

Fundação Pio XII
Instituto de Ensino e Pesquisa

**EFICÁCIA DOS INIBIDORES DE *CHECKPOINTS* IMUNOLÓGICOS NO TRATAMENTO DO
CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS (CPCNP) E O PAPEL DA EXPRESSÃO
GÊNICA E OUTROS BIOMARCADORES COMO PREDITORES DE RESPOSTA**

Pedro De Marchi

Tese para obtenção título de doutorado

Banca de Defesa

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Co-Orientador: Dr. Vladmir Claudio Cordeiro
de Lima

Barretos, SP

Outubro 2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pedro De Marchi

EFICÁCIA DOS INIBIDORES DE *CHECKPOINTS* IMUNOLÓGICOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS (CPCNP) E O PAPEL DA EXPRESSÃO GÊNICA E OUTROS BIOMARCADORES COMO PREDITORES DE RESPOSTA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.

Instituição:

Prof. Dr.

Instituição:

Prof. Dr.

Orientador:

Prof. Dr.

Presidente da Banca Examinadora

Este trabalho recebeu apoio do Ministério Público do Trabalho (MPT).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do MPT.

No presente trabalho o nome dos genes identificados na nova assinatura foram anonimizados para possibilitar a futura proteção intelectual dos achados, seguindo o protocolo instituído pela Comissão de Proteção Intelectual do Hospital de Câncer de Barretos Fundação Pio XII.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Dedico este trabalho à minha amada esposa, eterna namorada, amiga e parceira de todas as horas Rebeca Grasel que tornou sonhos em realidade e esteve sempre ao meu lado, aos meus filhos Alice e Samuel que me apresentaram a um amor genuíno, aos meus pais que me transmitiram os valores da educação e do trabalho, e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente com esse projeto.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Rui Manuel Reis pelo exemplo de liderança, profissionalismo, bom senso e também pela oportunidade e confiança a mim depositadas. A ele minha mais profunda admiração e respeito.

Ao meu co-orientador Dr. Vladmir Claudio Cordeiro de Lima pelo exemplo de dedicação à medicina, aos estudos e à ciência. Obrigado pelas orientações, sugestões e críticas.

Aos membros das minhas bancas de acompanhamento e qualificação, Dr. Vinícius de Lima Vazquez e Dr. Gilberto Lopes pelas sugestões, orientações e críticas.

À Dra. Letícia Ferro Leal pelo exemplo de dedicação e profissionalismo, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, pelo engajamento e liderança do nosso grupo translacional, pela empolgação nas manhãs de segunda-feira e principalmente pela amizade que persiste apesar da distância.

À Dra. Luciane Sussuchi da Silva pelas análises de bioinformática, pelos ensinamentos, pelo apoio e por decifrar o indecifrável.

Ao Dr. Vinícius Duval e ao Dr. Caetano da Silva pelo suporte, ensinamentos, análises de patologia e amizade.

Ao Mestre Rodrigo Cavagna e ao Dr. Gustavo Noriz pelo apoio e pelas análises de MSI.

Ao oncologista Flávio Augusto da Silva pelo apoio no levantamento de dados clínico e pela amizade.

Ao Dr. Augusto Obuti Saito e à equipe do Hospital A.C.Camargo pelo levantamento dos dados clínicos e fornecimento das amostras para as análises moleculares.

Aos meus ex-colegas de departamento e eternos amigos oncologistas, Josiane Mourão e Gustavo Dix pela compreensão nos momentos de ausência, parceria e apoio incondicional.

Ao Prof. Molina e sua equipe pelo apoio e por terem viabilizado a validação dos resultados.

Ao Hospital de Câncer de Barretos por ter me recebido ainda recém formado, pelas oportunidades oferecidas e por ter me permitido andar entre gigantes.

Aos Departamentos de Oncologia Clínica e de Cirurgia de C&P e Tórax do Hospital de Câncer de Barretos pelos anos de convivência.

Ao CPOM por ter viabilizado as análises moleculares por meio de sua infraestrutura, equipamentos e recursos humanos.

Ao Grupo Translacional de Oncologia Torácica (GTOP) pelo suporte, pelas discussões, pelo aprendizado e acima de tudo pelo ensinamento quanto à importância do trabalho em equipe.

À Oncoclínicas pelo apoio e incentivo para que eu conseguisse finalizar essa etapa da minha carreira.

E por fim, obrigado aos pacientes e seus familiares que diariamente nos inspiram a melhorar, e nos trazem lições de superação e de vida.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de pulmão	1
1.2	Uma breve história da imunoterapia no tratamento do câncer	6
1.2.1	O começo	6
1.2.2	A hipótese da imunovigilância do câncer	6
1.2.3	BCG (<i>Bacille Calmette-Guérin</i>) intravesical	8
1.2.4	Citocinas	8
1.2.5	Interferon (IFN)	9
1.2.6	Interleucina-2 (IL-2)	10
1.2.7	Anticorpos monoclonais	10
1.2.8	Vacinas terapêuticas	11
1.2.9	Inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos (ICIs)	12
1.3	Inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos (ICI) no tratamento do câncer de pulmão avançado	14
1.3.1	ICI como segunda linha de tratamento	14
1.3.2	ICI como primeira linha de tratamento	16
1.3.2.1	Tumores com alta expressão de PD-L1	16
1.3.2.2	Tumores com expressão PD-L1 positiva	17
1.3.2.3	Tumores com expressão PD-L1 positiva ou negativa	18
1.3.3	Tumores com alta instabilidade de microssatélite (MSI-H) ou deficiência de <i>mismatch repair</i> (dMMR)	18
1.4	Biomarcadores preditivos de resposta aos ICI	19
1.4.1	Expressão de PD-L1	19
1.4.2	Carga mutacional (TMB - <i>Tumor Mutation Burden</i>)	20
1.4.3	Infiltrado linfocitário (TIL – <i>Tumor-Infiltrating Lymphocyte</i>)	22

1.4.4	Assinaturas de expressão gênica (GEP – <i>Gene Expression Profile</i>)	22
2.	JUSTIFICATIVA	24
3.	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo primário	25
3.2	Objetivos secundários	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Desenho do estudo	26
4.2	População do estudo	26
4.3	Critérios de elegibilidade	26
4.4	Coleta de dados	26
4.5	Extração de RNA, análise da expressão gênica por <i>NanoString</i>	27
4.6	Imunoistoquímica (IHQ) para expressão de PD-L1	28
4.7	Instabilidade de microssatélite (MSI - <i>Microsatellite Instability</i>)	29
4.8	Infiltrado tumoral inflamatório	30
4.9	Considerações estatísticas	31
4.9.1	Tamanho da amostra	31
4.9.2	Análises estatísticas	31
4.10	Análise de validação da assinatura imune	33
4.11	Considerações éticas	33
5.	RESULTADOS	34
5.1	Características clínico-patológicas	34
5.2	Taxa de resposta, sobrevida global, sobrevida pós-imunoterapia e sobrevida livre de progressão	36
5.2.1	Taxa de resposta	36

5.2.2	Sobrevida global	36
5.2.3	Sobrevida pós-imunoterapia (SPI)	39
5.2.4	Sobrevida livre de progressão (SLP)	43
5.3	Quimioterapia combinada à terapia anti-PD-1 e anti-CTLA4 (<i>doublet</i> de platina + nivolumabe + ipilimumabe)	44
5.4	Anti-PD-1 (pembrolizumabe) no cenário de Saúde Pública – primeira experiência brasileira	59
5.5	Expressão de PD-L1 por Tumor Proportion Score (TPS) e Combined Proportion Score (CPS)	60
5.6	Pesquisa de instabilidade de microsatélites (MSI)	67
5.7	Infiltrado tumoral inflamatório	69
5.8	Expressão gênica por NanoString (GEP – <i>gene expression profile</i>)	71
5.8.1	Assinaturas de expressão gênica	71
5.8.2	Predição por LASSO (<i>least absolute shrinkage and selection operator</i>)	79
5.8.3	Análise de validação da assinatura imune	88
5.9	Combinação de biomarcadores	90
5.9.1	Expressão de PD-L1 por IHQ e expressão <i>CD274</i>	90
5.9.2	Sobrevida pós-imunoterapia de acordo com <i>status</i> de PD-L1 e escore imune	92
6.	DISCUSSÃO	94
7.	CONCLUSÃO	107
8.	REFERÊNCIAS	108
	ANEXO A – Painel <i>PanCancer IO 360</i> (NanoString Technology) – lista de genes	124
	ANEXO B – Assinaturas de expressão gênicas	126

ANEXO C – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos	135
ANEXO D – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo	143

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Subtipos histológicos e moleculares do câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). SqCC: carcinoma de células escamosas; AdC: adenocarcinoma. 20 3
- Figura 2 – Mecanismo de ação das drogas anti-CTLA4 e anti-PD-(L)1. À esquerda da figura nota-se o bloqueio com anti-CTLA4 inibindo a interação entre a célula dendrítica e a célula T, dentro do linfonodo. À direita da figura nota-se o bloqueio com anti-PD-(L)1 inibindo a interação entre a célula T e a célula tumoral, no microambiente tumoral. CTLA-4 = *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; MHC = *major histocompatibility complex*; PD-1 = *programmed death-1*; PD-L1 = *programmed death ligand 1*; TCR = *T-cell receptor*. Figura adaptada.¹⁰⁶ 14
- Figura 3 – Curva de sobrevida global (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier, dos 135 portadores de CPCNP incluídos no estudo. A mediana de seguimento foi de 27,7 meses e a mediana de sobrevida global foi de 27,5 meses. 37
- Figura 4 – Curvas de sobrevida global (em meses) pelo método de Kaplan-Meier de acordo com resposta ao tratamento imunoterápico: (A) resposta completa ou parcial ou doença estável *versus* progressão de doença; (B) resposta completa *versus* resposta parcial *versus* doença estável *versus* progressão de doença. mSG: mediana de sobrevida global 38
- Figura 5 – Curva de sobrevida pós-imunoterapia (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier dos 135 portadores de CPCNP incluídos no estudo. 39
- Figura 6 – Curvas de sobrevida pós-imunoterapia (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com (A) resposta ao tratamento imunoterápico e (B) expressão de PD-L1. mSPI: mediana de sobrevida pós-imunoterapia; RC: resposta completa; RP: resposta parcial; DE: doença estável; PD: progressão de doença. 40
- Figura 7 – Curvas de SPI (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com (A) esquema de tratamento e (B) linha de tratamento. mSPI: mediana de sobrevida pós-imunoterapia. 42

- Figura 8 – Curvas de SLP (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier (A) de toda a população; (B) de acordo com expressão de PD-L1; (C) de acordo com resposta ao tratamento e (D) de acordo com linha de tratamento. 43
- Figura 9 – Curvas de SPI (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de pacientes tratados com pembrolizumabe no SUS (todos os tumores apresentavam PD-L1 $\geq 50\%$). NA: não atingida 60
- Figura 10 - Análise de fragmento do caso MSI-H exibindo instabilidade dos 6 marcadores. 68
- Figura 11 – Fotomicrografias representativas de reações de imunistoquímica para avaliação de células do infiltrado inflamatório. (A) CD8+, (B) CD25+ e (C) CD68+. Coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina). Aumento 400x. 69
- Figura 12 – Curvas de SPI (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier quanto ao infiltrado inflamatório (CD8, CD25, C68 e os scores de CD8+CD68 e (CD8+CD68)/CD25. 70
- Figura 13 – Média geométrica de genes *housekeeping* de cada amostra. Em verde, amostras com contagens adequadas (incluídas). Em cinza, amostras com contagens limítrofes, entre 32 e 100 (incluídas). Em vermelho, amostras com contagens abaixo do limiar mínimo 32 (excluídas). 71
- Figura 14 – *Heatmap* com 43 assinaturas referente aos 66 pacientes incluídos na análise. 73
- Figura 15 – Assinaturas relacionadas a perda de expressão sem nenhum caso identificado (*MMR Loss, MSI predictor e APM Loss*) 74
- Figura 16 – Assinaturas relacionadas a perda de expressão com casos identificados (*JAKSTAT Loss, Hypermutation*). 75
- Figura 17 – *Forest plot* de sobrevida pós-imunoterapia que demonstra distribuição da mediana de razão de risco e os intervalos de confiança (95%) não ajustados para cada assinatura. 76

Figura 18 – *Volcano plot* de sobrevida pós-imunoterapia exibe a razão de risco e a significância de cada assinatura (valor p). As assinaturas que têm maior significância estatística aparecem mais alto no gráfico com pontos maiores e mais escuros, enquanto as assinaturas que têm razões de risco mais extremas aparecem mais longe do centro do gráfico. As assinaturas mais à direita estão associadas a um risco reduzido de um evento em relação à linha de base e as assinaturas mais à esquerda estão associadas a um maior risco de um evento em relação à linha de base. As linhas horizontais indicam o valor p ajustado de 0,01 e 0,05. Quando os valores p ajustados variam acima de 0,05, os limites não são mostrados no gráfico. 77

Figura 19 – Curvas de sobrevida pós-imunoterapia (em dias) avaliada pelo método de Kaplan-Meier dos 66 portadores de CPCNP incluídos na análise em relação às assinaturas gênicas IFN Gamma (gráfico de cima) e TIS (gráfico de baixo). 78

Figura 20 – Expressão de RNA, em log₂, para cada uma das 78 amostras analisadas. As cores representam diferentes experimentos. 79

Figura 21 – *Heatmap* de expressão gênica (770 genes) dos 70 pacientes analisados (eixo y=pacientes; eixo X=genes), figura adaptada. 80

Figura 22 – *Heatmap* de expressão gênica (seis genes) dos 66 pacientes analisados (eixo y=pacientes; eixo X=genes) 83

Figura 23 – Curvas de sobrevida pós-imunoterapia (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com escore imune de 6 genes definido pelo teste do LASSO. 84

Figura 24 – (A) Casos ordenados conforme escore (eixo x), e relação com status de sobrevida e o corte utilizado para o escore imune; (B) Sobrevida pós-imunoterapia vs escore imune vs status de sobrevida. 85

Figura 25 – Curvas ROC para os cortes de 12, 18 e 24 meses relativos à sobrevida pós-imunoterapia. 86

- Figura 26 – Curvas de sobrevida livre de progressão (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com *score* imune de 6 genes definido pelo teste do LASSO. 87
- Figura 27 – Curvas de sobrevida pós-imunoterapia (A) e sobrevida livre de progressão (B) (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com *score* imune de 6 genes definido pelo teste do LASSO, na coorte de validação do estudo. 90
- Figura 28 – *Boxplot* demonstrando correlação entre expressão PD-L1 por IHC (eixo X) e expressão gênica normalizada de PD-L1 (*CD274*). 91
- Figura 29 – Curva ROC para definição de PD-L1 positivos de acordo com expressão de *CD274*. 92
- Figura 30 – Curvas de sobrevida pós-imunoterapia avaliadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com subgrupos definidos conforme expressão de *CD274* (H: positivos; L: negativos) e conforme *score* imune (H: alto; L: baixo) 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais diferenças entre as vias de sinalização a partir da ativação CTLA4 e PD-(L)1	13
Tabela 2 - Classificação do nível de expressão e padrões de coloração PD-L1 avaliados por imunohistoquímica.	29
Tabela 3 – Características clínico-patológicas e de tratamento dos 135 portadores de CPCNP tratados com terapia anti-PD-(L)1	34
Tabela 4 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP tratados com pembrolizumabe (anti-PD-1) no sistema público de saúde.	59
Tabela 5 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP testados para MSI (N = 526).	67
Tabela 6 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP tratados com ICI e incluídos na análise de expressão gênica	72
Tabela 7 - Genes associados a SPI através de análise univariada (N=72).	81
Tabela 8 – Genes e seus coeficientes, selecionados através do teste do LASSO para sobrevida pós-imunoterapia.	83
Tabela 9 – Resposta radiológica (de acordo com RECIST 1.1) conforme score imune, alto ou baixo.	87
Tabela 10 – Características clínico-patológicas dos 66 pacientes da coorte do estudo e dos 39 pacientes da coorte de validação.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
BCG	-	Bacille Calmette-Guérin
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CPCNP	-	Câncer de pulmão de células não-pequenas
CPCP	-	Câncer de pulmão de células pequenas
CPOM	-	Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular
CPS	-	Combined positive score
CTLA4	-	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>
DE	-	Doença estável
dMMR	-	Deficiência mismatch repair
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
ECOG	-	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
FDA	-	Food and Drug Administration
FOVs	-	<i>Fields of view</i>
GEP	-	Gene Expression Profile
HCB	-	Hospital de Câncer de Barretos
ICIs	-	Inibidores de <i>checkpoints</i> imunológicos
IFN	-	Interferon
IHQ	-	Imunoistoquímica
IL-2	-	Interleucina-2
MSI-H	-	Metastático com alta instabilidade de microssatélite
mSPI	-	Mediana de sobrevida pós-imunoterapia
NK	-	<i>Natural killer</i>
NSCLC	-	<i>Non-small cell lung cancer</i>
PD	-	Progressão de doença
PD-1	-	<i>Programmed Death 1</i>
PD-L1	-	<i>Programmed Death Ligand 1</i>
RC	-	Resposta completa
RNA	-	Ácido ribonucleico

RP	-	Resposta Parcial
SLP	-	Sobrevida livre de progressão
SPI	-	Sobrevida pós-imunoterapia
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TILs	-	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TMB	-	<i>Tumor mutation burden</i>
TPS	-	<i>Tumor proportion score</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou Igual
≥	Maior ou Igual
=	Igual
+	Mais ou Positivo
>	Maior
=	Igual

RESUMO

Marchi P. Eficácia dos inibidores de *checkpoints* imunológicos no tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) e o papel da expressão gênica e outros biomarcadores como preditores de resposta. **TESE (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021.

RACIONAL: Os inibidores de *checkpoint* imunológicos têm revolucionado o tratamento do CPCNP. No entanto, apenas uma parcela de pacientes se beneficia desse tipo de tratamento e o único biomarcador utilizado na prática clínica (expressão de PD-L1) é falho na seleção de pacientes. O desenvolvimento de novos biomarcadores ou a combinação de biomarcadores pode ser útil na potencialização dos resultados e redução dos custos. Ademais pouco se tem em relação a dados de mundo real de pacientes brasileiros com CPCNP tratados com imunoterapia. **OBJETIVOS:** Avaliar os desfechos clínicos de pacientes com CPCNP tratados com ICIs no Brasil e associá-los com expressão de PD-L1, instabilidade de microssatélite (MSI), infiltrado inflamatório tumoral, diferentes perfis de expressão gênica, e com a combinação desses biomarcadores. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo que incluiu pacientes com CPCNP avançado que iniciaram tratamento paliativo com ICIs no Hospital de Câncer de Barretos (HCB) ou no A.C. Camargo Cancer Center (ACCCC) até 31/05/2020 e que apresentavam pelo menos uma avaliação radiológica de resposta. Amostras de parafina armazenadas foram utilizadas para as análises dos biomarcadores. Expressão de PD-L1 foi avaliada através de imunistoquímica (anticorpo 22C3, utilizando TPS – *tumor proportion score* e CPS – *combined positive score*) por dois patologistas experientes e através de expressão de *CD274*; instabilidade de microssatélite através de PCR (*polymerase chain reaction*); infiltrado tumoral inflamatório através de imunistoquímica (CD8+, CD25+ e CD68+); e perfis de expressão gênica através do painel *PanCancer IO 360* da plataforma *NanoString* que é composto por 770 genes relacionados à resposta imune. **RESULTADOS:** Foram incluídos 135 pacientes, sendo 100 do HCB e 35 do ACCCC. A idade mediana ao diagnóstico foi de 61 anos. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (57,8%), ECOG-PS 0-1 (88,7%) e tinha histórico de tabagismo (83,6%). A maioria dos tumores eram estágio clínico IV (91,9%) e adenocarcinomas (65,1%). Como tratamento, 40,7% receberam imunoterapia paliativa em primeira linha, sendo nivolumabe o imunoterápico mais utilizado. A taxa de resposta foi de 33,3%, sendo maior dentre aqueles

tratados com combinação de imunoterapia e quimioterapia (64,8%). A mediana de sobrevida pós-início da imunoterapia (sobrevida pós-imunoterapia – SPI) foi de 17,8 meses sendo maior entre os respondedores ($p < 0,001$) e aqueles com PD-L1 positivos ($p < 0,001$). A mediana de sobrevida livre de progressão foi de 5,5 meses. 56 pacientes foram incluídos na análise de expressão de PD-L1 por imunoistoquímica. O coeficiente Kappa referente à adequação da amostra para a leitura de expressão de PD-L1 foi de 0,82 (95%CI;0.67-0.97). Houve alta concordância entre TPS e CPS (Kappa=0,85) e entre os dois métodos em si (Kappa=0,94 para TPS e Kappa=0,93 para CPS) quando avaliado por dois patologistas. A avaliação de MSI foi realizada em 79 pacientes e nenhum apresentou alteração. Esta análise foi estendida a uma coorte adicional de casos do HCB totalizando 526 pacientes, sendo apenas um tumor (0,19%) classificado como tendo alta frequência de instabilidade de microsatélite (MSI-H), o que limitou as análises de associação com desfechos clínicos. O infiltrado tumoral inflamatório foi avaliado em 51 pacientes. As medianas do número de células por mm^2 foram 37 (CD8+), 15 (CD25+) e 51 (CD68+). Não houve associação entre concentração de nenhuma das três populações celulares e SPI. Também não houve associação com o somatório de células CD8+ e CD68+ ou com o escore [(CD8+ + CD68+)/CD25+]. Após vários filtros de qualidade, 66 pacientes foram incluídos na análise de expressão gênica. 14 diferentes assinaturas já conhecidas foram associadas a maior sobrevida (*IDO1, PD-L2, Citotoxicity, Cytotoxic Cells, IFN Downstream, CTLA4, PD-L1, TIGIT, Lymphoid, Immunoproteasome, Exhausted CD8, IFN Gamma, TIS* e *APM*) e uma nova assinatura genética foi identificada. Essa assinatura é composta por 6 genes representativos dos componentes imune, tumoral e do microambiente (*Lung-tumor signature – LungTS*). Pacientes com baixo escore de *LungTS* apresentaram maior sobrevida pós-imunoterapia, (medianas de 36,0 versus 15,5 meses, $p < 0,001$), maior sobrevida livre de progressão (medianas de 10,12 versus 4,17 meses, $p < 0,001$) e maior taxa de resposta (57,5% versus 27,2%, $p = 0,013$). Esta assinatura foi validada em uma população independente composta por 39 pacientes espanhóis portadores de CPCNP tratados com inibidores de *checkpoint* imunológicos, validando o seu papel preditivo. A análise combinada de expressão de PD-L1 e o escore *LungTS* foi capaz de discriminar duas populações distintas em relação à sobrevida pós-imunoterapia dentre pacientes PD-L1 positivos. **CONCLUSÕES:** Os resultados clínicos apresentados por essa coorte são semelhantes ao observado na literatura, com sobrevida prolongada em relação aos dados históricos de tratamento com quimioterapia. MSI-H se

mostrou raro na população com CPCNP não sendo útil para seleção de pacientes. Infiltrado tumoral inflamatório não foi capaz de discriminar melhores candidatos à imunoterapia. Quatorze assinaturas genéticas já conhecidas foram relacionadas à sobrevida e uma nova assinatura foi identificada (*LungTS*). Pacientes com baixo *LungTS* apresentaram melhores desfecho clínicos e, em combinação com expressão de PD-L1, foi possível discriminar duas populações distintas em relação à SPI dentre os pacientes PD-L1 positivos. Novos estudos com essa assinatura são desejados.

PALAVRAS-CHAVES: câncer de pulmão de células não-pequenas; CPCNP; imunoterapia; anti-PD-(L)1; anti-CTLA4; instabilidade de microssatélite; MSI; PD-L1; TPS; CPS; infiltrado tumoral inflamatório; *gene expression profile*; GEP; *TIS*; *Gama interferon*; *lung-tumor signature*; *LungTS*

ABSTRACT

De Marchi P. *Efficacy of immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment and the role of gene expression profiles and other predictive biomarkers of response*. Thesis (Doctor's degree). Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021.

BRACKGROUND: Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have improved the treatment outcomes for advanced NSCLC. However, only a small fraction of these patients benefits from this type of treatment and the only biomarker used in clinical practice (PD-L1 expression) is imperfect, with both negative and positive patients responding to treatment. The development of new biomarkers or the combination of biomarkers can be useful in enhance results and reduce costs. Furthermore, real-world evidence of immunotherapy efficacy in the treatment of Brazilian's NSCLC patients is scarce. **OBJECTIVES:** To evaluate the clinical outcomes of patients with NSCLC treated with ICIs in Brazil and associate them with PD-L1 expression, microsatellite instability (MSI), tumor infiltrating inflammatory cells, different gene expression profiles, and the combination of these biomarkers. **METHODS:** This is a retrospective cohort study that included advanced NSCLC patients who started palliative treatment with ICIs at Barretos Cancer Hospital (BCH) or AC Camargo Cancer Center (ACCC) up to 31-May-2020 and who had at least one radiological response assessment. Biomarker analyses were performed on archival FFPE samples. PD-L1 expression was evaluated by immunohistochemistry (22C3 antibody, using TPS – tumor proportion score and CPS – combined positive score) by two experienced pathologists; microsatellite instability by PCR (polymerase chain reaction); tumor infiltrating inflammatory cells by immunohistochemistry (CD8+, CD25+ and CD68+); and gene expression profiles by the *PanCancer IO 360* panel of the *NanoString* platform, which is composed of 770 genes related to the immune response. **RESULTS:** The median age at diagnosis was 61 years old. Most patients were male (57.8%), smokers/former-smokers (83.6%) and had ECOG-PS 0-1 (88.7%). Most tumors were clinical stage IV (91.9%) and adenocarcinomas (65.1%). As treatment, 40.7% received first-line palliative immunotherapy, with nivolumab being the most used anti-PD-(L)1. The objective response rate was 33.3%, being higher among those treated combined immunotherapy and chemotherapy (64.8%). Median overall survival after immunotherapy start (post-immunotherapy survival – PIS) was 17.8 months, being higher among responders ($p < 0.001$)

and those with positive PD-L1 tumors ($p < 0.001$). Median progression-free survival (PFS) was 5.5 months. 56 patients were included in the analysis of PD-L1 expression by immunohistochemistry. Kappa coefficient for adequacy was 0.82 (95%CI;0.67-0.97). There was a high agreement between TPS and CPS ($K=0.85$ for both pathologists) and a high agreement between pathologists concerning the two methods ((TPS, Kappa=0.94; and CPS, Kappa=0.93). MSI evaluation was performed in 79 patients and none was considered positive (MSI-H). This cohort was added to an additional cohort of patients from BCH, which evaluated 526 patients in total, with only one case (0.19%) being classified as MSI-H. This low frequency hampered the association with clinical outcomes. Tumor infiltrating inflammatory cells was evaluated in 51 patients. The median number of cells per mm^2 was 37 (CD8+), 15 (CD25+) and 51 (CD68+). There was no association between any of these cell populations and PIS. There was also no association between the PIS and the sum of CD8+ and CD68+ cells neither with the score $[(\text{CD8+} + \text{CD68+})/\text{CD25+}]$. After several filters 66 patients were included in the gene expression profile analysis. 14 different previously described signatures were associated with PIS (*IDO1*, *PD-L2*, *Cytotoxicity*, *Cytotoxic Cells*, *IFN Downstream*, *CTLA4*, *PD-L1*, *TIGIT*, *Lymphoid*, *Immunoproteasome*, *Exhausted CD8*, *IFN Gamma*, *TIS* and *APM*) and we identified a new signature not previously reported composed of 6 representative of components of immune response, tumor and microenvironment (lung-tumor signature – *LungTS*). Patients with low *LungTS* scores had longer PIS (median 36.0 versus 15.5 months, $p < 0.001$), longer PFS (median 10.12 versus 4.17 months, $p < 0.001$) and higher objective response rate (57.5% versus 27.2%, $p = 0.013$). This new signature has been validated in an independent population composed by 39 Spanish NSCLC patients treated with ICIs, which validates its predictive value. The combined analysis of PD-L1 expression and the *LungTS* score was able to discriminate two distinct populations regarding PIS among PD-L1 positive patients. **CONCLUSION:** The clinical outcomes observed in this cohort are similar to those reported in the literature, with prolonged survival compared to historical data. MSI-H has been shown to be rare in the NSCLC population and is not useful for patient selection for immunotherapy. Tumor infiltrating inflammatory cell was not able to discriminate good candidates for immunotherapy. Fourteen known gene expression signatures were related to survival and a new signature was identified (*LungTS*). Patients with low *LungTS* score had better clinical outcomes and, in combination with PD-L1

expression, it was possible to discriminate two distinct populations in relation to PIS among PD-L1 positive patients. New studies with this signature are desired.

KEYWORDS: non-small cell lung cancer; NSCLC; immunotherapy; anti-PD-(L)1; anti-CTLA-4; microsatellite instability; MSI; PD-L1; TPS; CPS; tumor infiltrating inflammatory cells; gene expression profile; GEP; *TIS*; *Gama interferon*; *lung-tumor signature*; LungTS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de pulmão

No mundo, são diagnosticados cerca de 18,1 milhões de novos casos de câncer anualmente, excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Destes, 2,2 milhões são câncer de pulmão, sendo o segundo câncer mais incidente no mundo¹. A variação internacional nas taxas e tendências do câncer de pulmão reflete em grande parte a realidade da epidemia do tabaco em cada região, e devido à sua alta letalidade (a proporção global mortalidade/incidência é de 0,87), os padrões de mortalidade são semelhantes aos de incidência². O câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por câncer, sendo responsável por quase uma em cada cinco mortes (1,8 milhão de mortes, 18% do total)¹.

Para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima, para cada ano do triênio 2020-2022, 17.760 casos novos de câncer de pulmão em homens (terceiro mais incidente) e 12.440 em mulheres (quarto mais incidente)³. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,99 casos novos a cada 100 mil homens e 11,56 para cada 100 mil mulheres³. Entre os anos de 1974 e 2004 a mortalidade por câncer de pulmão no país aumentou de 10,6 para 31,1 mortes por 100.000 homens, e de 3,0 para 5,4 mortes por 100.000 mulheres⁴.

Historicamente, de acordo com padrões histológicos, o câncer de pulmão é classificado em dois grandes grupos: o câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP), que corresponde a 85% dos casos; e o câncer de pulmão de células pequenas (CPCP), que corresponde a 15% do total^{5, 6}. O CPCNP é subdividido em adenocarcinoma, carcinoma escamoso e o carcinoma de grandes células, além de variantes menos comuns (carcinoma adenoescamoso, adenoide cístico, etc.)⁷.

O subtipo mais comum de câncer de pulmão é o adenocarcinoma, compreendendo cerca de 40% de todos os casos⁷. Tem origem a partir das células alveolares tipo II, que secretam surfactante e outras substâncias^{5, 6}. Ele tende a ocorrer na periferia dos pulmões, o que pode se dever à presença dos filtros nos cigarros de papel, que previne a inalação de partículas grandes e leva a uma inalação mais profunda da fumaça do cigarro^{6, 8, 9}. Comparado a outros tipos de câncer de pulmão, o adenocarcinoma tende a crescer mais devagar e é o tipo histológico mais frequente entre os tumores diagnosticados em estádios iniciais⁶. O carcinoma de células escamosas compreende 25-30% de todos os casos de câncer

de pulmão⁷. Tem origem a partir das células basais do epitélio das vias aéreas e está fortemente relacionado com o tabagismo¹⁰. Já o carcinoma de grandes células corresponde a 5-10% dos casos, sendo um diagnóstico de exclusão (ausência de morfologia ou imunofenótipo característico de carcinoma epidermóide, adenocarcinoma ou carcinoma neuroendócrino)⁷. Mais frequentemente se localiza em regiões centrais dos pulmões e está fortemente relacionado a altas cargas tabágicas^{6, 11}.

Quanto ao estadiamento a maioria dos casos de câncer de pulmão apresenta-se em estádios avançados ao diagnóstico, sendo que 55% já são metastáticos. Neste contexto, os pacientes são tratados em caráter paliativo, sendo a expectativa de sobrevida em 5 anos em torno de apenas 5%¹².

O tratamento da doença metastática vem evoluindo significativamente ao longo dos últimos anos. Apenas na década de 1990 houve comprovação do benefício da quimioterapia em relação à sobrevida global. Duas meta-análises demonstraram aumento relativo de cerca de 10% em 1 ano para aqueles pacientes tratado com quimioterapia^{13, 14}. A partir de então vários estudos compararam diferentes esquemas de quimioterapia com intenção de definir o padrão de tratamento em primeira linha. Em 2002, foram publicados os resultados de um ensaio clínico de fase III do grupo ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), que estabeleceu os esquemas de quimioterapia de terceira geração baseados em platina (platina com taxano ou platina com gencitabina) como terapias padrões, não havendo diferença entre eles em relação à sobrevida global.¹⁵

Em 2006, pela primeira vez, foi observada sobrevida mediana maior que 1 ano, com a adição de bevacizumabe (anti-VEGFA), primeiro anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento de câncer de pulmão à quimioterapia em pacientes com histologia não escamosa.¹⁶ Pemetrexede, um agente anti-folato, foi o último agente citotóxico aprovado no Brasil, em combinação com platina, após um estudo de fase III de não inferioridade demonstrar similar eficácia e menor toxicidade quando comparado ao esquema com cisplatina e gencitabina. Dentre os pacientes com histologia não-escamosa houve ainda ganho de sobrevida a favor do esquema de pemetrexede combinado a um sal platina, tornando-se um padrão de tratamento para essa histologia¹⁷.

Atualmente, a classificação histológica não é mais suficiente para se traçar um plano terapêutico, principalmente para aqueles pacientes com doença avançada (tratamento sistêmico paliativo). Com o advento da medicina personalizada faz-se necessário também

uma classificação molecular que tem por intenção identificar mutações relacionadas à oncogênese para as quais há terapias-alvo disponíveis. O perfil molecular é variável conforme a histologia (Figura 1), havendo terapias-alvo já estabelecidas e aprovadas em diferentes agências regulatórias para pacientes com mutações em genes como *EGFR* (gefitinibe, erlotinibe, afatinibe, dacomitinibe e osimertinibe), *ALK* (crizotinibe, ceritinibe, alectinibe, brigatinibe, ensartinibe e lorlatinibe), *ROS1* (crizotinibe e entrectinibe), *NTRK* (larotrectinibe e entrectinibe), *BRAF* (dabrafenibe combinado a trametinibe), *MET* (capmatinibe e tepotinibe) e *RET* (selpercatinibe e pralsetinibe)^{18,19}.

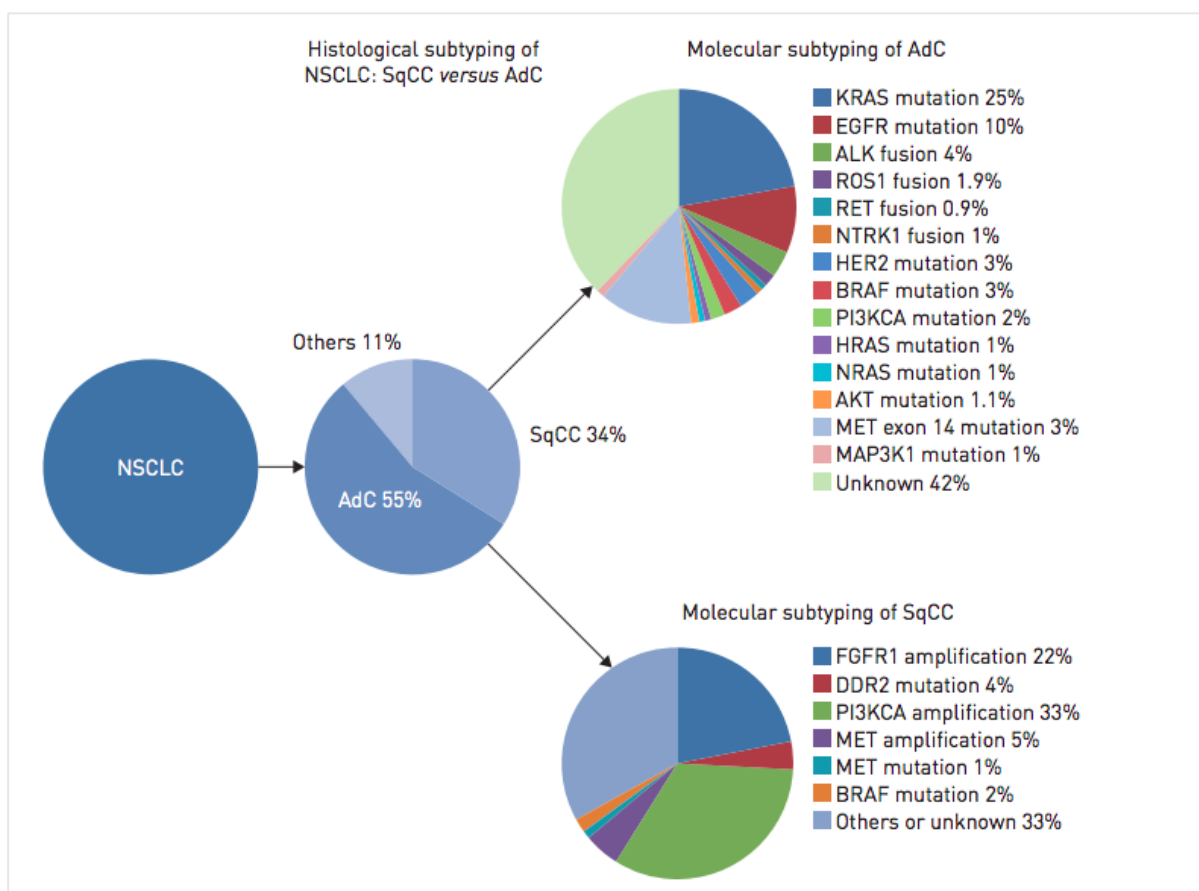


Figura 1 - Subtipos histológicos e moleculares do câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). SqCC: carcinoma de células escamosas; AdC: adenocarcinoma.²⁰

O estudo IPASS foi um estudo asiático de fase III, de não inferioridade que comparou gefitinibe (inibidor de tirosina quinase anti-EGFR – *epidermal growth factor receptor*) à carboplatina + paclitaxel em primeira linha de tratamento em população selecionada de acordo com características clínicas (não tabagistas ou tabagistas leves – até 100 cigarros ao

longo da vida). Foram randomizados 1.217 pacientes, sendo um estudo positivo - gefitinibe se mostrou não inferior à quimioterapia em relação à sobrevida livre de progressão (*hazard ratio* 0,74; 95% CI, 0,65 - 0,85; $P < 0,001$), desfecho primário do estudo. Esse estudo marca o início da era da terapia-alvo no tratamento do câncer de pulmão, não pelo resultado de seu desfecho primário, mas sim pela análise pré-planejada de pacientes portadores de mutações no gene *EGFR* (deleções no éxon 19 ou a mutação pontual L858R no éxon 21). Do total, 437 pacientes foram testados, sendo que 261 (59,7%) eram portadores de tumores com mutações ativadoras no gene *EGFR*. Neste subgrupo a sobrevida livre de progressão (SLP) foi significativamente maior nos pacientes que receberam gefitinibe (*hazard ratio* 0,48; 95% CI, 0,36 – 0,64; $P < 0,001$), enquanto no subgrupo de 176 pacientes com tumores sem mutação, a SLP foi significativamente maior para aqueles que receberam quimioterapia com carboplatina + paclitaxel (*hazard ratio* 2,85; 95% CI, 2,05 to 3,98; $P < 0,001$). Nos anos a seguir, outros agentes anti-EGFR de primeira²¹ e segunda²²⁻²⁴ geração também se mostraram mais eficazes do que quimioterapia no tratamento da doença.

Apesar da terapia com inibidores de tirosina-quinase (TKI – *tyrosine kinase inhibitor*) anti-EGFR de primeira e segunda geração ter demonstrado altas taxas de resposta e aumento de SLP em comparação com quimioterapia baseada em platina, o desenvolvimento de resistência é inevitável, limitando a mediana de SLP a cerca de 10-13 meses²⁵. Existem vários mecanismos de resistência já identificados sendo o principal o desenvolvimento da mutação p.T790M no éxon 20 do gene *EGFR* - responsável por 50-60% dos casos²⁶. Em fevereiro de 2017 foram publicados os resultados do estudo AURA 3²⁷ que comparou osimertinibe (TKI anti-EGFR de terceira geração) à quimioterapia baseada em platina, em segunda linha de tratamento naqueles pacientes *EGFR* p.T790M positivos. A SLP foi significativamente maior com osimertinibe (mediana 10,1 *versus* 4,4 meses; HR 0,3; 95% CI, 0,23 – 0,41; $P < 0,001$) além de ter demonstrado maior taxa de resposta (71% *versus* 31%; OR 5,39; 95% CI, 3,47 – 8,48; $P < 0,001$). Tais resultados estabeleceram osimertinibe como o novo padrão de tratamento em pacientes com tumores *EGFR* p.T790M positivos. Para a maioria dos casos *EGFR* p.T790M negativos a única opção é a quimioterapia. Mais recentemente, o osimertinibe se tornou o padrão de tratamento em primeira linha após o ensaio clínico de fase III FLAURA demonstrar ganho de sobrevida quando comparado a inibidores de primeira geração (sobrevida global mediana 38,6 meses *versus* 31,8 meses; HR 0,80; 95,05% CI, 0,64 to 1,00; $P = 0,046$)²⁸.

Outro avanço de suma importância foi o desenvolvimento dos TKIs anti-ALK (*anaplastic lymphoma kinase*). O primeiro deles foi o crizotinibe que foi comparado em primeira linha com quimioterapia à base de platina em um ensaio clínico de fase III chamado PROFILE 1014. Nesse estudo, 313 pacientes com CPCNP com rearranjo do gene *ALK* foram randomizados para receber crizotinibe ou platina + pemetrexede. A SLP foi significativamente maior no braço tratado com crizotinibe (mediana 10,9 meses *versus* 7,0 meses; HR 0,45; 95% IC 0,35-0,60; $P < 0,001$), assim como a taxa de resposta (74% *versus* 45%; $P < 0,001$)²⁹. Inibidores ALK de nova geração, nos anos a seguir, mostraram-se eficazes após falha ao crizotinibe (ceritinibe³⁰, alectinibe³¹, brigatinibe³² e ensartinibe³³), sendo a maioria inclusive melhores que crizotinibe em primeira linha de tratamento (alectinibe³⁴⁻³⁶, brigatinibe³⁷, ensartinibe³⁸ e lorlatinibe³⁹). Embora ainda não esteja claro qual a melhor sequência de tratamento para os tumores com rearranjo de ALK, pacientes que recebem pelo menos 2 linhas de terapia anti-ALK apresentam as maiores sobrevidas já vistas em câncer de pulmão metastático, superando 49 meses (mediana ainda não alcançada)^{40, 41}.

Os demais alvos (*ROS1*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *NTRK*) para os quais já há aprovações terapêuticas por alguma agência regulatória são pouco frequentes, o que limita a realização de ensaios clínicos randomizados de fase III. Assim, essas aprovações foram baseadas em estudos menores que envolveram ou não outros tumores sólidos com alterações moleculares em comum⁴²⁻⁵⁰. O advento dessas drogas-alvo é o principal responsável pelo aumento de sobrevida observado em CPCNP nos Estados Unidos da América (EUA). A sobrevida câncer-específica em 2 anos do CPCNP aumentou de 26% entre os homens diagnosticados em 2001 para 35% entre aqueles diagnosticados em 2014. Padrões semelhantes foram encontrados entre mulheres⁵¹.

