza expresie PD-L1 proteínu

Klinicko-patologickú analýzu predloženej série zahŕňa rozdelenie prípadov podľa typov, podtypov, stupňa diferenciacie, resp. výskytu genetickej alterácie, a to vždy vo vzťahu týchto parametrov ku expresii PD-L1 proteínu.

## VÝSLEDKY

Celkový počet pacientov zahrnutých do našej štúdie bol 325 s nasledovným podielom jednotlivých typov pľúcneho karcinómu: a) prevládajúcu skupinu 71,4 % prípadov tvoria pacienti s NSCLC typu AC (n=232), b) pacienti s NSCLC typu SCC tvoria približne 1/5 súboru (63 prípadov = 19,4 %) a c) 9,2 % prípadov sú pacienti s iným typom karcinómu. Podrobné výsledky typizácie



**Obr. 1.** Negatívny nález - absencia expície PD-L1 proteínu v nádorových bunkách (pozitivita len v imunitných bunkách), zväčš. 10x, metodika je uvedená v texte.

**Obr. 2.** Detail z obr. 1, zväčš. 40x.

**Obr. 3.** Pozitívna expícia PD-L1 proteínu v rozsahu 1-9% nádorových buniek, zväčš. 10x

**Obr. 4.** Detail z obr. 3, zväčš. 40x.

**Obr. 5.** Pozitívna expícia PD-L1 proteínu v rozsahu 10-49% nádorových buniek, zväčš. 10x

**Obr. 6.** Detail z obr. 5, zväčš. 40x

**Obr. 7.** Pozitívna expícia PD-L1 proteínu v rozsahu ≥ 50% nádorových buniek, zväčš. 10x

**Obr. 8.** Detail z obr. 7, zväčš. 40x

**Obr. 9.** Pozitívna expícia PD-L1 proteínu v „100%“ (rozsahu ≥ 50%) nádorových buniek, zväčš. 10x

**Obr. 10.** Detail z obr. 9, zväčš. 40x

a incidencie jednotlivých typov, resp. podtypov vyšetrených prípadov pľúcnych karcinómov sú uvedené prehľadne v *tab. č. 1*. V súbore prevládajú vyšetrenia IHC expície PD-L1 proteínu v prípadoch bez mutácie génu *EGFR*, resp. bez prestavby *ALK* a *ROS1* génu (n=302). V biopsiách 23 pacientov s NSCLC bola dokázaná genetická „driver“ alterácia a súčasne vyšetrená aj IHC expícia PD-L1, tieto prípady sú uvedené v *tab. č. 2*.

V celom analyzovanom súbore sme nezistili podstatné rozdiely:

- 1) medzi pozitívnou expíciou PD-L1 proteínu v prípadoch AC verus SCC, keď v skupine 232 pacientov s NSCLC typu AC bolo PD-L1 pozitívnych 47,4 % prípadov a v skupine 63 prípadov s SCC 44,4 % prípadov,
- 2) takisto ani medzi expíciou PD-L1 proteínu v identických typoch NSCLC v závislosti od veľkosti analyzovanej vzorky: v podskupine 114 pacientov s NSCLC typu AC diagnostikovaným vo veľkej biopsii bola pozitívita zistená v 45,6 % prípadov (n=52/114) a v podskupine 118 pacientov s AC verifikovaným v malej biopsii

v 49,1 % prípadov (n=58/118). V podskupine 39 pacientov s nádorom typu SCC diagnostikovaným v resekáte bola pozitívita zistená v 48,7 % prípadov (n=19/39) a v podskupine 24 pacientov s SCC zisteným v malej biopsii v 37,5 % prípadov (n=9/24).