O ano de 2015 marca o início de uma nova era terapêutica para o CPCNP que veio juntar-se à terapia-alvo. A imunoterapia, representada pelos inibidores de *checkpoints* imunológicos, vem alcançando importantes resultados e revolucionando o tratamento tanto de pacientes com doença avançada quanto, mais recentemente, de pacientes com estadiamento mais precoce (estádio III irresssecável) com será discutido a seguir.

1.2 Uma breve história da imunoterapia no tratamento do câncer

1.2.1 O começo

Em 1891, um jovem cirurgião chamado William Bradley Coley, hoje conhecido como “pai da imunoterapia”, assombrado pela morte de uma de suas primeiras pacientes por um sarcoma metastático, iniciou sua pesquisa em busca de potenciais curas para o câncer. Coley encontrou 47 relatos de casos de pacientes com câncer que pareciam ter alcançado remissão espontâneas após seus portadores desenvolverem uma doença infecciosa. O que chamou mais a atenção de Coley foi a relação entre erisipela, uma infecção de pele causada por estreptococos, e remissões de sarcomas de tecidos moles. Sua pesquisa também encontrou relatos anedóticos de cirurgiões do século XVIII que descreveram taxas de cura oncológica superiores a 80% entre pacientes que foram amputados, desenvolveram algum tipo de infecção e sobreviveram a ela.⁵²

Quando Coley começou a injetar *Streptococcus pyogenes* (causador da erisipela) em seus pacientes com câncer, ele encontrou algumas dificuldades. Inexplicavelmente era muito difícil induzir erisipela na maioria dos pacientes, e quando a infecção se instalava era muito difícil curar os pacientes da doença estreptocócica invasiva.⁵²

Em 1893, após a morte de dois pacientes por septicemia, Coley iniciou uma segunda etapa em sua pesquisa com uma mistura de *S. pyogenes* e *Serratia marcescens* inativadas através de calor. Essa fortuita combinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuía uma ampla gama de propriedades imunoestimuladoras, o que permitiu que Coley obtivesse respostas como remissões completas duráveis em vários tipos de neoplasias malignas como sarcomas, linfomas e carcinomas testiculares. Apesar de algum sucesso, a falta de um mecanismo de ação conhecido para as "toxinas de Coley" e os riscos de se infectar deliberadamente pacientes com câncer, fizeram com que os oncologistas adotassem a cirurgia e a radioterapia como tratamentos padrões no início do século XX⁵².

1.2.2 A hipótese da imunovigilância do câncer

Paul Ehrlich (1854 - 1915) foi um dos primeiros a conceber a ideia de que o sistema imunológico poderia impedir o desenvolvimento de carcinomas. No entanto, a ideia de

controle imune de doença neoplásica não foi valorizada até que houvesse maturação do campo em desenvolvimento da imunologia, em meados do século XX.⁵³ Na década de 1950, o trabalho de Peter B. Medawar esclareceu o papel crítico dos componentes celulares da imunidade na mediação da rejeição do aloenxerto⁵⁴. Este trabalho levantava dúvidas em relação à existência de antígenos tumorais. Especificamente, embora houvesse aceitação de que a resposta imune era capaz de reconhecer e destruir tumores transplantados em camundongos, logo ficou claro que o mecanismo subjacente era uma rejeição de aloenxerto em vez de rejeição específica do tumor.

Posteriormente, utilizando-se ratos endogâmicos pôde-se demonstrar que os tumores eram imunologicamente distintos das células normais. A demonstração de que camundongos poderiam ser imunizados contra transplantes de tumores singênicos estabeleceu a existência de "antígenos específicos de tumores"^{53, 55, 56}, pedra angular na hipótese da imunovigilância do câncer. Claramente não poderia haver imunovigilância tumoral se não houvesse estruturas distintas nas células tumorais que pudessem ser reconhecidas pelo sistema imunológico. Essas descobertas emergentes foram incorporadas à hipótese formal de "imunovigilância do câncer" proposta por Sir Frank Macfarlane Burnet e Lewis Thomas. Em 1957, Burnet declarou: *"Não é inconcebível que pequenos acúmulos de células tumorais possam se desenvolver e que devido à posse de novas potencialidades antigênicas, provoquem uma reação imunológica efetiva com resultante regressão do tumor e nenhuma dica clínica de sua existência."*^{53, 57}

Aproximadamente na mesma época, Thomas sugeriu que a função primária da imunidade celular não era de fato promover a rejeição do aloenxerto, mas sim proteger das doenças neoplásicas, mantendo assim a homeostase dos tecidos em organismos multicelulares complexos. Essas especulações formaram a estrutura evolutiva que resultou em um desenvolvimento do conceito de imunovigilância, que foi assim definido por Burnet: *"Em animais grandes e longevos, como a maioria dos vertebrados de sangue quente, as mudanças genéticas hereditárias devem ser comuns em células somáticas e uma proporção dessas mudanças representará um passo em direção à malignidade. É uma necessidade evolutiva que deva haver algum mecanismo para eliminar ou inativar essas células mutantes potencialmente perigosas e postula-se que esse mecanismo é de caráter imunológico."*

Tanto Burnet quanto Thomas especularam que os linfócitos atuavam como sentinelas no reconhecimento e eliminação de células imunologicamente estranhas ao

indivíduo^{53, 58}. A hipótese da imunovigilância, no entanto, foi abandonada pouco depois devido à ausência de evidências experimentais que sustentassem o conceito e só recentemente foi retomada frente a novas evidências.

1.2.3 BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) intravesical

A estratégia de usar bactérias atenuadas para tratar neoplasias malignas ressurgiu em 1976 quando um ensaio clínico foi conduzido para testar o uso da vacina contra a tuberculose Bacille Calmette-Guérin (BCG), como meio de prevenir a recorrência de câncer de bexiga sem invasão muscular.⁵⁹ O tratamento e a profilaxia do câncer superficial de bexiga vinha sendo tratado durante muitos anos com a instilação intravesical de agentes oncolíticos como tiotepa (trietilenefosforamida)⁶⁰, *epodyl* (éter-trietilenoglicol-dimetil)⁶¹ e *Yttrium-90*⁶². A localização, a história natural dessas neoplasias e a fácil acessibilidade da bexiga tornavam práticas essas estratégias.⁵⁹

A antigenicidade dos tumores de bexiga já havia sido demonstrada na década de 70^{63, 64}, sugerindo que a imunoterapia poderia ser útil na erradicação dos tumores não invasivos de bexiga. O sucesso do tratamento com BCG dependia de vários fatores: habilidade de se desenvolver resposta imune aos antígenos micobacterianos, contato próximo entre o bacilo e o tumor, baixo volume tumoral e ausência de eventos adversos sistêmicos. Tumores não invasivos de bexiga pareceram ideais para se testar essa estratégia⁵⁹. Em 1976 foi publicado o primeiro estudo clínico avaliando BCG intravesical em portadores de câncer de bexiga totalmente ou parcialmente ressecado⁵⁹. Desde então vários outros estudos foram realizados, sendo a BCG intravesical utilizada até os dias atuais. Sua eficácia é comprovada por quatro metanálises⁶⁵⁻⁶⁸, o que suporta sua indicação como profilaxia de recorrência tumoral nos principais *guidelines* de tratamento do câncer de bexiga⁶⁹. Esse sucesso deixou claro o potencial efeito terapêutico de agente imunoterápicos e a necessidade de se aprofundar os conhecimentos na área.

1.2.4 Citocinas

Citocina é uma designação genérica de certas substâncias produzidas por células do sistema imune e que apresentam função imunorregulatória. A definição de uma citocina como um fator solúvel produzido por uma célula e com atuação em outra célula, para

provocar uma mudança na função da célula-alvo, foi baseada no sistema endócrino. De certa forma, pode-se considerar as citocinas como os "hormônios" das respostas imunes e inflamatórias. No entanto, existem algumas propriedades das citocinas que escapam a esta definição. Por exemplo, os hormônios são o principal produto de um tecido ou célula específica, enquanto as citocinas são produtos da maioria das células. Mais importante ainda, em uma base molar, as citocinas são muito mais potentes que os hormônios⁷⁰.

Hoje, o termo "citocina" abrange os interferons, as interleucinas, as quimiocinas, os fatores de crescimento mesenquimais, a família dos fatores de necrose tumoral e as adipocinas. Dentre esses, o interferon (IFN) e a interleucina-2 (IL-2) são utilizados como imunoterapia contra o câncer⁷⁰.

1.2.5 Interferon (IFN)

Na década de 1950, Isaacs e Lindenmann estudavam a "interferência viral", que se refere à inibição do crescimento do vírus causada pela exposição prévia das células a um vírus ativo ou a um vírus inativado pelo calor. Seus experimentos revelaram que essa interferência era mediada por uma proteína liberada pelas células previamente expostas ao vírus. Seus resultados foram publicados em 1957, nomeando como "interferon" o fator antiviral que tinham descoberto⁷¹.

Na década de 1970, e pela primeira vez, o interferon pôde ser isolado a partir do *buffy coat* de sangue centrifugado, e permitiu a realização dos primeiros ensaios clínicos como terapia adjuvante para osteossarcoma.⁷² São vários os mecanismos de ação responsáveis pela atividade anticancerígena do interferon: indução de enzimas que resultam em efeito citostático, estimulação de células *natural killer* (NK), estímulo à expressão do receptor Fc e de antígeno tumoral, estímulo à diferenciação e atividade das células imunes do hospedeiro, e imunomodulação de células T e células dendríticas.^{72, 73}

Embora o uso dos interferons em oncologia tenha diminuído bastante nos últimos anos, podem ainda ser utilizados no tratamento de alguns tumores como melanoma maligno, câncer de rim, sarcoma de Kaposi, além de algumas desordens mieloproliferativas.⁷⁴

1.2.6 Interleucina-2 (IL-2)

Em 1976, Morgan e colaboradores descreveram, pela primeira vez, um sistema que permitia que as células T fossem cultivadas *in vitro* em que células normais da medula óssea humana foram cultivadas em meio condicionado obtido a partir de linfócitos estimulados com fito-hemaglutinina.⁷⁵ No entanto, o fator de crescimento das células T, interleucina-2 (IL-2), só foi isolado em 1979, a partir de células de ratos, e, em 1980, a partir de células humanas.⁷⁶

A utilização de IL-2 como agente imunoterápico mostrou-se eficaz quando administrada a doentes com neoplasias metastáticas, através do aumento da produção de células T. O FDA aprovou o uso deste agente imunoterápico em pacientes com câncer de rim em 1991 e para melanoma em 1998.⁷⁷ No entanto, nos últimos anos vem caindo em desuso devido ao advento dos inibidores de *checkpoints* imunológicos - imunoterápicos mais modernos, mais eficazes e com menos efeitos adversos.

1.2.7 Anticorpos monoclonais

“É possível hibridizar células produtoras de anticorpos de origens diversas. Esses híbridos podem ser cultivados in vitro, em grandes quantidades e fornecer anticorpos específicos, o que poderia ter importância na medicina e na indústria” (Köhler & Milstein, 1975).^{78, 79}

No ano de 1975, os médicos imunologistas Georges Jean Franz Köhler (alemão) e César Milstein (argentino) desenvolveram uma técnica de fusão entre linfócitos B imunizados e células de mieloma. O produto dessa fusão foi nomeado “hibridoma” e permitiu a produção específica de um anticorpo específico (anticorpo monoclonal) desejado em grandes quantidades. Tal desenvolvimento valeu a eles o prêmio Nobel de Medicina de 1984⁷⁹. A preparação de hibridomas constitui um marco na imunoquímica pois permitiu a substituição dos anticorpos policlonais por monoclonais e contribuiu para uma melhor compreensão de diversos processos imunes, o que viabilizou a manipulação *in vitro* de anticorpos⁷⁹.

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais com especificidade definida e disponibilidade ilimitada, reviveu o interesse da comunidade científica na sua aplicação como forma de terapia contra o câncer. Pesquisas sobre terapias baseadas em anticorpos

levaram ao desenvolvimento do rituximabe, que se liga ao CD20 na superfície das células B, permitindo sua eliminação por células NK. Em 1997, o FDA aprovou o rituximabe como primeiro anticorpo monoclonal para o tratamento de um câncer, o linfoma não-Hodgkin de células B.⁷⁷⁻⁷⁹

Hoje em dia, existem dezenas de anticorpos monoclonais aprovados para tratamento contra do câncer, nas mais diferentes agências regulatórias e para inúmeras indicações. Entre eles, os inibidores de *checkpoints* imunológicos.

1.2.8 Vacinas terapêuticas

Diferente das vacinas tradicionais, que são administradas a indivíduos saudáveis, as vacinas terapêuticas para o câncer são administradas com intenção de erradicar as células cancerosas através da ativação do sistema imune do paciente⁸⁰. Os vários mecanismos imunes ativados pela vacinação terapêutica, em teoria, atacam e destroem especificamente as células cancerosas poupando as células normais. Assim, as vacinas terapêuticas contra o câncer, em princípio, podem ser utilizadas para inibir o crescimento adicional de tumores avançados ou recidivados refratários a terapias convencionais, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia.⁸¹

Com base no seu formato e conteúdo, as vacinas terapêuticas podem ser classificadas em diferentes categorias: vacinas celulares (células tumorais ou imunes), vacinas proteicas e vacinas genéticas (DNA, RNA e vírus). As vacinas tumorais autólogas (preparadas usando células tumorais derivadas do paciente) foram as primeiras a serem testadas⁸². Nessa técnica, células tumorais do indivíduo são irradiadas, combinadas a um adjuvante imunoestimulador (por exemplo, BCG) e administradas ao próprio paciente.⁸³⁻⁸⁶ Foram testadas em vários tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão⁸⁶⁻⁸⁸, câncer colorretal^{84, 89-91}, melanoma⁹²⁻⁹⁴, câncer de rim⁹⁵⁻⁹⁷ e câncer de próstata.⁸³ Uma vantagem importante de vacinas de células tumorais é o seu potencial para apresentar todo o espectro de antígenos do tumor ao sistema imunológico do paciente. No entanto, a preparação de vacinas de células tumorais autólogas requer grande quantidade de amostra tumoral, o que limita sua utilização.⁸¹

Apesar dos consideráveis esforços para se desenvolver essas vacinas, os resultados têm sido desencorajadores há décadas. Apenas recentemente, com os avanços na

imunologia, pôde-se comprovar clinicamente o conceito da vacina terapêutica contra o câncer. Sipuleucel-T, uma vacina baseada em células dendríticas, foi a primeira vacina terapêutica a demonstrar aumento de sobrevida em pacientes com câncer de próstata hormônio refratário, sendo a única vacina aprovada pelo FDA^{81, 98, 99}.

1.2.9 Inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICIs)

Os inibidores de *checkpoint* imunológicos têm como alvo proteínas de superfície encontradas em vários tipos de células, incluindo células imunes e tumorais. Essas proteínas estão relacionadas a uma infinidade de vias de sinalização inibitórias do sistema imune que são fundamentais para manter a auto-tolerância, ou seja, prevenir autoimunidade. Para isso, modulam a duração e a amplitude das respostas fisiológicas imunes nos tecidos imunes centrais e periféricos, a fim de minimizar danos colaterais. Está claro hoje em dia que os tumores são capazes de utilizar essas vias como mecanismo de escape ao sistema imune. Considerando-se que muitos dos *checkpoints* imunes são ativados a partir da interação entre um ligante e um receptor, eles podem ser facilmente bloqueados por anticorpos ou modulados por formas recombinantes de ligantes ou receptores.¹⁰⁰

Dentre os imunoterápicos antineoplásicos, os inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICIs) são, no momento, os mais eficazes e vêm revolucionando o tratamento do câncer desde a primeira aprovação em 2011 do ipilimumabe, um anticorpo anti- (CTLA-4, que promoveu aumento de sobrevida de pacientes com melanoma metastático previamente tratados¹⁰¹. O tratamento com essas drogas envolve, atualmente, a utilização de anticorpos contra o antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* - CTLA-4), contra a proteína de morte celular programada 1 (*Programmed Death 1* - PD-1) ou seu ligante (*Programmed Death Ligand 1* - PD-L1). Embora ambas as vias de sinalização, a partir da ativação CTLA-4 e PD-(L)1, levem à inibição do linfócito, há uma série de diferenças entre elas - Tabela 1.

Tabela 1 - Principais diferenças entre as vias de sinalização a partir da ativação CTLA4 e PD-(L)1

CTLA4	PD-(L1)
<ul style="list-style-type: none"> • Modula expansão a ativação de células T durante fase precoce de ativação das células T¹⁰⁰ • Ativação ocorre na fase inicial de resposta das células T através da associação com ligantes das células apresentadoras de antígeno dentro dos linfonodos¹⁰² • Inibe ativação AKT mas não interfere na atividade de PI3K¹⁰³ • Expresso nas células T¹⁰⁰ • Dois ligantes (B7-1; B7-2)¹⁰⁰ • Ligantes encontrados nas células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas, macrófagos, e células B ativadas¹⁰⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> • Modula funções das células T no tecido periférico para suprimir resposta auto-imune¹⁰⁰ • Ativação ocorre na fase efetora de resposta das células T através da associação com ligantes das células tumorais ou do microambiente tumoral no tecido periférico^{100, 102} • Inibe atividade PI3K e diminui atividade de Akt¹⁰³ • Expresso em várias células, do sistema imune ou não, incluindo células T¹⁰² • Dois ligantes (PD-L1; PD-L2)¹⁰⁰ • Ligantes encontrados no tumor, nas células imunes, e tecido normal em menor proporção¹⁰²

Com a inibição de vias inibitórias esses fármacos modulam a interação entre células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (nos órgãos linfoides secundários e estruturas linfoides terciárias), e células tumorais ou células do microambiente tumoral com linfócitos T (no microambiente tumoral), restaurando a função dos linfócitos T que se encontram em estado de exaustão (Figura 2)¹⁰⁵.

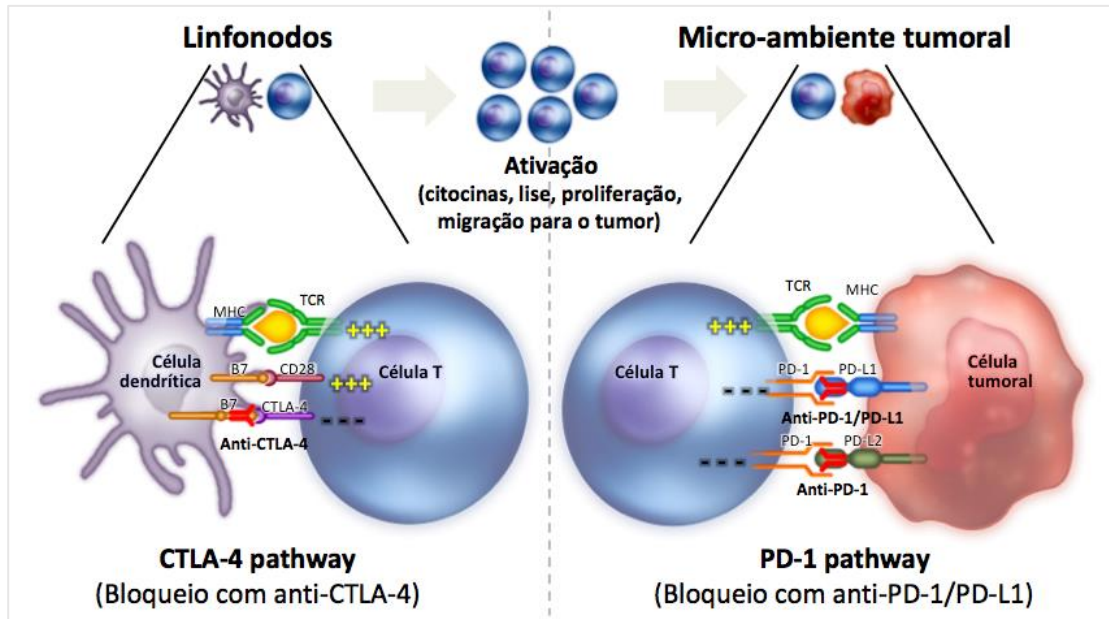


Figura 2 – Mecanismo de ação das drogas anti-CTLA4 e anti-PD(L)1. À esquerda da figura nota-se o bloqueio com anti-CTLA4 inibindo a interação entre a célula dendrítica e a célula T, dentro do linfonodo. À direita da figura nota-se o bloqueio com anti-PD(L)1 inibindo a interação entre a célula T e a célula tumoral, no microambiente tumoral. CTLA-4 = *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*; MHC = *major histocompatibility complex*; PD-1 = *programmed death-1*; PD-L1 = *programmed death ligand 1*; TCR = *T-cell receptor*. Figura adaptada.¹⁰⁶

1.3 Inibidores de *checkpoints* imunológicos (ICI) no tratamento do câncer de pulmão avançado

1.3.1 ICI como segunda linha de tratamento

O ano de 2015 marca o início da era da imunoterapia no tratamento do câncer de pulmão com a publicação dos resultados de dois ensaios clínicos de fase III demonstrando superioridade do nivolumabe (anticorpo monoclonal anti-PD-1) em relação à quimioterapia como segunda linha de tratamento. O primeiro estudo, CheckMate 017¹⁰⁷, comparou nivolumabe *versus* docetaxel em portadores de carcinoma de células escamosas de pulmão, demonstrando aumento de sobrevida global, mediana de 9,2 *versus* 6,0 meses (HR 0,59; IC95%, 0,44-0,79; $p < 0,001$), e melhor taxa de resposta, 20% *versus* 9% ($p = 0,008$) a favor do grupo tratado com nivolumabe. Nesse estudo avaliou-se a porcentagem de células tumorais com expressão de PD-L1 (TPS – *tumor proportion score*), não havendo clara associação com resposta. Mesmo no subgrupo de pacientes com PD-L1 $< 1\%$ houve maior sobrevida no braço

tratado com nivolumabe (HR 0,58; IC95%; 0,37–0,92).

O segundo estudo, CheckMate 057¹⁰⁸, teve o mesmo desenho que o primeiro, no entanto incluiu portadores de CPCNP não-escamoso. A sobrevida global mediana foi de 12,2 meses no braço de nivolumabe e 9,4 meses no braço de docetaxel (HR 0,73; IC95%, 0,59–0,89; p=0,002). A taxa de resposta também foi melhor com nivolumabe 19% *versus* 8%. Quanto à expressão de PD-L1, apesar de não ter havido diferença em relação a sobrevida global no grupo de pacientes com PD-L1 <1%, observou-se maior benefício quanto maior sua expressão (PD-L1 ≥1%, HR 0,59; PD-L1 ≥5%, HR 0,43; PD-L1 ≥10%, HR 0,40). A taxa de sobrevida em 5 anos combinada desses dois estudos foi recentemente apresentada e continua demonstrando benefício a favor do tratamento com nivolumabe: 13,4% *versus* 2,6%¹⁰⁹.

Pembrolizumabe foi o segundo anticorpo monoclonal anti-PD-1 a demonstrar aumento de sobrevida em segunda linha de tratamento em portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas metastáticos. O estudo de fase II/III Keynote-010 randomizou 1.034 pacientes: 345 deles foram alocados para receber pembrolizumabe 2mg/kg, 346 para receber pembrolizumabe 10mg/kg e 343 para receber docetaxel. Foram incluídos apenas pacientes com tumores apresentando expressão de PD-L1≥1% (diferente dos estudos CheckMate que incluíram pacientes independentemente de qualquer biomarcador). Observou-se maior sobrevida mediana entre pacientes tratados com pembrolizumabe - 10,4 meses (2mg/kg) e 12,7 meses (10mg/kg) - *versus* 8,5 meses para aqueles tratados com docetaxel. Para o subgrupo de pacientes com hiperexpressão de PD-L1 (≥50%) o aumento de sobrevida foi ainda mais expressivo em relação à quimioterapia: pembrolizumabe 2mg/kg (mediana 14,9 *versus* 8,2 meses; HR 0,54; IC95%; 0,38–0,77; p=0,0002) e pembrolizumabe 10mg/kg (17,3 *versus* 8,2 meses; HR 0,50; IC95%; 0,36–0,70; p<0,0001)¹¹⁰. A taxa de sobrevida em 5 anos foi de 15,6% *versus* 6,5% a favor de pembrolizumabe. Entre aqueles com expressão de PD-L1 ≥50% essa taxa foi de 25%¹¹¹.

Atezolizumabe foi o primeiro anticorpo monoclonal anti-PD-L1 a demonstrar aumento de sobrevida quando comparado à quimioterapia em segunda linha de tratamento em pacientes portadores de câncer de pulmão de células não-pequenas. O estudo de fase III OAK randomizou 425 pacientes para receberem atezolizumabe na dose fixa de 1.200mg a cada 3 semanas e 425 pacientes para receberem docetaxel. A sobrevida global foi significativamente maior no grupo de pacientes tratado com imunoterapia, mediana de 13,8

versus 9,6 meses (HR 0,73; IC95%, 0,62-0,87; p=0,0003). Embora para a análise de expressão de PD-L1 tenha sido utilizada metodologia distinta dos estudos anteriores (nesse estudo foi considerado o número tanto células tumorais quanto células inflamatórias por área de tumor) todos os subgrupos apresentaram maior sobrevida com atezolizumabe, inclusive o subgrupo com menor expressão de PD-L1¹¹². A taxa de sobrevida em 4 anos foi de 15,5% com atezolizumabe e 8,5% com docetaxel¹¹³.

Tislelizumabe e sintilimabe (apenas carcinoma escamoso) são outros dois agentes anti-PD-1 que foram comparados a docetaxel em estudos de fase III e que também demonstraram ganho em sobrevida global. Ambos incluíram apenas pacientes asiáticos^{114, 115}.

1.3.2 ICI como primeira linha de tratamento

1.3.2.1 Tumores com alta expressão de PD-L1

Considerando as melhores taxas de respostas entre pacientes com alta expressão de PD-L1 nos estudos de segunda linha, pelo menos três estudos de fase III compararam ICI e quimioterapia em primeira linha de tratamento, especificamente nessa população e demonstraram ganho de sobrevida.

O estudo Keynote-024, selecionou pacientes com CPCNP, virgens de tratamento, sem mutações em *EGFR* ou rearranjo de *ALK*, com PD-L1 (TPS) $\geq 50\%$ e randomizou 305 pacientes para receberem pembrolizumabe na dose fixa de 200mg (154 pacientes) ou quimioterapia baseada em platina (151 pacientes). A sobrevida global mediana foi de 26,3 meses *versus* 13,4 meses a favor do pembrolizumabe (HR 0,62; IC95%; 0,48–0,81). A taxa de sobrevida em 5 anos foi de 31,9% *versus* 16,3%. As taxas de resposta observadas foram 44,8% com pembrolizumabe *versus* 27,8% com quimioterapia^{116, 117}.

Atezolizumabe foi comparado à quimioterapia em primeira linha no estudo IMPOWER 110 que selecionou pacientes com CPCNP PD-L1 positivos ($\geq 1\%$ em células tumorais ou células inflamatórias). Foram randomizados 572 pacientes. Para o desfecho primário de sobrevida global foi considerada apenas a população sem alteração genômica em *EGFR* ou *ALK*, sendo realizada uma análise hierárquica de acordo com a expressão de PD-L1. Dentre os pacientes com alta expressão (PD-L1 $\geq 50\%$ em células tumorais [TC3] ou $\geq 10\%$

em células inflamatórias [IC3]), empregando o clone de anticorpo SP142), 205 no total, houve maior sobrevida com atezolizumabe (20,2 *versus* 13,1 meses - HR 0,59; p=0,01). Quando se avaliou a expressão de PD-L1 com o clone 22C3 (semelhante ao utilizado nos estudos com pembrolizumabe), a população com TPS \geq 50% também apresentou ganho de sobrevida a favor do atezolizumabe – 20,2 meses *versus* 11,0 meses (HR 0,60; IC95%; 0,42-0,86)¹¹⁸. Recentemente foram apresentados os resultados da população com expressão de PD-L1 intermediária ou alta (\geq 5% em células tumorais ou inflamatórias), não havendo diferença estatística entre os braços (19,9 meses com atezolizumabe *versus* 16,1 meses com quimioterapia; HR, 0,87; IC95%; 0,66-1,14; p=0,3091)¹¹⁹.

Cemiplimabe é o terceiro anti-PD-1 em monoterapia a demonstrar ganho de sobrevida quando comparado à quimioterapia em primeira linha de tratamento. O estudo EMPOWER-Lung 1 recrutou pacientes tabagistas com CPCNP, e tinha como um dos objetivos co-primários a análise de sobrevida global nos pacientes com PD-L1 TPS \geq 50%. O estudo demonstrou maior sobrevida com uso de cemiplimabe, mediana não alcançada *versus* 14,2 meses com quimioterapia (HR 0,57; IC95%; 0,42-0,77; p=0,0002).¹²⁰

1.3.2.2 Tumores com expressão PD-L1 positiva

Dois estudos de fase III demonstraram ganho de sobrevida com imunoterapia em relação à quimioterapia para pacientes com CPCNP positivos para PD-L1 (TPS \geq 1%). O primeiro, Keynote-042, utilizou pembrolizumabe como braço experimental. Para o seu desfecho primário de sobrevida global foi observada mediada de 16,7 *versus* 12,1 meses (HR 0,81; IC95%; 0,71-0,93; p=0,0018). Dentre os pacientes incluídos, 47% apresentavam PD-L1 \geq 50%. Quando analisado o subgrupo de pacientes com PD-L1 entre 1-49% (expressão intermediária) não houve diferença estatística entre os braços do estudo, demonstrando que a diferença observada em toda a população foi puxada pelos alto expressores¹²¹. Apesar de haver, inclusive no Brasil, aprovação para o uso de pembrolizumabe nesses pacientes com expressão intermediária, na prática, tem sido considerada uma indicação de exceção.

O estudo CheckMate 227 usou como braço experimental a combinação de nivolumabe e ipilimumabe (anti-CTLA-4), sendo um dos desfechos co-primários a avaliação de sobrevida global em pacientes com tumores PD-L1 positivos. Houve ganho de sobrevida

global estatisticamente significativo a favor da combinação de imunoterapia, medianas de 17,1 *versus* 14,9 meses (HR 0,79; IC 97,72%; 0,65-0,96; p=0,007)¹²². Esse foi o primeiro esquema combinado de dois imunoterápicos a demonstrar benefício de tratamento em primeira linha CPCNP. Recentemente aprovado pelo FDA ainda não está aprovado no Brasil.

1.3.2.3 Tumores com expressão PD-L1 positiva ou negativa

Os estudos Keynote-189¹²³ e Keynote-407¹²⁴ utilizaram a estratégia de combinar quimioterapia a pembrolizumabe em pacientes com CPCNP e histologias não-escamosa e escamosa, respectivamente. Ambos os estudos utilizaram quimioterapia como tratamento no braço controle e demonstraram ganho de sobrevida independente da expressão de PD-L1 a favor do braço experimental. Em análise de subgrupos, inclusive os pacientes com PD-L1 <1% se beneficiaram da adição de pembrolizumabe ao esquema quimioterápico. Assim, quimioterapia combinada a pembrolizumabe encontra-se aprovada em diferentes países, em ambas as histologias e independente da expressão de PD-L1, inclusive no Brasil.

1.3.3 Tumores com alta instabilidade de microssatélite (MSI-H) ou deficiência de mismatch repair (dMMR)

Pembrolizumabe também recebeu aprovação pela agência regulatória americana (FDA) para tratamento de qualquer tumor sólido irressecável ou metastático com alta instabilidade de microssatélite (MSI-H) ou deficiência *mismatch repair* (dMMR) que tenham falhado a pelo menos uma terapia prévia. A aprovação foi baseada em dados de 149 pacientes com MSI-H ou dMMR incluídos em 5 ensaios clínicos de braço único. A taxa de resposta com pembrolizumabe foi de 39,6%, incluindo 11 (7,4%) respostas completas. Dentre esses pacientes que apresentaram resposta 78% a mantiveram por mais de 6 meses¹²⁵. Esta indicação de pembrolizumabe não é aprovado no Brasil.

Novos estudos têm avaliado combinações de ICIs com quimioterapia, radioterapia, terapias-alvo e outros agentes imunoterápicos. Ainda há muita controvérsia em relação ao uso de ICIs em pacientes mutados (com alvos terapêuticos acionáveis), permanecendo até o momento as recomendações de tratamento inicial com inibidores específicos quando existentes. Há esforços contínuos para encontrar biomarcadores preditivos que permitam uma melhor seleção de pacientes para serem ou não tratados com imunoterapia. A

expressão de PD-L1 por imunistoquímica (IHQ) e a carga mutacional do tumor (TMB – *tumor mutation burden*) são os biomarcadores mais estudados em ensaios clínicos. No entanto, ainda há necessidade de se melhorar a seleção dos pacientes e de se estabelecer as terapias, sequenciais ou concomitantes, de combinação mais eficazes em diferentes cenários do CPCNP¹²⁶.

1.4 Biomarcadores preditivos de resposta aos ICI

Embora a imunoterapia moderna tenha revolucionado o tratamento do câncer de pulmão avançado, nem os pacientes se beneficiam do tratamento e alguns sofrem de imunotoxicidades significativas. Em teoria, qualquer órgão do corpo pode ser afetado por um evento adverso imunomediado após a terapia com ICI, embora dermatite, pneumonite, colite e endocrinopatias tendam a ser mais comuns. Diante disso, biomarcadores preditivos de resposta à terapia são essenciais. Expressão de PD-L1 demonstrou correlação com resposta aos ICIs sendo utilizado na prática clínica, principalmente para a seleção de candidatos à imunoterapia isolada em primeira linha de tratamento (PD-L1 \geq 50%). No entanto existem limitações com este marcador¹²⁷.

Mais recentemente, a carga mutacional do tumor (TMB – *Tumor Mutation Burden*) surgiu como um biomarcador alternativo, sendo independente do PD-L1. Além disso, assinaturas de expressão gênica, bem como infiltrado linfocitário (TILs – *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) no microambiente tumoral também parecem afetar a resposta à imunoterapia e estão sendo extensamente estudados¹²⁷.

1.4.1 Expressão de PD-L1

Apesar de diversos ensaios clínicos randomizados terem demonstrado correlação entre os níveis de expressão de PD-L1 com resposta e eficácia clínica aos ICIs, PD-L1 permanece como um biomarcador controverso e vários problemas limitam sua utilidade: diferenças nas plataformas de teste, diferenças na definição das células a serem avaliadas, diferenças nos pontos de corte utilizados^{112, 116}, além da heterogeneidade de expressão que pode ser encontrada no mesmo tumor^{128, 129}.

Quanto às diferentes plataformas de teste, cada um dos atuais ICIs disponíveis na prática clínica utilizou um clone específico de PD-L1 nos estudos que levaram às suas

aprovações. Por exemplo, pembrolizumabe usou o clone 22C3, nivolumabe o clone 28-8, atezolizumabe o clone SP142 e durvalumabe o clone SP263. Apesar de três deles (22C3, 28-8 e SP263) terem se mostrado intercambiáveis nos estudos Blueprint1¹³⁰ e Blueprint2¹³¹, o clone SP142 se mostrou menos sensível, destoando dos demais. Além disso, nos estudos com atezolizumabe, onde esse clone foi utilizado, a expressão de PD-L1 foi considerada não apenas nas células tumorais como também em células inflamatórias¹¹².

A questão dos diferentes cortes de PD-L1 está refletida na prática clínica onde tem-se aprovado pembrolizumabe em primeira linha para pacientes com tumores com expressão de PD-L1 \geq 50%, e em segunda linha para aqueles com PD-L1 \geq 1%. Já nivolumabe e atezolizumabe estão aprovados em segunda linha independente da expressão de PD-L1, e atezolizumabe em primeira para tumores com alta expressão em células tumorais (TC3, PD-L1 \geq 50%) ou células imunes (IC3, PD-L1 \geq 10%)¹²⁷. Ademais, nem todos os pacientes com alta expressão de PD-L1 respondem à terapia, enquanto alguns pacientes com baixa ou nenhuma expressão de PD-L1 apresentam respostas duradouras. No estudo Keynote-024¹¹⁶, que incluiu apenas pacientes com tumores com PD-L1 \geq 50%, a taxa de resposta com pembrolizumabe foi de 45%, o que significa que mesmo em uma população definida por seus altos níveis de expressão de PD-L1, uma proporção significativa de os pacientes não apresentam resposta à terapia.

Além disso, a expressão de PD-L1 é heterogênea, como demonstrado em estudo comparando expressão de PD-L1 no tumor primário e em amostras de lesões cerebrais metastáticas¹²⁸. O valor preditivo de PD-L1 também pode ser dependente do subtipo histológico. Correlação entre expressão de PD-L1 e resposta aos ICIs pode ser mais relevante para adenocarcinoma do que para carcinoma de células escamosas. O estudo CheckMate 057¹⁰⁸ (adenocarcinomas; nivolumabe *versus* docetaxel em segunda linha) demonstrou melhores resultados em pacientes com tumores com alta expressão de PD-L1. Já no estudo CheckMate 017¹⁰⁷ (carcinomas escamosos; nivolumabe *versus* docetaxel em segunda linha) a expressão tumoral de PD-L1 não foi nem prognóstica, nem preditiva de resposta.

1.4.2 Carga mutacional (TMB - *Tumor Mutation Burden*)

A carga mutacional do tumor ou *Tumor Mutation Burden* (TMB), como é mais utilizado na prática, é definido como o número total de mutações (incluindo substituições de

bases, inserções e deleções) numa extensão sequenciada do genoma tumoral. O teste considerado padrão ouro para análise de TMB é o exoma¹³². No entanto, o custo e o tempo de execução limitam a sua incorporação na prática clínica. Assim, mais recentemente, técnicas de NGS foram avaliadas como possíveis alternativas para o teste, sendo, algumas delas, como o ensaio FoundationOne CDx, validadas para inferência do TMB¹³³.

O CPCNP está entre os tumores com as maiores cargas mutacionais. Um número alto de mutações somáticas tem um potencial de gerar uma maior quantidade de neoantígenos. Esses neoantígenos, quando apresentados ligados ao complexo de histocompatibilidade maior na superfície tumoral, refletem a imunogenicidade do tumor e teoricamente estão associados a um maior potencial efeito dos ICIs¹³⁴. Esse conceito foi comprovado em estudo que correlacionou as taxas de resposta de diferentes tipos de câncer à terapia anti-PD(L)1, com o TMB desses tumores¹³⁴. Ademais, estudos retrospectivos utilizando tanto exoma¹³⁵ quanto NGS¹³⁶ também demonstraram relação direta entre alta carga mutacional e melhores desfechos clínicos. No entanto, no que tange à definição de tumor com alto TMB, que poderia ser utilizado para seleção de pacientes candidato aos ICIs, ainda há muitas incertezas com variações importantes entre os diferentes tumores¹³⁶.

Ensaio clínico randomizados recentes, mais notavelmente o estudo CheckMate 227, investigou a utilidade do TMB na predição de resposta à combinação de ipilimumabe com nivolumabe¹³⁷. Embora o estudo tenha demonstrado ganho de sobrevida livre de progressão em pacientes com mais de 10 mutações por megabase (conforme FoundationOne CDx), independentemente da expressão de PD-L1 ou histologia, não houve diferença em termos de sobrevida global. Assim, o papel do TMB como biomarcador para imunoterapia em CPCNP permanece incerto e não tem sido utilizado na prática clínica para seleção de pacientes candidatos à imunoterapia¹³⁸. TMB como um biomarcador tem ainda outras limitações como necessidade de tecido tumoral em maior quantidade e com qualidade pré-analítica, influência de variáveis experimentais bem como *pipelines* de bioinformática para quantificação do TMB, falta de harmonização entre as diferentes plataformas para quantificação de TMB a partir de painéis, falta de métodos para se converter as estimativas de TMB dentre os diferentes painéis, além da já citada provável falta de um *cutoff* universal¹³².

1.4.3 Infiltrado linfocitário (TIL – *Tumor-Infiltrating Lymphocyte*)

A extensão do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral parece ter valor prognóstico. Estudos correlacionam altos níveis de infiltrado linfocitário com sobrevida em vários tipos de câncer, incluindo CPCNP¹³⁹.

Alta densidade de TILs é considerada um reflexo de um melhor reconhecimento do tumor pelo sistema imune do indivíduo, sendo um dos critérios que caracterizam o fenótipo de tumor inflamado. Este fenótipo pode ser mais sensível aos ICIs e, portanto, tem sido estudado como um biomarcador preditivo¹²⁷.

Estudo com 53 pacientes com CPCNP demonstrou associação entre resposta ao tratamento com atezolizumabe e a extensão da expressão de PDL1 em TILs ($p=0,015$), sem haver, no entanto, correlação com expressão de PD-L1 em células tumorais¹⁴⁰. Novos estudos são necessários para se determinar a utilidade do TIL como um biomarcador preditivo de resposta aos ICIs.

1.4.4 Assinaturas de expressão gênica (GEP – *Gene Expression Profile*)

O perfil de expressão gênica (GEP) é uma área ativa de pesquisa com estudos sugerindo potencial utilidade como um biomarcador preditivo de resposta aos ICIs¹²⁷. Assinaturas de genes imunológicos, em particular aqueles associados à sinalização de IFN- γ e células-T ativadas podem ter valor preditivo e foram associados à resposta à imunoterapia em vários tipos de câncer¹⁴¹⁻¹⁴³.

No estudo POPLAR, estudo de fase II de atezolizumabe no tratamento de segunda linha de CPCNP avançado, pacientes com tumores com alta expressão de células T efectoras e de IFN- γ , apresentaram maior sobrevida (HR 0,43, IC95% 0,24-0,77)¹⁴⁴. No entanto, no estudo IMpower150, estudo de fase III de atezolizumabe combinado à quimioterapia e bevacizumabe no tratamento de primeira linha de CPCNP avançado, mesmo pacientes com tumores apresentando baixa expressão, apresentaram benefício em sobrevida livre de progressão no braço de imunoterapia (HR 0,76, IC95%, 0,60-0,96).¹⁴⁵

A assinatura genética TIS (*Tumor Inflammation Signature*) é composta pela expressão diferencial de 18 genes. Seu valor preditivo de resposta aos ICIs foi avaliado em uma coorte prospectiva de 58 pacientes com diferentes tumores primários (38 cânceres de pulmão, 5 melanomas, 10 carcinomas renais, 4 carcinomas uroteliais e 1 câncer de cólon). O escore TIS

foi significativamente associado à resposta à terapia anti-PD-1 em toda a coorte (OR 2,64; IC95%; 1,4-6,0; p=0,008), bem como na população de pacientes com CPCNP (OR 3,27; IC95%; 1,2-11,6; p=0,03). Pacientes cujo tumor apresentava um escore alto de TIS (tercil superior) apresentaram maior sobrevida global tanto em toda a coorte (HR 0,37; IC95%; 0,18-0,76; p=0,005) quanto na população com CPCNP (HR 0,36; IC95%; 0,14-0,90; p=0,02)¹⁴⁶.

As assinaturas de expressão gênica são uma promessa para a identificação de tumores imunogênicos mais propensos a se beneficiar de agentes imunoterápicos. Assim, mais estudos são necessários, bem como uma validação prospectiva dos achados.

Em suma, vários biomarcadores têm sido estudados com intenção de se selecionar pacientes com CPCNP melhores candidatos à imunoterapia. Apesar dos esforços apenas a expressão de PD-L1 avaliada exclusivamente em células tumorais tem sido utilizada na prática clínica. TMB apresenta limitações quanto a padronizações, custo e quantidade de material necessário para realizar o teste. Infiltrado linfocitário e GEP são potenciais biomarcadores promissores, mas carecem de estudos mais robustos e principalmente ensaios clínicos randomizados que comprovem seu papel preditivo de resposta à imunoterapia. Como alternativa ao uso isolado desses biomarcadores, a combinação deles poderia viabilizar uma seleção mais adequada dos pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

Os ICIs têm revolucionado o tratamento do câncer de pulmão. No entanto, apesar de terem aumentado a sobrevida de portadores dessa doença, muitos pacientes não se beneficiam do tratamento. Vários biomarcadores vêm sendo estudados, mas nenhum deles possui valor preditivo negativo adequado, o que limita sua utilização para adequada seleção de pacientes. Com exceção de pacientes mutados para os quais há terapias-alvo disponíveis, teoricamente todos os demais têm indicação de ICI na primeira linha de tratamento, em monoterapia ou combinados à quimioterapia.

Na prática clínica, apenas a expressão de PD-L1 tem sido utilizada como biomarcador preditivo de resposta. No entanto apenas 50% dos pacientes com alta expressão de PD-L1 ($\geq 50\%$) respondem ao tratamento e mesmo os pacientes com PD-L1 $< 1\%$ podem se beneficiar da imunoterapia.

Considerando-se que o câncer de pulmão é uma neoplasia agressiva e que esse tipo de tratamento é oneroso, faz-se necessário o desenvolvimento de um biomarcador, ou um conjunto de biomarcadores, que permita uma melhor seleção dos pacientes candidatos a essa terapia. O desenvolvimento de biomarcadores com valor preditivo negativo adequado resultaria numa diminuição dos custos com ICIs para os pacientes que não se beneficiarão deste tipo de tratamento. Ademais, pouco se tem em relação a dados de mundo real de pacientes brasileiros com CPCNP em tratamento com imunoterapia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Identificar um perfil de expressão gênica preditivo de resposta aos ICIs em portadores de CPCNP.

3.2 Objetivos secundários

1. Avaliar desfechos de sobrevida [global, livre de progressão (SLP) e pós-imunoterapia (SPI)] de pacientes tratado com anti-PD-(L)1 isolado ou em combinação;
2. Avaliar a resposta ao tratamento de acordo com RECIST 1.1¹⁴⁷;
3. Avaliar desfechos de clínicos daqueles tratados com combinação de nivolumabe, ipilimumabe e quimioterapia;
4. Avaliar desfechos de sobrevida e taxa de resposta daqueles tratados com pembrolizumabe no contexto de sistema público de saúde a partir de convênio estabelecido entre Hospital de Câncer de Barretos, MSD e governo do estado de São Paulo;
5. Avaliar a expressão gênica de 770 genes associados à resposta imune nas amostras tumorais utilizando-se o painel *PanCancer IO 360* da plataforma *NanoString*;
6. Avaliar a expressão tumoral de PD-L1 por técnica de imunoistoquímica (IHQ) tanto por TPS (*Tumor Proportion Score*) quanto CPS (*Combined Positive Score*);
7. Correlacionar a expressão de PD-L1 por IHQ com expressão do gene *CD274* (PD-L1) encontrada no painel *PanCancer IO 360*;
8. Avaliar infiltrado linfocitário tumoral por técnica de IHQ;
9. Avaliar a presença de instabilidade de microssatélites (*Microsatellite Instability – MSI*) nos tumores;
10. Correlacionar os diferentes perfis de expressão gênica identificados, com sobrevida livre de progressão, sobrevida global e resposta ao tratamento;
11. Desenvolver um escore de resposta imunológica aos inibidores de *checkpoints* anti-PD-(L)1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo coorte retrospectivo, com coleta de dados em prontuário (ver item 4.4). Os testes moleculares foram realizados no Centro Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos (HCB), a partir de amostras tumorais parafinadas previamente coletadas e armazenadas.

4.2 População do estudo

Portadores de CPCNP com doença avançada que iniciaram tratamento com terapia anti-PD-(L)1 até 31/05/2020 no Hospital de Câncer de Barretos (n=100) ou no A.C. Camargo Cancer Center (n=35). A terapia anti-PD(L)-1 podia ter sido feita em monoterapia ou combinada à quimioterapia, anti-angiogênico ou anticorpo anti-CTLA-4.

4.3 Critérios de elegibilidade

Ser portador de CPCNP avançado, com comprovação histológica; ter iniciado terapia anti-PD-(L)1, em monoterapia ou em combinação com quimioterapia, anti-angiogênico ou anticorpo anti-CTLA-4, no Hospital de Câncer de Barretos ou A.C. Camargo Cancer Center até 31/05/2020; e ter pelo menos uma avaliação de resposta radiológica após início da imunoterapia.

4.4 Coleta de dados

Foram coletados, a partir do prontuário médico, dados clínicos, patológicos e demográficos - a saber: iniciais do nome, RH, data de nascimento, comorbidades, *status* tabágico, data do diagnóstico de câncer de pulmão, estadiamento T, estadiamento N, estadiamento M, estadiamento agrupado, sítios de doença metastática, histologia tumoral, perfil molecular (exemplo: presença de alterações moleculares envolvendo os genes *EGFR*, *ALK*, *KRAS*...), linha de tratamento na qual a imunoterapia foi utilizada, melhor resposta ao tratamento com imunoterapia (de acordo com *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* -

RECIST 1.1)¹⁴⁷, nome do imunoterápico utilizado, data de início do primeiro tratamento paliativo, data de início do tratamento imunoterápico, data da progressão da doença após início da imunoterapia e data de óbito.

4.5 Extração de RNA, análise da expressão gênica por *NanoString*

Baseado em coloração com hematoxilina e eosina (HE), as lâminas provenientes do bloco de parafina de cada tumor tiveram a área tumoral delimitada por um patologista experiente para isolamento do tecido tumoral. A partir de 5 cortes de 10 micra de cada bloco, as amostras foram submetidas à extração de RNA por kit comercial (RNeasy FFPE Mini Kit, Qiagen). O RNA obtido foi quantificado (Qubit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e diluído para 50ng de RNA total.

A definição do perfil imunológico dos tumores foi realizada por meio do painel *nCounter® PanCancer IO360* (NanoString Technologies). Este painel conta com a avaliação de 770 genes envolvidos na resposta imune do câncer, tanto inata quanto adaptativa (Anexo A). A partir de 50ng de RNA, a hibridização das amostras com as sondas de captura e *reporter* aconteceu em termociclador a 65°C por 24h, seguido de purificação e imobilização dos complexos formados (etapa automatizada – equipamento PrepStation, NanoString Technologies). A leitura dos cartuchos foi realizada no Digital Analyzer (NanoString Technologies) considerando 555 FOVs (campos de leitura, do inglês *fields of view*).

O NanoString (NanoString Technologies) é um dispositivo automatizado que requer pouco tempo dispensado às atividades de bancada e pode processar até 12 amostras distintas simultaneamente. De acordo com o painel escolhido, pode-se avaliar a expressão gênica de dezenas e até centenas de genes e miRNAs de interesse bem como rearranjos/translocações e CNVs pela tecnologia *nCounter®* (NanoString Technologies). Este sistema captura e conta um código baseado em combinações de 4 cores (*color-code*), correspondendo cada combinação a um gene distinto¹⁴⁸. Esta técnica é extremamente sensível, sendo comparável à PCR em tempo real e mais sensível que o método de microarranjos, sem necessitar de reações enzimáticas e amplificação. Além disso, esta técnica é capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação (amostras derivadas de tecido parafinado, por exemplo) e não necessita validação por outro método. Os resultados foram captados pelo programa *nSolverAnalysis*

Software v4.0[®] (NanoString Technologies) e analisados pelo *Data Analysis Service* da *NanoString Technologies* em ambiente R (R-project v3.2.1; The R Foundation, Viena, Austria) com *pipeline* específico para definição de assinaturas moleculares (patente *NanoString Technologies*).

Em paralelo, dados normalizados do nSolver foram aplicados para definir uma assinatura de prognóstico com base no nCounter[®] PanCancer Pathways Panel usando ambiente estatístico R (versão 3.6.3).

4.6 Imunoistoquímica (IHQ) para expressão de PD-L1

O ensaio utilizou o kit *Dako EnVision FLEX + HRP-Polymer* e o clone 22C3. Em resumo, as lâminas foram aquecidas a 60°C e em seguida um procedimento 3 em 1 foi realizado: desparafinização, reidratação e recuperação de antígeno. Esta etapa utilizou a solução *Dako EnVision FLEX Target Retrieval, low pH* (fornecida como solução tamponada baseada em citrato a pH 6,1), no *Dako PT Link* (código Dako PT100).

As lâminas foram coradas usando a plataforma de coloração *Dako Automated Link 48*. A diluição do clone 22C3 utilizou diluente próprio (*Dako Primary Antibody Diluent*) contendo uma proteína estabilizadora. Os reagentes *EnVision FLEX + Polymer* foram utilizados para a detecção primária do anticorpo. O *EnVision FLEX+ Wash Buffer* foi usado durante os passos incubação. No final do processo as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, enxaguadas em água destilada, desidratadas em etanol e diafanizadas em xileno.

A coloração foi feita com DAB (3,3'-diaminobenzidina), que confere coloração marrom para a marcação positiva. A intensidade de coloração membranosa das células foi graduada em 1+ (intensidade baixa), 2+ (intensidade moderada) ou 3+ (intensidade forte). Utilizando-se microscópio em baixa magnificação foi certificado que existam pelo menos 100 células tumorais viáveis na amostra. Em magnificações de 10x, 20x, e 40x, foram observadas todas as áreas tumorais com e sem coloração da membrana celular. Nesta etapa do processo, de magnificação múltipla, a análise primária envolve: (a) distinguir as células tumorais das células imunes; (b) determinar as áreas tumorais positivas e negativas; (c) determinar a coloração parcial e completa da membrana $\geq 1+$. Foi então calculada o TPS (*Tumor Proportion Score*) definido como a proporção de células tumorais positivas para PD-

L1 em relação ao total de células tumorais e também o CPS (*Combined Positive Score*) definido como a proporção células tumorais + células inflamatórias (linfócitos e macrófagos) positivas para PD-L1 em relação ao total de células tumorais. O tumor foi então classificado em uma dentre três categorias de acordo com a expressão de PD-L1, tanto por TPS quanto por CPS (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação do nível de expressão e padrões de coloração PD-L1 avaliados por imunohistoquímica.

Classificação do nível de expressão	% células expressando PD-L1	Padrão de coloração
Não expressor de PD-L1	<1%	Coloração parcial ou completa ($\geq 1+$) em <1% das células tumorais
Expressor de PD-L1	1-49%	Coloração parcial ou completa ($\geq 1+$) em $\geq 1-49\%$ das células tumorais
Alto expressor de PD-L1	$\geq 50\%$	Coloração parcial ou completa ($\geq 1+$) em $\geq 50\%$ das células tumorais

Coloração marrom, marcação com DAB (3,3'-diaminobenzidine) para PD-L1.

A avaliação foi realizada por dois patologistas experientes em neoplasia de pulmão de forma independente. Discrepâncias entre os resultados foram esclarecidas pela revisão simultânea do material pelos dois patologistas para uma definição consensual.

4.7 Instabilidade de microssatélite (MSI - *Microsatellite Instability*)

A avaliação de MSI foi realizada usando PCR *multiplex* para avaliação de 6 marcadores de regiões de repetição de mononucleotídeos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e NR-27 e HSP110)¹⁴⁹. Cada iniciador reverso é marcado na extremidade com um corante fluorescente: 6-carboxifluoresceína para BAT-26 e NR-21; 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína para BAT-25 e NR-27; e 2,7,8-benzo-5-fluoro-2,4,7-tricloro-5-

carboxifluoresceína para NR-24 e PET® (ThermoFisher) para HSP110. A PCR foi realizada usando o *kit Qiagen Multiplex PCR (Qiagen, Inc.)*, com 1 µl de DNA a 50 ng/ml e as seguintes condições de termociclagem: 15 min a 95°C; 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos; 55°C por 90 segundos e 72°C durante 30 segundos; e uma extensão final a 72°C durante 40 min. Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese capilar em um sequenciador *ABI 3500XL (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.)* de acordo com o protocolo do fabricante, e os resultados foram analisados usando-se o *software GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.)*. Para as análises, foi utilizado o DNA da linhagem celular HCT-15 (ATCC® CCL-225™, *American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA*) (MSI-high) como um controle positivo para MSI.

As amostras são consideradas altas em MSI quando dois ou mais marcadores forem alterados, MSI-baixo quando um marcador foi alterado e microsatélites estáveis (MSS) na ausência de instabilidade.¹⁵⁰

4.8 Infiltrado tumoral inflamatório

A avaliação do infiltrado tumoral inflamatório foi realizada através da observação de lâminas coradas por hematoxilina e eosina em magnificação de 400X, com uso de retículo para seleção de campos para aquisição de imagens e seleção aleatorizada dos campos, de acordo com Gundersen^{151, 152}. Para isso utilizou-se microscópio óptico convencional trinocular Olympus BX41 (*Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan*), com óptica planacromática com quatro campos de 400X perfazendo 1mm². As células mononucleares da reação inflamatória na área intratumoral foram caracterizadas em linfócitos T citotóxicos (CD8+), linfócitos T regulatórios (CD25+) e macrófagos (CD68+). Células polimorfonucleares e áreas de necrose extensa foram excluídas. Para esta avaliação foi utilizada reação imunoistoquímica em plataforma automatizada Dako Autostainer 48 (Dako, Carpinteria, EUA), com anticorpos e protocolos validados para uso diagnóstico pelo FDA e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). A contagem da positividade para CD8, CD25 e CD68 foi realizada nos campos aleatoriamente selecionados previamente e expressa em positividade total de células em pelo menos 4 campos intratumorais. A leitura e a análise não foram realizadas em materiais com menos de 4 campos apropriados para contagem. As imagens foram

capturadas no mesmo sistema e analisadas com o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) para avaliação de áreas de coloração.

4.9 Considerações estatísticas

4.9.1 Tamanho da amostra

Trata-se de uma amostragem não aleatória de conveniência. A estimativa era de se incluir cerca de 100 pacientes, sendo que ao menos 40% tivessem sido tratados com anti-PD-(L)1 em monoterapia. Foram incluídos portadores de CPCNP tratados com anti-PD-(L)1 no HCB e no A. C. Camargo Cancer Center que iniciaram imunoterapia até 31/05/2020.

Para a comparação entre TPS e CPS (expressão de PD-L1): considerando-se uma diferença de 45,1%¹⁵³ entre percentuais de $TPS \geq 1\%$ e $CPS \geq 1$, uma significância de 5% e poder de 90%, determinou-se que seria necessário um tamanho amostral de 50 amostras.

4.9.2 Análises estatísticas

Inicialmente, os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas para os dados quantitativos e as tabelas de frequência para as variáveis qualitativas. Quanto aos parâmetros clínicos foram analisados:

- Sobrevida livre de progressão: calculado como o período entre o início do tratamento anti-PD-(L)1 e a data da ocorrência da progressão tumoral ou óbito, ou a data do último seguimento (para os casos que não apresentaram progressão);
- Sobrevida global: período de tempo entre o primeiro tratamento paliativo e a data da ocorrência do óbito decorrente de qualquer motivo ou a data do último seguimento (para os pacientes vivos nesta data);
- Sobrevida pós-imunoterapia: período de tempo entre o início da imunoterapia e a data da ocorrência do óbito decorrente de qualquer motivo ou a data do último seguimento (para os pacientes vivos nesta data);
- Resposta tumoral: avaliada de acordo com critérios RECIST 1.1. Para cálculo da taxa de resposta utilizou-se a proporção de pacientes que apresentaram resposta parcial

ou resposta completa. Foram incluídos para esta análise apenas os pacientes que realizaram pelo menos uma tomografia de controle após início da imunoterapia.

A sobrevida foi estimada utilizando-se o método de Kaplan-Meier e a comparação das curvas foi realizada através do teste de log-rank. O modelo de regressão de Cox foi utilizado para o cálculo das razões de risco para óbito. Pacientes que não compareceram ao hospital em um período maior do que 2 vezes o período estipulado pelo médico para seu retomo foram considerados como perda de seguimento na data da última informação disponível no prontuário. Estes pacientes contribuíram para curva de sobrevida até esta data, sendo então classificados como censura.

A associação entre resultados moleculares com sobrevida global, sobrevida pós-imunoterapia, sobrevida livre de progressão e taxa de resposta foi realizada utilizando-se o programa estatístico *IBM SPSS 19.0 for Windows*. As análises univariadas foram realizadas através dos testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher. As análises multivariadas foram feitas através de regressão logística múltipla, sendo incluídas no modelo as variáveis que apresentarem $p < 0,2$ nas análises univariadas.

Para as análises de associação dos perfis de expressão gênica e sobrevida, foram utilizados os pontos de cortes de 6 meses para sobrevida livre de progressão e 18 meses para sobrevida pós-imunoterapia.

Para análises de concordância e reprodutibilidade foram empregadas análises de concordância Kappa.

A significância estatística foi considerada para os valores de $p \leq 0,05$ em todas as análises. A data de 31/12/2020 foi considerada a data de *cut-off* para análise dos dados.

Para análise de LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*), análises univariadas foram realizadas para selecionar genes com associação significativa com a sobrevida pós-imunoterapia no pacote *survival* (versão 3.2-7) do programa R. Os genes selecionados foram aplicados em uma regressão LASSO com modelo de riscos proporcionais de Cox usando o pacote *glmnet* (versão 4.1)^{154, 155}. A validação cruzada *leave-one-out* foi realizada para selecionar o valor de λ com erro médio de validação cruzada mínimo (λ_{min}). O escore de risco baseado nos coeficientes da regressão foi calculado e utilizado para classificar os pacientes em baixo e alto risco por meio do valor mediano dos escores de risco. As curvas de Kaplan-Meier foram construídas com o pacote *survminer* (versão 0.4.8) e as

curvas ROC dependentes do tempo foram construídas com o pacote *timeROC* (versão 0.4). O C-index foi calculado com o pacote *suvcomp* (versão 1.34.0).

4.10 Análise de validação da assinatura imune

A validação da nova assinatura imune encontrada foi realizada em uma coorte independente de pacientes portadores de CPCNP tratados com anti-PD-(L)1 no Hospital Universitário Quiron Dexeus (Barcelona, Espanha). Para essa análise, o mesmo painel PanCancer IO-360 da NanoString foi utilizado. Essa coorte foi composta por 39 pacientes (coorte de validação).

4.11 Considerações éticas

O estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII e só foi iniciado após todo o processo de tramitação ter sido completado e o projeto ter sido aprovado (CAAE 87212918.5.0000.5437). Embora um perfil genético também estivesse sendo pesquisado, os testes se limitaram a alterações somáticas, não havendo risco de identificação de alterações germinativas. A condução do estudo seguiu os princípios da Resolução CNS 466/2012 bem como das regulamentações para uso de amostras biológicas.

Foi solicitado ao CEP a dispensa do TCLE considerando-se que se trata de estudo de risco mínimo, retrospectivo, no qual participariam portadores de câncer de pulmão com doença avançada tratados com intuito paliativo que, muito provavelmente, já teriam falecido.

5. RESULTADOS

5.1 Características clínico-patológicas

Foram incluídos 135 portadores de CPCNP tratados com terapia anti-PD-(L)1 no estudo, sendo 100 provenientes do Hospital de Câncer de Barretos e 35 do A. C. Camargo Cancer Center. A idade mediana foi 61 anos, variando de 33 a 81 anos. Houve predominância do sexo masculino (57,8%), estágio clínico IV (91,9%) e ECOG-PS \leq 1 (88,7%). A maioria dos pacientes tinha história de tabagismo (83,6%), sendo 47% tabagistas ativos no momento do diagnóstico. A histologia predominante foi adenocarcinoma (65,1%), seguida de carcinoma escamoso (30,3%). Alguns poucos pacientes apresentavam alterações genéticas somáticas em *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF* ou *KRAS*. Quanto ao tratamento a maioria recebeu imunoterapia paliativa em primeira linha (40,7%), sendo nivolumabe o anti-PD-(L)1 mais utilizado (52,6%). A Tabela 3 resume as características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 3 – Características clínico-patológicas e de tratamento dos 135 portadores de CPCNP tratados com terapia anti-PD-(L)1

Característica clínico-patológicas e de tratamento	n	(%)
Idade mediana = 61 anos (33-81)		
Local		
Hospital de Câncer de Barretos	100	74,1
A. C. Camargo	35	25,9
Sexo		
Masculino	78	57,8
Feminino	57	42,2
Estádio clínico		
III	11	8,1
IV	124	91,9
ECOG-PS		
0-1	128	88,7
2	12	9,0
3-4	3	2,2
Ignorado	2	-

Continua na próxima página...

Tabela 3 (continuação) – Características clínico-patológicas e de tratamento dos 135 portadores de CPCNP tratados com terapia anti-PD-(L)1

Característica clínico-patológicas e de tratamento	n	(%)
Histologia		
Adenocarcinoma	88	65,1
Carcinoma escamoso	41	30,3
Adenoescamoso	3	2,2
CPCNP	3	2,2
Perfil molecular		
<i>EGFR</i> positivo (del19 ou L858R)	5	5,7
<i>ALK</i> positivo (imunoistoquímica)	3	3,4
<i>ROS1</i>	1	4,1
<i>BRAF</i>	1	3,5
<i>KRAS</i>	3	10,7
Tabagismo		
Nunca fumou	22	16,4
Passado	49	36,6
Ativo	63	47,0
Ignorado	1	-
ICIs utilizado(s)		
Nivolumabe	71	52,6
Pembrolizumabe	33	24,4
Atezolizumabe	14	10,4
Cemiplimabe	2	1,5
Avelumabe	1	0,7
Durvalumabe	1	0,7
Nivolumabe + ipilimumabe	9	6,7
Pembrolizumabe + ipilimumabe	1	0,7
Durvalumabe + tremelimumabe	3	2,2
Linha tratamento		
Primeira	55	40,7
Segunda	38	28,1
A partir da terceira	42	31,1
Esquema tratamento utilizado		
Anti-PD-(L)1 isolado	95	70,4
Anti-PD-(L)1 + Anti-CTLA4	3	2,2
Anti-PD-(L)1 + QT	27	20,0
Anti-PD-(L)1 + Anti-CTLA4 + QT	10	7,4

5.2 Taxa de resposta, sobrevida global, sobrevida pós-imunoterapia e sobrevida livre de progressão

Na data de corte estipulada para análise dos dados (31/12/2020) o seguimento mediano para sobrevida global e sobrevida pós-imunoterapia foi de 27,7 meses, para ambos, e para sobrevida livre de progressão, de 28,2 meses.

5.2.1 Taxa de resposta

A taxa de resposta objetiva dentre os 135 pacientes incluídos no estudo foi 33,3%, sendo 39 respostas parciais (28,9%) e 6 respostas completas (4,4%). 48 pacientes (35,5%) apresentaram progressão de doença como melhor resposta ao tratamento. A taxa de resposta entre os pacientes tratados em primeira linha (n=55) e entre aqueles tratados a partir da segunda linha (n=80) foi de 54,5% e 18,7%, respectivamente ($p<0,001$). Já a taxa de resposta observada entre pacientes tratados com anti-PD(L)1 em monoterapia (n=95), anti-PD(L)1 combinado a anti-CTLA4 (n=3) e anti-PD(L)1 combinado à quimioterapia com ou sem anti-CTLA4 ou anti-angiogênico (n=37) foi de 20,1%, 33,3% e 64,8%, respectivamente ($p<0,001$).

5.2.2 Sobrevida global

Dentre os 135 pacientes incluídos no estudo, 91 pacientes haviam falecido (67,4%) até a data de fechamento do banco de dados. A sobrevida global mediana foi de 27,5 meses - Figura 3.

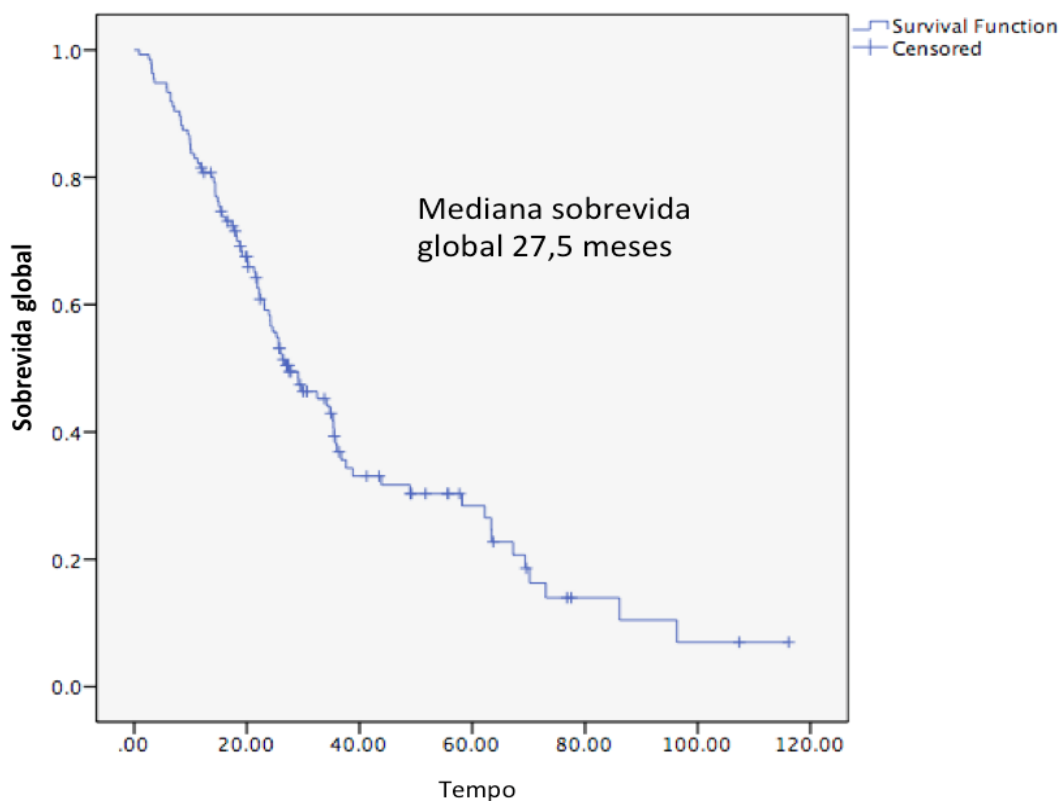


Figura 3 – Curva de sobrevida global (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier, dos 135 portadores de CPCNP incluídos no estudo. A mediana de seguimento foi de 27,7 meses e a mediana de sobrevida global foi de 27,5 meses.

A sobrevida global foi estatisticamente superior entre os pacientes que apresentaram resposta ao tratamento (resposta completa, parcial ou doença estável) em relação àqueles com progressão de doença (mediana 36,7 meses *versus* 19,12 meses; $p < 0,001$). A mediana de sobrevida global para aqueles com resposta completa, resposta parcial, doença estável e progressão de doença foi respectivamente NA (não atingida), 38,8 meses, 29,1 meses, 19,1 meses ($p < 0,001$). Não houve óbito entre aqueles que atingiram resposta completa com imunoterapia (Figura 4).

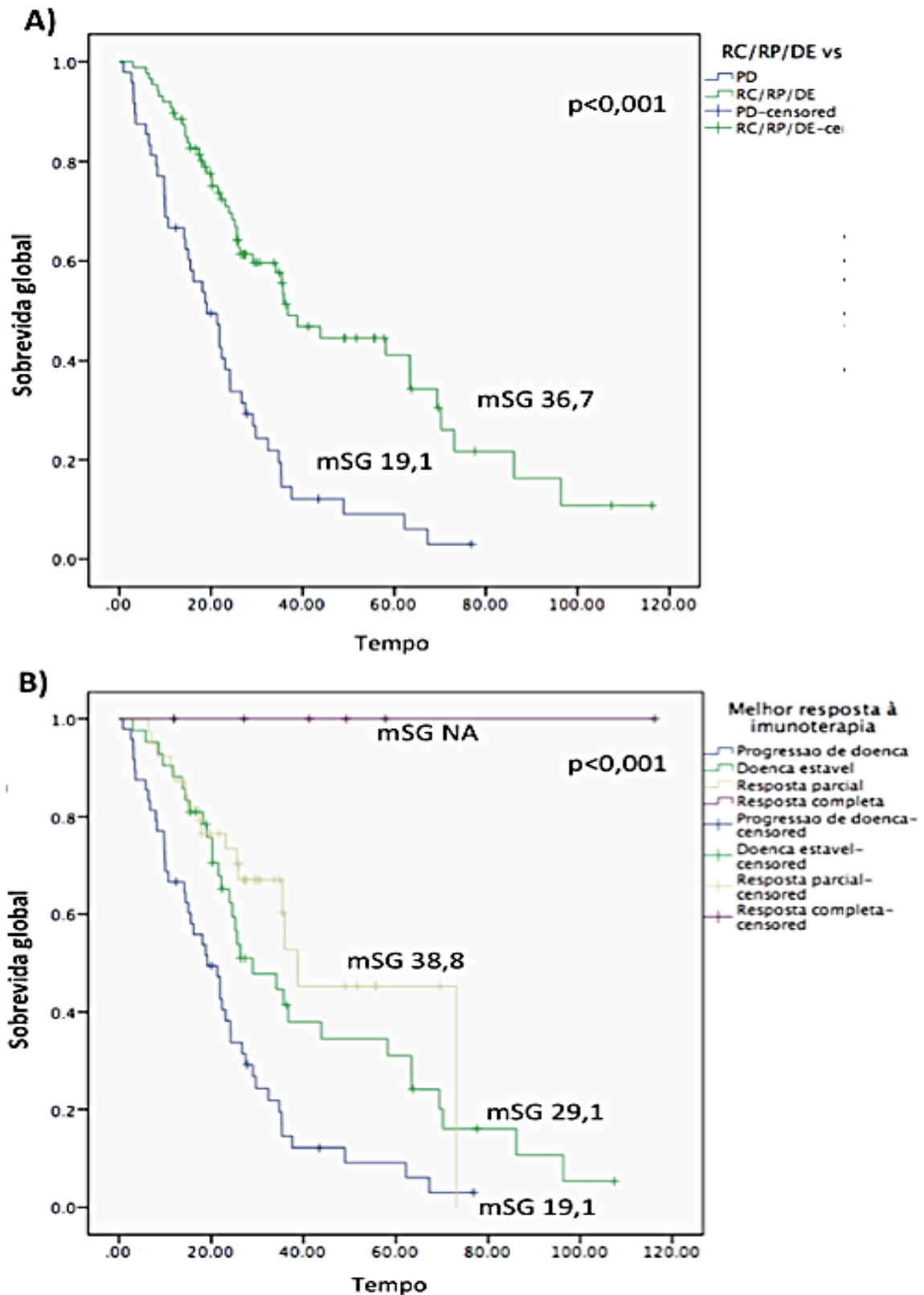


Figura 4 – Curvas de sobrevida global (em meses) pelo método de Kaplan-Meier de acordo com resposta ao tratamento imunoterápico: (A) resposta completa ou parcial ou doença estável *versus* progressão de doença; (B) resposta completa *versus* resposta parcial *versus* doença estável *versus* progressão de doença. mSG: mediana de sobrevida global

5.2.3 Sobrevida pós-imunoterapia (SPI)

A mediana de SPI entre os 135 pacientes incluídos no estudo foi de 17,74 meses (Figura 5). Foi maior entre aqueles que apresentaram resposta ao tratamento (resposta completa, parcial ou doença estável) em relação aos que apresentaram progressão de doença como melhor resposta (17,7 *versus* 3,6 meses; $p < 0,001$), e também maior entre os pacientes com tumores PD-L1 positivos *versus* negativos (NA *versus* 14,85 meses; $p < 0,001$) (Figura 6).

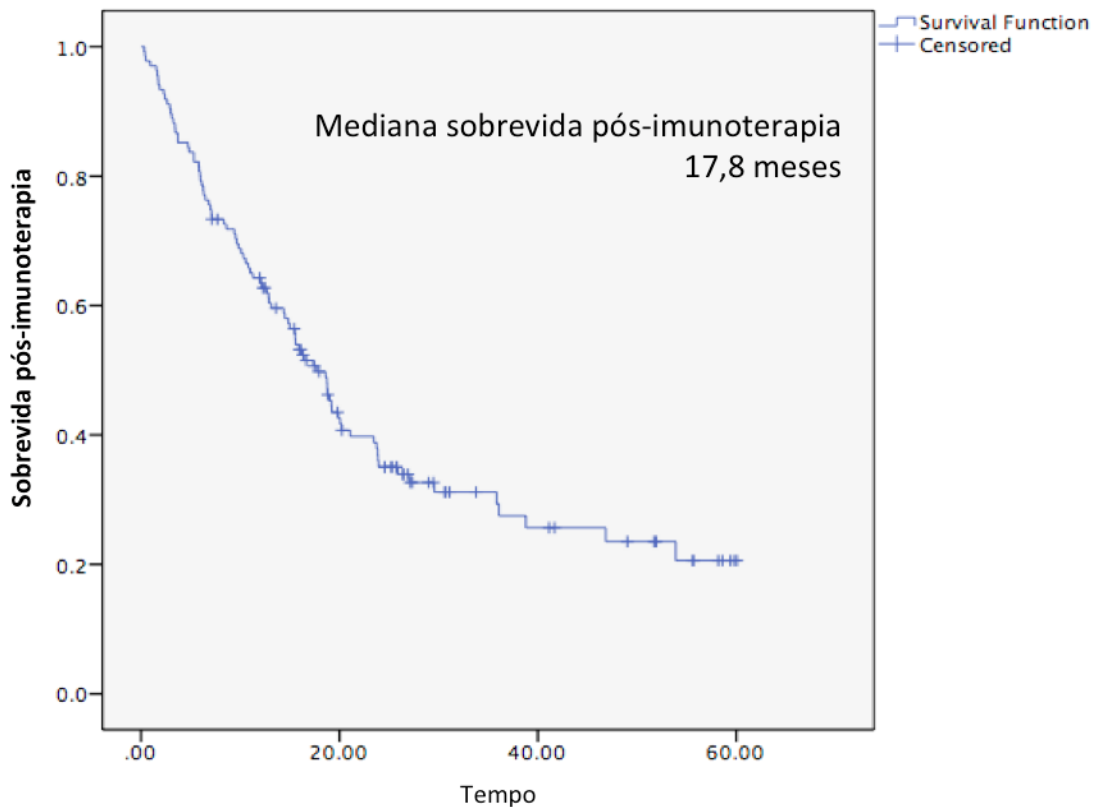


Figura 5 – Curva de sobrevida pós-imunoterapia (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier dos 135 portadores de CPCNP incluídos no estudo.

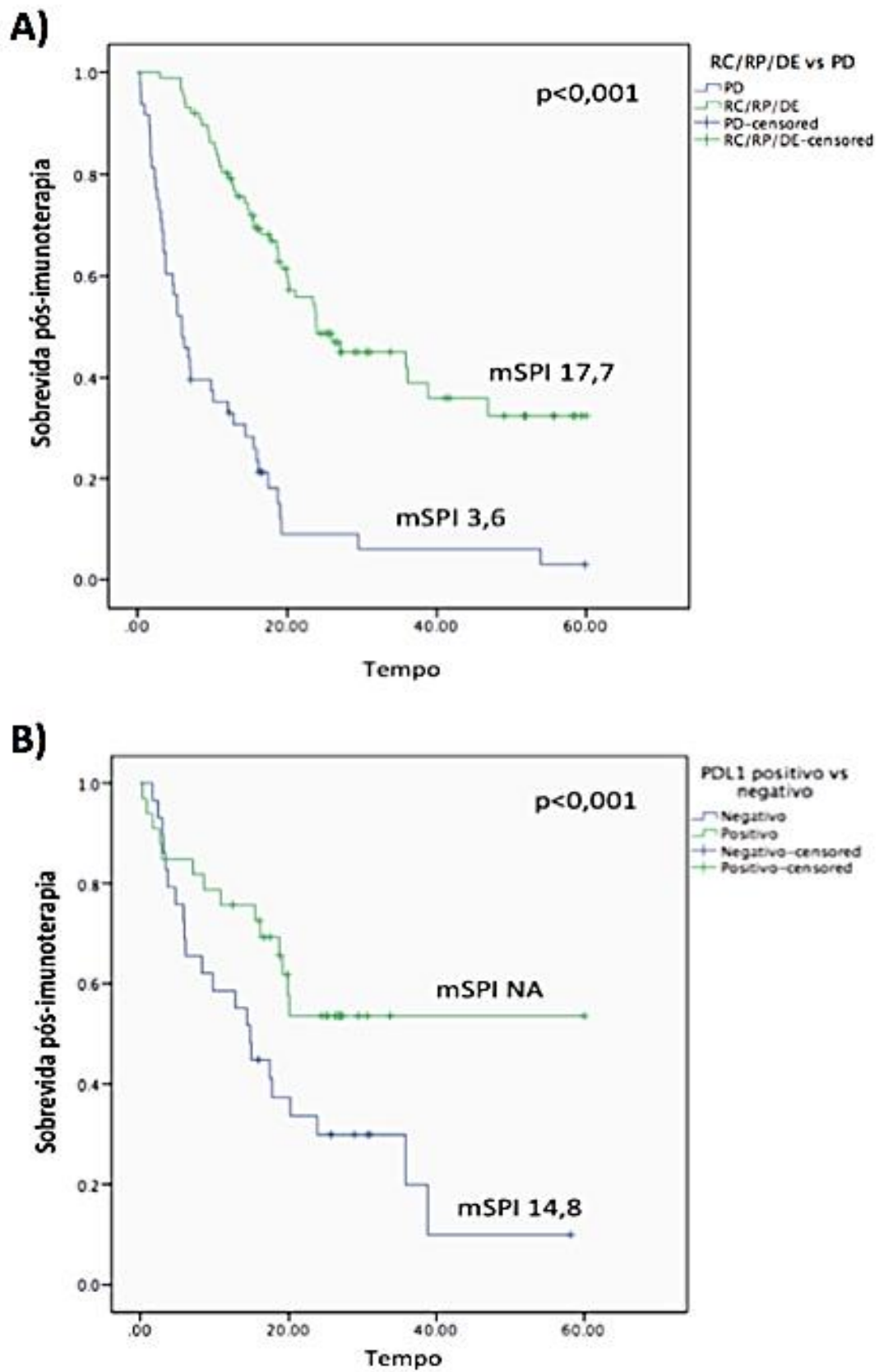


Figura 6 – Curvas de sobrevivida pós-imunoterapia (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com (A) resposta ao tratamento imunoterápico e (B) expressão de PD-L1. mSPI: mediana de sobrevivida pós-imunoterapia; RC: resposta completa; RP: resposta parcial; DE: doença estável; PD: progressão de doença.

Quanto ao esquema de tratamento utilizado, apesar de haver uma tendência de benefício a favor do tratamento combinado de imunoterapia com quimioterapia, não houve diferença estatisticamente significativa (23,9 meses *versus* 16,6 meses; $p=0,08$). Aqueles tratados em primeira linha apresentaram SPI maior que os tratados em segunda linha ou além (23,8 *versus* 15,0 meses; $p=0,016$) (Figura 7).

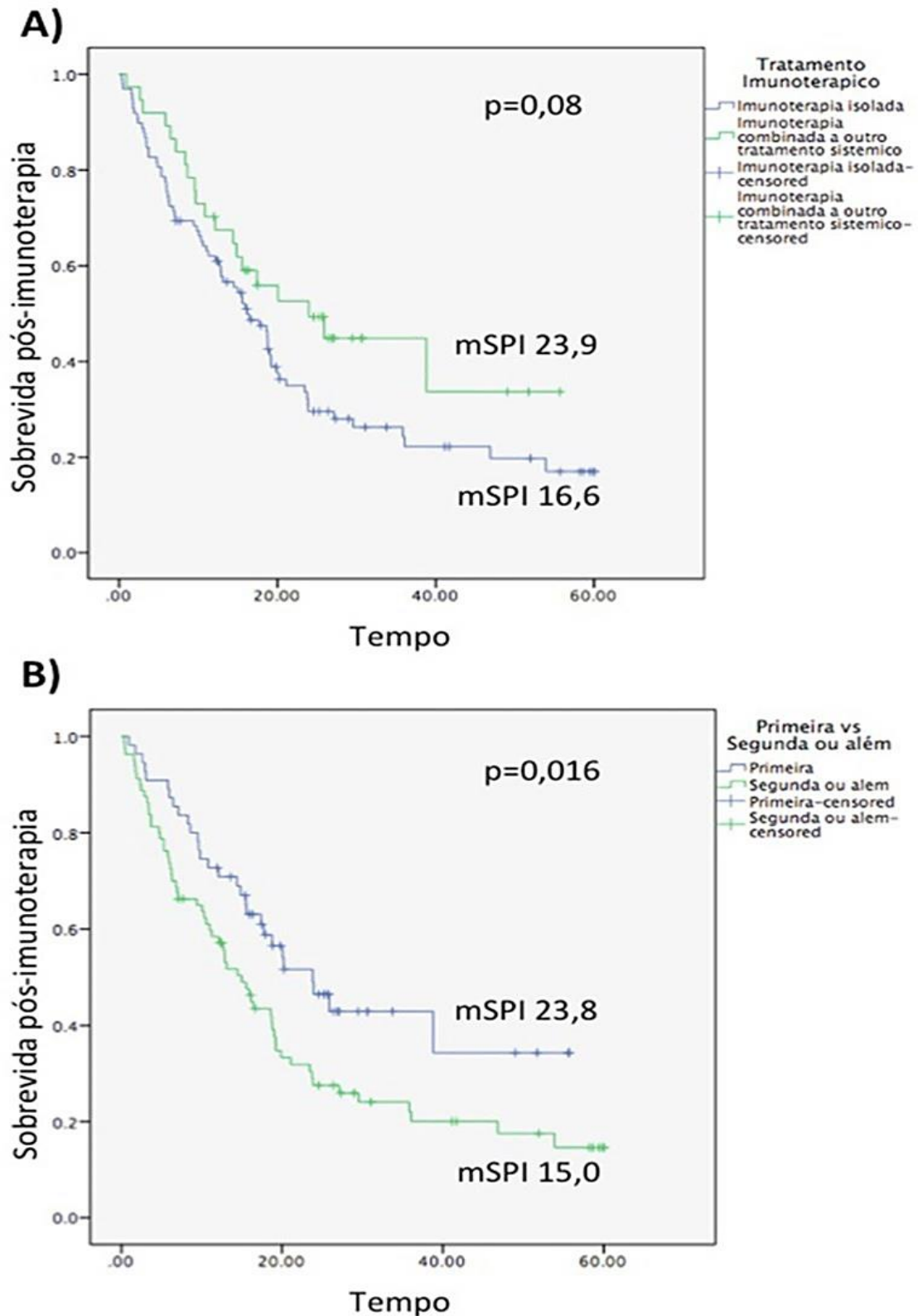


Figura 7 – Curvas de SPI (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com (A) esquema de tratamento e (B) linha de tratamento. mSPI: mediana de sobrevivida pós-imunoterapia.