Súčasne sme identifikovali nasledovné rozdiely expície PD-L1 proteínu:

a) pri binárnom rozlíšení, t.j. absencia PD-L1 pozitivity verus pozitívita ľubovoľného stupňa expície PD-L1 proteínu podľa predominantného typu AC, resp. keratinizácie SCC (len v prípadoch veľkých biopsií) a to nasledovne:

- v prípadoch AC s prevahou lepidického rastu bolo PD-L1 pozitívnych 18,8 % prípadov, v prípadoch s prevahou acinárneho alebo papilárneho rastu (G2 AC) 40,8 % a v biopsiách s prevahou solídneho alebo mikropapilárneho typu (G3 AC) 74,1 % prípadov,
- v prípadoch SCC bolo v skupine keratinizujúcich nádorov pozitívnych 38,5 % a v skupine nekeratinizujúcich SCC 53,8 % všetkých prípadov,

- b) pri porovnaní pozitivity s verifikovaným TPS  $\geq 50\%$  nádorových bunkách podľa jednotlivých histopatologických typov: táto pozitivita bola prítomná v 24,6 % prípadov AC a v 17,5 % prípadov SCC,
- c) v 9 z 10 prípadoch zo skupiny sarkomatoidných karcinómov (90 %) bola PD-L1 pozitívna v 1 prípade v rozmedzí 10-49 % a v 8 prípadoch (80 % všetkých) išlo o silnú pozitívitu s TPS  $\geq 50\%$ ,
- d) v súbore 23 prípadov NSCLC s dokázanou genetickou „driver“ alteráciou (tab. č. 2) bolo 13 pacientov s mutáciou génu *EGFR* (9 s aktivačnou a 4 s tzv. rezistentnou): v 4 prípadoch bol výsledok expresie PD-L1 negatívny, v 2 bola pozitívna na úrovni 1-9 %, v 5 na úrovni 10-49 % a v dvoch bolo TPS  $\geq 50\%$ . V skupine 10 pacientov s prestavbou génu *ALK1* (n=5) alebo *ROS1* (n=5) bol výsledok expresie PD-L1 negatívny v jednom prípade, v dvoch prípadoch bola pozitívna na úrovni 1-9 %, v štyroch bola expresia PD-L1 v rozmedzí 10-49 % a v troch v hodnote  $\geq 50\%$  nádorových buniek.

## DISKUSIA

V posledných rokoch imunoterapia preukázateľne prispela k zlepšeniu prognózy pacientov s pokročilým NSCLC a stala sa fakultatívnou liečebnou modalitou tohto ochorenia. Inhibítory anti-PD-1 (nivolumab a pembrolizumab) a najnovšie aj anti-PD-L1 (atezolizumab) boli najprv používané v druhej línii terapie, dnes už je pembrolizumab akceptovaný do prvej líniovanej liečby pacientov s vysokou hodnotou PD-L1 pozitivity (TPS  $\geq 50\%$ ) (13-15). Tak sa zároveň preukázala dôležitosť IHC stanovenia hodnoty PD-L1 v bioptickom materiáli NSCLC, lebo expresia PD-L1 proteínu je dosiaľ v klinickej praxi jediným reálne využívaným prediktívnym biomarkerom. Pri aplikácii anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie pacienti s PD-L1 pozitívnymi NSCLC vykazujú vyššiu celkovú odpoveď a dlhšie celkové prežívanie než PD-L1 negatívni pacienti (5,6,16). PD-L1 ale nie je dokonalý biomarker. Jeho negatívna nevyklučuje možnosť, že pacient bude profitovať z imunoterapie a naopak, približne polovica pacientov aj s vysokým stupňom PD-L1 pozitivity patrí v praxi medzi „non-res-

ponderov“ (17). Je zjavné, že sme na začiatku cesty hľadania a overovania ďalších biomarkerov. Už dnes sa uvažuje o korelácii produkcie PD-L1 proteínu s tvorbou neoantigénov pri súhľadnom počte genetických zmien v nádorovej bunke, či o korelácii s tzv. mutačnou náložou nádoru (18). Nami analyzovaná podskupina pacientov s dokázanou genetickou driver alteráciou je primárna na závažnejšiu výpoveď, aj keď istá tendencia v tomto smere je zrejme v podskupine NSCLC s prestavbou *ALK*, resp. *ROS1* génov.