5.2.4 Sobrevida livre de progressão (SLP)

A SLP mediana foi de 5,5 meses, sendo maior entre os pacientes com PD-L1 positivos (10,2 *versus* 5,1 meses; $p=0,025$), entre os respondedores ao tratamento (9,8 *versus* 1,7 meses; $p<0,001$) e entre aqueles tratados em primeira linha (9,6 *versus* 4,0 meses; $p=0,04$) (Figura 8).

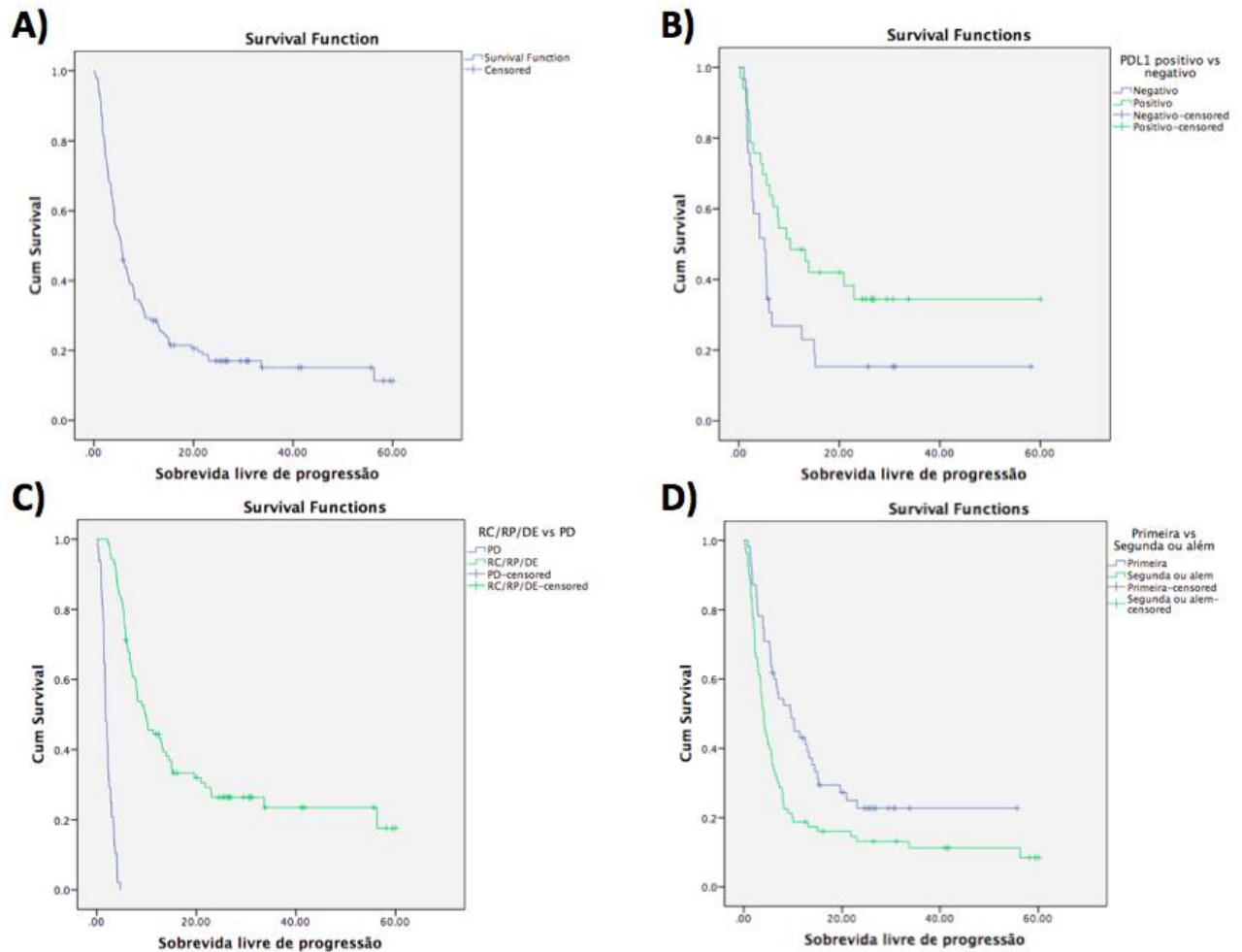


Figura 8 – Curvas de SLP (em meses), avaliada pelo método de Kaplan-Meier (A) de toda a população; (B) de acordo com expressão de PD-L1; (C) de acordo com resposta ao tratamento e (D) de acordo com linha de tratamento.

5.3 Quimioterapia combinada à terapia anti-PD-1 e anti-CTLA4 (*doublet* de platina + nivolumabe + ipilimumabe)

Dentre os pacientes incluídos, sete deles foram tratados no braço experimental do ensaio clínico de fase 3 Checkmate9LA. Esses pacientes receberam dois ciclos de quimioterapia baseada em platina combinada a nivolumabe e ipilimumabe, seguido de nivolumabe e ipilimumabe até progressão de doença, intolerância ao tratamento ou até que se completassem dois anos de tratamento. Apenas dois desses pacientes tinham falecido e três tinham progredido até a data de corte analisada (tempo de seguimento mediano para SPI de 27,14 meses e de SLP de 25,76 meses). Assim, as medianas de SPI e SLP não foram atingidas. A taxa de resposta objetiva foi de 85,7%, sendo uma resposta completa (14,3%), cinco respostas parciais (71,4%) e uma doença estável (14,3%).

Os dados desses pacientes foram publicados em conjunto com os resultados do estudo. Houve ganho de sobrevida a favor do braço combinado de quimioterapia com imunoterapia, com medianas 14,1 *versus* 10,7 meses (HR 0,69; 96,71% CI; 0,55-0,87; $p=0,00065$)¹⁵⁶. O CheckMate-9LA foi o primeiro estudo de fase III a demonstrar benefício da combinação de quimioterapia com dois agentes imunoterápicos (nivolumabe e ipilimumabe). Esse estudo levou a um novo padrão em primeira linha de tratamento estando já aprovado pelo FDA e tendo sido recentemente aprovado no Brasil - Artigo 1.

Artigo 1 - *First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncology, 2021.*

First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial



Luis Paz-Ares, Tudor-Eliade Ciuleanu, Manuel Cobo, Michael Schenker, Bogdan Zurawski, Juliana Meneses, Eduardo Richardet, Jaafar Bennouna, Enriqueta Felip, Oscar Juan-Vidal, Aurelia Alexandru, Hiroshi Sakai, Alejo Lingua, Pamela Salman, Pierre-Jean Souquet, Pedro DeMarchi, Claudio Martin, Maurice Pérol, Arnaud Scharpereel, Shun Lu, Thomas John, David P Carbone, Stephanie Meadows-Shropshire, Shrut i Agrawal, Abderahim Ouksessou, Jinchun Yan, Martin Reck

Summary

Background First-line nivolumab plus ipilimumab has shown improved overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). We aimed to investigate whether the addition of a limited course (two cycles) of chemotherapy to this combination would further enhance the clinical benefit.

Methods This randomised, open-label, phase 3 trial was done at 103 hospitals in 19 countries. Eligible patients were aged 18 years or older with treatment-naïve, histologically confirmed stage IV or recurrent NSCLC, and an Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 0–1. Patients were randomly assigned (1:1) by an interactive web response system via permuted blocks (block size of four) to nivolumab (360 mg intravenously every 3 weeks) plus ipilimumab (1 mg/kg intravenously every 6 weeks) combined with histology-based, platinum doublet chemotherapy (intravenously every 3 weeks for two cycles; experimental group), or chemotherapy alone (every 3 weeks for four cycles; control group). Randomisation was stratified by tumour histology, sex, and PD-L1 expression. The primary endpoint was overall survival in all randomly assigned patients. Safety was analysed in all treated patients. Results reported here are from a pre-planned interim analysis (when the study met its primary endpoint) and an exploratory longer-term follow-up analysis. This study is active but no longer recruiting patients, and is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT03215706.

Findings Between Aug 24, 2017, and Jan 30, 2019, 1150 patients were enrolled and 719 (62.5%) randomly assigned to nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy (n=361 [50%]) or four cycles of chemotherapy alone (n=358 [50%]). At the pre-planned interim analysis (median follow-up 9.7 months [IQR 6.4–12.8]), overall survival in all randomly assigned patients was significantly longer in the experimental group than in the control group (median 14.1 months [95% CI 13.2–16.2] vs 10.7 months [9.5–12.4]; hazard ratio [HR] 0.69 [95% CI 0.55–0.87]; p=0.00065). With 3.5 months longer median follow-up (median 13.2 months [IQR 6.4–17.0]), median overall survival was 15.6 months (95% CI 13.9–20.0) in the experimental group versus 10.9 months (9.5–12.6) in the control group (HR 0.66 [95% CI 0.55–0.80]). The most common grade 3–4 treatment-related adverse events were neutropenia (in 24 [7%] patients in the experimental group vs 32 [9%] in the control group), anaemia (21 [6%] vs 50 [14%]), diarrhoea (14 [4%] vs two [1%]), increased lipase (22 [6%] vs three [1%]), and asthenia (three [1%] vs eight [2%]). Serious treatment-related adverse events of any grade occurred in 106 (30%) patients in the experimental group and 62 (18%) in the control group. Seven (2%) deaths in the experimental group (acute kidney failure, diarrhoea, hepatotoxicity, hepatitis, pneumonitis, sepsis with acute renal insufficiency, and thrombocytopenia; one patient each) and six (2%) deaths in the control group (anaemia, febrile neutropenia, pancytopenia, pulmonary sepsis, respiratory failure, and sepsis; one patient each) were treatment related.

Interpretation Nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy provided a significant improvement in overall survival versus chemotherapy alone and had a favourable risk–benefit profile. These data support this regimen as a new first-line treatment option for patients with advanced NSCLC.

Funding Bristol Myers Squibb.

Copyright © 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

First-line treatment with PD-1 or PD-L1 blockade, as monotherapy or combined with chemotherapy, has

improved outcomes for patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) with no targetable driver alterations.^{1–7} Although a subset of patients might have

Lancet Oncol 2021

Published Online

January 18, 2021

[https://doi.org/10.1016/S1473-2045\(20\)30641-0](https://doi.org/10.1016/S1473-2045(20)30641-0)

See Online/Comment

[https://doi.org/10.1016/S1473-2045\(20\)30701-4](https://doi.org/10.1016/S1473-2045(20)30701-4)

Hospital Universitario

12 de Octubre, CNIO-H120

Lung Cancer Unit, Universidad

Complutense & GberOnc,

Madrid, Spain

(Prof L Paz-Ares MD); Institutul

Oncologic Prof Dr Ion Chiticuta

and UMF Iuliu Hatieganu,

Cluj-Napoca, Romania

(T-E Ciuleanu MD); Unidad de

Gestión Clínica Intercursos de

Oncología Médica, Hospitales

Universitarios Regionales

Virgen de la Victoria, IBIMA,

Málaga, Spain (M Cobo MD);

SF Nectaris Oncology Centre,

Craiova, Romania

(M Schenker MD);

Ambulatorium Chemioterapii,

Bydgoszcz, Poland

(B Zurawski MD); Hospital

Nossa Senhora Da Conceição,

Porto Alegre, Brazil

(J Meneses MD); Instituto

Oncológico De Córdoba,

Córdoba, Argentina (E Richardet

MD); Thoracic Oncology Unit,

University Hospital of Nantes

and INSERM, CRCINA, Nantes,

France (J Bernoussi MD);

Vall d'Hebron University

Hospital, Vall d'Hebron

Institute of Oncology,

Barcelona, Spain

(Prof E Felip MD); Hospital

Universitario La Fe, Valencia,

Spain (Prof O Juan-Vidal MD);

Instituto de Oncology

Prof Dr Alexandru Trebucianu

Bucsa, Bucharest, Romania

(A Alexandru MD); Saitama

Cancer Center, Saitama,

Japan (H Sakai MD); Instituto Medico

Rio Cuarto SA, Córdoba,

Argentina (A Lingua MD);

Fundacion Arturo Lopez Perez, Santiago, Metropolitana, Chile (Prof P Salazar MD); Hôpital Lyon Sud, Lyon, Pierre Bénite, France (P-J Souquet MD); Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil (P De Marchi MD); Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina (C Martin MD); Léon Bérard Cancer Center, Lyon, France (M Pirol MD); Pulmonary and Thoracic Oncology, University of Lille, CHU Lille, INSERM U1189, OncoThal, Lille, France (Prof A Scherpereel MD); Shanghai Lung Cancer Center, Shanghai Chest Hospital, Shanghai JiaoTong University, Shanghai, China (Prof S Lu MD); Austin Hospital, Heidelberg, VIC, Australia (T John MD); The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, OH, USA (Prof D P Carbone MD); Bristol Myers Squibb, Princeton, NJ, USA (S Meadows-Shropshire PhD, S Agrawal PhD, A Orlowski MD, J Yan MD); Department of Thoracic Oncology, A Inoway Research Center North, German Center for Lung Research, LungClinic, Grosshansdorf, Germany (Prof M Reck MD)

Correspondence to: Prof Luis Paz-Ares, Hospital Universitario 12 de Octubre, CNIO-H12o Lung Cancer Unit, Universidad Complutense & IberOnc, 28041 Madrid, Spain
lpazares@icm.es

Research in context

Evidence before this study

We searched for articles in PubMed and abstracts from major oncology congresses for studies relevant to non-small-cell lung cancer (NSCLC) and cancer immunotherapy regimens with a focus primarily on phase 3 trials. Search terms were "non-small cell lung cancer", "anti-PD-L1", "anti-PD-1", "anti-CTLA-4", "chemotherapy", "pembrolizumab", "atezolizumab", and "nivolumab" (full names and abbreviations), and relevant articles published from database inception to July 22, 2020, were identified. At the time of the design of CheckMate 91A (2017), checkpoint inhibition had shown efficacy in patients with NSCLC expressing high levels of PD-L1; however, chemotherapy was the first-line standard of care for many patients with advanced or metastatic NSCLC and no actionable mutations, and was associated with poor survival outcomes. Since then, several clinical trials in patients with NSCLC have assessed first-line immunotherapy regimens versus chemotherapy; regimens included checkpoint inhibitors as monotherapies, in combination with chemotherapy, or alongside other immunotherapy. During the conduct of CheckMate 91A, checkpoint inhibition in other studies was shown to improve the outcomes in patients with NSCLC regardless of PD-L1 expression, when administered in combination with chemotherapy. Additionally, data showing the clinical benefit of nivolumab plus ipilimumab in patients with NSCLC emerged in CheckMate 227. Improved disease control is needed during the initial phase of immunotherapy treatment to enhance clinical benefit. Because chemotherapy might provide rapid disease control, CheckMate 91A was designed to investigate the efficacy and safety of nivolumab plus ipilimumab with a limited course (two cycles) of chemotherapy versus a full course (four cycles) of

chemotherapy alone. A single-arm phase 2 study assessing nivolumab plus ipilimumab with a limited course (two cycles) of chemotherapy showed that this regimen was tolerable and had encouraging clinical activity.

Added value of this study

We provide results from the randomised CheckMate 91A study, which to our knowledge is the first phase 3 study to show a significant overall survival benefit, regardless of PD-L1 expression or histology, with dual PD-1 and CTLA-4 inhibition combined with two cycles of chemotherapy versus a standard course (four cycles) of chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced NSCLC. Results presented here build upon those previously reported in the single-arm, phase 2 study and confirm the clinical activity and tolerability of this regimen. Benefit improved with longer follow-up and was consistent across all efficacy endpoints. Notably, a survival benefit was observed across various patient subgroups, including populations with a high unmet medical need, such as those with CNS metastases. Furthermore, the safety profile of this combination therapy was consistent with the profiles of the components of the regimen in first-line treatment for patients with NSCLC, and no new safety signals were reported.

Implications of all the available evidence

Overall, efficacy and safety data from CheckMate 91A support a favourable risk-benefit profile for nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced NSCLC. Nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy is now approved and indicated in the USA, Singapore, Australia, Canada, and other countries for first-line treatment of patients with metastatic or recurrent NSCLC with no *EGFR* or *ALK* genomic tumour aberrations.

improved survival with available anti-PD-(L)1 therapies, such as pembrolizumab with or without chemotherapy, nivolumab plus ipilimumab, and atezolizumab, long-term outcomes for most patients remain poor.⁸

Nivolumab, a fully human anti-PD-1 antibody, and ipilimumab, a fully human anti-CTLA4 antibody, are immune checkpoint inhibitors with distinct but complementary mechanisms of action. Ipilimumab induces T-cell proliferation and de-novo anti-tumour T-cell responses, including in memory T cells, whereas nivolumab restores the function of existing anti-tumour T cells.^{9,11} In part 1 of the CheckMate 227 trial (NCT02477826), first-line nivolumab plus ipilimumab versus chemotherapy showed durable responses and overall survival benefit, which were maintained with longer follow-up, in patients with advanced NSCLC and PD-L1 expression on at least 1% of tumour cells. Similar benefit was also observed in patients with PD-L1 expression on less than 1% of tumour cells in the same study, based on a descriptive analysis.^{12,13} A third of patients who were treated with nivolumab plus ipilimumab were still alive at 3 years in both the group of patients with

PD-L1 expression of at least 1% and in those with PD-L1 expression less than 1%, compared with 22% and 15%, respectively, of those treated with chemotherapy.¹³

Nivolumab plus ipilimumab is indicated in the USA and other countries for the first-line treatment of adults with metastatic NSCLC with PD-L1 expression of at least 1% and no *EGFR* or *ALK* genomic tumour aberrations.¹⁴ However, as reported in other NSCLC trials that assessed first-line single-agent or dual immunotherapy,^{15,16} there remains a need, in a subset of patients, for disease control during the first few weeks of immunotherapy to enhance clinical benefit. Previous studies have shown that chemotherapy elicits anti-tumour effects through the immune system, which might result in increased immunotherapy activity,^{17,18} although whether this effect is additive or synergistic with immunotherapy, or potentially due to interpatient variability, is not known.^{19,20} We hypothesised that dual immunotherapy combined with two cycles of chemotherapy would provide early disease control while building on the durable survival benefit provided by nivolumab and ipilimumab, and minimise the

side-effects that are associated with a full course of chemotherapy. A feasibility study showed that this regimen was tolerable.²⁷ We therefore aimed to investigate nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy versus chemotherapy alone (four cycles, with optional pemetrexed maintenance for patients with non-squamous histology) as first-line treatment for patients with advanced NSCLC.

Methods

Study design and participants

CheckMate 91A was an international, randomised, open-label phase 3 trial that was done in 103 hospitals in 19 countries (appendix pp 2–4, 33). Eligible patients were aged at least 18 years with histologically confirmed squamous or non-squamous stage IV or recurrent NSCLC (per the 7th International Association for the Study of Lung Cancer classification²⁸), an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status of 0–1, and no previous systemic anti-cancer therapy as the primary treatment for advanced or metastatic disease. Patients had to have a life expectancy of at least 3 months and were required to have measurable disease per Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (version 1.1). Patients who had previous adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for early-stage disease and those with locally advanced NSCLC with recurrence after chemoradiotherapy must have completed treatment at least 6 months before enrolment. Patients with CNS metastases were eligible if they were adequately treated and if neurological findings had returned to baseline (except for residual signs or symptoms related to the CNS treatment) at least 2 weeks before starting study treatment, and thus were considered stable. Additionally, patients had to be off corticosteroids, or on a stable or decreasing dose of 10 mg or less daily prednisone (or equivalent) for at least 2 weeks before first treatment. All patients had to have tumour tissue available to assess PD-L1 expression levels at study entry, and results had to be available for randomisation. To assess eligibility, the following laboratory tests were done within 14 days before randomisation: complete blood count with differential; chemistry panel including concentrations of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total bilirubin, blood urea nitrogen or serum urea level, creatinine, phosphate, albumin, calcium, magnesium, sodium, potassium, chloride, lactate dehydrogenase, glucose, amylase, and lipase; and thyroid panel including concentrations of thyroid-stimulating hormone, free thyroxine, and free triiodothyronine. Negative hepatitis B and hepatitis C tests were required within 28 days before randomisation.

Exclusion criteria included known *EGFR* mutations and *ALK* translocations that were sensitive to targeted therapy, unknown or undetermined *EGFR* status in patients with non-squamous histology, and autoimmune disease. Patients were also excluded if they had carcinomatous

meningitis, symptomatic interstitial lung disease, HIV, AIDS, or previous malignancy (except non-melanoma skin cancers and in situ cancers) within 2 years of first study dose. Patients with conditions requiring systemic corticosteroids (>10 mg daily prednisone or equivalent) or immunosuppressive medication within 14 days of the first dose of study drug were also not eligible. Previous treatment with agents targeting T-cell co-stimulation or checkpoint pathways was not permitted. Additional details on eligibility criteria are in the appendix (p 5) and in the protocol (appendix p 43).

This study was done according to the Declaration of Helsinki and the international standards of Good Clinical Practice. The independent ethics committee or institutional review board of each participating study centre approved the protocol and all amendments. All patients provided written informed consent.

See Online for appendix

Randomisation and masking

Patients were randomly assigned (1:1) to nivolumab plus ipilimumab combined with chemotherapy or chemotherapy alone through an interactive web response system. Randomisation was done via permuted blocks within each stratum, with a block size of four and stratified by tumour histology (squamous vs non-squamous), sex (male vs female), and tumour PD-L1 expression level (<1% vs ≥1%). Per protocol, patients with tumour PD-L1 expression data that could not be assessed (maximum of 10% of all randomly assigned patients) were stratified with the patient population with PD-L1 expression less than 1%. Allocation and implementation were managed via the interactive web response system. The trial was open label.

Procedures

Patients received nivolumab (360 mg intravenously every 3 weeks) given first, followed by NSCLC-optimised ipilimumab (1 mg/kg intravenously every 6 weeks) combined with histology-based platinum doublet chemotherapy (intravenously every 3 weeks for two cycles) or chemotherapy alone (intravenously every 3 weeks for four cycles). The intravenous chemotherapy regimens (which were standard of care when the trial was designed) for both treatment groups consisted of carboplatin (area under the concentration–time curve [AUC] 6) plus paclitaxel (200 mg/m²) for patients with squamous histology or carboplatin (AUC 5 or 6) plus pemetrexed (500 mg/m²) or cisplatin (75 mg/m²) plus pemetrexed (500 mg/m²) for patients with non-squamous histology. In the experimental group, treatment with nivolumab plus ipilimumab continued until disease progression (unless prespecified criteria were met for treatment beyond progression; appendix p 5), unacceptable toxicity, or completion per protocol (2 years). Optional maintenance therapy with pemetrexed (500 mg/m²) was permitted for patients with non-squamous tumour histology treated with chemotherapy alone (not permitted

in the experimental group), until disease progression or unacceptable toxicity. Dose reductions were permitted for chemotherapy, but not for nivolumab or ipilimumab. Additional details about dose reductions, delays, and criteria for patient discontinuation from the study can be found in the appendix (pp 5–7). Crossover between the treatment groups was not permitted; however, patients could receive subsequent immunotherapy upon the discontinuation of study treatment in either group at the physician's discretion.

Tumours were assessed using CT or MRI scans at baseline, approximately every 6 weeks after the first dose for the first 12 months, and every 12 weeks thereafter until disease progression confirmed by blinded independent central review or treatment discontinuation. MRI or CT of the brain was required at baseline and patients with a history of brain metastasis were assessed per standard of care using Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (version 1.1). Adverse events were assessed at baseline, continuously while on treatment, and within 100 days of discontinuation of dosing, and were graded per the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (version 4.0). Laboratory tests included HIV testing done within 14 days before randomisation, as per local regulations; hepatitis B and hepatitis C testing done within 28 days before randomisation; chemistry and haematology tests done within 14 days before randomisation and within 72 h before dosing on day 1 of cycle one and on day 1 of each subsequent cycle; and thyroid function testing done within 14 days before randomisation and within 72 h before dosing every other cycle. Squamous and non-squamous tumour histologies were assessed by investigators. Archival or fresh formalin-fixed, paraffin-embedded tumour tissue samples were collected within 3 months before enrolment. PD-L1 expression on viable tumour cells was assessed at a central laboratory (Q2 Solutions, Marietta, GA, USA) using the analytically and clinically validated approved immunohistochemical 28-8 pharmDx assay (Agilent Dako, Santa Clara, CA, USA).

Outcomes

The primary endpoint was overall survival was defined as the time from randomisation to the date of death due to any cause. Hierarchical secondary endpoints (tested statistically if the primary endpoint was met) were progression-free survival and objective response rate (radiographic tumour assessments per Response Evaluation Criteria in Solid Tumors [version 1.1], according to blinded independent central review). Progression-free survival was defined as the time from randomisation to the date of the first documented tumour progression, or death from any cause, whichever occurred first. Objective response rate was defined as the proportion of patients with a best overall response of partial response or better. Confirmation of response was required at least 4 weeks

after the initial response. Other secondary endpoints were overall survival, progression-free survival, and objective response rate by PD-L1 expression level. Data on efficacy by tumour mutational burden (secondary endpoint), progression-free survival after next line of treatment (prespecified exploratory endpoint), and patient-reported outcomes (exploratory endpoint) were not fully available at the time of the analyses in this report and will be published separately. Additional details about study outcomes are provided in the appendix (pp 7–8).

Statistical analysis

For the primary endpoint of overall survival, we hypothesised that a sample of approximately 700 randomly assigned patients and 402 deaths would provide more than 80% power to detect an average hazard ratio (HR) of 0.75 for nivolumab and ipilimumab combined with chemotherapy versus chemotherapy alone with a two-sided type 1 error of 0.05, by means of a log-rank test. At the time of the prespecified interim analysis (Oct 3, 2019), 351 patients had died. The planned number of deaths was 322 for the interim analysis, which was approximately 80% of planned total deaths. The boundary for declaring superiority for overall survival at the interim analysis was a p value of less than 0.033, which was based on the Lan-DeMets alpha spending function with O'Brien-Fleming boundaries. If superiority with respect to overall survival was shown, formal statistical testing was done hierarchically on progression-free survival and objective response rate at the significance level adjusted for the primary endpoint and interim analysis to preserve the overall type 1 error rate (0.0252 for progression-free survival and 0.025 for objective response rate). Efficacy analyses were done in all patients who were randomly assigned through the interactive web response system. As part of the assessment of objective response rate, time to first documented complete or partial response and duration of response (time between date of first confirmed documented response and date of first documented tumour progression, death, or last tumour assessment that occurred before subsequent therapy [data censoring date]) were assessed in all patients who had a confirmed complete or partial response. Survival curves and rates were estimated using the Kaplan-Meier method. HRs and CIs were estimated with a stratified Cox proportional-hazards model with treatment group as a single covariate. For overall survival, patients who had not died were censored at last known date alive. For overall survival, a Cox model with a time-dependent treatment interaction did not result in statistical significance ($p=0.9197$), indicating that the proportional hazards assumption was met. The primary definition of progression-free survival used in the analysis accounts for subsequent therapy by censoring at the last evaluable tumour assessment on or before the date of subsequent therapy. Analyses of overall survival, progression-free survival, and objective response rates were stratified by

PD-L1 expression, sex, and histology. Patients who could not be assessed for PD-L1 expression were stratified with patients with PD-L1 expression less than 1%; patients who could not be assessed for PD-L1 expression were included in analyses of all randomly assigned patients but were excluded from analyses of the subgroup of patients with PD-L1 expression less than 1%. Objective response rates were compared using a stratified two-sided Cochran-Mantel-Haenszel test. Prespecified key subgroup analyses were done for overall survival, progression-free survival, and objective response rate to assess the consistency of treatment effects in patient subgroups (baseline age; sex; ECOG status; smoking status; tumour histology; liver, bone, and CNS metastases; and PD-L1 expression). Subgroup analyses were descriptive and summarised using 95% CIs. Safety analyses, including a prespecified assessment of the incidence of treatment-related adverse events per 100 patient-years, assessed all randomly assigned patients who received at least one dose of study drug.

Sensitivity analyses of the primary endpoint of overall survival included an unstratified analysis and a multivariate analysis of overall survival (adjusted for baseline ECOG performance status, histology, sex, and PD-L1 expression) and were done in all randomly assigned patients. Sensitivity analyses of progression-free survival, including an analysis of progression-free survival per blinded independent central review using the secondary definition of progression-free survival (patients were not censored at the initiation of subsequent therapy), and progression-free survival per investigator assessment using the primary and secondary definitions of progression-free survival were also done. These analyses were done using the methods described for progression-free survival per blinded independent central review using the primary definition. Other sensitivity analyses were prespecified; however, because conditions were not met (more than 10% of participants had relevant protocol deviations) these analyses were not done. Data with longer follow-up for primary and secondary endpoints from an exploratory database lock (March 9, 2020), along with additional outcomes, are also reported. All analyses reported from this updated database lock were prespecified, with the exception of the following post hoc analyses: the number of platinum-based chemotherapy cycles received; the proportion of patients on pemetrexed maintenance therapy; the proportion of patients receiving platinum doublet chemotherapy as subsequent therapy; and subsequent systemic therapy by PD-L1 and histology, and among patients with disease progression during the study. Additional details on statistical methods are in the appendix (pp 7–8).

Statistical analyses were done using SAS (version 9.2). An independent data monitoring committee reviewed efficacy and safety data on a periodic basis and at the time of the pre-planned interim analysis.

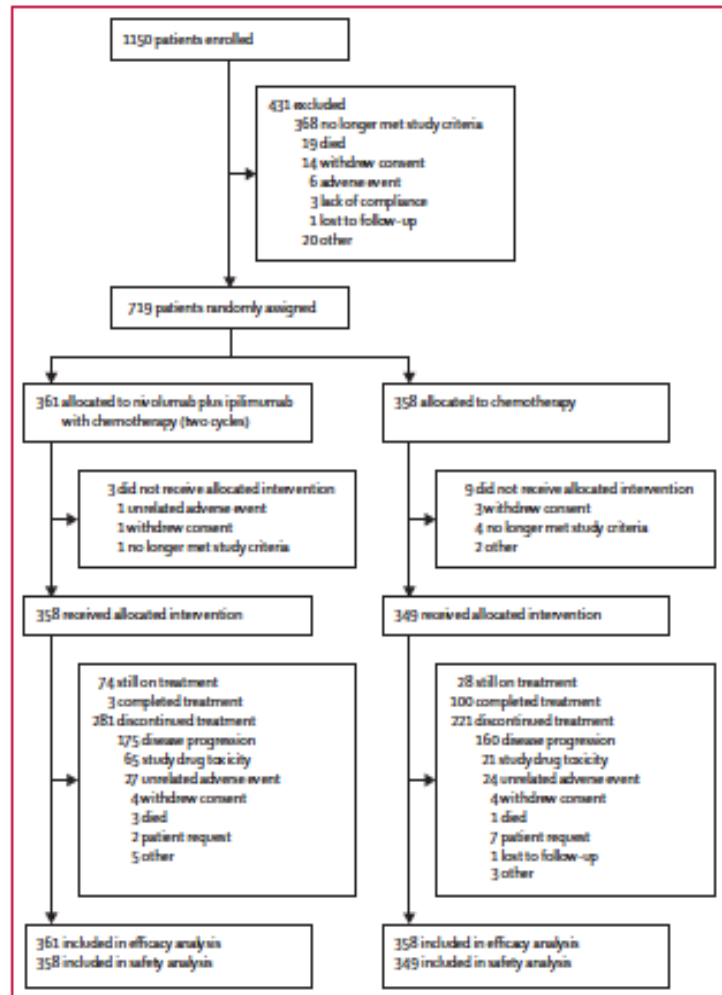


Figure 1: Trial profile

This trial is registered with ClinicalTrials.gov number, NCT03215706.

Role of the funding source

The study was designed by the steering committee and the funder. The funder contributed to data collection with the investigators, to data analysis and interpretation in collaboration with the authors, and to the writing of the report by funding professional medical writing assistance. All authors had full access to all the data in the study. The corresponding author had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Between Aug 24, 2017, and Jan 30, 2019, 1150 patients were enrolled. 431 (37.5%) patients were excluded before randomisation, most commonly due to failure to

	Nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy group (n=361)	Chemotherapy group (n=358)
Age, years	65.0 (59.0-70.0)	65.0 (58.0-70.0)
<65	176 (49%)	178 (50%)
≥65 to <75	148 (41%)	147 (41%)
≥75	37 (10%)	33 (9%)
Sex		
Male	252 (70%)	252 (70%)
Female	109 (30%)	106 (30%)
Region		
North America	36 (10%)	28 (8%)
Europe	212 (59%)	213 (60%)
Asia	28 (8%)	30 (8%)
Rest of world*	85 (24%)	87 (24%)
Eastern Cooperative Oncology Group performance status†		
0	113 (31%)	112 (31%)
1	247 (68%)	245 (68%)
Smoking status		
Never smoked	46 (13%)	52 (14%)
Current or former smoker	315 (87%)	306 (86%)
Tumour histological type		
Squamous	113 (31%)	111 (31%)
Non-squamous	248 (69%)	247 (69%)
Liver metastasis	68 (19%)	86 (24%)
Bone metastasis	97 (27%)	110 (31%)
CNS metastasis	64 (18%)	58 (16%)
PD-L1 status‡		
Quantifiable	338 (94%)	333 (93%)
<1%	135 (40%)	129 (39%)
≥1%	203 (60%)	204 (61%)
1-49%	127 (38%)	106 (32%)
≥50%	76 (22%)	98 (29%)

Data are median (IQR) or n (%). *Includes Argentina, Australia, Brazil, and Chile. †Eastern Cooperative Oncology Group performance status was not reported for one patient in each treatment group. ‡Patients with tumour tissue that could not be assessed for PD-L1 (maximum of 10% of the total randomly assigned population) were stratified with the subgroup of patients with PD-L1 expression less than 1%.

Table 1: Baseline characteristics

meet study criteria (figure 1), the main reasons for which were patients having untreated CNS metastases (79 [22%] of 368 patients), known *EGFR* mutations or non-squamous histology with unknown *EGFR* status (59 [16%]), ECOG performance status greater than 1 (46 [12%]), and no tumour tissue sample available for PD-L1 testing before randomisation (45 [12%]). 719 eligible patients were randomly assigned to nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy (experimental group; n=361 [50%]) or to chemotherapy alone (control group; n=358 [50%]). Of these patients, 358 (99%) in the nivolumab plus ipilimumab group and 349 (97%) in the chemotherapy alone group received treatment (figure 1). Baseline characteristics were well balanced between treatment groups (table 1). 338 (94%) of 361 patients in the

experimental group and 333 (93%) of 358 in the control group had quantifiable PD-L1 expression.

We report the primary endpoint of overall survival (minimum follow-up 8.1 months), and hierarchical secondary efficacy endpoints (minimum follow-up 6.5 months) from the Oct 3, 2019 database lock (prespecified interim analysis), with a median follow-up of 9.7 months (IQR 6.4-12.8). Because the minimum follow-up was relatively short at the interim analysis, the clinical benefit of nivolumab plus ipilimumab combined with chemotherapy was further characterised with an updated, exploratory database lock (March 9, 2020) to enable the report of more mature data for overall survival (minimum follow-up 12.7 months), and the secondary endpoints (minimum follow-up 12.2 months). With longer follow-up (median 13.2 months [IQR 6.4-17.0]), the study had reached 60% maturity.

At the prespecified interim analysis the independent data and safety monitoring committee confirmed that CheckMate 91A met the primary endpoint of prolonged overall survival, and this report is therefore considered the final analysis. 156 (43%) of 361 patients in the experimental group and 195 (54%) of 358 patients in the control group had died. Median overall survival was 14.1 months (95% CI 13.2-16.2) in the experimental group versus 10.7 months (9.5-12.4) in the control group (stratified HR 0.69 [96.71% CI 0.55-0.87], p=0.00065; figure 2A). The secondary endpoints of progression-free survival and objective response rates were tested hierarchically, and both were significantly improved in the experimental versus control group. 232 (64%) of 361 patients in the experimental group and 249 (70%) of 358 patients in the control group had disease progression or died by the time of data cutoff (Oct 3, 2019). Median progression-free survival was 6.8 months (95% CI 5.6-7.7) in the experimental group versus 5.0 months (4.3-5.6) in the control group (HR 0.70 [97.48% CI 0.57-0.86]; p=0.00012; appendix p 34). An objective response was reported in 136 (37.7% [95% CI 32.7-42.9]) of 361 patients in the experimental group versus 90 (25.1% [20.7-30.0]) of 358 patients in the control group (p=0.00030; appendix p 13). Results from the sensitivity analyses of overall survival at the interim analysis were consistent with the primary analysis (data not shown). Additionally, results from the analysis of progression-free survival using the secondary definition were consistent with those obtained using the primary definition (data not shown). We found no notable difference between blinded independent central review-assessed and investigator-assessed progression-free survival (data not shown).

With an additional 4.6 months of minimum follow-up (3.5 months longer median follow-up) for overall survival (minimum 12.7 months; median 13.2 months [IQR 6.4-17.0]; March 9, 2020 database lock), 190 (53%) patients in the experimental group and 242 (68%) patients in the control group had died.

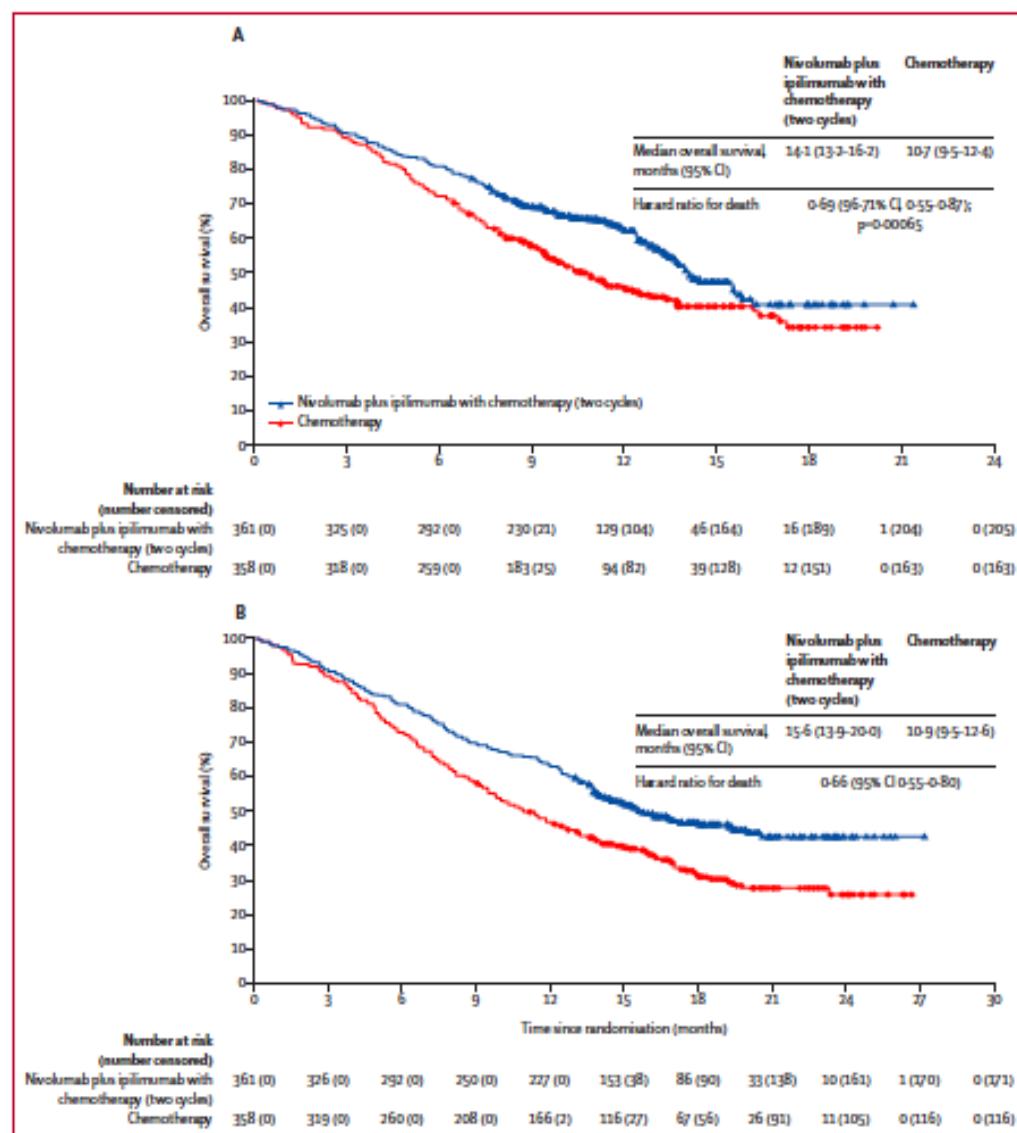


Figure 2: Overall survival

Overall survival in all randomly assigned patients at interim analysis (A) and with longer follow-up (B). The hazard ratios for overall survival presented on the graphs are stratified.

Median overall survival was 15.6 months (95% CI 13.9–20.0) in the experimental group and 10.9 months (9.5–12.6) in the control group (stratified HR 0.66; 95% CI 0.55–0.80; figure 2B). 12-month overall survival rates were 63% (95% CI 57.7–67.6) in the experimental group versus 47% (41.6–51.9) in the control group (appendix p 16).

Overall survival in most prespecified subgroups favoured the experimental group (HR less than 1), with the exception (figure 3). Improved overall survival in the experimental group versus the control group was

observed across all PD-L1 expression levels (figure 4A, B; appendix pp 35–36). Similar benefit was seen in the experimental group in patients with non-squamous and squamous histology (figure 4C, D).

With longer follow-up, 249 (69%) patients in the experimental group and 265 (74%) patients in the control group had progressive disease or died by the time of data cutoff. Median progression-free survival was 6.7 months (95% CI 5.6–7.8) in the experimental group versus 5.0 months (4.3–5.6) in the control group (HR 0.68 [95% CI 0.57–0.82];

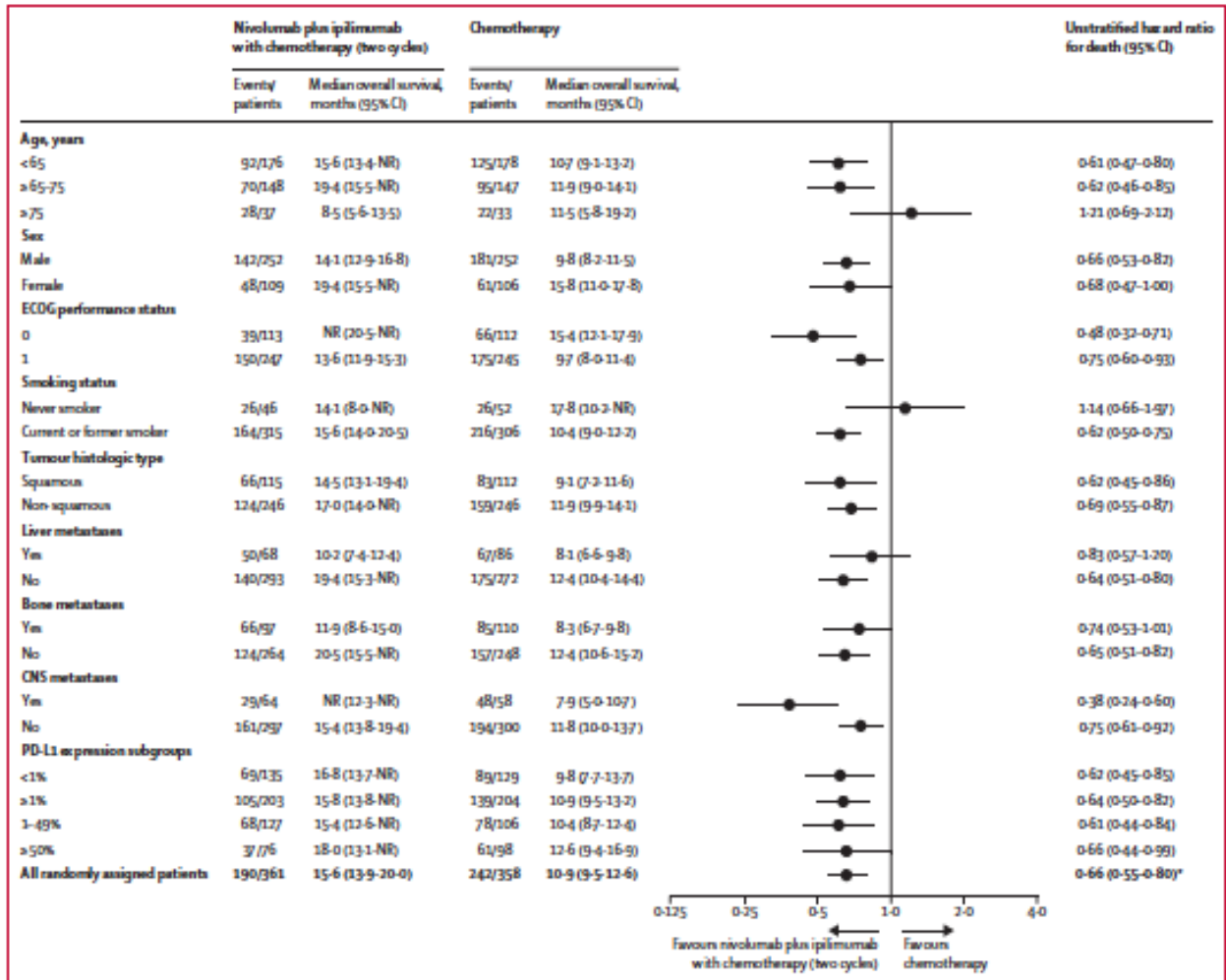


Figure 3: Forest plot of overall survival based on longer follow-up in predefined patient subgroups

ECOG=Eastern Cooperative Oncology Group. NR=not reached. *Stratified hazard ratio. Unstratified hazard ratio was 0.67 (95% CI 0.55-0.81).

appendix p 38). Longer progression-free survival in the experimental group versus the control group was observed in most patient subgroups, (appendix p 37). Progression-free survival was longer in the experimental group than in the control group regardless of PD-L1 expression level or tumour histology (appendix pp 39-43).

Objective response rates did not change notably with longer follow-up since the Interim analysis (table 2). More patients in the experimental group had a 30% reduction or more from baseline in tumour burden than in the control group (appendix p 44). Median duration of response was longer in the experimental group than in the control group, with heavy censoring from 9 months in the experimental group (table 2; appendix p 45). At 1 year, more patients in the experimental group than in the

control group had an ongoing response. Differences between the experimental and control groups in objective responses and median durations of response were consistent across PD-L1 and histology subgroups (appendix pp 14-15). Results from the sensitivity analyses of overall survival and progression-free survival were consistent with the primary analysis for the longer follow-up, and with the sensitivity analyses at the Interim analysis (data not shown).

Median duration of treatment was 6.1 months (IQR 2.7-13.5) in the experimental group and 2.4 months (2.0-5.3) in the control group. In the experimental group, the median number of doses of nivolumab received was 9.0 (IQR 4.0-19.0) and the median number of doses of ipilimumab received was 4.0 (2.0-10.0). Further information about treatment exposure and dose reductions is

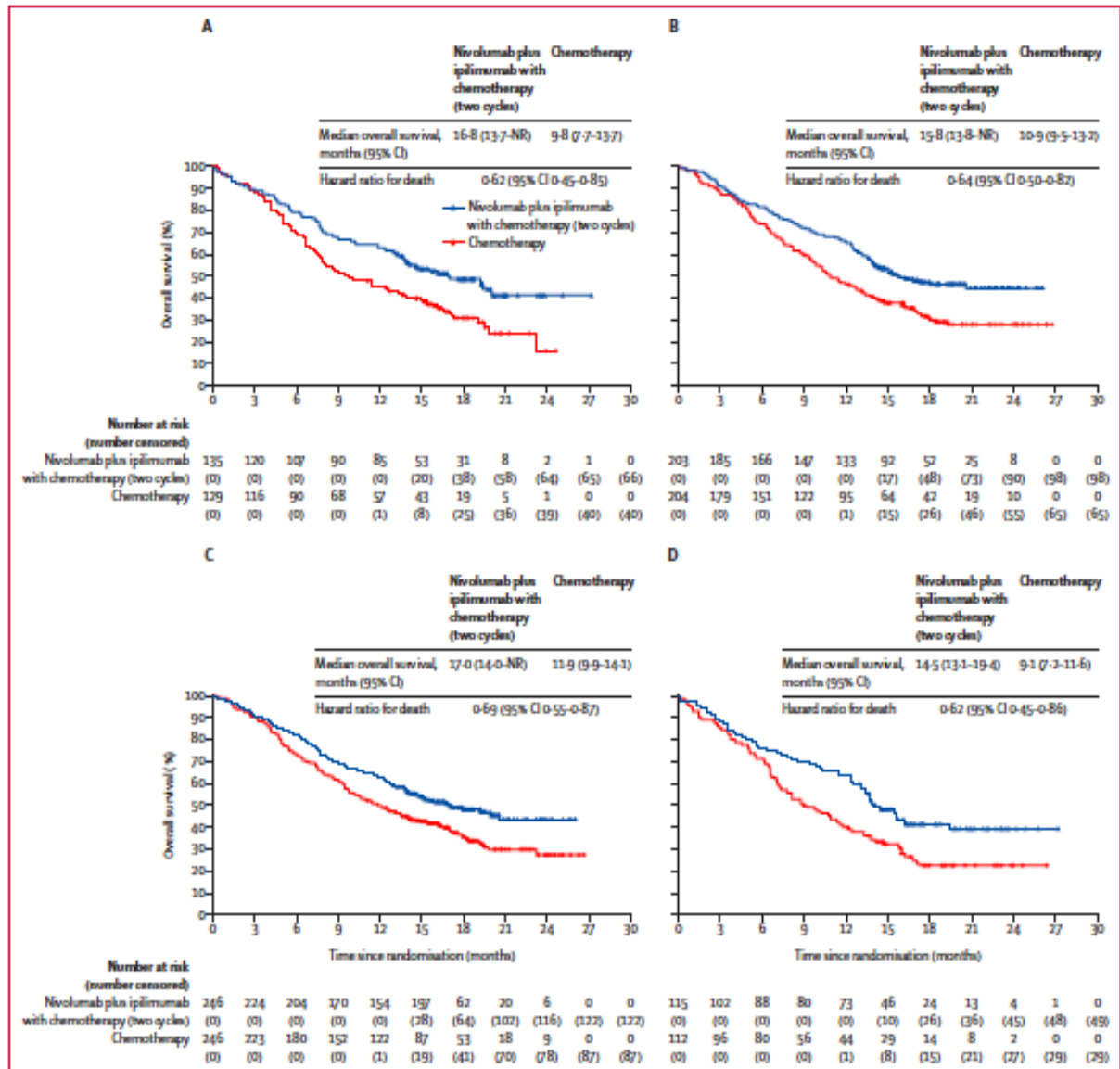


Figure 4: Overall survival by tumour PD-L1 expression and tumour histology

Overall survival in patients with tumour PD-L1 expression less than 1% (A), 1% or more (B), and in patients with non-squamous tumour histology (C), and squamous tumour histology (D). NR-not reached.

available in the appendix (pp 17–19). 333 (93%) patients in the experimental group received two cycles of chemotherapy. The most common reason for treatment discontinuation was disease progression (175 [49%] patients in the experimental group vs 160 [46%] in the control group; figure 1). At the March 9, 2020, database lock, 74 (21%) of 358 patients in the experimental group and 28 (8%) of 349 in the control group remained on treatment.

In all randomly assigned patients, subsequent systemic therapy was received by 111 (31%) of 361 patients in the

experimental group, of whom 59 (53%) received platinum doublet chemotherapy. Subsequent systemic therapy was received by 144 (40%) of 358 patients in the control group (appendix pp 9–10). Subsequent immunotherapy was received by 19 (5%) of 361 patients in the experimental group and 108 (30%) of 358 patients in the control group, and subsequent chemotherapy by 105 (29%) of 361 patients in the experimental group and 80 (22%) of 358 patients in the control group. Among patients with disease progression on study, subsequent systemic therapy was

	Nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy group (n=351)	Chemotherapy group (n=358)
Objective responses (% [95% CI])	138 (38.2%; 33.7-43.5)	89 (24.9%; 20.5-29.7)
Best overall response		
Complete response	8 (2%)	4 (1%)
Partial response	130 (36%)	85 (24%)
Stable disease	164 (45%)	185 (52%)
Progressive disease	32 (9%)	45 (13%)
Could not be determined or not reported	27 (8%)	39 (11%)
Median time to response, months (IQR)	2.6 (1.4-3.1)	1.5 (1.4-2.8)
Median duration of response, months (95% CI)	11.3 (8.5-not reached)	5.6 (4.4-7.5)
Patients with a response who had ongoing responses		
Rate (95% CI) at 6 months	73% (65-80)	45% (34-55)
Rate (95% CI) at 12 months	49% (40-58)	24% (14-34)

Data are n (%) unless indicated otherwise.

Table 2: Objective response, time to response, and duration of response in all randomly assigned patients

received by 111 (40%) of 278 patients in the experimental group and 139 (44%) of 315 patients in the control group; subsequent immunotherapy was received by 19 (7%) of 278 patients in the experimental group and 106 (34%) of 315 patients in the control group, and subsequent chemotherapy by 105 (38%) of 278 patients in the experimental group and 76 (24%) of 315 patients in the control group. Subsequent therapy by PD-L1 expression level and histology are shown in the appendix (pp 11-12).

Safety is summarised in table 3, and all reported grade 3 and 4 treatment-related adverse events are listed in the appendix (pp 22-25). Grade 3-4 treatment-related adverse events occurred in 168 (47%) of 358 patients in the experimental group and 132 (38%) of 349 in the control group, the most common being neutropenia (in 24 [7%] patients in the experimental group vs 32 [9%] in the control group), anaemia (21 [6%] vs 50 [14%]), diarrhoea (14 [4%] vs two [1%]), increased lipase (22 [6%] vs three [1%]), and ashenia (three [1%] vs eight [2%]). Treatment-related serious adverse events of any grade were reported in 106 (30%) patients in the experimental group and 62 (18%) patients in the control group. Grade 3-4 treatment-related serious adverse events were reported in 91 (25%) patients in the experimental group and 51 (15%) patients in the control group. The most common treatment-related serious adverse events of any grade in the experimental group were diarrhoea (11 [3%] of 358 patients), febrile neutropenia (11 [3%]), and anaemia (eight [2%]), whereas in the control group they were anaemia (12 [3%] of 349 patients), febrile neutropenia (nine [3%]), and thrombocytopenia (six [2%]). All reported treatment-related serious adverse events are listed in the appendix (pp 24-27). Treatment-related adverse events of any grade leading to treatment discontinuation were reported in 69 (19%) patients in the experimental group (due to any of the components of the regimen; ipilimumab alone,

nivolumab plus ipilimumab, or the chemotherapy regimen) versus 26 (7%) patients in the control group. Treatment-related adverse events of grade 3-4 leading to treatment discontinuation were reported in 58 (16%) patients in the experimental group and 16 (5%) patients in the control group (appendix p 28). In the experimental group, 17 (5%) patients discontinued ipilimumab because of treatment-related adverse events but continued with nivolumab. The most frequent treatment-related adverse events of any grade that are typically associated with chemotherapy were anaemia (83 [23%] of 358 patients vs 132 [38%] of 349 patients), neutropenia (35 [10%] vs 59 [17%]), and thrombocytopenia (17 [5%] vs 34 [10%]; appendix p 29).

Treatment exposure was 258.7 person-years in the experimental group and 161.2 person-years in the control group. In the prespecified analysis of treatment-related adverse events adjusted by treatment exposure, the overall incidence of treatment-related adverse events per 100 patient-years was 785.1 in the experimental group versus 951.8 in the control group (appendix p 30).

The most commonly reported treatment-related select adverse events (those with a potential immunological cause) of grade 3-4 in the experimental group were gastrointestinal (20 [6%] patients), skin (16 [4%] patients), and hepatic (16 [4%] patients) events, most of which resolved (appendix p 31). Time to onset and resolution of select treatment-related adverse events, and the proportion of patients requiring immune-modulating medication (including corticosteroids and tumour necrosis factor antagonists) in the experimental group are shown in the appendix (p 32). Seven (2%) treatment-related deaths occurred in the experimental group due to acute kidney failure attributed to chemotherapy, diarrhoea, hepatotoxicity, hepatitis, pneumonitis, sepsis with acute renal insufficiency, and thrombocytopenia (in one patient each). Six (2%) treatment-related deaths occurred in the chemotherapy group due to anaemia, febrile neutropenia, pancytopenia, pulmonary sepsis, respiratory failure, and sepsis (in one patient each). The primary reason for death regardless of association with treatment was disease progression in both groups (187 [52%] deaths in the experimental group, including 153 [43%] due to disease progression; and 237 [68%] in the control group, including 206 [59%] due to disease progression).

Discussion

To our knowledge, CheckMate 9LA is the first phase 3 study to show a significant overall survival benefit by combining a limited course (two cycles) of chemotherapy with nivolumab plus ipilimumab versus a full course of chemotherapy (four cycles, with optional pemetrexed maintenance treatment permitted for patients with non-squamous histology) as first-line treatment in patients with advanced NSCLC, regardless of PD-L1 expression level or histology. Benefit improved with longer follow-up and was observed in most subgroups, except for

	Nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy group (n=358)			Chemotherapy group (n=349)		
	Grade 1-2	Grade 3	Grade 4	Grade 1-2	Grade 3	Grade 4
Any	159 (44%)	124 (35%)	44 (12%)	171 (49%)	111 (32%)	21 (6%)
Nausea	91 (25%)	5 (1%)	0	122 (35%)	3 (1%)	0
Asthenia	72 (20%)	3 (1%)	0	54 (16%)	8 (2%)	0
Pruritus	72 (20%)	3 (1%)	0	6 (2%)	0	0
Anaemia	62 (17%)	20 (6%)	1 (<1%)	82 (24%)	50 (14%)	0
Diarrhoea	60 (17%)	13 (4%)	1 (<1%)	39 (11%)	2 (1%)	0
Rash	61 (17%)	6 (2%)	0	11 (3%)	0	0
Hypothyroidism	56 (16%)	1 (<1%)	0	1 (<1%)	0	0
Fatigue	53 (15%)	8 (2%)	0	36 (10%)	2 (1%)	0
Decreased appetite	55 (15%)	4 (1%)	0	51 (15%)	4 (1%)	0
Vomiting	42 (12%)	6 (2%)	0	47 (14%)	5 (1%)	0
Constipation	32 (9%)	0	0	40 (12%)	0	0
Increased lipase	4 (1%)	17 (5%)	5 (1%)	1 (<1%)	3 (1%)	0
Neutropenia	11 (3%)	14 (4%)	10 (3%)	27 (8%)	26 (7%)	6 (2%)
Increased amylase	11 (3%)	10 (3%)	1 (<1%)	6 (2%)	0	0
Febrile neutropenia	0	9 (2%)	5 (1%)	1 (<1%)	7 (2%)	3 (1%)
Decreased neutrophil count	5 (1%)	6 (2%)	6 (2%)	4 (1%)	5 (1%)	4 (1%)
Thrombocytopenia	7 (2%)	5 (1%)	5 (1%)	25 (7%)	6 (2%)	3 (1%)
Maculo-papular rash	14 (4%)	5 (1%)	0	3 (1%)	1 (<1%)	0
Colitis	6 (2%)	5 (1%)	0	1 (<1%)	0	0
Increased alanine aminotransferase	19 (5%)	5 (1%)	0	12 (3%)	2 (1%)	0
Dehydration	6 (2%)	5 (1%)	0	5 (1%)	2 (1%)	0
Hepatotoxicity	5 (1%)	5 (1%)	0	2 (1%)	0	0
Decreased white blood cell count	7 (2%)	5 (1%)	0	6 (2%)	2 (1%)	0
Decreased platelet count	6 (2%)	2 (1%)	0	11 (3%)	5 (1%)	0
Adrenal insufficiency	8 (2%)	4 (1%)	0	0	0	0

Data are n (%). Grade 1-2 treatment-related adverse events with an incidence of at least 10% in either group, and grade 3-4 events with an incidence of at least 1% in either group are shown. All grade 3 and 4 events are listed in the appendix (pp 19-22). Treatment-related adverse events included those reported between the first dose of study drug and 30 days after the last dose of study drug. According to the study sponsor practice, only events that led to death within 24 h were documented as grade 5 and are reported as deaths in the main text Results section. Events leading to death more than 24 h after onset are reported with the worst grade before death.

Table 3. Treatment-related adverse events in all treated patients

patients who had never smoked, consistent with findings from other immunotherapy trials,¹² and older patients (aged ≥ 75 years). Patients with stable CNS metastases at baseline derived benefit with nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy, as has previously been observed with nivolumab plus ipilimumab in patients with NSCLC and melanoma.^{16,20} However, these subgroups were small and not defined by stratification factors; thus, imbalances in prognostic factors between the two treatment groups might have affected the results in these patient subgroups, which prevents us from drawing definitive conclusions. As such, data from the subgroup analyses should be interpreted with caution. In addition to overall survival, progression-free survival and objective response were significantly improved in the experimental group versus the control group.

Safety in the experimental group was as expected from combining drugs with distinct mechanisms of action, supporting the feasibility of combining dual immunotherapy with chemotherapy as first-line treatment in

patients with NSCLC. No new safety signals were identified for nivolumab plus ipilimumab or chemotherapy in the experimental group^{12,20} and safety was manageable with existing treatment guidelines. The frequency of treatment-related adverse events, those of grade 3 or 4, and those leading to discontinuation were numerically higher in the experimental group than in the control group. This finding could be expected for a four-drug versus two-drug regimen, as well as the longer treatment exposure in the experimental group than in the control group. Moreover, when treatment-related adverse events were adjusted for exposure, the overall incidence rate was numerically lower in the experimental group than in the control group. Similar to previous reports^{12,20} of nivolumab plus ipilimumab in studies of first-line treatment in patients with NSCLC, most treatment-related select adverse events (those with a potential immunological cause) observed in the experimental group in CheckMate 91A were of low grade and mostly resolved. Additionally, toxicity that is typically associated

with chemotherapy (most notably nausea, anaemia, and neutropenia) occurred less frequently in the experimental group than in the control group. This finding might be attributed to the shorter course of chemotherapy in the experimental group and potentially could have a positive clinical effect on patients. As the study is still maturing (60% maturity in this report), longer follow-up will provide further characterisation of the risk–benefit profile of nivolumab plus ipilimumab combined with chemotherapy in this setting.

CheckMate 91A was designed on the basis of the long-term survival benefits and durable responses seen with nivolumab plus ipilimumab in patients with melanoma,²⁷ renal cell carcinoma,²⁸ and NSCLC,^{23,29} and the potential to achieve rapid initial disease control by adding two cycles of chemotherapy to this regimen. As hypothesised, the addition of a limited course (two cycles) of chemotherapy to nivolumab plus ipilimumab provided an efficacy benefit over chemotherapy with early disease control relative to immunotherapy-only regimens in other trials.¹⁰ This finding is supported by reduced rates of primary disease progression versus chemotherapy in this study, and relative to nivolumab plus ipilimumab in CheckMate 227 part 1 (both in patients with tumour PD-L1 expression $\geq 1\%$ those with $<1\%$).³⁰ Additionally, in CheckMate 91A, the overall and progression-free survival curves of the experimental group showed early separation from the chemotherapy curves with no crossing. As a result, a greater difference in overall survival between the experimental group and control group was observed in CheckMate 91A (HR of 0.66 at a minimum follow-up of 12.7 months) than in CheckMate 227 (HR of 0.73 at a minimum follow-up of 29.3 months).³⁰ In CheckMate 91A, the proportion of patients who received subsequent immunotherapy in the control group (30%) was similar to that reported in other trials of first-line treatment in patients with NSCLC (31.7–40.8%),^{31,32} and notably higher than in the experimental group (5%). Although subsequent immunotherapy might have disproportionately improved overall survival in the control group, the overall survival curve for the experimental group continued to separate from the control group with longer follow-up. Analyses are ongoing to find clinical and biomarker characteristics that could identify patient subgroups that particularly benefit from the addition of a limited course of chemotherapy to nivolumab plus ipilimumab. Nonetheless, longer follow-up is needed to investigate the effect of adding two cycles of chemotherapy on the previously observed durability of the dual immunotherapy regimen, and also to provide a more accurate perspective on the risk–benefit profile of the regimen.

In the past 5 years, substantial progress has been made in the first-line treatment of patients with advanced NSCLC with immunotherapy-based regimens. Treatment selection in clinical practice is usually based on PD-L1 expression or histology.³³ Dual immunotherapy with nivolumab plus ipilimumab subsequently showed

durable benefit across PD-L1 expression levels and tumour histologies.²⁴ When CheckMate 91A was initiated, chemotherapy was the standard of care and no other studies had assessed immunotherapy combined with a limited course of chemotherapy in patients with NSCLC who were unselected for histology or PD-L1 expression status. On the basis of this study, nivolumab plus ipilimumab with two cycles of chemotherapy was approved in several countries, including the USA in May, 2020, thus increasing the number of treatment options for first-line treatment in patients with advanced NSCLC without targetable driver mutations.³⁴ In clinical practice at present, patients with tumours expressing PD-L1 on at least 50% of tumour cells are treated with anti-PD-(L)1 monotherapy,^{3,17} although those with a high disease burden also receive immunotherapy with chemotherapy. Immunotherapy plus chemotherapy has been approved regardless of PD-L1 expression levels in both patients with squamous and non-squamous histology, but clinical activity is higher in patients with PD-L1 expression on at least 50% of tumour cells.³⁵ Results from CheckMate 91A have shown that PD-L1 expression was not predictive of improved survival because the magnitude of benefit with nivolumab plus ipilimumab with a limited course of chemotherapy versus chemotherapy alone was consistent across all PD-L1 expression levels assessed. Encouragingly, this regimen showed a clinically meaningful improvement in overall survival in the preplanned interim analysis with 8.1 months of minimum follow-up, which continued to improve with an additional 4–6 months of follow-up. Longer follow-up from CheckMate 91A and other studies of anti-PD-(L)1 with chemotherapy will be essential to identify regimens that offer long-term survival and durable responses for other patient populations, including patients with PD-L1 expression less than 1% and those with squamous histology. However, when making cross-trial comparisons, the limitations imposed by different patient populations and study designs must also be taken into account. For example, CheckMate 91A was an open-label trial and enrolled patients who were unselected for PD-L1 expression status and histology, whereas the double-blind KEYNOTE-189 trial³ enrolled patients with only non-squamous histology and KEYNOTE-407¹⁷ patients with only squamous histology. KEYNOTE-024³⁶ enrolled only patients with PD-L1 expression on at least 50% of tumour cells and in IMPower150,³ patients with *EGFR/ALK* alterations were permitted.

In addition to those already noted, other limitations of this analysis of CheckMate 91A include the short follow-up duration at the time of database lock, which did not allow assessment of the durability of the dual immunotherapy with chemotherapy regimen. Another limitation is the use of chemotherapy as the control group, in view of the fact that chemotherapy is no longer standard of care in this setting because of treatment advances made during the course of the trial.

In summary, nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy provided a significantly improved survival benefit compared with chemotherapy alone, irrespective of tumour histology or PD-L1 expression. Efficacy and safety data support a favourable risk-benefit profile for nivolumab plus ipilimumab combined with chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced NSCLC.

Contributors

LPA, AS, SL, TJ, DPC, SA, AO, JY, and MR provided substantial contributions to the conception and design of the study. LPA, T-EC, MC, MS, BZ, JM, ER, JB, EF, OJ-V, AA, HS, AL, PS, P-JS, PDM, CM, MP, AS, SL, TJ, DPC, and MR enrolled and treated patients. SM-S wrote the study statistical analysis plan, did all statistical analyses, and generated data. LPA, SL, TJ, DPC, SM-S, SA, AO, JY, and MR analysed and interpreted the data. SM-S and JY verified the data. All authors reviewed the data, contributed to the development of the manuscript, and approved the final version for publication.

Declaration of interests

LPA has received grant support and personal fees from Bristol Myers Squibb and AstraZeneca (provided scientific advice for both); personal fees from Merck Sharp & Dohme, Roche, Eli Lilly, Merck, Novartis, Amgen, Incyte, Takeda, Blueprint Medicines, and Bayer, Pharmamar, and Ipsen (provided scientific advice for all); personal fees and is a board member of Genentech; and is a founder of and holds stock options in Alum Sequencing, all outside of the submitted work. T-EC has received personal fees and non-financial support from Bristol Myers Squibb (provided consulting and scientific advice) for the submitted work; and personal fees and non-financial support from A&D Pharma, Amgen, Assilias Pharma, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Janssen, Eli Lilly, Merck Serono, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Roche, Sanofi, Servier, Ipsen, Merck, and Genmab (provided consulting and scientific advice for all), all outside of the submitted work. MS has received research funding and non-financial support from Bristol Myers Squibb for the submitted work; and research funding from Amgen, Assilias Pharma, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme, EMD Serono, and Roche, all outside of the submitted work. BZ has received research funding from Bristol Myers Squibb for the submitted work; and research funding from Amgen, AstraZeneca, GlaxoSmithKline, Janssen-Cilag, Merck Sharp & Dohme, and Roche, all outside of the submitted work. JB has received personal fees from Roche, Boehringer-Ingelheim, Bristol Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme, Bayer, and Servier (served on the advisory board and participated in educational sessions for all); and personal fees from AstraZeneca (served on the advisory board, participated in educational sessions and collaborated on grants), all outside of the submitted work. EF has received the Grant for Oncology Innovation, funded by Merck, and a grant from Fundación Merck Salud; and personal fees from AbbVie, Blueprint Medicines, Guardant Health, Janssen, Merck, Samsung, GlaxoSmithKline, and Bayer (served on the advisory board for all); personal fees from Medscape, PRIME Oncology, and Touchstone (served on the speaker's bureau for all); and personal fees from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Roche, and Takeda (served on the advisory board and speaker's bureau for all), all outside of the submitted work. EF is also an independent member of the board of Grifols. OJ-V has received personal fees and non-financial support from Bristol Myers Squibb (provided consulting and scientific advice) for the submitted work; research funding from AstraZeneca Spain; personal fees from MedImmune, Eli Lilly, Pfizer, and Takeda (provided consulting or scientific advice for all); and personal fees and non-financial support from Boehringer Ingelheim, Merck Sharp & Dohme, and Genesch (provided consulting or scientific advice for all), all outside of the submitted work. AA has received personal fees from Bristol Myers Squibb (served on the speaker's bureau and gave expert testimony) for the submitted work; and received personal fees from Boehringer Ingelheim and Roche (provided consulting or advice), Novartis, and Sanofi (served on the speaker's bureau and gave expert testimony),

all outside of the submitted work. HS has received personal fees from Bristol Myers Squibb Japan (served on the speaker's bureau); grant funding from Bristol Myers Squibb, for the submitted work; personal fees from Boehringer Ingelheim (served on the speaker's bureau); and personal fees and research grant funding from AstraZeneca, Chugai Pharmaceutical, Merck, Merck Sharp & Dohme, Ono Pharmaceutical, and Taiho Pharmaceutical (served on the speaker's bureau for all), all outside of the submitted work. P-JS has received grant funding, personal fees and non-financial support from Bristol Myers Squibb for the submitted work; grant funding, personal fees, and non-financial support from AstraZeneca and Roche; grant funding and personal fees from Novartis; and grant funding and non-financial support from Merck Sharp & Dohme, all outside of the submitted work. CM has received personal fees from Bristol Myers Squibb, AstraZeneca, and Merck Sharp & Dohme (provided scientific advice and gave lectures for all), all outside of the submitted work. MP has received personal fees and non-financial support from Bristol Myers Squibb (provided scientific advice and lectures) for the submitted work; grant funding, personal fees, and non-financial support from Roche, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Takeda (provided scientific advice and lectures for all), and Chugai Pharmaceutical (gave lectures); personal fees and non-financial support from Merck Sharp & Dohme, Pfizer, and Eli Lilly (provided scientific advice and lectures for all); and personal fees from Novartis (provided scientific advice) and Amgen (gave lecture), all outside of the submitted work. AS has received research grant funding, personal fees, and non-financial support from Bristol Myers Squibb (provided consulting and scientific advice) for the submitted work; personal fees from AstraZeneca (provided consulting and scientific advice and served on the speaker's bureau), and Roche (provided consulting and scientific advice and served on the speaker's bureau); research grant funding, personal fees, and non-financial support from Merck Sharp & Dohme (provided consulting and scientific advice); and non-financial support from Roche South Africa, all outside of the submitted work. SL has received research grant funding and personal fees from AstraZeneca, Roche (served on the speaker's bureau for both), and Hutchinson MediPharma (provided consulting and scientific advice); grant funding from Heng Rui and Betgene (served on the speaker's bureau); and personal fees Boehringer Ingelheim, Simcere (provided consulting or scientific advice for both), and Hanseng (served on the speaker's bureau), all outside of the submitted work. TJ has received personal fees (honoraria) from Bristol Myers Squibb (provided consulting and scientific advice) for the submitted work; and personal fees (honoraria) from AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Ignyta, Merck, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, Roche, and Takeda (provided consulting or scientific advice for all), all outside of the submitted work. DPC has received research grant funding and personal fees from Bristol Myers Squibb (provided consulting and scientific advice) for the submitted work; personal fees from, and is an employee of, James Cancer Center; personal fees (honoraria) from AstraZeneca (provided consulting and scientific advice) and Nexus Oncology; and personal fees from AbbVie, Bayer, Biobara, Boehringer Ingelheim, Clovis Oncology, Genesch, Incyte, Imvua, Leo Oncology, Merck, Novartis, Peregrine Pharmaceuticals, Pfizer, and Syna Pharmaceuticals (provided consulting or scientific advice for all), all outside of the submitted work. SM-S, SA, AO, and JY are employees of Bristol Myers Squibb. SM-S has received personal fees, non-financial support, and other support from and has stock in Bristol Myers Squibb, all for the submitted work. SA has received personal fees from Bristol Myers Squibb, all for the submitted work. AO has received personal fees and other support from and has stock in Bristol Myers Squibb, all for the submitted work. JY has received personal fees and non-financial support from and has stock in Bristol Myers Squibb, all for the submitted work. MR has received personal fees from Bristol Myers Squibb (provided consulting and scientific advice and served on the speaker's bureau) for the submitted work; personal fees from AbbVie (provided consulting and scientific advice); and personal fees from Amgen, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Celgene, Eli Lilly, Merck Serono, Merck Sharp & Dohme, Novartis, Pfizer, and Genesch (provided consulting and scientific advice and served on the speaker's bureau for all), all outside of the submitted work. All other authors declare no competing interests.

For Bristol Myers Squibb's policy on data sharing see <https://www.bms.com/researchers-and-partners/clinical-trials-and-research-disclosure-commitment.html>

Data sharing

Bristol Myers Squibb's policy on data sharing is available online.

Acknowledgments

This study was supported by Bristol Myers Squibb (Princeton, NJ, USA). We thank the patients and families for making this trial possible, and the investigators (appendix pp 2–4) and clinical study teams who participated in the trial; Ruby Pandit (Bristol Myers Squibb) for contributions as protocol manager of this trial; and Dako, an Agilent Technologies company (Santa Clara, CA, USA) for collaborative development of the PD-L1 IHC 28-8 pharmDx assay. Mhairi Laird (Cambridge, Oxford, UK) provided medical writing and editorial assistance, funded by Bristol Myers Squibb.

References

- Rack M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016; 375: 1823–33.
- Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378: 2078–92.
- Paz-Ares L, Lora A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 379: 2040–51.
- Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2019; 393: 1819–30.
- Socinski MA, Jossé RM, Cappuzzo F, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* 2018; 378: 2288–301.
- West H, McCleod M, Hussein M, et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20: 924–32.
- Spiigel D, de Marinis F, Giaccone G, et al. IMPOWER110: Interim overall survival (OS) analysis of a phase III study of atezolizumab (atezo) vs platinum-based chemotherapy (chemo) as first-line (1L) treatment (TX) in PD-L1-selected NSCLC. European Society for Medical Oncology 2019 Congress; Barcelona, Spain; Sept 27–Oct 1, 2019 [abstr 6256].
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2017. National Cancer Institute. April, 2020. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/ (accessed June 1, 2020).
- Sharma P, Allison JP. Dissociating the mechanisms of immune checkpoint therapy. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 75–76.
- Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov* 2018; 8: 1069–86.
- Das R, Verma R, Senol M, et al. Combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 leads to distinct immunologic changes in vivo. *J Immunol* 2015; 194: 950–59.
- Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2019; 381: 2020–31.
- Ramalingam SS, Choueiri TE, Fizanski A, et al. Nivolumab + ipilimumab versus platinum-doublet chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer: three-year update from CheckMate 227 Part 1. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2020; 38 (15 suppl): 9500.
- Bristol Myers Squibb. OPDIVO (nivolumab). Prescribing information. US Food and Drug Administration. December, 2020. https://packageinserts.bms.com/pi/pi_opdivo.pdf (accessed Jan 14, 2021).
- Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 2415–26.
- Rizvi NA, Chhoo R, Reinmuth N, et al. Durvalumab with or without etoposide vs platinum-based chemotherapy as first-line treatment for metastatic non-small-cell lung cancer. MYSTIC. *Ann Oncol* 2018; 29 (suppl 10): LBA6 [abstr].
- Peng J, Hamanishi J, Masumura N, et al. Chemotherapy induces programmed cell death-ligand 1 overexpression via the nuclear factor-kappaB to foster an immunosuppressive tumor microenvironment in ovarian cancer. *Cancer Res* 2015; 75: 5034–45.
- Bracci L, Schtaylor G, Stetig A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ* 2014; 21: 15–25.
- Looney A, Wover B, Mazzaschi G, et al. Molecular basis and rationale for combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Drug Resist Update* 2019; 46: 100644.
- Judd J, Borghaei H. Combining immunotherapy and chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Thorac Surg Clin* 2020; 30: 199–206.
- Palmer AC, Izar B, Sorger PK, Hwangbo H. Combinatorial benefits without synergy in recent clinical trials of immune checkpoint inhibitors. *medRxiv* 2020; published online July 10. <https://doi.org/10.1101/2020.07.11.20019604> [preprint].
- Gattoni JF, Schneter JG, Guisard M, et al. Nivolumab plus ipilimumab with 2 cycles of chemotherapy in first-line metastatic non-small cell lung cancer. *CheckMate 568 Part 2. Proc Am Soc Clin Oncol* 2020; 38 (15 suppl): 9560.
- Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 706–14.
- Borghaei H, Fizanski A, Bernabe Caro R, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for patients with advanced non-small cell lung cancer with brain metastases: results from CheckMate 227 Part 1. American Association for Cancer Research Annual Meeting; online; June 22–24, 2020 [abstr CT221].
- Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, et al. Combined nivolumab and ipilimumab in melanoma metastatic to the brain. *N Engl J Med* 2018; 379: 722–30.
- Hellmann MD, Rizvi NA, Goldman JW, et al. Nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 012): results of an open-label, phase 1, multicohort study. *Lancet Oncol* 2017; 18: 31–41.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2019; 381: 1535–46.
- Moszer RJ, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: a second follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20: 1370–85.

5.4 Anti-PD-1 (pembrolizumabe) no cenário de Saúde Pública – primeira experiência brasileira

Também dentro dessa coorte de pacientes encontram-se participantes de uma iniciativa inovadora envolvendo uma parceria entre o Hospital de Câncer de Barretos, a MSD (Merck Sharp and Dohme) e o Governo do Estado de São Paulo. Essa iniciativa teve por fim disponibilizar pembrolizumabe (anti-PD-1) para o tratamento de pacientes com CPCNP com alta expressão de PD-L1 (TPS \geq 50%). Pembrolizumabe, apesar de estar aprovado pela ANVISA para essa indicação desde 2017, não é disponível para a população do Sistema Único de Saúde (SUS). Os 12 participantes dessa iniciativa são a primeira experiência brasileira com imunoterapia no tratamento do câncer de pulmão de pacientes do sistema público de saúde. A Tabela 4 sumariza as características clínicas desses pacientes.

Tabela 4 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP tratados com pembrolizumabe (anti-PD-1) no sistema público de saúde (n=12).

Característica clínico-patológicas e de tratamento	n	(%)
Idade mediana = 61 anos (36-74)		
Sexo		
Masculino	7	58,3
Feminino	5	41,7
Histologia		
Adenocarcinoma	5	41,7
Carcinoma escamoso	6	50,0
CPCNP	1	8,3
Tabagismo		
Nunca fumou	2	16,7
Passado	2	16,7
Ativo	8	66,7
Linha tratamento		
Primeira	7	58,3
Segunda	4	33,3
A partir da terceira	1	8,3
Esquema tratamento utilizado		
Pembrolizumabe monoterapia	6	50,0
Pembrolizumabe combinado à quimioterapia	6	50,0

A taxa de resposta objetiva foi de 50% e a taxa de controle de doença de 83,3%. Com seguimento mediano de 25,2 meses, a mediana de SPI não foi alcançada e a taxa de sobrevida em 2 anos foi de 58,3% (Figura 9).

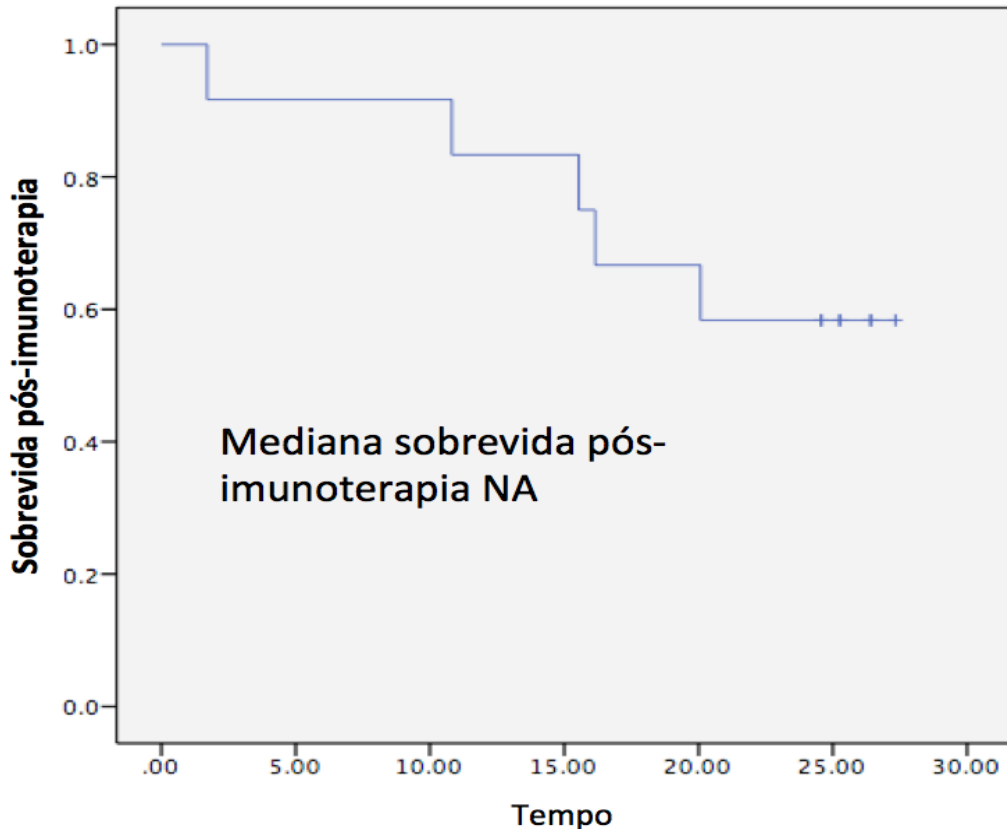


Figura 9 – Curvas de SPI (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de pacientes tratados com pembrolizumabe no SUS (todos os tumores apresentavam PD-L1 $\geq 50\%$). NA: não atingida


5.5 Expressão de PD-L1 por Tumor Proportion Score (TPS) e Combined Proportion Score (CPS)

Em CPCNP, o método mais utilizado para se avaliar a expressão de PD-L1 é o escore TPS (*tumor proportion score*). No entanto, para outros tipos de tumor, o escore CPS (*combined positive score*) tem sido o método de escolha. Com os objetivos de se avaliar e comparar o valor preditivo de TPS e CPS como preditores de resposta à imunoterapia em CPCNP e de se avaliar a concordância intra-observador entre os dois métodos e inter-observador entre dois patologistas, 56 pacientes foram incluídos nessas análises. Os dados dessa análise estão sumarizados no artigo anexado abaixo – Artigo 2.

Artigo 2. PD-L1 expression by Tumor Proportion Score (TPS) and Combined Positive Score (CPS) are similar in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Pathology*, 2021.

Original research

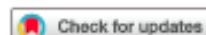
PD-L1 expression by Tumor Proportion Score (TPS) and Combined Positive Score (CPS) are similar in non-small cell lung cancer (NSCLC)

Pedro De Marchi ^{1,2}, Leticia Ferro Leal^{3,4}, Vinicius Duval da Silva^{4,5}, Eduardo Caetano Albino da Silva⁵, Vladimir Claudio Cordeiro de Lima⁶, Rui Manuel Reis^{3,7,8}

¹Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil
²Oncoclinicas - Lung Cancer Branch, Rio de Janeiro, Brazil
³Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil
⁴Barretos School of Health Sciences Dr. Paulo Prata - FACSIB, Barretos, Brazil
⁵Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil
⁶Department of Medical Oncology, ACCCamargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil
⁷Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Braga, Portugal
⁸ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

Correspondence to
 Dr Pedro De Marchi, Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil; pedrodemarchi@yahoo.com.br

Received 2 June 2020
 Revised 20 August 2020
 Accepted 3 September 2020



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: De Marchi P, Leal LF, Duval da Silva V, et al. *J Clin Pathol* Epub ahead of print: please include Day Month Year. doi:10.1136/jclinpath-2020-206832

ABSTRACT

Background For non-small cell lung cancer (NSCLC) the most used method for analysing programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression is the Tumor Proportion Score (TPS). Nevertheless, for other tumour types, the Combined Positive Score (CPS) has been the method of choice.

Aim Evaluate and compare the predictive value of both CPS and TPS as predictors of immunotherapy response in NSCLC, and to evaluate the agreement intra-observer between both methods and inter-observer between two expert lung pathologists.

Methods 56 NSCLC patients who were treated with anti-programmed cell death 1 (PD-1)/PD-L1 therapy were included. Two pathologists evaluated all cases independently, considering the sample's adequacy for analysis, and the PD-L1 expression by TPS and CPS.