Celkovo sme v rámci našej analýzy s použitím preddefinovanej IHC metodiky (klon 22C3) a kritérií hodnotenia (podľa odporúčaní výrobcu eseje) v súbore 325 vyšetrených prípadov pľúcneho karcinómu identifikovali 47,7 % (n=155) prípadov s pozitívitou a 52,3 % (n=170) prípadov bez expresie PD-L1 proteínu. Literárne sa pozitivita PD-L1 v NSCLC udáva v rozmedzí od 20 % do 70 % prípadov (19-23). Ideálna hranica hodnoty „cut-off“ pre pozitívitu tejto expresie stále nie je jednoznačne určená a v klinických štúdiách použité hodnoty predstavujú len arbitrárne číslo. Taktiež nie je spoľahlivo zodpovedaná otázka reprodukovateľnosti IHC expresie PD-L1 proteínu pri použití odlišných esejí od rôznych výrobcov pri hodnotení expresie PD-L1 v nádorových a ešte menej v imunitných bunkách. Predbežné výsledky projektu vedeného snahou o rozriešenie daného problému (tzv. Blueprint) ale poukazujú na skutočnosť, že zámenné používanie niektorých klonov (22C3, 28-8 a SP263) je pravdepodobne legítimne (9,10). Preto je celosvetovo netrepeživo očakávaná štandardizácia a unifikácia IHC metodík na dôkaz PD-L1 proteínu a jeho hodnotenia.

Ďalšie zložitosť vyšetrenia PD-L1 proteínu súvisia s dynamikou jeho expresie počas evolúcie ochorenia, vrátane fenoménu vnútronádorovej heterogenity. Aj keď to vedie k pochybnostiam o výpovednej hodnote malých biopsií (24), tak výsledky našej analýzy tu ponúkajú optimistickjší pohľad. Incidencia PD-L1 pozitívnych prípadov v kategórii NSCLC typu AC bola porovnateľná pri vyšetrení malých (49,1 %) a veľkých biopsií (45,6 %). Len v kategórii SCC bol záchyt pozitívnych prípadov menší v podskupine malých biopsií (37,5 % versus 48,7 %), čo môže byť ovplyvnené menším počtom testovaných prípadov SCC v porovnaní s nádormi typu AC v dôsledku zvoleného algoritmu vyšetrení.

**Tabuľka č. 1.** Expresia PD-L1 v jednotlivých histologických podtypoch NSCLC.

Adenokarcinómy (232)					
	Predominantný histologický typ	PD-L1			
		Negat.	1-9 %	10-49 %	$\geq 50\%$
Veľké biopsie (114)	Lepidický (16)	13 (81,25 %)	0	1 (6,25 %)	2 (12,5 %)
	Acinárny (54)	32 (59,26 %)	7 (12,96 %)	6 (11,11 %)	9 (16,67 %)
	Papilárny (17)	10 (58,82 %)	3 (17,65 %)	3 (17,65 %)	1 (5,88 %)
	Mikropapilárny (3)	0	0	2 (66,67 %)	1 (33,33 %)
	Solidný (24)	7 (29,17 %)	2 (8,33 %)	6 (25 %)	9 (37,5 %)
Malé biopsie (118)	NSCLC	60 (50,85 %)	9 (7,63 %)	14 (11,86 %)	35 (29,66 %)
Skvamocelulárne karcinómy (63)					
	Diferenciácia	PD-L1			
		Negat.	1-9 %	10-49 %	$\geq 50\%$
Veľké biopsie (39)	Keratinizujúce (13)	8 (61,54 %)	1 (7,69 %)	3 (23,08 %)	1 (7,69 %)
	Nekeratinizujúce (26)	12 (46,15 %)	2 (7,69 %)	6 (23,08 %)	6 (23,08 %)
Malé biopsie (24)	NSCLC	15 (62,5 %)	4 (16,67 %)	1 (4,17 %)	4 (16,67 %)
Iné karcinómy (30)					
		PD-L1			
		Negat.	1-9 %	10-49 %	$\geq 50\%$
Veľké biopsie (30)	Adenosquamózne (7)	3 (42,86 %)	1 (14,29 %)	0	3 (42,86 %)
	Malobunkové (6)	5 (83,33 %)	0	1 (16,67 %)	0
	Veľkobunkové (7)	4 (57,14 %)	2 (28,57 %)	0	1 (14,29 %)
	Sarkomatoidné (10)	1 (10 %)	0	1 (10 %)	8 (80 %)

**Tabuľka č. 2.** Expresia PD-L1 proteínu v biopsiách 23 pacientov s NSCLC s pozitívnou „driver“ genetickou alteráciou (mutáciou *EGFR* génu, resp. prestavbou *ALK* alebo *ROS1* génu).