Results The Kappa coefficient for adequacy was 0.82 (95% CI 0.67 to 0.97). There was a high agreement between TPS and CPS and a high agreement between pathologists concerning the two methods. The Kappa coefficient between TPS and CPS was 0.85 for both pathologists, and between pathologists was 0.94 and 0.93 for TPS and CPS, respectively.

Conclusions Both methods proved to be equally predictive of response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. There was both a high intra-observer agreement between the two methods and a high inter-observer agreement between pathologists. This study suggests that CPS could also be used in a routine setting for immunotherapy decision in NSCLC.

INTRODUCTION

Lung cancer is the most incident and deadliest cancer worldwide.¹ In the last few decades, targeted therapies based mainly on tyrosine kinase inhibitors have significantly improved the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC).² Despite the great improvement in the clinical management of NSCLC patients, only a subset of patients benefit from these targeted therapies.²

In the last few years, anti-programmed cell death 1 (PD-1)/programmed cell death ligand 1 (PD-L1) immune checkpoint inhibitors have revolutionized cancer treatment, including NSCLC.³ In this context, a number of studies identified several predictive biomarkers of response.⁴ Among these biomarkers, the PD-L1 expression, as determined

by immunohistochemistry in tumour tissue, proved to be an important predictive biomarker, and several methodologies for PD-L1 immunostaining scoring have been developed.⁵⁻⁶ One of the most used is the Tumor Proportion Score (TPS), which considers the percentage of tumour cells expressing PD-L1.⁷⁻⁹ Limiting expression analysis to tumour cells can have some advantages, such as making the analysis easier and even allowing it to be performed on cytology cell blocks.¹⁰ Both in the first and second-line treatment, the higher the expression of PD-L1 in tumour cells, the better the results achieved with immunotherapy, combined or not with chemotherapy.^{7-9 11-14} However, for other tumour types such as gastric/gastro-oesophageal junction carcinoma, cervical carcinoma, oesophageal squamous cell carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, bladder and renal cancer the Combined Positive Score (CPS) which considers the expression of PD-L1 in both tumour and inflammatory cells, exhibited a better correlation with immunotherapy response.^{4 15}

This study aimed to evaluate and to compare the predictive value of both CPS and TPS as predictors of response to immunotherapy in NSCLC. Additionally, we compared the concordance of both scoring systems between two distinct observers. Clinical endpoints were assessed as secondary objectives.

PATIENTS AND METHODS

Study design

This is a retrospective study that evaluated 56 NSCLC patients treated at Barretos Cancer Hospital and who have received at least one cycle of anti-PD-1/PD-L1 therapy with palliative intent and had a formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue available for immunohistochemistry analysis of PD-L1 expression. The tissue should necessarily have been collected before the first dose of immunotherapy and for response analysis, patients should have had at least one radiological image after immunotherapy initiation to assess response to treatment.

The institutional review board approved the study protocol (CAAE 87212918.5.0000.5437) and a waiver for the written informed consent was obtained, given the retrospective nature of the study.

Original research

Table 1 Scoring methods evaluated

Method	Scoring
TPS	(No. of PD-L1 stained tumour cells/No. of tumour cells)×100
CPS	(No. of PD-L1 stained tumour and inflammatory cells*/No. of tumour cells)×100

*Lymphocytes and macrophages.

CPS, Combined Positive Score; PD-L1, programmed cell death ligand 1; TPS, Tumor Proportion Score.

Clinical data

Clinical, demographic, radiological and pathological data were collected from patient's medical records. Histological diagnosis and staging of NSCLC were based on the 2015 WHO Classification of Lung Tumors¹⁶ and the 8th tumour, node, metastases Staging System of Lung Cancer,¹⁷ respectively. Tumour measurement was assessed at baseline and at least at one other time point after treatment initiation. All assessments were performed by investigators using Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) version 1.1. Objective response rate (ORR) was defined as the proportion of patients with partial or complete radiological response to immunotherapy treatment. Overall survival (OS) and post-immunotherapy survival (PIS) were defined as the time intervals from the date of the first cycle of palliative therapy and from the first cycle of palliative immunotherapy, respectively, until death from any cause.

PD-L1 expression analysis

Immunohistochemistry staining for PD-L1 was performed on FFPE tumour tissue with Dako 22C3 pharmDx (Agilent Technologies/Dako, Carpinteria, California, USA)¹⁸ kit, following manufacturer's instructions. PD-L1 expression was measured by TPS and CPS—table 1. Furthermore, both TPS and CPS were categorised in low (<1% for TPS and <1 for CPS), intermediate (1%–49% for TPS and 1–49 for CPS) or high (≥50% for TPS and ≥50 for CPS) expression.

Neoplastic cells had to show partial or complete membrane staining to be counted as positive, whereas immune cells were counted if any staining level was observed. A minimum number of 100 neoplastic cells were counted to consider a sample valid for its evaluation. Although, theoretically, CPS can exceed 100, the maximum score was set at 100.⁶

Two experienced lung pathologists independently evaluated all cases, considering their adequacy for analysis and the expression of PD-L1 by both TPS and CPS.

Statistical considerations

Based on the results found in gastric and oesophago-gastric junction carcinoma where the percentages of patients with PD-L1 expression ≥1% by TPS and CPS were compared (12.5% and 57.6%, respectively),⁶ the sample size calculation was performed taking into account a similar difference in the proportion of positive samples, a significance level of 5% and power of 90%, what yielded a sample size of 50 tumour samples.

To analyse the agreement between the measurements (TPS vs CPS) and the reproducibility between different pathologists, it was used the Cohen's kappa coefficient (κ).

The Kaplan-Meier method and the log-rank test were employed for survival analysis. A stratified Cox regression model was used to calculate HRs. Patients without an OS or PIS event were censored at the date of the last visit they were known to be alive. The OR was used to evaluate the association between response rate and PD-L1 expression by TPS and CPS.

Table 2 Clinicopathological features of NSCLC patients (n=52)

	N (%)
Median age—63 years old (36–81)	
Gender	
Male	33 (63.5)
Female	19 (36.5)
TNM stage	
III	6 (11.5)
IV	46 (88.5)
ECOG-PS	
0	3 (5.8)
1	44 (84.6)
2	3 (5.8)
3–4	2 (3.6)
Histology	
Adenocarcinoma	27 (51.9)
Squamous cell carcinoma	23 (44.2)
Adenosquamous	1 (1.9)
NSCLC-NOS	1 (1.9)
Smoking status	
Active	23 (45.1)
Former	20 (39.2)
Never	8 (15.7)
Unknown	1 (-)
Immunotherapy used	
Nivolumab	17 (32.6)
Pembrolizumab	18 (34.6)
Atezolizumab	4 (7.7)
Avelumab	1 (1.9)
Cemiplimab	2 (3.8)
Nivolumab+ipilimumab	9 (17.3)
Durvalumab+tremelimumab	1 (1.9)
Line of treatment	
First	30 (57.7)
Second	13 (25.0)
Third or beyond	9 (17.3)
Treatment regimen	
Anti-PD-1/PD-L1 isolated	28 (53.8)
Anti-PD-1/PD-L1+anti-CTLA4	1 (1.9)
Anti-PD-1/PD-L1+chemotherapy	14 (26.9)
Anti-PD-1/PD-L1+anti-CTLA4+chemotherapy	9 (17.3)

ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; NOS, not otherwise specified; NSCLC, non-small cell lung cancer; PD-1, programmed cell death protein 1; PD-L1, programmed cell death ligand 1; TNM, tumour, node, metastases.

For comparisons involving PD-L1 expression (TPS and CPS) and clinical outcomes, PD-L1 analysis performed by the pathologist 1 was used.



Figure 1 Examples of PD-L1 Immunohistochemical staining using 22C3PhamDX kit. (A) TPS <1%; (B) TPS 1%–49%; (C) TPS ≥50% (x400 magnification). PD-L1, programmed cell death ligand 1; TPS, Tumor Proportion Score.

Table 3 PD-L1 expression analysis by TPS and by CPS according each pathologist (n=52)

TPS	P1		CPS	P2	
	No. (%)	No. (%)		No. (%)	No. (%)
PD-L1 <1%	27 (51.9)	25 (48.0)	PD-L1 <1	22 (42.3)	20 (38.4)
PD-L1 1%-49%	6 (11.5)	8 (15.3)	PD-L1 1-49	11 (21.1)	13 (25.0)
PD-L1 ≥50%	19 (36.5)	19 (36.5)	PD-L1 ≥50	19 (36.5)	19 (36.5)

CPS, Combined Positive Score; P1, pathologist 1; P2, pathologist 2; PD-L1, programmed cell death ligand 1; TPS, Tumor Proportion Score.

RESULTS

The median time between sample collection (biopsy) and FFPE tissue cutting for PD-L1 immunohistochemistry analysis was of 571 days (range from 2 to 2071 days). PD-L1 immunohistochemistry was performed in the same week (1–5 days) of FFPE tissue cutting.

Initially, the 56 cases were evaluated in terms of the adequacy of the material (at least 100 neoplastic cells). Both pathologists analysed the samples and classified them as suitable or not suitable for PD-L1 expression analysis. Most cases (n=50; 89.3%) were classified as suitable by both pathologists. One sample (1.8%) was consensually classified as unsuitable and it was not considered for further evaluation. In five (8.9%) discordant cases, they were analysed simultaneously by both pathologists, and a final consensus decision was attained. Two of these cases were considered adequate and three of them were excluded, totalising 52 samples for further analysis. The Kappa coefficient between the two pathologists for adequacy was 0.82 (95% CI 0.67 to 0.97).

The clinicopathological features of the 52 patients are summarised in table 2. Most of patients were men (63.5%) and Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status 1 (84.6%). The predominant histology was adenocarcinoma (51.9%), followed by squamous cell carcinoma (44.2%) (table 2). The majority of patients presented at clinical stage IV and 15% were never smokers (table 2). Thirty patients (57.7%) were treated with anti-PD-1/PD-L1 in first-line and most of them (53.8%) received anti-PD-1/PD-L1 as monotherapy (table 2).

Regarding PD-L1 expression, the pathologist 1 (P1), using TPS, classified 27 cases (51.9%) as low, 6 cases (11.5%) as intermediate and 19 cases (36.5%) as high expression (figure 1).

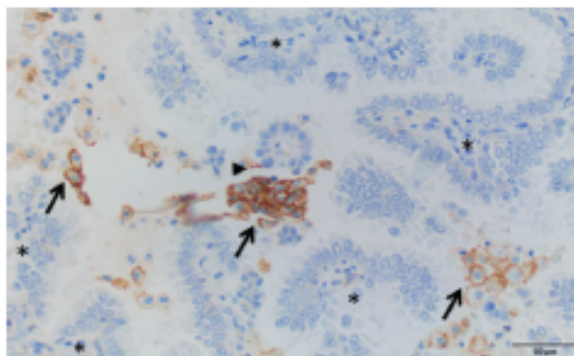


Figure 2 PD-L1 expression variability according to methodology: low PD-L1 expression by TPS (<1%) and intermediate PD-L1 expression (30) by CPS. (Arrows) Inflammatory stained cell; (Triangle) Tumoural stained cell; (Asterisks) Tumoural cell group - papillary arrangement. CPS, Combined Positive Score; TPS, Tumor Proportion Score.

Table 4 Best radiological response (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST) 1.1) and objective response rate among cases with TPS <1% and CPS >1, regarding at least one pathologist (n=6)

Patient ID	TPS1 (%)	CPS1	TPS2 (%)	CPS2	BRR	ORR
24	<1	02	<1	10	PD	33.3%
68	<1	30	<1	15	PD	
75	<1	05	<1	05	PR	
111	<1	32	<1	10	PR	
60	<1	01	5	10	PD	
7	<1	<1	<1	5	PD	

BRR, best radiological response; CPS1, Combined Positive Score by pathologist 1; CPS2, Combined Positive Score by pathologist 2; ORR, objective response rate; PD, Progressive Disease; PR, Partial Response; TPS1, Tumor Proportion Score by pathologist 1; TPS2, Tumor Proportion Score by pathologist 2.

Likewise, the pathologist 2 (P2), using TPS, classified 25 cases (48.0%) as low, 8 cases (15.3%) as intermediate and 19 cases (36.5%) as high expression. Considering the CPS approach, P1 classified 22 cases (42.3%) as low, 11 cases (21.1%) as intermediate and 19 cases (36.5%) as high expression, and P2 classified 20 cases (38.4%) as low, 13 cases (25.0%) as intermediate and 19 cases (36.5%) as high expression. The Kappa coefficient between TPS and CPS was 0.85 for both pathologists, and between pathologists was 0.94 and 0.93 for TPS and CPS, respectively (table 3). Only two cases (3.8%) where discordant among pathologists for TPS and CPS, and the disagreement was for cases with low and intermediate expression in both TPS and CPS methodologies. Concerning the agreement between TPS and CPS, each pathologist changed the classification of five samples, all of them from low expression to intermediate expression (figure 2). However, these cases are not exactly the same. There were four cases in which both pathologists changed the category and two cases in which only one of the pathologists changed the category, totalling six cases. The ORR observed among these patients was 33% (table 4).

For clinical endpoints all 52 cases were included and PD-L1 expression, both by TPS and CPS, was that performed by P1. Considering the response to treatment, 2 of the 52 patients were excluded since no radiological response evaluation was available. The ORR was 42.0%. The response rate was numerically higher among those who showed PD-L1 expression (intermediate or high), both by TPS (47.8% vs 37.0%) and CPS (46.4% vs 36.3%). However, the odds for response were similar regardless of the method employed (table 5). The median OS was 24.1 months (95% CI 18.3 to 30.0 months) and the median PIS was 20.2 months (95% CI 11.5 to 28.9 months). There was no statistically significant difference in survival analyses in relation to PD-L1 expression regardless of the TPS or CPS methodology employed. The median OS and PIS for TPS <1% was 21.5 months (95% CI 10.2 to 32.8 months) and 14.8 months (95% CI 6.3 to 23.3

Table 5 ORR by TPS and by CPS according to pathologist 1 (n=50)

	Total (n=50)		ORR, %	OR	
	No. (%)	Response			No response
TPS ≥1%	23 (46)	11	12	47.8	1.56
TPS <1%	27 (54)	10	17	37.0	
CPS ≥1	28 (56)	13	15	46.4	1.51
CPS <1	22 (44)	8	14	36.3	

CPS, Combined Positive Score; ORR, overall response rate; TPS, Tumor Proportion Score.

Original research

Table 6 Overall survival (OS) and post-immunotherapy survival (PIS) by TPS and by CPS according to pathologist 1 (n=52)

	Median OS (months)	P value	Median PIS (months)	P value
TPS < 1%	21.5 (14.5–28.6)	0.63	14.8 (6.3–23.4)	0.29
TPS 1–49%	NR		NR	
TPS ≥ 50%	NR		NR	
CPS < 1	21.5 (10.2–32.8)	0.59	14.8 (6.3–23.3)	0.29
CPS 1–49	32.4 (–)		NR	
CPS ≥ 50	NR		NR	

CPS, Combined Positive Score; NR, not reached; TPS, Tumor Proportion Score.

months), respectively (table 6; figures 3 and 4). For those with TPS > 1%, median survival was not reached.

DISCUSSION

The effectiveness of anti-PD-1/PD-L1 therapy in NSCLC was first demonstrated in 2015 with the presentation of positive results from two phase III randomised controlled trials, CheckMate 017⁴¹ and CheckMate 057,⁴² that investigated nivolumab (anti-PD-1) as the second line of treatment for metastatic NSCLC. Despite the positive results, only about 20% of the patients had an objective response following immunotherapy. Since then, PD-L1 expression has been consolidated as the only biomarker used in clinical practice, with a consensus that PD-L1 expression on tumour cells predicts response to PD-1/PD-L1 inhibitors. However, the value of PD-L1 as the 'definitive' or agnostic biomarker is controversial and there are multiple unsolved issues such as the lack of validation for immunohistochemistry laboratory-developed tests,¹⁹ the use of different staining platforms and antibodies, thresholds values used for PD-L1-positivity, the source and timing for sample collection and the type of cells in which PD-L1 is assessed (tumour vs immune cells).²⁰ To clarify this last point, we carried out this study that analysed the expression of PD-L1 by two different estimation methods, one of them including inflammatory cells in addition to tumour cells. Moreover, since PD-L1 expression is an observer-dependent measurement, NSCLC cases were independently analysed by two pathologists to reduce bias.

Among the 52 cases included, the clinicopathological features are those expected for patients with NSCLC: male predominance, adenocarcinoma histology, tobacco-related disease

and stage IV. Most patients received anti-PD-1/PD-L1 treatment as the first line of treatment combined or not with anti-CTLA4 or chemotherapy, which justifies the high response rate observed and a median survival longer than 2 years. About 25% of the cases received immunotherapeutic agents not yet approved for the treatment of NSCLC such as avelumab, cemiplimab, nivolumab combined with ipilimumab and durvalumab combined with tremelimumab, since these patients were treated within randomised clinical trials.

For the analysis of PD-L1 expression, the adequacy of the material for analysis is the first issue, since at least 100 tumour cells are required and this number may not be attained due to scarcity of material, particularly in small biopsies. Regarding this stage of the process, although there was a high degree of agreement between the two pathologists, a few cases were discordant. After concurrent analysis of these five cases by the two pathologists using a double-headed microscope, there was a consensus regarding the adequacy of two out of these five samples. Although the limited number of discordant cases, it seems important to consider a double check by a second pathologist in cases considered unsuitable for analysis as it would save the patient from a new invasive procedure and avoid delays at the beginning of treatment.

Likewise, for PD-L1 expression, a high agreement between TPS and CPS and a high agreement between pathologists in relation to the two methods were reported. The main difference observed between TPS and CPS is the change from low to intermediate expression. There was no case classified as high expression only by CPS, which would potentially have stronger clinical relevance since immunotherapy alone is a robust therapeutic option in this scenario. Furthermore, there was a 100% agreement between the two pathologists in relation to samples with high expression, by both methods. There was also no difference regarding the probability of response to treatment when using TPS or CPS. Thus, external and internal reproducibility is high for both TPS and CPS and the use of CPS does not seem to demonstrate a better correlation with response to therapy based on anti-PD-1/PD-L1 agents. However, it might exist biases related to other treatments administered concomitantly with immunotherapy, which is a limitation of this study.

The expression of PD-L1 in inflammatory cells might have some role in predicting response to immunotherapy. However, only six patients were classified as TPS < 1% and CPS > 1 in our

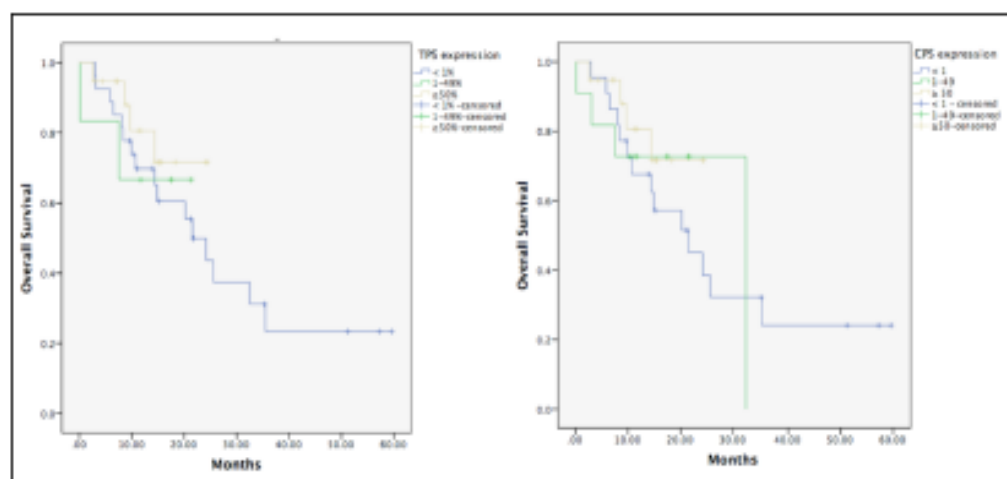


Figure 3 Overall Survival by TPS and by CPS (n=52). CPS, Combined Positive Score; TPS, Tumor Proportion Score.

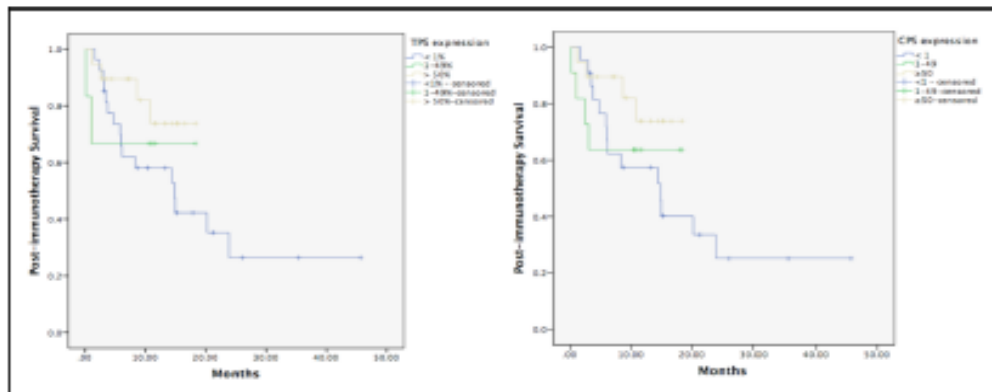


Figure 4 Post-Immunotherapy Survival by TPS and by CPS (n=52). CPS, Combined Positive Score; TPS, Tumor Proportion Score.

cohort, therefore limiting any conclusion. This is a point that deserves further investigation in the future.

CONCLUSION

The determination of the adequacy of tumour samples is an essential step in the process to evaluate the expression of PD-L1 and a double-check seems to be highly recommended for cases considered unsuitable for analysis as it can save the patient from a new invasive procedure and avoid delays in treatment start.

Although the standard method to analyse PD-L1 expression in NSCLC is TPS, this study suggests that CPS can also be used and is associated with similar outcomes. However, considering that TPS's use is already consolidated in clinical practice and has a high correlation with response to anti-PD-1/PD-L1 therapy, which has been consistently demonstrated, it is more likely that TPS will remain the method of choice.

Take home messages

- ▶ Samples considered unsuitable for programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression analysis should be double-checked.
- ▶ For PD-L1 expression, a high agreement between Tumor Proportion Score (TPS) and Combined Positive Score (CPS) and a high agreement between pathologists in relation to the two methods were reported.
- ▶ The response rate is higher among PD-L1 positive patients, both by TPS and CPS. The odds for response were similar regardless of the method employed.

Handling editor Dharendra Gowder.

Acknowledgements We thank all members of the GTOP group (Translational Group of Pulmonary Oncology - Barretos Cancer Hospital, Brazil) for scientific discussion and suggestions.

Contributors PDM: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Roles/Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Project administration. LFL: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing – review & editing, Visualization, Project administration. VDS: Investigation, Resources, Writing – review & editing, Visualization. ECAdS: Investigation, Resources, Writing – review & editing, Visualization. VCCdL: Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Visualization, Supervision. RMR: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition.

De Marchi P, et al. *J Clin Pathol* 2021;0:1–6. doi:10.1136/jclinpath-2020-206832

Funding This study was funded by the Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention and Education of Occupational Cancer) and by Barretos Cancer Hospital internal funds.

Competing interests LFL is recipient of a Public Ministry of Labor Campinas Fellowship, and RMR is recipient of CNPq productivity fellowship.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval The institutional review board approved the study protocol (CAAE 87212918.5.0000.5437) and a waiver for the written informed consent was obtained, given the retrospective nature of the study.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article.

ORCID iD

Pedro De Marchi <http://orcid.org/0000-0001-5259-0215>

REFERENCES

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424.
- National Comprehensive Cancer Network. Non Small Cell Lung Cancer Version 3.2020. [Internet]. 2020. Available: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
- Dubois M, Ardin C, André F, et al. [The revolution of immuno-oncology therapy: review of immune checkpoint inhibitors efficacy]. *Med Sci* 2019;35:937–45.
- Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;19:133–50.
- Uddall M, Rizzo M, Kenny J, et al. PD-L1 diagnostic tests: a systematic literature review of scoring algorithms and test-validation metrics. *Diagn Pathol* 2018;13:12.
- Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, et al. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2019;143:330–7.
- Herbst RS, Basu P, Kim D-W, 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;387:1540–50.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1823–33.
- Mok TSK, Wu Y-L, Kudaba I, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2019;393:1819–30.
- Wang H, Aguilnik I, Kasymjanova G, et al. Cytology cell blocks are suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. *Ann Oncol* 2018;29:1417–22.
- 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;373:1627–39.
- Brahmer J, Reckamp KL, Basu P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015;373:123–35.
- Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;378:2078–92.

Original research

- 14 Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2040–51.
- 15 Muro K, Chung HC, Shankaran V, et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1B trial. *Lancet Oncol* 2016;17:717–26.
- 16 Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health organization classification of lung tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol* 2015;10:1243–60.
- 17 Amin MB, GE, Edge SB, et al. *AJCC staging manual*. 8th edn. Springer International Publishing, 2017.
- 18 US Food and Drug Administration. Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. [Internet]. Available: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf15/P150013c.pdf
- 19 Torlakovic E, Albadine R, Bigras G, et al. Canadian multicentre project on standardization of PD-L1 22C3 immunohistochemistry laboratory developed tests for pembrolizumab therapy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2020.
- 20 Tebbió C, Vilarinho N, Reyes R, et al. Pd-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Thor Adv Med Oncol* 2018;10:1758835918763493.

5.6 Pesquisa de instabilidade de microssatélites (MSI)

A partir dos casos do Hospital de Câncer de Barretos, 79 foram testados para presença de MSI e nenhum apresentou alteração. Considerando-se a baixa prevalência de MSI-H encontrada entre os tumores de pacientes tratados com ICIs, essa coorte de pacientes testada para MSI foi adicionada a uma coorte adicional com intenção de se identificar a frequência de MSI-H entre pacientes brasileiros com CPCNP. No total foram testados 526 portadores de CPCNP diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos. A idade mediana ao diagnóstico foi de 61 anos, sendo a maioria do sexo masculino (56,8%), com história de tabagismo (72,5%) e portadores de adenocarcinoma (92,8%). Quanto ao perfil molecular, 22,6% dos tumores apresentavam mutação no gene *EGFR* (Tabela 5).

Tabela 5 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP testados para MSI (N = 526).

Característica clínico-patológicas	n	(%)
Idade mediana = 61 anos		
Sexo		
Masculino	299	56,8
Feminino	227	43,2
Histologia		
Adenocarcinoma	488	92,8
Carcinoma escamoso	23	4,4
Carcinoma adenoescamoso	5	0,9
CPCNP	10	1,9
Tabagismo		
Nunca fumou	142	27,5
Passado	190	36,9
Ativo	183	35,5
Sem informação	11	-
KRAS		
<i>Wild-type</i>	420	89,8
Mutado	48	10,2
Sem informação	58	-
EGFR		
<i>Wild-type</i>	407	77,4
Mutado	119	22,6

Somente um paciente foi classificado como MSI-H por PCR (Figura 10). Este caso não possuía material tumoral disponível, impossibilitando a confirmação por imunohistoquímica da expressão das enzimas de *mismatch repair* MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Era uma paciente do sexo feminino, branca, natural e procedente do estado de Minas Gerais. Tabagista ativa com diagnóstico de adenocarcinoma de pulmão estágio clínico IV (metástases pleura/pulmão, osso, adrenal e fígado) aos 75 anos. Na família existiam uma irmã com câncer de pâncreas e um irmão com câncer de próstata. Perfil molecular não demonstrou mutações nos genes *EGFR*, *KRAS* e *BRAF*, porém 7 mutações foram identificadas em outros genes, sendo uma mutação no gene *ERBB2*, duas mutações no gene *KIT* e quatro mutações no gene *TP53*. Devido ao *performance status* comprometido ao diagnóstico, a paciente recebeu apenas tratamento de suporte (*best supportive care*) e faleceu menos de um mês após o diagnóstico.

Assim, a frequência de MSI-H encontrada nas duas coortes analisadas em conjunto (n=526) foi de apenas 0,19%.

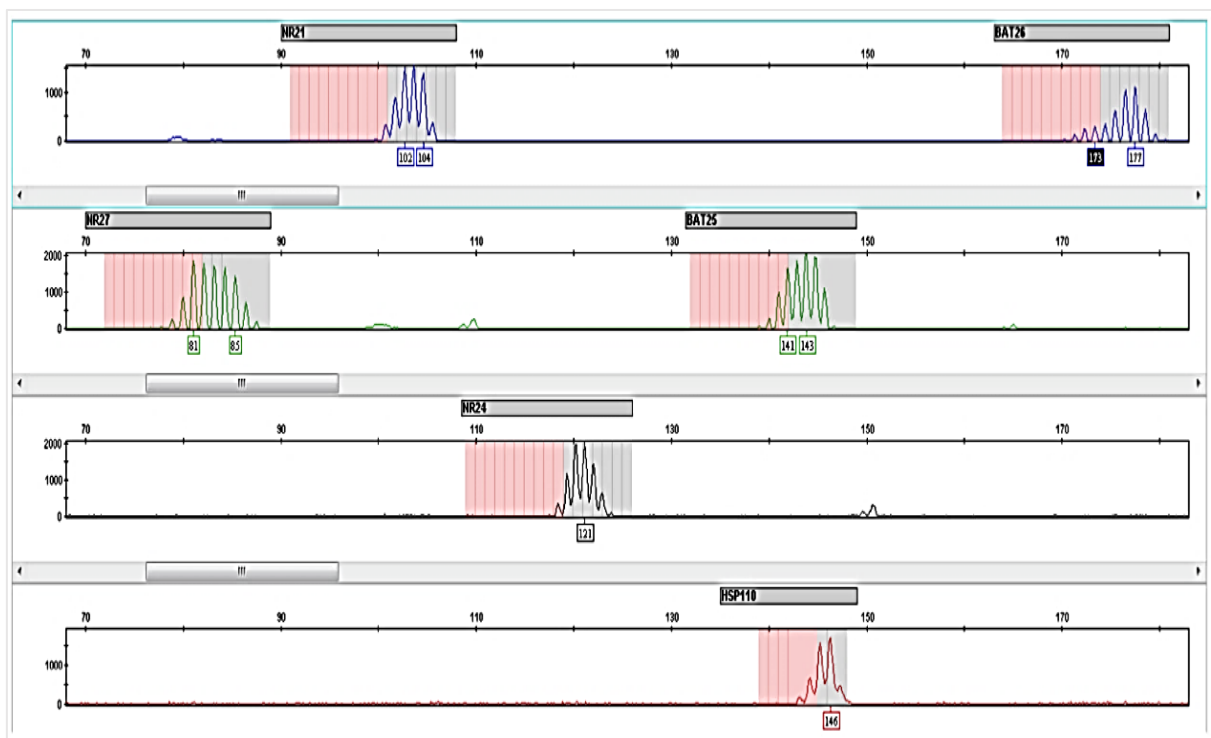


Figura 10 - Análise de fragmento do caso MSI-H exibindo instabilidade dos 6 marcadores.

5.7 Infiltrado tumoral inflamatório

No total, 51 casos foram avaliados em relação ao infiltrado tumoral inflamatório – CD8+ (linfócito T citotóxico), CD25+ (linfócito T regulatório) e CD68+ (macrófagos) (Figura 11). As medianas do número de células por mm² foram 37 (CD8+), 15 (CD25+) e 51 (CD68+). Não houve associação entre o número de células no infiltrado e SPI. Também não houve associação entre o somatório de células CD8+ e CD68+ ou com o escore [(CD8+ + CD68+)/CD25+] – Figura 12.

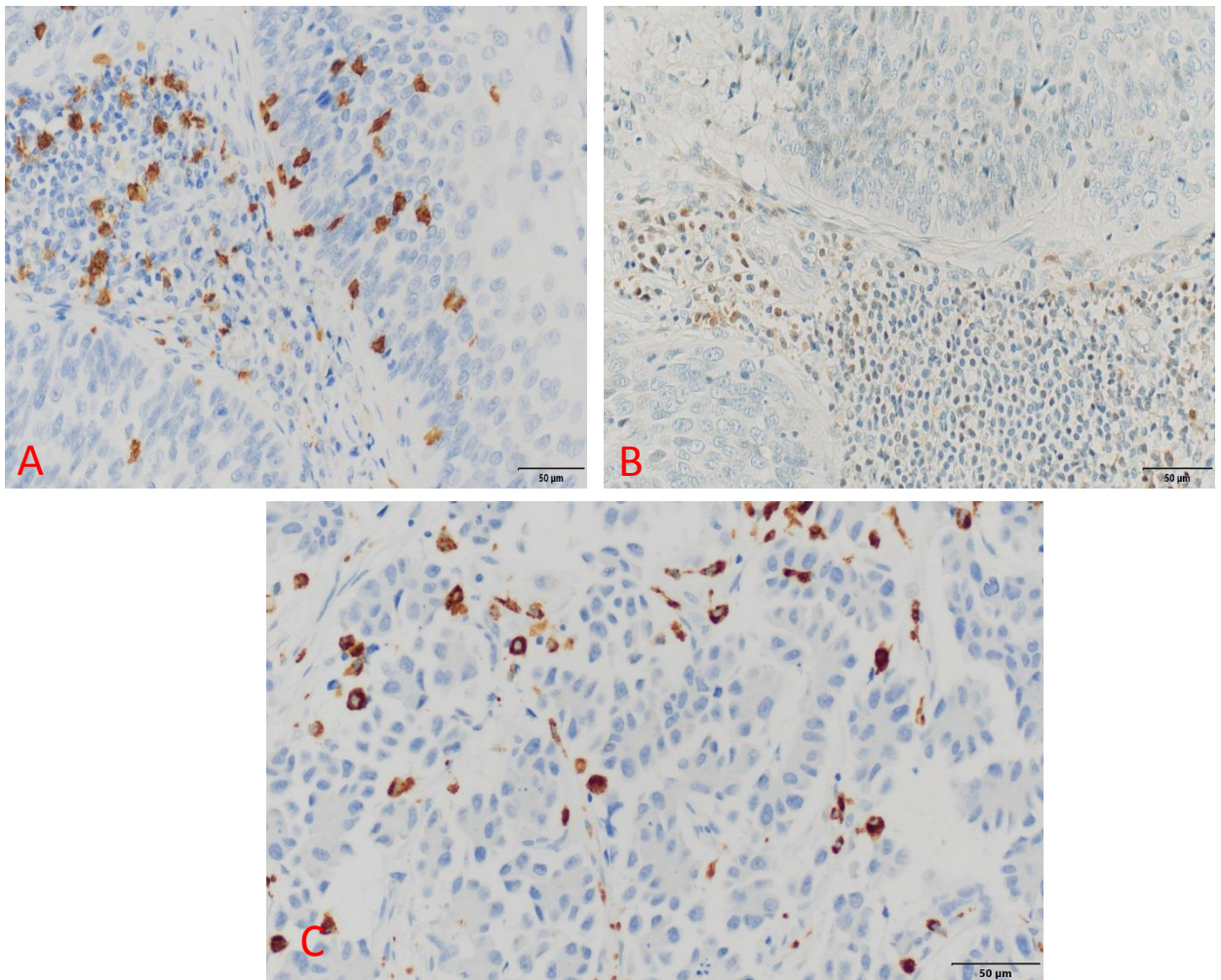


Figura 11 – Fotomicrografias representativas de reações de imunistoquímica para avaliação de células do infiltrado inflamatório. (A) CD8+, (B) CD25+ e (C) CD68+. Coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina). Aumento 400x.

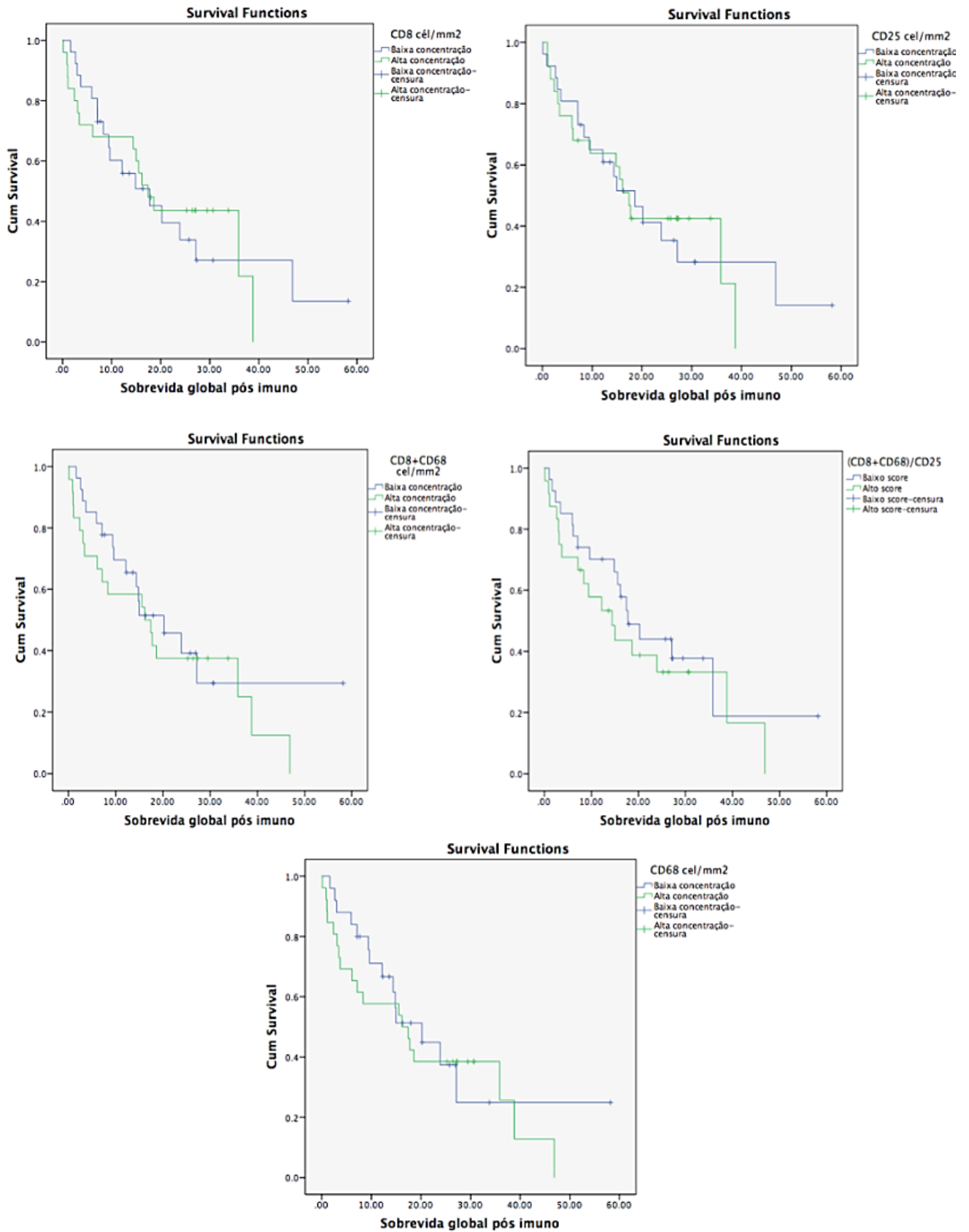


Figura 12 – Curvas de SPI (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier quanto ao infiltrado inflamatório (CD8, CD25, C68 e os scores de CD8+CD68 e (CD8+CD68)/CD25.

5.8 Expressão gênica por NanoString (GEP – *gene expression profile*)

Dentre os 135 pacientes do estudo, 78 foram incluídos na análise de expressão gênica com objetivo de se identificar assinaturas preditoras de resposta à imunoterapia. A exclusão de casos se deveu a vários fatores tais como: 1) ausência de amostra tumoral (n=38), 2) baixa celularidade tumoral nas lâminas (menos de 60%) (n=14) e 3) baixa concentração de RNA extraído (abaixo do limite de detecção, <0,002ng/uL) (n=5).

5.8.1 Assinaturas de expressão gênica

Inicialmente avaliou-se a média geométrica de expressão de genes *housekeeping* das 78 amostras incluídas. Considerou-se para inclusão nas análises um corte mínimo de expressão definido como sendo a média geométrica + 2 SD (desvio padrão) de controles negativos. Assim, contagens abaixo de 32 foram consideradas inadequadas para análise sendo, dessa forma, excluídas 12 amostras – Figura 13.

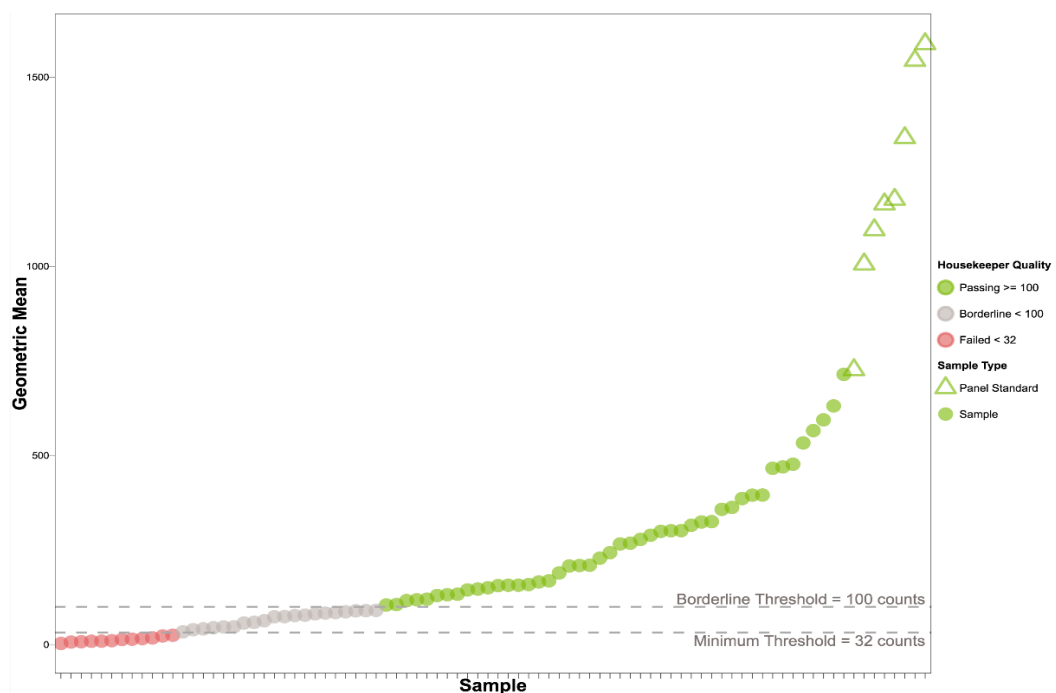


Figura 13 – Média geométrica de genes *housekeeping* de cada amostra. Em verde, amostras com contagens adequadas (incluídas). Em cinza, amostras com contagens limítrofes, entre 32 e 100 (incluídas). Em vermelho, amostras com contagens abaixo do limiar mínimo 32 (excluídas).

A Tabela 6 sumariza as características clínico-patológicas e terapêuticas dos 66 casos incluídos nessa análise. A mediana de sobrevida pós-imunoterapia, a mediana de sobrevida livre de progressão e a taxa de resposta objetiva nessa coorte de pacientes foi de 17,74 meses, 5,58 meses e 42,4% respectivamente.