Typ NSCLC	mutácie génu <i>EGFR</i>			prestavba génu <i>ALK</i>	prestavba génu <i>ROS1</i>	expresia PD-L1 proteínu
	aktivačné		rezistentné			
	exon 19 delécia	exon 21 mutácia (L858R)	exon 20 inzercia			
Acinárny AC n=5	1	1	1			0
	1			1		1-9 % 10-49 %
Papilárny AC n=6	1					0
			1	1	1	1-9 % 10-49 %
Solídny AC n=1	1					10-49 %
NSCLC skôr AC n=7					1	0
	1			1		1-9 % 10-49 %
	1			1	2	≥ 50 %
Skvamocelulárny karcinóm n=1			1			10-49 %
Adenoskvamózny karcinóm n=1				1		10-49 %
Sarkomatoidný karcinóm n=2		1				10-49 %
		1				≥ 50 %

Klinicko-patologické charakteristiky PD-L1 exprimujúcich NSCLC nie sú stále dokonale objasnené. Recentné metaanalýzy nezistili signifikantný rozdiel v hodnote pozitívnej expresie PD-L1 proteínu v pľúcnych AC pri porovnaní so SCC (25,26). V absolútnom počte všetkých nami hodnotených AC a SCC sme dospeli k podobným výsledkom aj my. Incidencia prípadov našej série s TPS  $\geq$  50 % nádorových buniek však bola vyššia v kategórii AC, čo môže opäť súvisieť s už konštatovaným limitom podskupiny pacientov s SCC. Aj keď pľúcne AC predstavujú biologicky veľmi heterogénnu skupinu nádorov, tak väčšina prác pri hodnotení expresie PD-L1 proteínu ich uvádza ako celok bez ďalšieho typizačného delenia. Počet štúdií, ktoré sa zaoberajú expresiou PD-L1 v jednotlivých histologických podtypoch pľúcnych AC je tak relatívne obmedzený. Situáciu tu komplikuje aj skutočnosť, že subtypizácia NSCLC typu AC diagnostikovaného v resekčnej biopsii do piatich základných rastových vzorov vlastne nahrádza absenciu celosvetovo akceptovaného gradingu týchto nádorov (11). Pri známej vnútronádorovej heterogenite je pre prognosticky-asociovaný „grading“ rozhodujúci predominantný rastový vzor a nie (na rozdiel od princípov gradingu iných karcinómov) prítomnosť najmenej diferencovanej komponenty (11, 12).

V tomto kontexte naša analýza prípadov s použitím recentných klasifikácií NSCLC (11,12) umožňuje poukázať na trend stúpajúcej pozitivity PD-L1 od prípadov s prevahou vzoru typu lepšie diferencovaného AC až po prípady s prevahou menej diferencovaných foriem. PD-L1 pozitívne prípady pľúcnych AC v našej sérii prípadov boli menej časté v nádoroch predominantne lepidického podtypu a častejšie v nádoroch predominantne solídneho podtypu. Toto zistenie je podporované výsledkami iných autorov, ktorí diskutujú o asociácii pozitívnej expresie PD-L1 proteínu s vlastnosťami nádoru ako sú nízka diferenciácia a solídny rast AC (22,27-28). Podobný trend sme pozorovali aj v prípade SCC, kedy pozitivita bola vyznačená vo viac než 1/2 (53,8 %) menej diferencovaných a v 38,5 % prípadov dobre diferencovaných prípadov. Obzvlášť vysoká incidencia PD-L1 pozitivity bola pozorovaná v skupine sarkomatoidných karcinómov s prevahou silnej pozitivity (TPS  $\geq$  50 %) v prevažnej väčšine (80 %) prípadov. K podobným konštatovaniam o vyššej PD-L1 expresii (v rozmedzí 53-90 %) v sarkomatoidnom karcinóme v porovnaní s konvenčnými NSCLC dospeli aj viaceré publikované pozorovania (29,30,31). Tento jav môže súvisieť aj s asociáciou expresie PD-L1 so zvýšenou expresiou vimentínu a zníženou E-cadherínu, t.j. s fenotypom epitelovo-mezenchýmového prechodu (28). Induktorom uvedeného prechodu je aktivácia ZEB1 cestou supresie miR-200, čo súčasne zvyšuje expre-

siu PD-L1 a následne znižuje protinádorovú imunitu a dôsledkom je vyššia migrácia, metastatický potenciál a agresivita nádoru (32).

Ak sa trendy zvyšovania expresie PD-L1 v závislosti od stupňa diferenciácie a nadobúdania fenotypu epitelovo-mezenchýmového prechodu potvrdia na väčšom súbore prípadov, tak môžu prispieť k diskusii o potenciáli prognostického významu expresie PD-L1 v pľúcnych karcinómoch. Pri analýze literárnych údajov je totiž zrejma protirečivosť údajov podľa rôznych autorov. Niektorí vyššiu expresiu PD-L1 v NSCLC považujú za negatívny (22,28,33), iní za pozitívny prognostický faktor (20,34) a časť autorov žiadny prognostický význam nepotvrdila (19,35). Rozdiely môžu súvisieť s už diskutovanými problémami vyšetovania PD-L1 proteínu, s reprezentatívnosťou hodnotených súborov, s rozdielmi v ich populačných charakteristikách a pod. My sa na základe zistenia, že IHC pozitivita PD-L1 je častejšie a vyššie exprimovaná v menej diferencovaných prevládajúcich typoch pľúcneho karcinómu prikláňame k názoru o potrebe verifikácie tohto trendu vo väčších súboroch v korelácii s klinickými parametrami ochorenia. To by pripustilo možnosť selekcie pacientov pre indikovanie imunoterapie. Napríklad pre pacientov s predominantne solídny AC, t.j. podtypom NSCLC s nepriaznivou prognózou a silno asociovaným s farmakologicky nenapadnuteľnými mutáciami génu KRAS (36) by sa anti-PD-1/PD-L1 imunoterapia mohla stať vhodnou liečebnou alternatívou.

Záverom možno zhrnúť, že expresia PD-L1 proteínu nádorovými bunkami odzrkadľuje potenciálne aktívne imunitné mikroprostredie. Napriek všetkým aj tu diskutovaným problémom dnes predstavuje nezávislý prediktívny parameter, ktorý dosiaľ najtesnejšie koreluje s úspechom anti-PD-1/PD-L1 imunoterapie (37,38). Hlbšie pochopenie imunitného profilu „responderov“ a „non-responderov“ IHC komplexnými anlyzami expresie génov nádoru a jeho mikroprostredia určite v blízkej budúcnosti objasnia protinádorové imunitné mechanizmy, prispedia k využitiu inhibítorov imunitných kontrolných bodov a potenciálne môžu viesť k objaveniu nových terapeutických metód. V predkladanej štúdiu, ktorá je podľa našich znalostí prvá svojho druhu v rámci Česka a Slovenska, prezentujeme výsledky IHC analýzy expresie PD-L1 na 325 vzorkách pľúcnych karcinómoch v závislosti od typu a podtypu nádoru.

## PREHLÁSENIE

Autor práce prehlasuje, že v súvislosti s témou, vznikom a publikovaním tohto článku nie je v konflikte záujmov a vznik ani publikovanie článku neboli podporené žiadnou farmaceutickou firmou. Toto prehlásenie sa týka i všetkých spoluautorov.