Tabela 6 – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP tratados com ICI e incluídos na análise de expressão gênica (n=66)

Característica clínico-patológicas de tratamento	n	(%)
Idade mediana = 62,5 anos (36-81)		
Local		
Hospital de Câncer de Barretos	42	63,6
A. C. Cancer Center	24	46,4
Sexo		
Masculino	38	57,6
Feminino	28	42,4
Histologia		
Adenocarcinoma	44	67,7
Carcinoma escamoso	21	31,8
Carcinoma adenoescamoso	1	1,5
ECOG PS		
0-1	58	90,7
2	5	7,8
3	1	1,5
Ignorado	2	-
Perfil molecular		
<i>EGFR</i> positivo (del 19 ou L858R)	4	10,5
<i>ALK</i> positivo	1	2,5
Expressão de PD-L1 (TPS)		
<1%	20	52,6
1-49%	3	7,9
≥50%	15	39,5
Tabagismo		
Nunca fumou	11	16,7
Passado	31	47,0
Ativo	24	36,4
Linha tratamento		
Primeira	28	42,4
Segunda	18	27,3
A partir da terceira	20	30,3

Continua na próxima página...

Tabela 6 (continuação) – Características clínico-patológicas dos pacientes com CPCNP tratados com ICI e incluídos na análise de expressão gênica

Característica clínico-patológicas de tratamento	n	(%)
Esquema tratamento utilizado		
Anti-PD-(L)1 isolado	48	72,7
Anti-PD-(L)1 + Anti-CTLA4	1	1,5
Anti-PD-(L)1 + QT	9	13,6
Anti-PD-(L)1 + Anti-CTLA4 + QT	8	12,1

A expressão de 43 assinaturas referente aos 66 pacientes pode ser observada na Figura 14. Não houve casos com perda de expressão das assinaturas *MMR Loss*, *MSI Predictor* e *APM Loss* – Figura 15, corroborando os resultados de MSI obtidos por PCR, previamente descrito. Cerca de 50% dos pacientes apresentaram perda de expressão para a assinatura *Hypermutation*, no entanto não houve uma clara clusterização em relação à resposta radiológica, SLP ou SPI – Figura 16. Em quatro amostras se observou perda de expressão da via JAK-STAT. Dentre esses pacientes, três apresentaram resposta à imunoterapia.

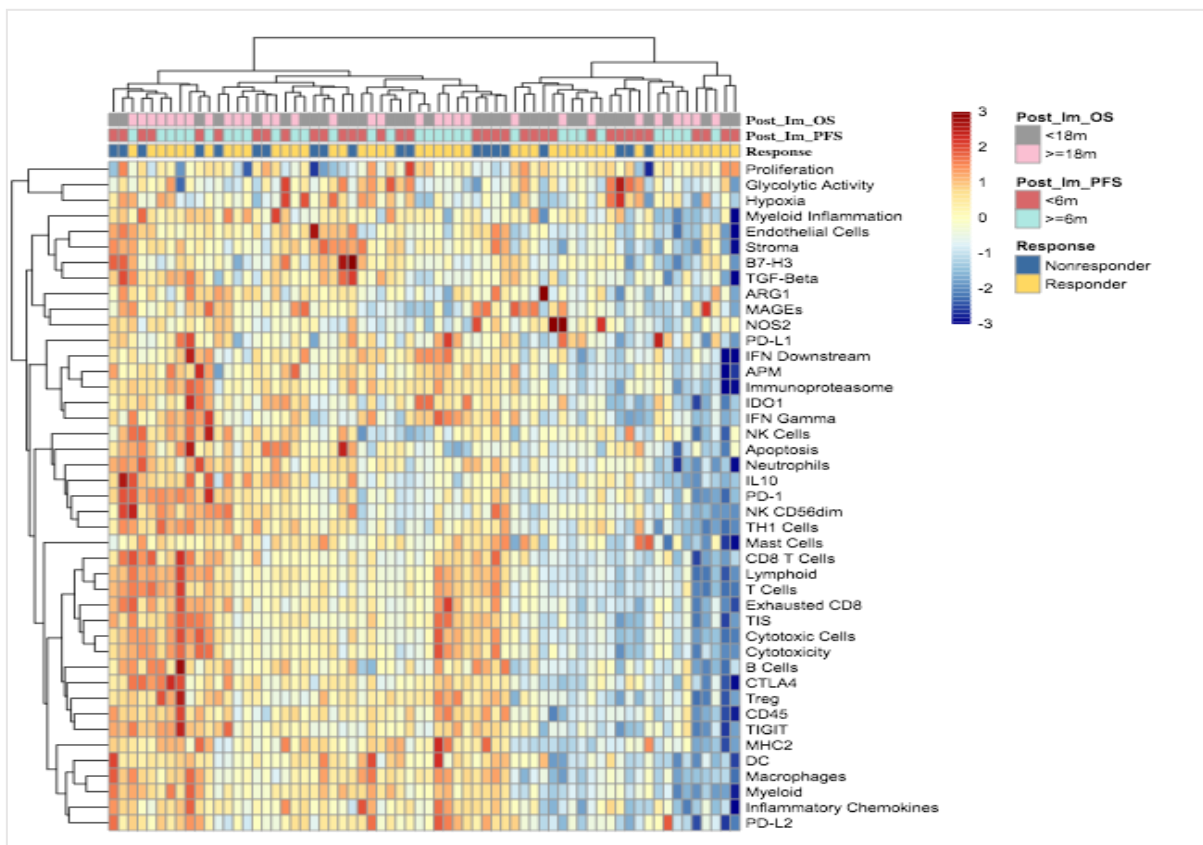


Figura 14 – Heatmap com 43 assinaturas referente aos 66 pacientes incluídos na análise.

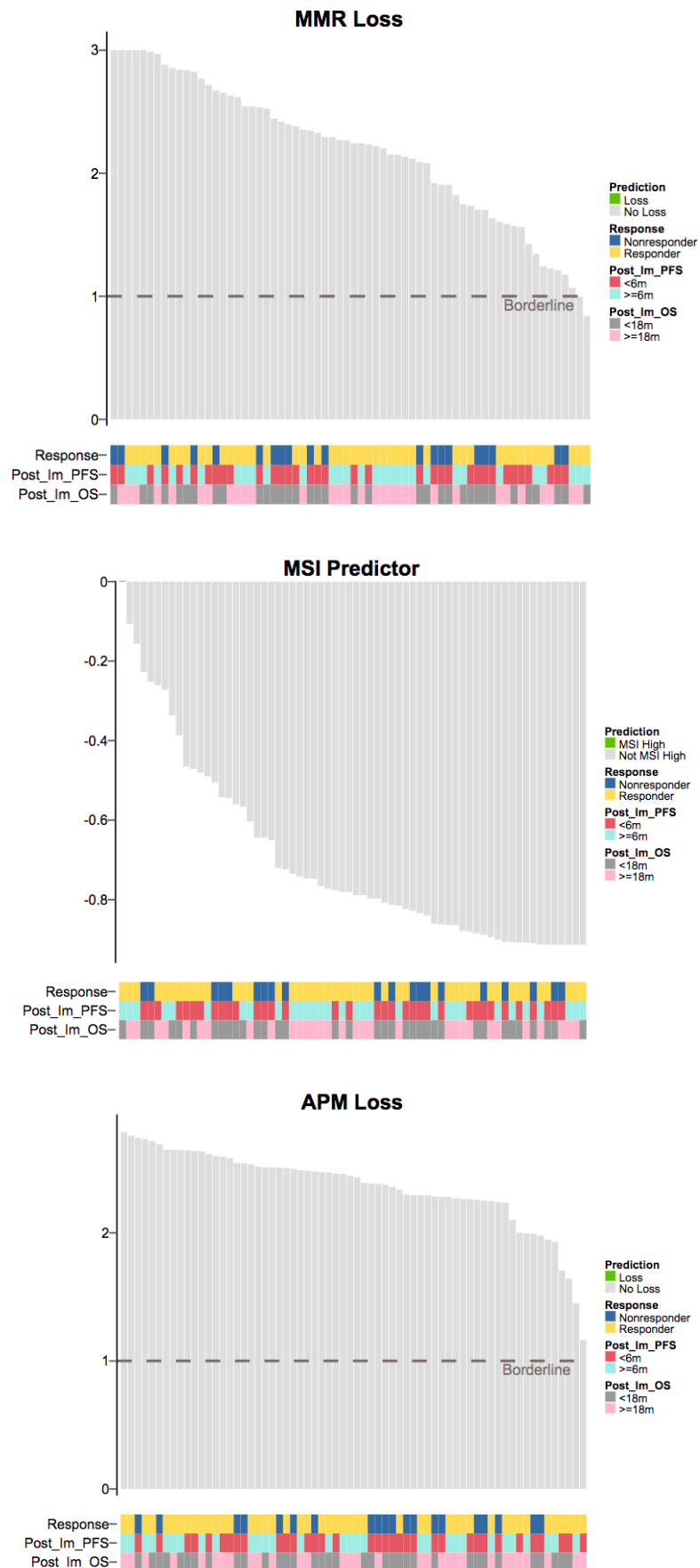


Figura 15 – Assinaturas relacionadas a perda de expressão sem nenhum caso identificado (MMR Loss, MSI predictor e APM Loss)

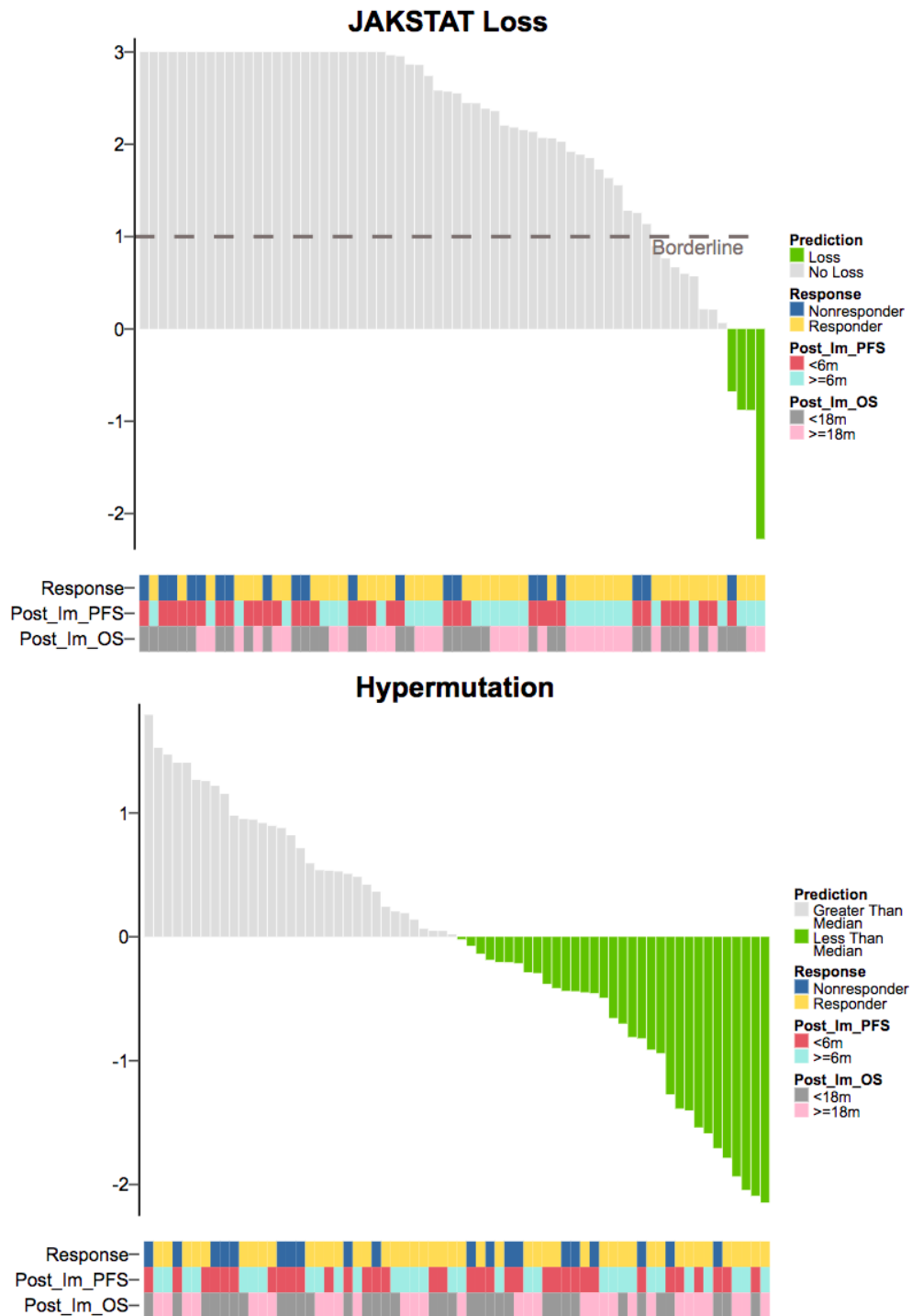


Figura 16 – Assinaturas relacionadas a perda de expressão com casos identificados (*JAKSTAT Loss*, *Hypermutation*).

Dentre as outras 43 assinaturas gênicas, 14 foram associadas à SPI (*IDO1*, *PD-L2*, *Citotoxicity*, *Cytotoxic Cells*, *IFN Downstream*, *CTLA4*, *PD-L1*, *TIGIT*, *Lymphoid*, *Immunoproteasome*, *Exhausted CD8*, *IFN Gamma*, *TIS* e *APM*) – Figura 17. As assinaturas *IFN Gama* e *TIS* foram as mais significativamente associadas à sobrevida – Figura 18.

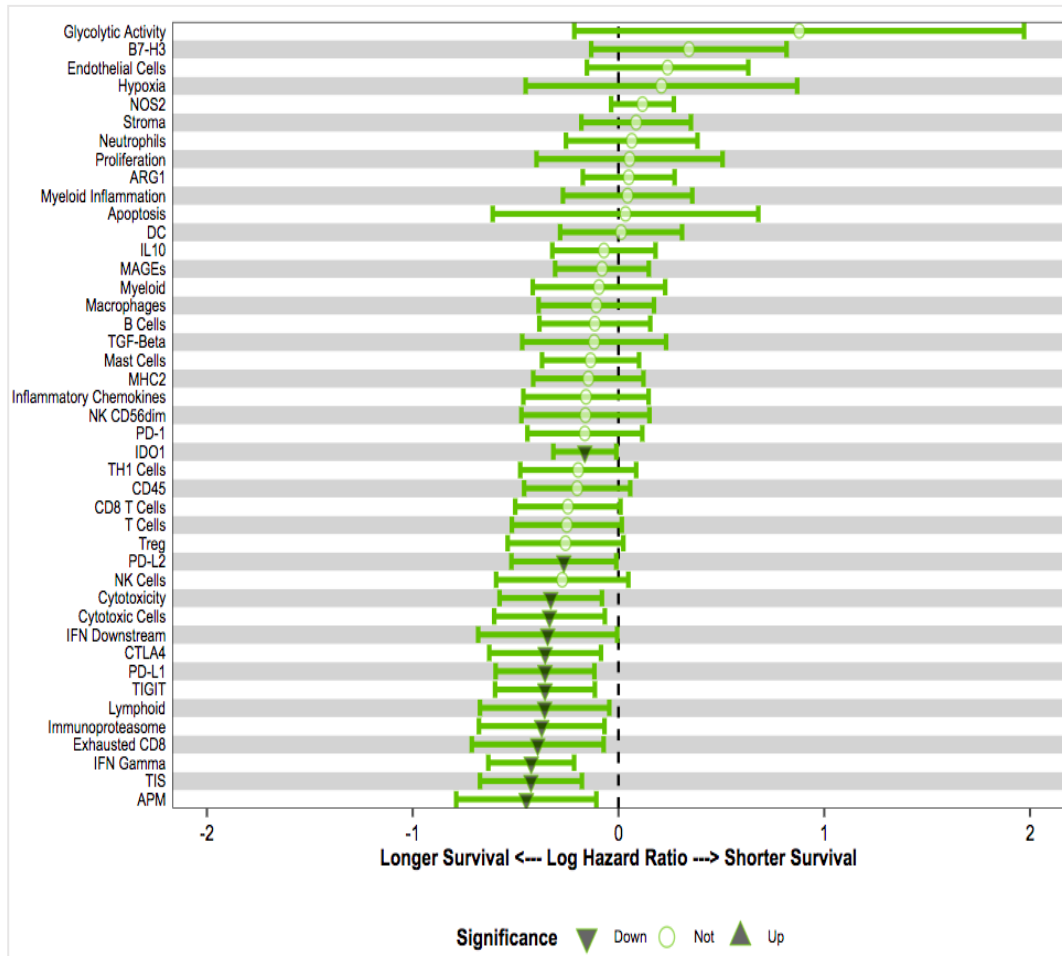


Figura 17 – *Forest plot* de sobrevivida pós-imunoterapia que demonstra distribuição da mediana de razão de risco e os intervalos de confiança (95%) não ajustados para cada assinatura.

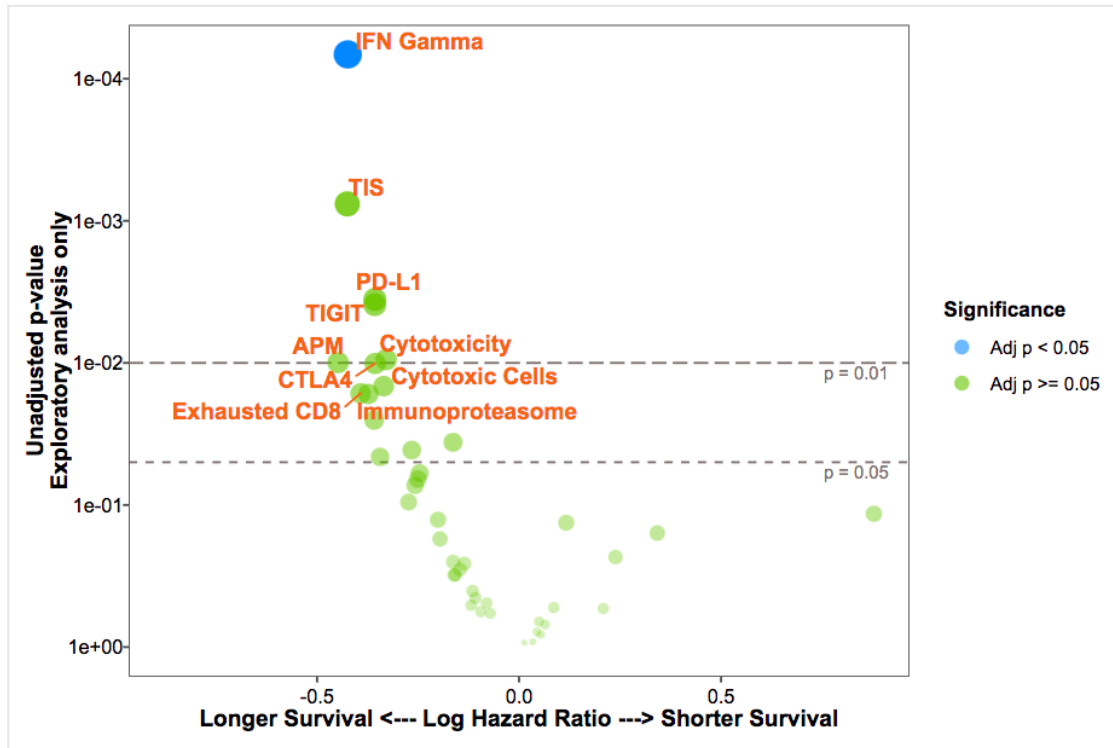


Figura 18 – *Volcano plot* de sobrevivida pós-imunoterapia exhibe a razão de risco e a significância de cada assinatura (valor p). As assinaturas que têm maior significância estatística aparecem mais alto no gráfico com pontos maiores e mais escuros, enquanto as assinaturas que têm razões de risco mais extremas aparecem mais longe do centro do gráfico. As assinaturas mais à direita estão associadas a um risco reduzido de um evento em relação à linha de base e as assinaturas mais à esquerda estão associadas a um maior risco de um evento em relação à linha de base. As linhas horizontais indicam o valor p ajustado de 0,01 e 0,05. Quando os valores p ajustados variam acima de 0,05, os limites não são mostrados no gráfico.

Os pacientes com alta expressão da assinatura *IFN Gama* apresentaram mediana de SPI significativamente maior do que aqueles com baixa expressão (medianas de 29,2 *versus* 15,5 meses; $p < 0,05$). Os mesmos resultados foram observados em relação à expressão de *TIS* – Figura 19.

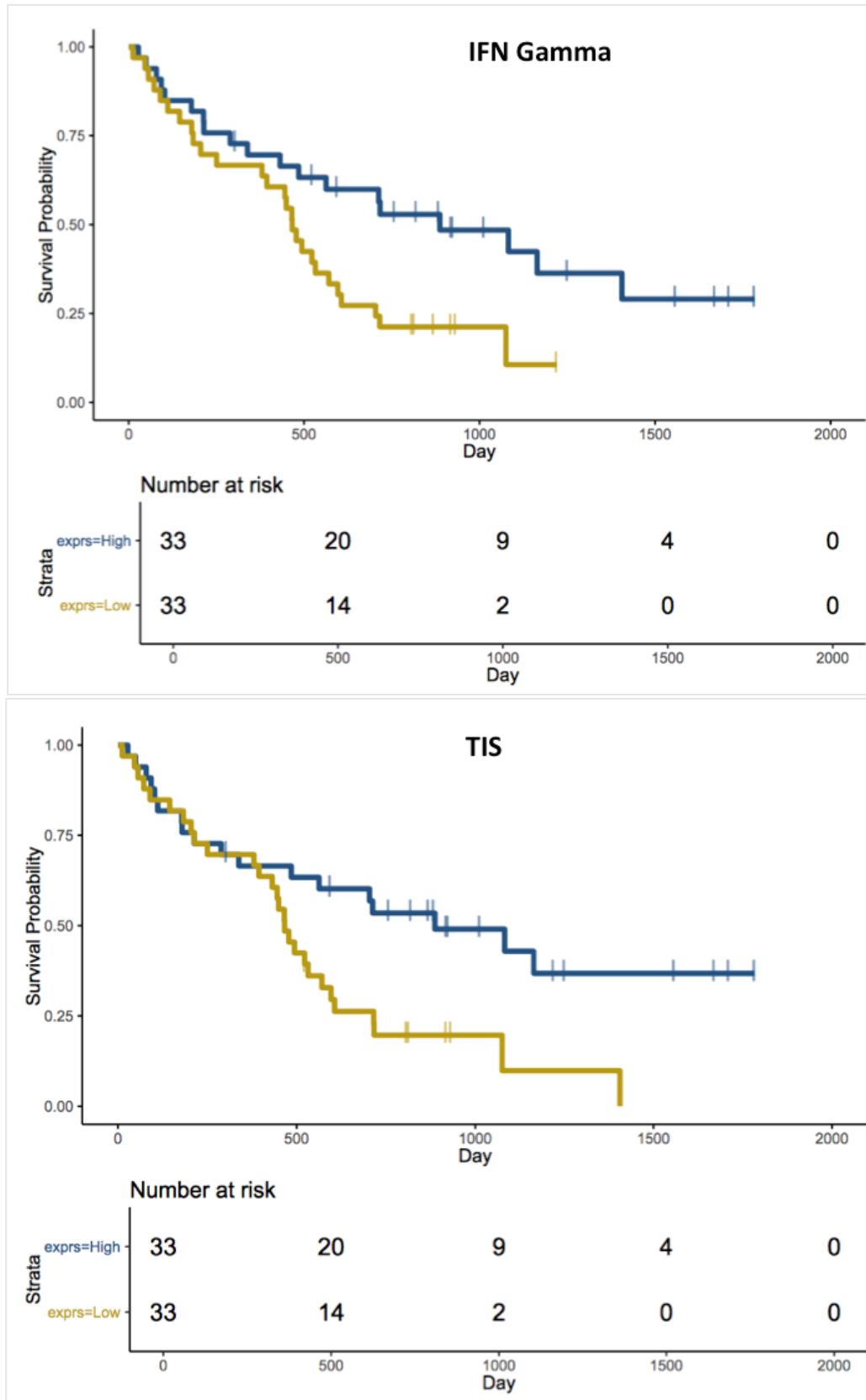


Figura 19 – Curvas de sobrevivência pós-imunoterapia (em dias) avaliada pelo método de Kaplan-Meier dos 66 portadores de CPCNP incluídos na análise em relação às assinaturas gênicas IFN Gamma (gráfico de cima) e TIS (gráfico de baixo).

5.8.2 Predição por LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*)

Em estatística e *machine learning*, LASSO é um método de análise de regressão que realiza seleção e regularização de variáveis para aumentar a precisão de predição e a interpretação do modelo estatístico resultante. Nesse sentido foi utilizado aqui para se selecionar um modelo, no caso, composto por padrões de expressão genética diferencial, capaz de prever maior sobrevida relacionada à imunoterapia.

A figura 20 demonstra nova análise quantitativa de expressão, em log₂, relativo aos 770 genes do painel, para os 78 casos. Nota-se novamente a presença de amostras com quantidade nitidamente menores de expressão. O mesmo critério para o item 5.8.1 foi utilizado aqui, excluindo-se os mesmos 12 casos (análise realizada com 66 casos – Tabela 7).

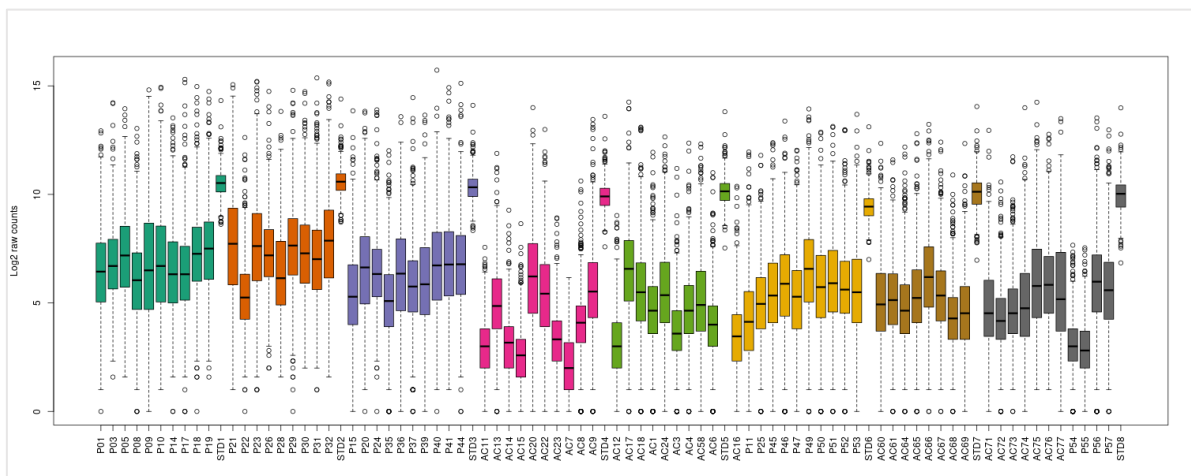


Figura 20 – Expressão de RNA, em log₂, para cada uma das 78 amostras analisadas. As cores representam diferentes experimentos.

Após o processo de normalização dos dados (que utilizou *Genorm* para seleção dos genes *housekeepings* e média geométrica destes genes *housekeepings* para normalização) foi gerado o *heatmap* que demonstra a expressão dos 770 genes estudados nas amostras dos 66 pacientes analisados - Figura 21. Não se observa, no entanto, uma clara discriminação de subgrupos.

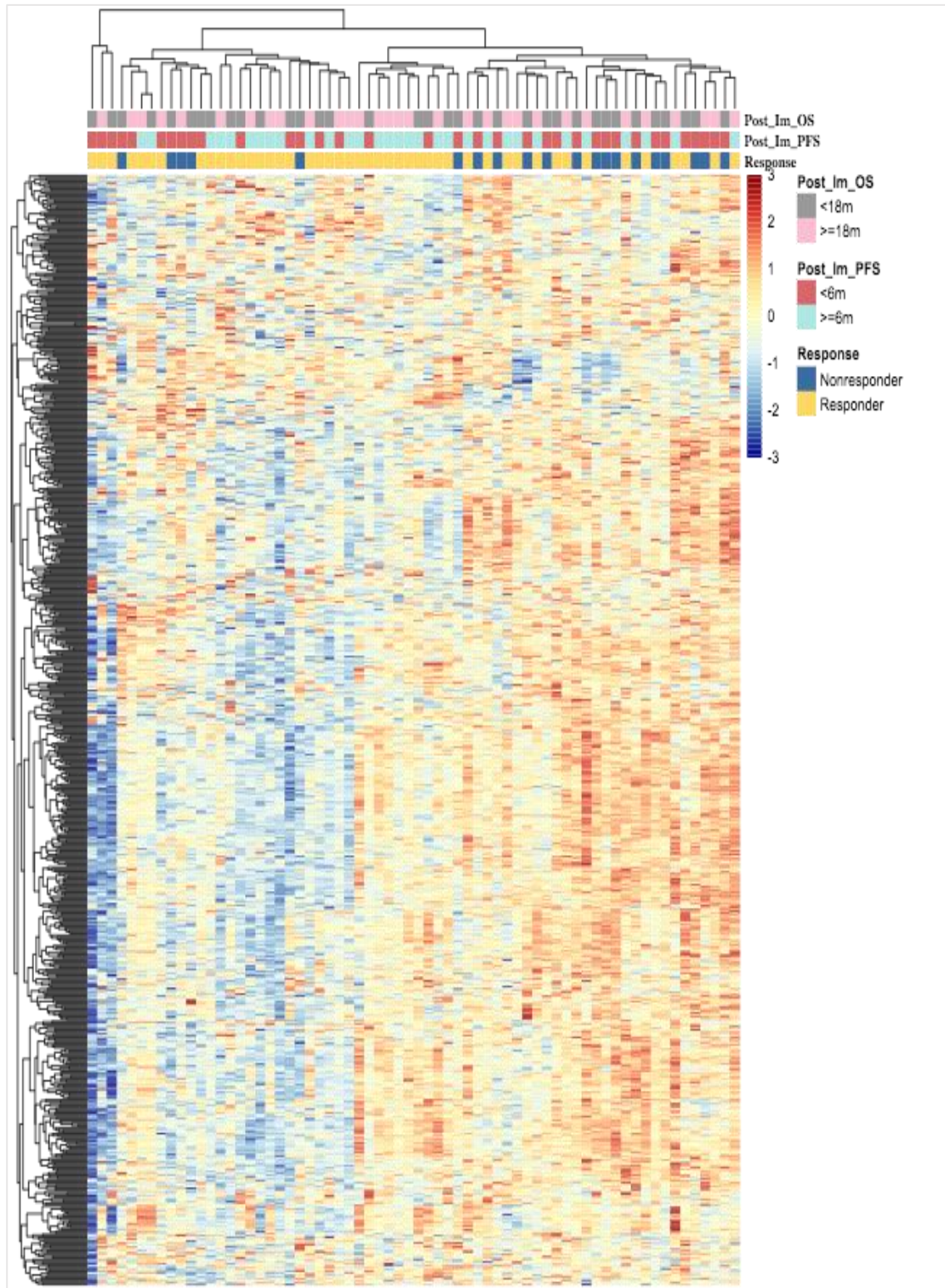


Figura 21 – *Heatmap* de expressão gênica (770 genes) dos 70 pacientes analisados (eixo y=pacientes; eixo X=genes), figura adaptada.

A análise univariada dos 770 genes identificou 72 genes associados com SPI ($p < 0,05$) - Tabela 7.

Tabela 7 - Genes associados a SPI através de análise univariada (N=72).

Gene	HR (95% CI for HR)	p
<i>B2M</i>	0.67089 (0.49-0.91)	0.0102775
<i>C5</i>	1.28343 (1-1.6)	0.047649
<i>CASP1</i>	0.73524 (0.56-0.97)	0.0291946
<i>CCL5</i>	0.731581 (0.59-0.91)	0.00413704
<i>CCNO</i>	1.27624 (1-1.6)	0.0451572
<i>CD27</i>	0.795869 (0.65-0.97)	0.0262344
<i>CD274</i>	0.687731 (0.54-0.88)	0.00252521
<i>CD38</i>	0.665408 (0.51-0.87)	0.00304096
<i>CD3D</i>	0.778876 (0.61-1)	0.0485168
<i>CD48</i>	0.730146 (0.57-0.93)	0.0111953
<i>CD6</i>	0.776452 (0.62-0.97)	0.027048
<i>CD7</i>	0.739451 (0.58-0.94)	0.0156225
<i>CD8A</i>	0.780745 (0.61-0.99)	0.0423663
<i>CTLA4</i>	0.712537 (0.55-0.93)	0.0123087
<i>CXCL10</i>	0.724216 (0.62-0.85)	6.8567e-05
<i>CXCL11</i>	0.690453 (0.57-0.83)	9.96641e-05
<i>CXCL9</i>	0.75496 (0.65-0.88)	0.000202345
<i>EOMES</i>	0.776255 (0.61-0.99)	0.0453659
<i>FASLG</i>	0.754017 (0.6-0.95)	0.0169279
<i>FOXP3</i>	0.744406 (0.56-0.99)	0.0413972
<i>GBP1</i>	0.717897 (0.58-0.89)	0.00222919
<i>GBP2</i>	0.707589 (0.55-0.9)	0.00576995
<i>GBP4</i>	0.697176 (0.56-0.87)	0.00109179
<i>GNLY</i>	0.718585 (0.57-0.91)	0.00599729
<i>GOT2</i>	1.88506 (1.1-3.2)	0.0162635
<i>GZMA</i>	0.802071 (0.68-0.95)	0.00922662
<i>GZMB</i>	0.774944 (0.62-0.97)	0.023419
<i>GZMH</i>	0.731159 (0.57-0.93)	0.0117825
<i>GZMK</i>	0.802443 (0.66-0.97)	0.0252842
<i>HLA.E</i>	0.6578 (0.47-0.91)	0.0128161
<i>ICOS</i>	0.669896 (0.5-0.89)	0.0061422
<i>IDO1</i>	0.837212 (0.72-0.98)	0.0247908
<i>IFI16</i>	0.804464 (0.65-0.99)	0.0398831
<i>IFI35</i>	0.762412 (0.58-1)	0.0467634
<i>IL10RA</i>	0.766549 (0.59-0.99)	0.0439722
<i>IL15</i>	0.742284 (0.58-0.95)	0.0175898
<i>IL18R1</i>	0.710342 (0.53-0.96)	0.0247551
<i>IL21R</i>	0.740449 (0.57-0.96)	0.0211417

Continua na próxima página...

Tabela 7 (continuação) - Genes associados a SPI através de análise univariada (N=72).

Gene	HR (95% CI for HR)	p
<i>IL2RG</i>	0.777831 (0.62-0.97)	0.0268531
<i>IRF1</i>	0.639844 (0.47-0.87)	0.00435541
<i>ITGAL</i>	0.753764 (0.57-0.99)	0.0427571
<i>KLRK1</i>	0.761077 (0.62-0.94)	0.0115173
<i>LAG3</i>	0.740602 (0.59-0.92)	0.00783468
<i>MX1</i>	0.777673 (0.61-0.98)	0.0360655
<i>NFKB2</i>	0.526422 (0.34-0.8)	0.00299949
<i>NKG7</i>	0.755513 (0.62-0.92)	0.00530366
<i>NLRC5</i>	0.739496 (0.55-0.99)	0.0444434
<i>OAS1</i>	0.750921 (0.6-0.95)	0.014989
<i>OAS2</i>	0.787102 (0.63-0.99)	0.0390326
<i>PDCD1LG2</i>	0.769113 (0.6-0.98)	0.0374169
<i>PPARGC1B</i>	0.708198 (0.52-0.96)	0.0283862
<i>PRF1</i>	0.771931 (0.61-0.97)	0.0293023
<i>PSMB8</i>	0.6819 (0.49-0.95)	0.0228156
<i>PSMB9</i>	0.651637 (0.51-0.83)	0.000560851
<i>RELB</i>	0.404259 (0.23-0.72)	0.00218584
<i>SAMSN1</i>	0.71091 (0.52-0.96)	0.0282641
<i>SERPINH1</i>	1.68772 (1.1-2.6)	0.0139566
<i>SGK1</i>	0.739257 (0.57-0.96)	0.0248156
<i>SH2D1A</i>	0.708896 (0.55-0.92)	0.00840744
<i>SLAMF7</i>	0.744738 (0.59-0.93)	0.0106989
<i>SPRY4</i>	1.41306 (1-2)	0.0397568
<i>STAT1</i>	0.55568 (0.4-0.78)	0.00056979
<i>STAT2</i>	0.609673 (0.38-0.99)	0.0445073
<i>TAP1</i>	0.592525 (0.46-0.77)	0.000101772
<i>TAP2</i>	0.640592 (0.48-0.86)	0.0027211
<i>TAPBP</i>	0.686692 (0.48-0.98)	0.039778
<i>TAPBPL</i>	0.728962 (0.54-0.99)	0.041609
<i>TIGIT</i>	0.682802 (0.54-0.87)	0.00168188
<i>TNFAIP3</i>	0.790987 (0.63-0.99)	0.0427889
<i>TNFRSF10B</i>	0.740666 (0.55-1)	0.0492281
<i>TNFSF10</i>	0.825883 (0.69-0.99)	0.0372473
<i>TRAT1</i>	0.797271 (0.64-0.99)	0.0437256
<i>TRIM21</i>	0.640885 (0.44-0.94)	0.0213129
<i>TYMP</i>	0.628312 (0.49-0.81)	0.000394865
<i>ZAP70</i>	0.759499 (0.6-0.97)	0.0254046

Através do LASSO, 6 genes foram selecionados para compor o escore de risco para mortalidade pós-imunoterapia. O escore de risco é calculado a partir dos coeficientes de expressão gênica como:

$$\text{Escore} = C1 * \text{Exp}(\text{Gene1}) + C2 * \text{Exp}(\text{Gene2}) + \dots + C9 * \text{Exp}(\text{Gene9})$$

Os genes selecionados e seus respectivos coeficientes de regressão estão sumarizados na Tabela 8. A Figura 22 traz o *heatmap* dos 66 casos e os 6 genes selecionados.

Tabela 8 – Genes e seus coeficientes, selecionados através do teste do LASSO para sobrevida pós-imunoterapia.

Gene	Coeficiente
Gene A	-0.1213868655
Gene B	-0.006926398638
Gene C	-0.006459550215
Gene D	0.1147628225
Gene E	0.1614433705
Gene F	-0.1242518833

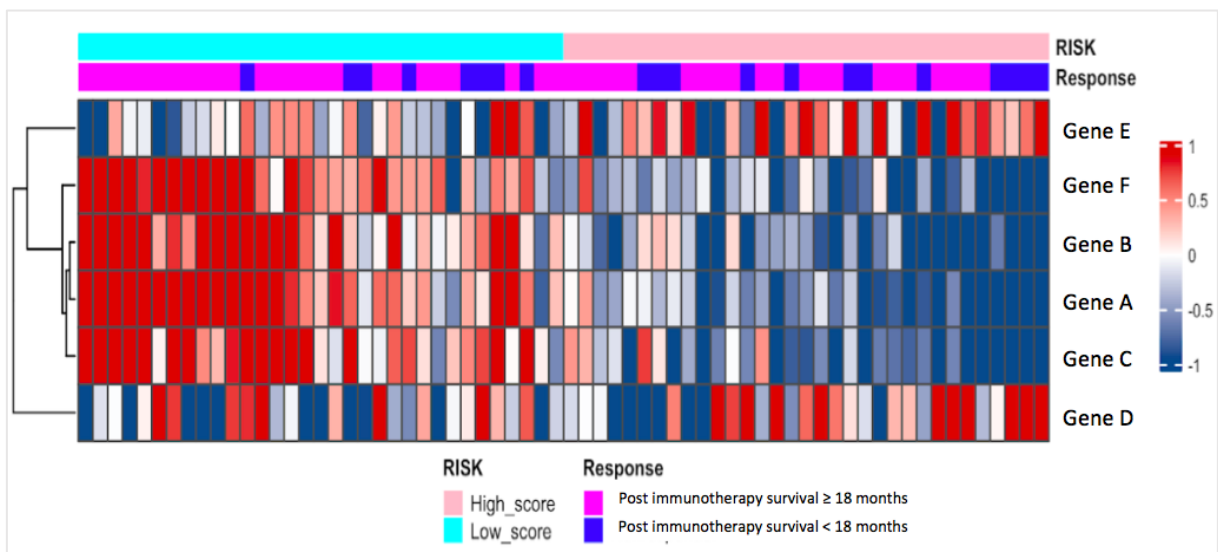


Figura 22 – *Heatmap* de expressão gênica (seis genes) dos 66 pacientes analisados (eixo y=pacientes; eixo X=genes)

Utilizando-se a mediana do escore dos 66 casos como corte para dicotomização da população, houve diferença estatisticamente significativa quanto à sobrevida pós-imunoterapia a favor daqueles com baixo escore, com medianas de de 36,0 *versus* 15,5 meses (Figura 23).

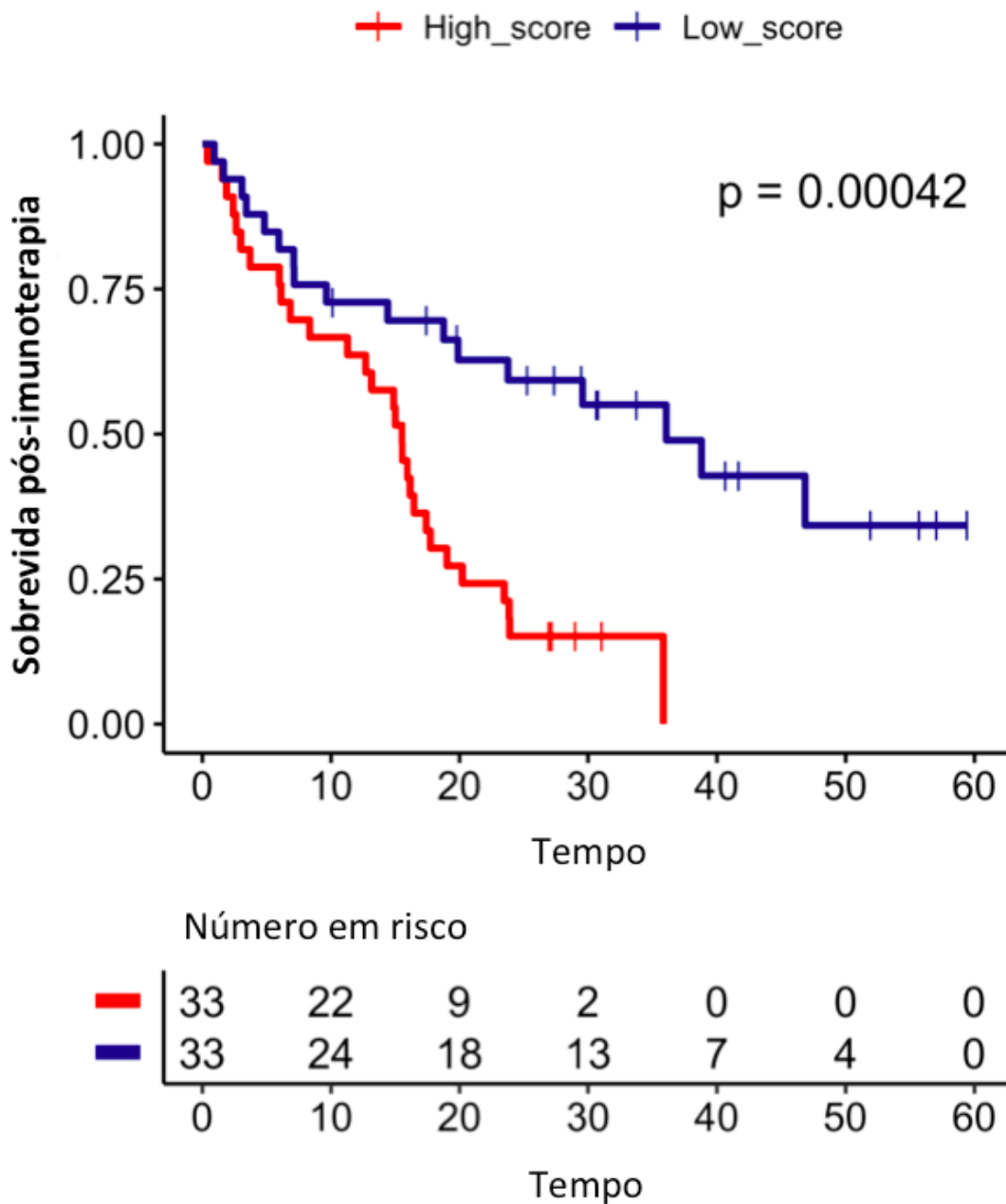


Figura 23 – Curvas de sobrevivida pós-imunoterapia (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com escore imune de 6 genes definido pelo teste do LASSO.