## LITERATÚRA

- Pardoll DM.** The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(4): 252-264.
- Chen DS, Mellman I.** Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013; 39(1):1-10.
- Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al.** Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20(19): 5064-5074.
- Patel SP, Kurzrock R.** PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(4): 847-856.
- Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, et al.** Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33(18): 2004-2012.
- Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, et al.** Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicenter, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10030): 1837-1846.
- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al.** Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26): 2443-2454.
- Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al.** Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20(19): 5064-5074.
- Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al.** PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 2017; 12(2): 208-222.
- Matěj R.** Hodnocení exprese PD-L1 u tzv. nemalobuněčných karcinomů plic je a bude složité. *Cesk Patol* 2017; 53(3): 113.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG,** eds. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart (4th ed). Lyon, IARC; 2015.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al.** International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6(2): 244-285.
- Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, et al.** FDA approval summary: nivolumab for the treatment of metastatic non-small cell lung cancer with progression on or after platinum-based chemotherapy. *Oncologist* 2016; 21(5): 634-642.
- Sul J, Blumenthal GM, Jiang X, He K, Keegan P, Pazdur R.** FDA approval summary: pembrolizumab for the treatment of patients with metastatic non-small cell lung cancer whose tumors express programmed death-ligand 1. *Oncologist* 2016; 21(5): 643-650.
- Seetharamu N, Preeshagul IR, Sullivan KM.** New PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer - impact of atezolizumab. *Lung Cancer* 2017; 8:67-78.
- 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.
- Gridelli C, Ardizzoni A, Barberis M, et al.** Predictive biomarkers of immunotherapy for non-small cell lung cancer: results from an Experts Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology. *Transl Lung Cancer Res* 2017; 6(3): 373-386.
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al.** Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 2015; 348(6230): 124-128.
- Boland JM, Kwon ED, Harrington SM, et al.** Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Lung Cancer* 2013; 14(2): 157-163.
- Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al.** Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 2014; 94(1): 107-116.
- Yang CY, Lin MW, Chang YL, Wu CT, Yang PC.** Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer* 2014; 50(7): 1361-1369.
- Zhang Y, Wang L, Li Y, et al.** Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *Oncotargets Ther* 2014; 7: 567-573.
- Mao Y, Li W, Chen K, et al.** B7-H1 and B7-H3 are independent predictors of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2015; 6(5): 3452-3461.
- Ilie M, Long-Mira E, Bence C, et al.** Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol* 2016; 27: 147-153.
- Wang A, Wang HY, Liu Y, et al.** The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2015; 41(4): 450-456.
- Pan ZK, Ye F, Wu X, An HX, Wu JX.** Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis* 2015; 7(3): 462-470.
- Koh J, Go H, Keam B, et al.** Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod Pathol* 2015; 28(9): 1154-1166.
- Shimoji M, Shimizu S, Sato K, et al.** Clinical and pathologic features of lung cancer expressing programmed cell death ligand 1 (PD-L1). *Lung Cancer* 2016; 98: 69-75.
- Kim S, Kim MY, Koh J, et al.** Programmed death-1 ligand 1 and 2 are highly expressed in pleomorphic carcinomas of the lung: Comparison of sarcomatous and carcinomatous areas. *Eur J Cancer* 2015; 51(17): 2698-2707.
- Vieira T, Antoine M, Hamard C, et al.** Sarcomatoid lung carcinomas show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1) and strong immune-cell infiltration by TCD3 cells and macrophages. *Lung Cancer* 2016; 98: 51-58.
- Chang YL, Yang CY, Lin MW, Wu CT, Yang PC.** High co-expression of PD-L1 and HIF-1 $\alpha$  correlates with tumour necrosis in pulmonary pleomorphic carcinoma. *Eur J Cancer* 2016; 60: 125-135.
- Chen L, Gibbons DL, Goswami S et al.** Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 2014; 5: 5241.
- Sun JM, Zhou W, Choi YL, et al.** Prognostic Significance of PD-L1 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Large Cohort Study of Surgically Resected Cases. *J Thorac Oncol* 2016; 11(7): 1003-1011.
- Schmidt LH, Kümmel A, Görlich D, et al.** PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups. *PLoS One* 2015; 10(8): e0136023.
- Kim MY, Koh J, Kim S, Go H, Jeon YK, Chung DH.** Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers. *Lung Cancer* 2015; 88: 24-33.
- Rekhtman N, Ang DC, Riely GJ, Ladanyi M, Moreira AL.** KRAS mutations are associated with solid growth pattern and tumor-infiltrating leukocytes in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2013; 26(10): 1307-1319.
- Abdel-Rahman O.** Correlation between PD-L1 expression and outcome of NSCLC patients treated with anti-PD-1/PD-L1 agents: A meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 101(1): 75-85.
- Sacher AG, Gandhi L.** Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: A review. *JAMA Oncol* 2016; 2(9): 1217-1222.