A figura 24 demonstra a relação entre o escore, o status de sobrevivida e o tempo de sobrevivida pós-imunoterapia. Pacientes com baixo escore estão mais frequentemente vivos e apresentam maior sobrevivida que aqueles com alto escore.

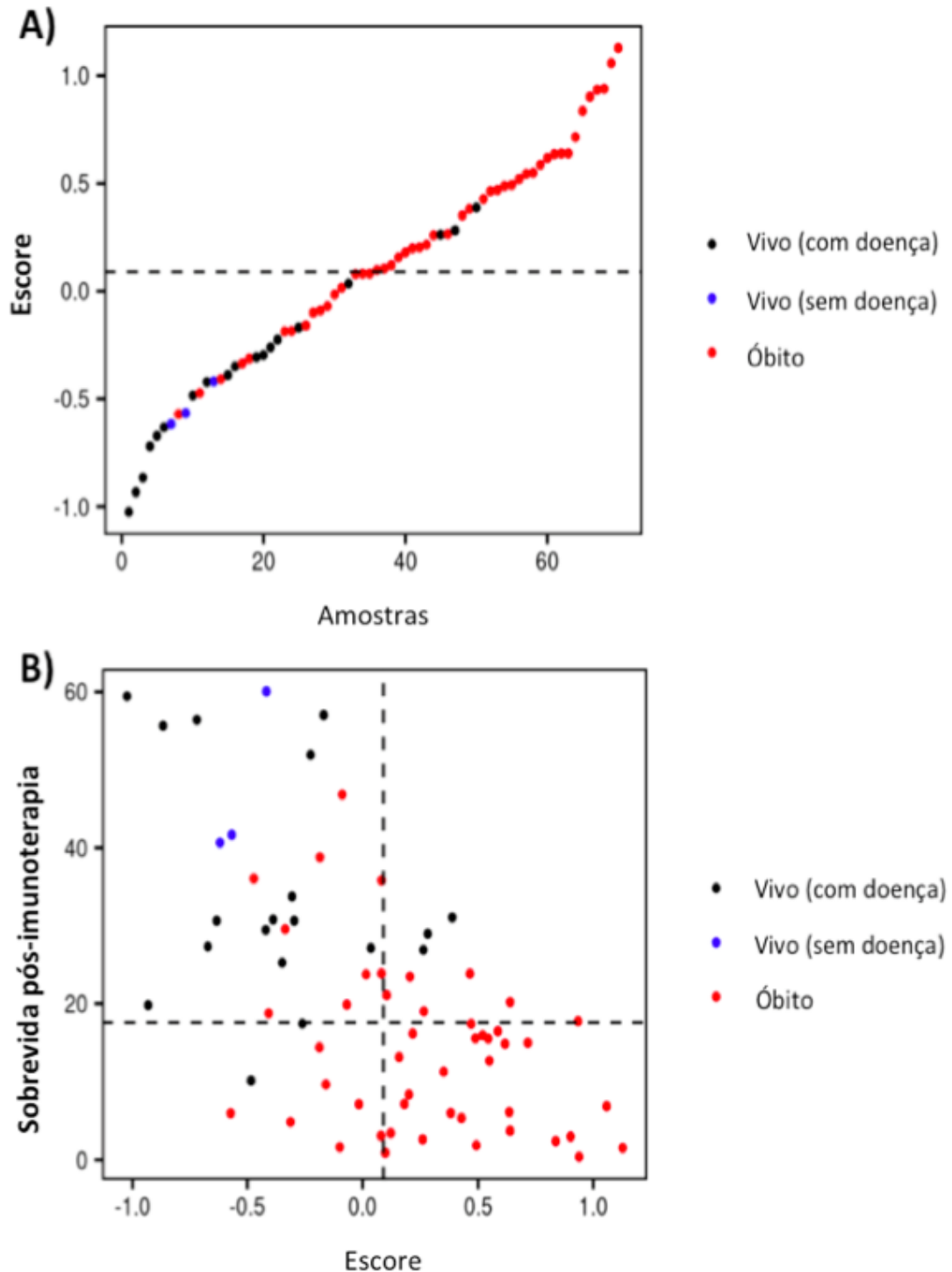


Figura 24 – (A) Casos ordenados conforme escore (eixo x), e relação com status de sobrevida e o corte utilizado para o escore imune; (B) Sobrevida pós-imunoterapia vs escore imune vs status de sobrevida.

Na análise de sensibilidade e especificidade do escore imune, a curva ROC demonstrou AUC de 0,65 (0,51-0,79), 0,81 (0,70-0,91) e 0,86 (0,78-0,95) para os cortes de sobrevida pós-imunoterapia de 12, 18 e 24 meses respectivamente (Figura 25). O índice de

concordância (C-index) foi de 0.71 (0.52-0.84). Esse índice representa a avaliação global do poder de discriminação do modelo. Valores acima de 0,7 indicam um bom modelo.

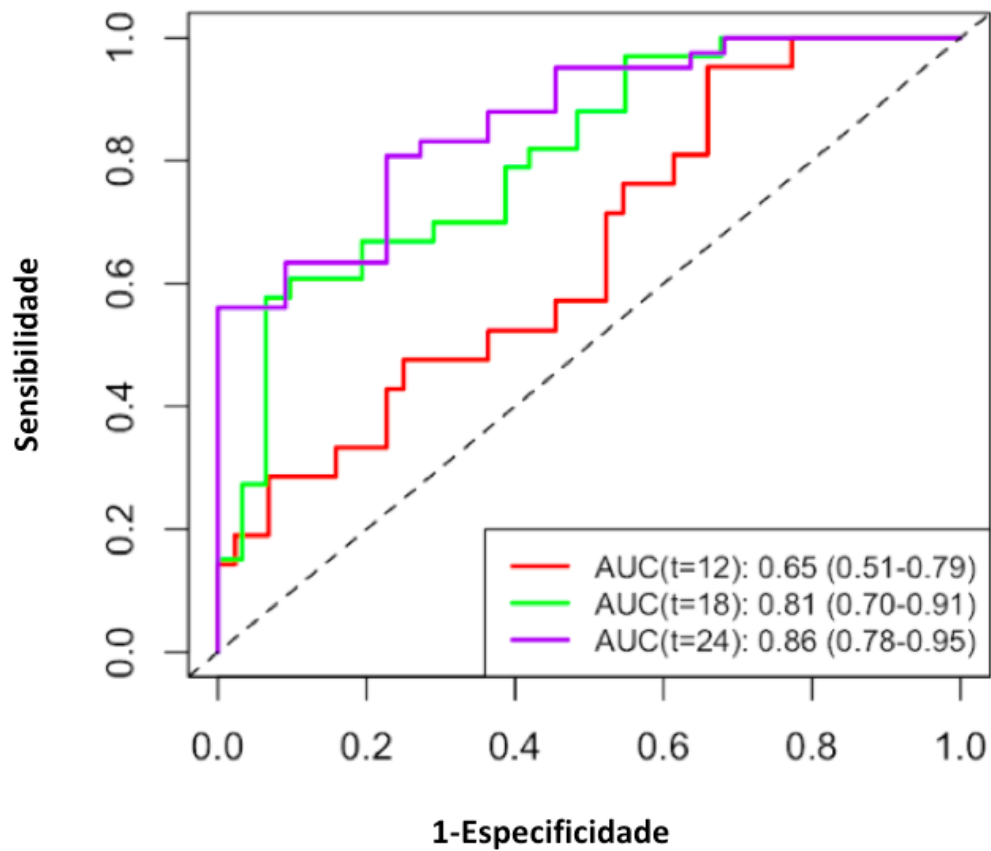


Figura 25 – Curvas ROC para os cortes de 12, 18 e 24 meses relativos à sobrevida pós-imunoterapia.

Quanto à sobrevida livre de progressão também houve diferença estatisticamente significativa entre as populações com escore baixo e alto – medianas de 10,12 *versus* 4,17 meses respectivamente ($p < 0,0001$) (Figura 26).

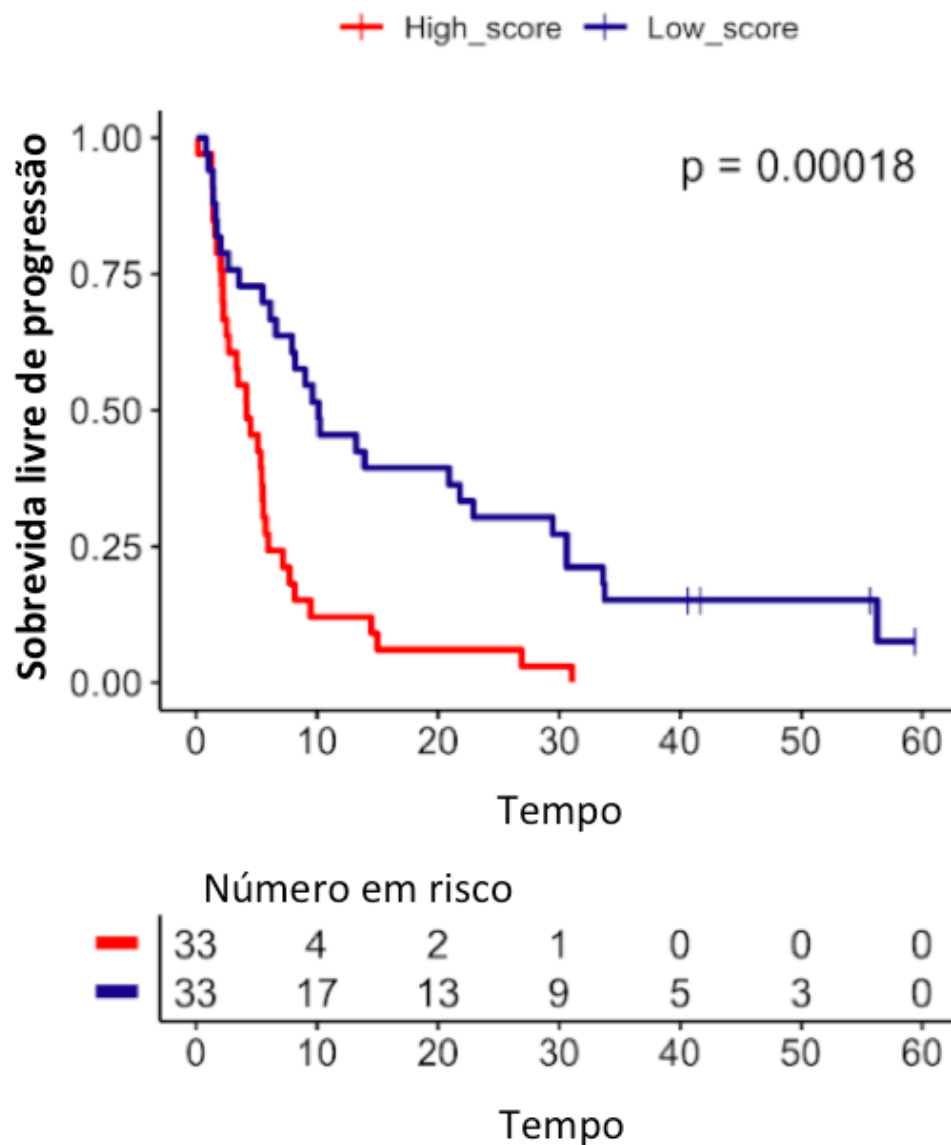


Figura 26 – Curvas de sobrevida livre de progressão (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com *score* imune de 6 genes definido pelo teste do LASSO.

A taxa de resposta (resposta completa ou parcial) foi estatisticamente maior no grupo de pacientes com *score* baixo, 57,5% *versus* 27,2% ($p=0,013$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Resposta radiológica (de acordo com RECIST 1.1) conforme *score* imune, alto ou baixo.

Score imune	RC/RP	DE/PD	Taxa Resposta	p
Baixo	19	14	57,5%	0,013
Alto	9	24	27,2%	

RC: resposta completa; RP: resposta parcial; DE: doença estável; PD: progressão de doença

5.8.3 Análise de validação da assinatura imune

Esta assinatura imune de 6 genes (*Lung-tumor signature – LungTS*) foi então validada em uma coorte independente de pacientes portadores de CPCNP tratados com anti-PD-(L)1 no Hospital Universitário Quiron Dexeus (Barcelona, Espanha). Para essa análise o mesmo painel PanCancer IO 360 da NanoString foi utilizado. Essa coorte foi composta por 39 pacientes (coorte de validação) - Tabela 10.

Tabela 10 – Características clínico-patológicas dos 66 pacientes da coorte do estudo e dos 39 pacientes da coorte de validação.

Característica clínico-patológicas e de tratamento	Coorte do estudo (n=66) n (%)	Coorte de validação (n=39) n (%)
Idade mediana (anos)	62,5	62,0
Sexo		
Masculino	38 (57,6)	26 (66,7)
Feminino	28 (42,4)	13 (33,3)
Histologia		
Adenocarcinoma	44 (67,7)	29 (74,4)
Carcinoma escamoso	21 (31,8)	10 (25,6)
Carcinoma adenoescamoso	1 (1,5)	-
Perfil molecular		
<i>EGFR</i> positivo (del 19 ou L858R)	4 (10,5)	2 (7,4)
<i>ALK</i> positivo	1 (2,5)	-
Expressão de PD-L1 (TPS)		
<1%	20 (52,6)	12 (57,1)
1-49%	3 (7,9)	6 (28,6)
≥50%	15 (39,5)	3 (14,3)
Tabagismo		
Nunca fumou	11 (16,7)	0 (0)
Passado	31 (47,0)	25 (64,1)
Ativo	24 (36,4)	14 (35,9)
Linha tratamento		
Primeira	28 (42,4)	16 (41,0)
Segunda	18 (27,3)	18 (46,2)
A partir da terceira	20 (30,3)	5 (12,8)

Continua na próxima página...

Tabela 10 (continuação) – Características clínico-patológicas dos 66 pacientes da coorte do estudo e dos 39 pacientes da coorte de validação.

Característica clínico-patológicas e de tratamento	Coorte do estudo (n=66) n (%)	Coorte de validação (n=39) n (%)
Esquema tratamento utilizado		
Anti-PD-(L)1 isolado	48 (72,7)	32 (80,0)
Anti-PD-(L)1 + Anti-CTLA4	1 (1,5)	2 (5,1)
Anti-PD-(L)1 + QT	9 (13,6)	5 (12,9)
Anti-PD-(L)1 + Anti-CTLA4 + QT	8 (12,1)	-

Quando comparadas entre si, as coortes apresentam mesma mediana de idade, predominância do sexo masculino, histologia adenocarcinoma, poucos casos com mutação acionável, sendo que a maioria dos casos apresentaram tumores sem expressão de PDL1 e foi tratada com imunoterapia isolada em linhas posteriores (segunda linha ou além). Observa-se, no entanto, maior proporção de pacientes não tabagistas na coorte do estudo. A mediana de SPI e a taxa de resposta objetiva na coorte de validação também se mostraram semelhantes ao observado na coorte do estudo, 16,0 meses e 42,6% respectivamente.

Pacientes com bom baixo escore imune apresentaram melhor sobrevida pós-imunoterapia, 18 *versus* 9,0 meses ($p=0,0051$) e melhor sobrevida livre de progressão, 10,0 *versus* 4,0 meses ($p=0,072$), o que valida os resultados observados na coorte do estudo (Figura 27).

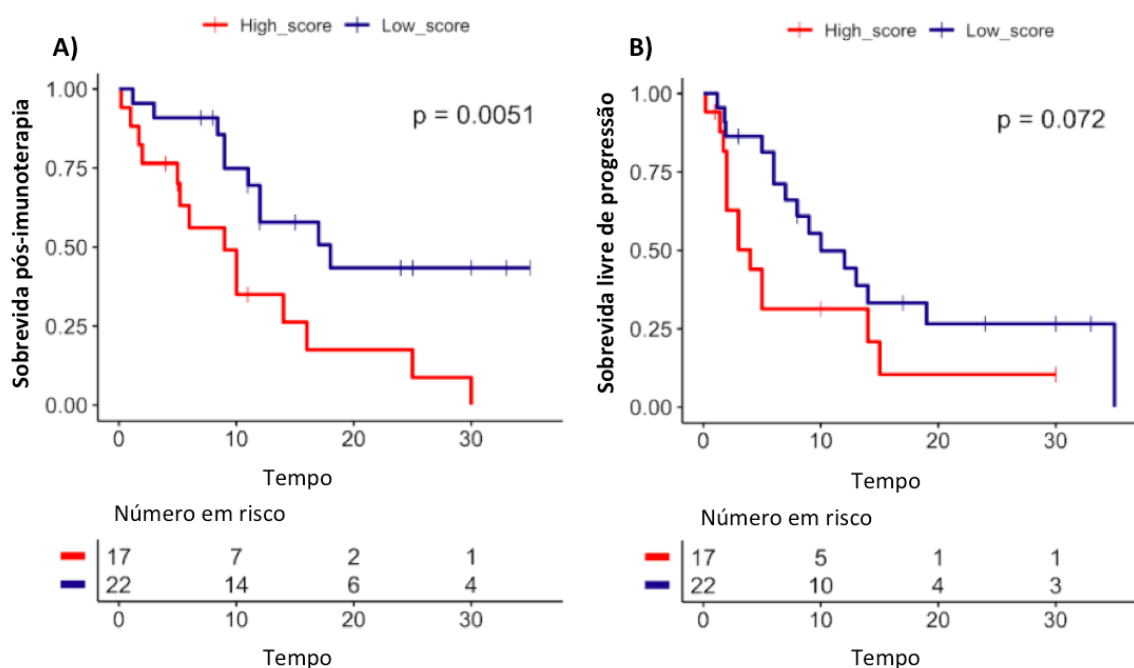


Figura 27 – Curvas de sobrevivida pós-imunoterapia (A) e sobrevivida livre de progressão (B) (em meses) avaliada pelo método de Kaplan-Meier de acordo com *score* imune de 6 genes definido pelo teste do LASSO, na coorte de validação do estudo.

Não houve diferença em relação às taxas de resposta, sendo de 45,4% para aqueles com baixo risco e 47,1% para aqueles com alto risco ($p=0,92$).

5.9 Combinação de biomarcadores

Nesse estudo, dentre os biomarcadores analisados, GEP e expressão de PD-L1 se mostraram úteis na discriminação de respondedores à imunoterapia, tanto em monoterapia quanto combinada à quimioterapia. MSI se mostrou demasiado raro e infiltrado tumoral inflamatório não discriminou os respondedores dos não respondedores. Assim, as análises que se seguem são referentes à combinação de GEP (especificamente a nova assinatura identificada) e expressão de PD-L1 (tanto IHQ quanto expressão CD274).

5.9.1 Expressão de PD-L1 por IHQ e expressão CD274

A partir dos 39 pacientes (dentre os 66) que apresentavam informação quanto a expressão de PD-L1 por IHQ, realizou-se a análise de correlação entre expressão proteica de PD-L1 e expressão do gene *CD274* (que codifica a proteína PD-L1). Considerando-se que

poucos pacientes apresentavam expressão intermediária de PD-L1 por IHQ (1-49%), a análise foi realizada considerando-se a variável PD-L1 de forma dicotomizada (PD-L1 positivo, $\geq 1\%$; ou negativo, $< 1\%$). Houve associação estatisticamente significativa entre expressão proteica de PD-L1 e expressão do gene *CD274* ($p < 0,001$), conforme demonstrado na Figura 28.

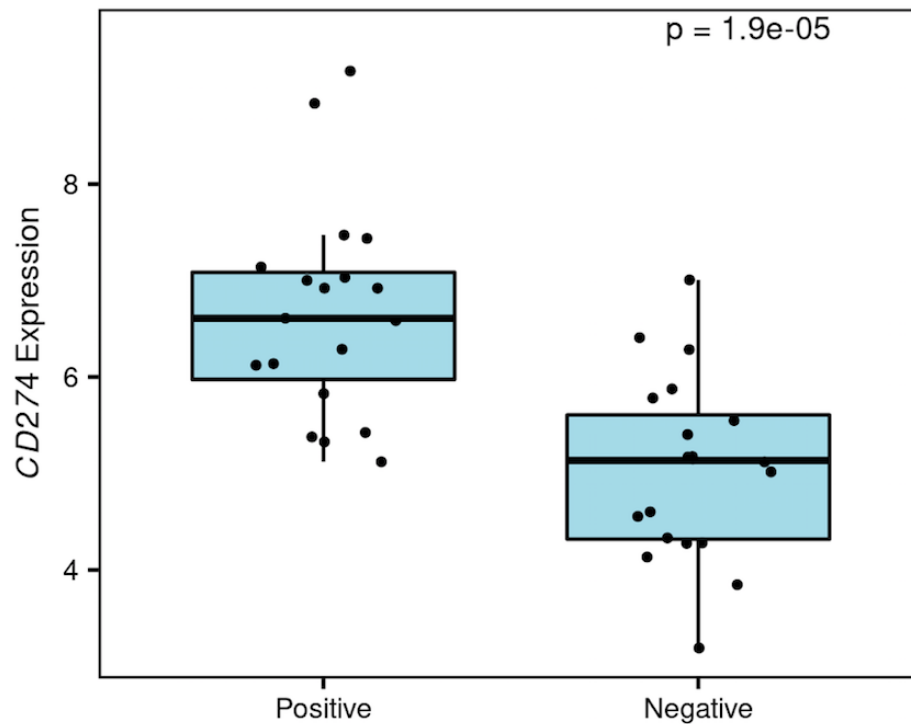


Figura 28 – *Boxplot* demonstrando correlação entre expressão PD-L1 por IHQ (eixo X) e expressão gênica normalizada de PD-L1 (*CD274*).

O ponto de corte de expressão de *CD274* para se considerar um caso PD-L1 positivo foi definido a partir da realização de uma curva ROC – Figura 29.

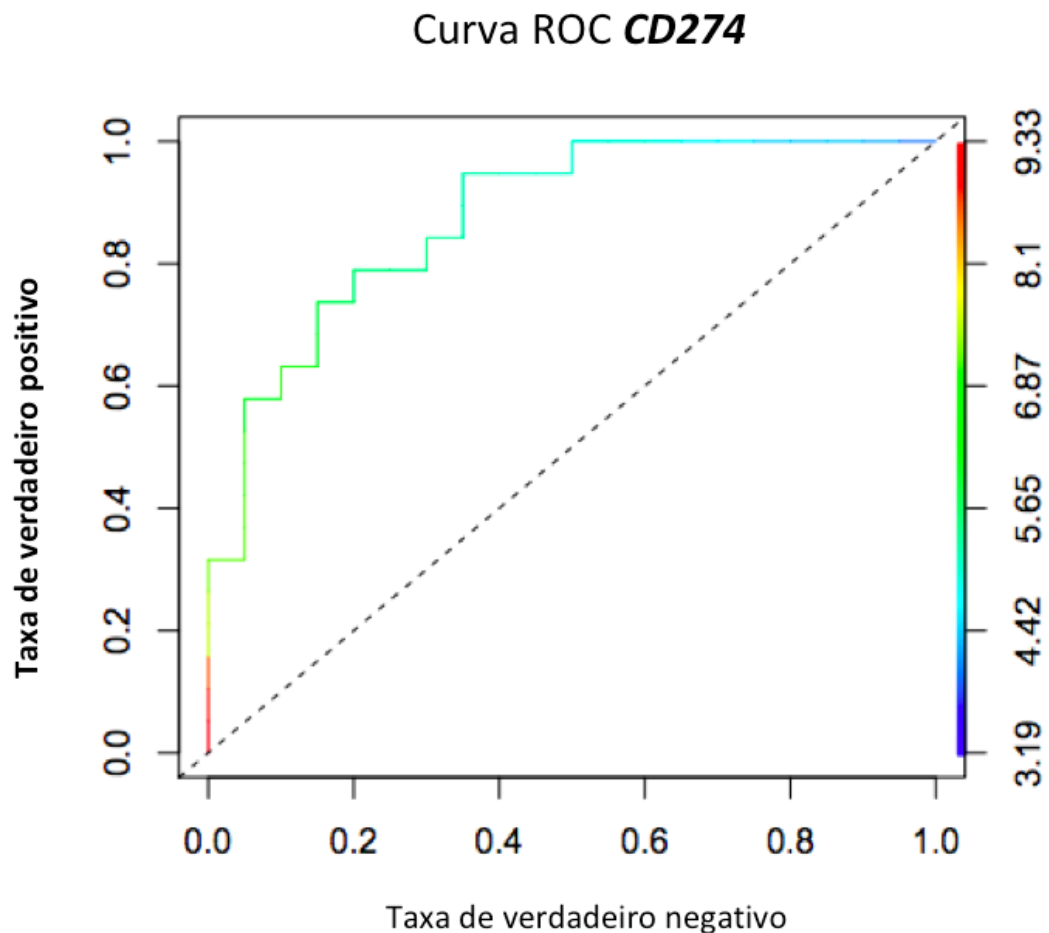


Figura 29 – Curva ROC para definição de PD-L1 positivos de acordo com expressão de *CD274*.

5.9.2 Sobrevida pós-imunoterapia de acordo com *status* de PD-L1 e escore imune

Definidos os casos PD-L1 positivos a partir da expressão de *CD274*, os 66 pacientes foram classificados de acordo com esse critério e o escore imune. As curvas de sobrevida pós-imunoterapia, de acordo com os quatro subgrupos formados estão representadas na Figura 30. O grupo de pacientes PD-L1 positivos (*CD274*-H) e baixo escore imune (Score-L) apresenta melhor sobrevida pós-imunoterapia do que os demais grupos com mediana de 46,85 meses. Os demais subgrupos apresentaram mediana de 14,98 meses (*CD274*-H e Score-H), 15,72 meses (*CD274*-L e Score-H) e 18,76 meses (*CD274*-L e Score-L) ($p=0,0014$).

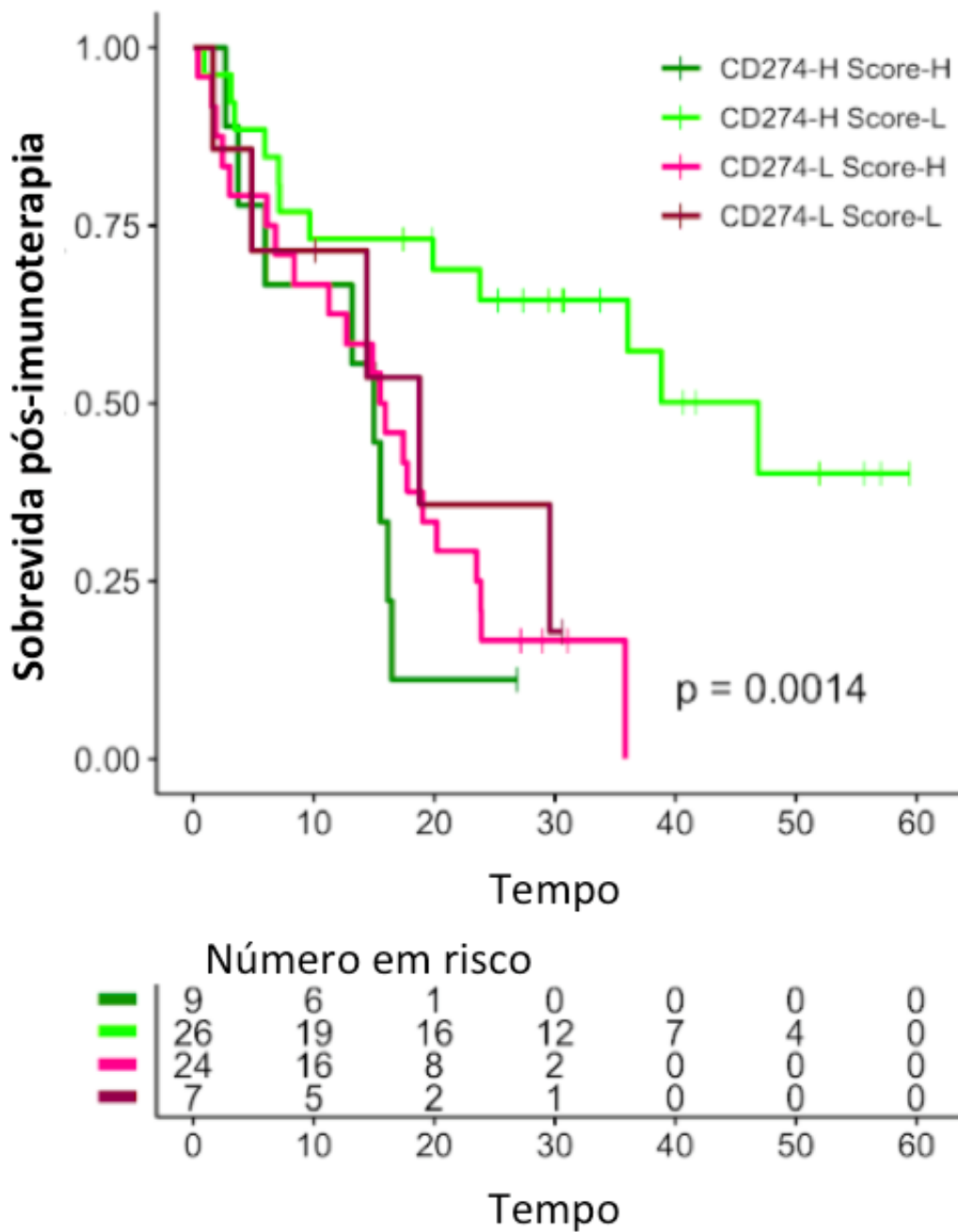


Figura 30 – Curvas de sobrevivida pós-imunoterapia avaliadas pelo método de Kaplan-Meier, de acordo com subgrupos definidos conforme expressão de *CD274* (H: positivos; L: negativos) e conforme escore imune (H: alto; L: baixo)

6. DISCUSSÃO

Até meados dos anos 2000 a quimioterapia citotóxica era considerada o padrão de tratamento paliativo para pacientes com CPCNP e associada a uma sobrevida mediana de apenas 8 meses. A partir de 2009, com a terapia anti-EGFR, a terapia-alvo iniciou uma nova era no tratamento da doença e inaugurou o conceito de personalização do tratamento. Novos alvos vêm ainda sendo identificados e novas drogas desenvolvidas o que tem estendido a sobrevida desses pacientes em uma magnitude nunca antes imaginado. No entanto, grande parte dos CPCNP não apresentam as alterações moleculares alvo, e, portanto, não são candidatos a esse tipo de tratamento.

Em paralelo ao desenvolvimento da terapia-alvo surgiram os novos imunoterápicos, agentes anti-PD-(L)1 e anti-CTLA4, que beneficiam principalmente pacientes tabagistas e sem mutações acionáveis. No entanto, apesar de serem aprovados para praticamente todos os casos de CPCNP avançado, apenas uma parcela desses pacientes é beneficiada com esse tipo de tratamento, o que acaba por onerar o sistema de saúde. Além disso não são isentos de efeitos colaterais. Seguindo o conceito da terapia-alvo, fica evidente a necessidade de se utilizar na prática clínica biomarcadores preditivos de resposta ao tratamento imunoterápico. No entanto, apesar de vários estudos direcionados a esse propósito, apenas a expressão de PD-L1 vem sendo utilizada na prática e nitidamente apresenta limitações importantes, com pacientes alto expressores não respondendo ao tratamento e pacientes sem expressão de PD-L1 apresentando respostas duradouras.

Com a intenção de explorar novos biomarcadores e a combinação de biomarcadores preditivos de resposta aos inibidores de PD-(L)1, incluímos retrospectivamente nesse estudo 135 pacientes portadores de CPCNP tratados com essas drogas em dois centros de referência nacional para o tratamento do câncer – Hospital de Câncer de Barretos e o A.C. Camargo Cancer Center. Dos pacientes incluídos as características clinicopatológicas refletem uma típica população de CPCNP com idade mediana em torno de 60 anos, predomínio do sexo masculino e tabagistas. Nota-se no entanto que apenas 40% desses pacientes receberam imunoterapia na primeira linha de tratamento e 70% dos pacientes utilizou anti-PD(L)1 isolado. Isso é justificado por três motivos: (1) momento histórico, visto que grande parte desses pacientes recebeu tratamento imunoterápico antes das aprovações dessas drogas na primeira linha de tratamento; (2) grande parte desses pacientes foi tratada

no contexto de saúde pública, o que inviabiliza o acesso ao tratamento na primeira linha; (3) grande parte desses pacientes, principalmente aqueles provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, foi participante de um programa de acesso expandido de nivolumabe a partir da segunda linha de tratamento. Também pode-se notar que 17 pacientes (12,5%) receberam imunoterápicos (cemiplimabe, avelumabe e durvalumabe) ou combinações de imunoterápicos (pembrolizumabe + ipilimumabe e durvalumabe + tremelimumabe) ainda não aprovados no Brasil para o tratamento do CPCNP. Esses pacientes foram participantes de ensaios clínicos patrocinados pela indústria abertos no Hospital de Câncer de Barretos durante o período do estudo.

Quanto aos desfechos clínicos, os resultados estão alinhados com o que é observado na literatura. Cerca de um terço dos pacientes apresentou resposta radiológica ao tratamento, sendo mais proeminente quando o tratamento imunoterápico foi realizado na primeira linha. Isso se justifica, pois além do tumor ainda não ter sido submetido à pressão seletiva do tratamento, na primeira linha, o tratamento é combinado com quimioterapia ou utilizado em monoterapia em pacientes com alta expressão de PD-L1. Dez pacientes foram tratados com combinação de quimioterapia com anti-PD-1 e anti-CTLA4 e apresentaram a maior taxa de resposta da coorte, possivelmente por terem recebido tratamento combinado e terem sido todos tratados na primeira linha.

A sobrevida global mediana observada é nitidamente superior inclusive à de ensaios clínicos randomizados com imunoterapia em primeira linha. Aqui provavelmente estamos diante de um viés de imortalidade visto que o estudo permitiu a inclusão de pacientes em qualquer linha de tratamento. Essa é uma limitação do estudo, mas, com intenção de minimizá-la, as principais análises foram realizadas em relação à sobrevida pós-imunoterapia que leva em consideração como data de início da contagem do tempo de sobrevida não o primeiro dia de tratamento paliativo, mas sim o primeiro dia de imunoterapia. Como esperado, e já demonstrado em vários outros estudos, aqueles pacientes que apresentaram resposta radiológica ao tratamento foram os que apresentaram as maiores sobrevidas globais. Curiosamente, não houve óbitos dentre os pacientes com resposta completa, apesar do longo tempo de seguimento do estudo (mediana de 27,7 meses).

A sobrevida mediana pós-imunoterapia observada (17,8 meses) é um pouco superior ao reportado em estudo latino-americano que incluiu portadores de CPCNP tratados com imunoterapia independente da linha de tratamento (12,7 meses)¹⁵⁷, possivelmente devido a

uma maior proporção de pacientes tratados com imunoterapia em primeira linha no nosso estudo. Por outro lado, aqueles pacientes que apresentaram progressão de doença como melhor resposta, apresentaram pior sobrevida, assim como aqueles com tumores PD-L1 negativos.

PD-L1 é o único biomarcador que tem sido utilizado na prática clínica havendo um robusto corpo de evidência na literatura demonstrando que a expressão de PD-L1 é um biomarcador preditivo de resposta à imunoterapia. Todo paciente candidato à imunoterapia, principalmente na primeira linha em casos sem mutações acionáveis, tem indicação de realizar o teste que auxiliará na escolha do esquema de tratamento (em geral, imunoterapia isolada para aqueles com expressão acima de 50% e terapia combinada para aqueles expressão abaixo desse corte). Quando comparada a sobrevida pós-imunoterapia de acordo com esquema de tratamento (monoterapia versus terapia combinada), houve tendência de benefício para aqueles tratados com combinação, embora não tenha havido diferença estatística. Esse dado deve ser olhado com cautela, visto que alguns fatores de confusão podem estar influenciando esse resultado. Como dito anteriormente, não há opção de tratamento combinado além da primeira linha. Assim, todos os pacientes tratados com terapia combinada o fizeram em primeira linha o que pode ser o responsável pela melhor curva de sobrevida. Isso fica bem demonstrado na Figura 7, gráfico B, onde os pacientes tratados em primeira linha apresentam maior sobrevida pós-imunoterapia, com diferença estatisticamente significativa. Os resultados de sobrevida livre de progressão são esperados e alinhados com os dados de sobrevida pós-imunoterapia. Em suma, pacientes PD-L1 positivos, respondedores e tratados em primeira linha apresentaram melhores desfechos clínicos.

Sete pacientes do estudo receberam esquema de tratamento com quimioterapia combinada a nivolumabe (anti-PD-1) e ipilimumabe (anti-CTLA4). Esses pacientes foram participantes do ensaio clínico de fase 3 CheckMate 9LA. Esse estudo demonstrou ganho de sobrevida global quando comparado à quimioterapia, se tornou um novo padrão de tratamento em primeira linha e recentemente foi aprovado por várias agências regulatórias, incluindo a agência americana (FDA) e a brasileira (ANVISA). Muito se tem discutido sobre qual seria o perfil ideal de paciente para receber tratamento com esse esquema, até porque a expressão de PD-L1 e a carga mutacional (TMB) não foram úteis em discriminar uma população específica. No entanto, um dado do estudo chama a atenção, a magnitude do

benefício de sobrevida é semelhante (*hazard ratio* em torno de 0,6) independente da expressão de PD-L1 (positivo, negativo, intermediário ou acima de 50%) e da histologia, o que não acontece nos estudos com combinação de quimioterapia e imunoterapia, onde o subgrupo de pacientes com tumores PD-L1 negativos apresenta resultados inferiores, principalmente na histologia escamosa (análise de subgrupo estudo Keynote 407 é negativa para sobrevida)¹⁵⁸. Discute-se também qual o real benefício em se associar dois ciclos de quimioterapia nesse esquema. É difícil chegar a uma conclusão, mas provavelmente esses dois ciclos potencialmente reduzam o número de progressores rápidos e aumentem a taxa de resposta. No entanto, é improvável que esses dois ciclos iniciais de quimioterapia interfiram no resultado de sobrevida global que deve estar relacionado apenas à combinação de imunoterápicos anti-PD-1 e anti-CTLA4. Esse é o primeiro estudo em CPCNP que incorporou um anti-CTLA-4 no tratamento da doença.

Apesar dos inequívocos avanços no tratamento do CPCNP observados na última década, infelizmente a população brasileira está à deriva desses benefícios. Não há até o momento disponibilidade de imunoterapia para o tratamento de brasileiros com CPCNP tratados no sistema público de saúde. Através de um acordo tripartite envolvendo o Hospital de Câncer de Barretos, o governo do estado de São Paulo e a MSD (detentora da patente do pembrolizumabe) foi criado um programa de acesso à imunoterapia para pacientes portadores de CPCNP que apresentam alta expressão de PD-L1. Infelizmente, o programa recrutou pacientes por apenas 5 meses, sendo extinto logo após a troca de governo estadual em 2019. Os 12 participantes dessa iniciativa são a primeira experiência brasileira com imunoterapia no tratamento do câncer de pulmão de pacientes do sistema público de saúde e os resultados estão em linha ou são até melhores do que os observados no estudo de fase 3 que levou à aprovação de pembrolizumabe nessa indicação – Keynote 024¹¹⁶. Com longo tempo de seguimento a mediana de sobrevida ainda não foi alcançada e metade dos pacientes apresentou resposta radiológica ao tratamento. Esses resultados sugerem que o sistema público brasileiro tem capacidade técnica de utilizar essas novas drogas e derivar o benefício delas aos pacientes do SUS. A seleção criteriosa dos candidatos, a organização do centro infusional e o seguimento radiológico periódico se mostraram úteis em garantir que desperdícios econômicos fossem evitados.

Em relação às análises de biomarcadores, a expressão de PD-L1 está consolidada como o único biomarcador usado na prática clínica, sendo um consenso que a expressão por

células tumorais prediz resposta a inibidores de PD-(L)1. No entanto, o valor da expressão de PD-L1 como um biomarcador 'definitivo' ou agnóstico é controverso, estando ainda várias questões ainda em aberto como a falta de validação dos testes desenvolvidos em laboratório de imunoistoquímica¹⁵⁹, o uso de diferentes plataformas de coloração e anticorpos, valores limites usados para positividade de PD-L1, a fonte e o tempo para coleta de amostra, e o tipo de células em que a expressão de PD-L1 é considerada (células tumorais versus células imunes)¹⁶⁰.

Para esclarecer este último ponto, realizamos a análise comparativa de expressão de PD-L1 por dois métodos diferentes: o padrão, avaliando apenas células tumorais (TPS) e um método alternativo, considerando também a expressão de células imunes (CPS). Além disso, uma vez que a expressão de PD-L1 é uma medida dependente do observador, os casos foram analisados independentemente por dois patologistas para comparações. Entre os 52 casos incluídos nessa análise, as características clínico-patológicas são semelhantes à toda população do estudo: predominância do sexo masculino, histologia adenocarcinoma e estágio clínico IV. A maioria dos pacientes recebeu tratamento anti-PD-(L)1 em primeira linha combinado ou não com anti-CTLA4. Para a análise da expressão de PD-L1, a avaliação da quantidade de células tumorais é a primeira etapa a ser realizada, visto que são necessárias pelo menos 100 células tumorais e esse número pode não ser atingido principalmente em produtos de pequenas biópsias. Em relação a essa etapa do processo, embora tenha havido alto grau de concordância entre os dois patologistas, houve cinco casos discordantes. Após análise concomitante desses casos pelos dois patologistas utilizando microscópio de dupla-cabeça, houve consenso quanto à adequação de duas dessas amostras. Apesar do número limitado de casos discordantes, parece adequado sugerir uma dupla verificação em casos considerados inadequados para análise, pois pouparia o paciente de um novo procedimento invasivo e evitaria atrasos no início do tratamento.

Houve alta concordância entre TPS e CPS e também alta concordância entre patologistas em relação aos dois métodos. A principal diferença observada entre os dois métodos foi a mudança da categoria de baixa expressão para expressão intermediária quando se considera CPS em relação a TPS. Não houve nenhum caso classificado como de alta expressão apenas pelo CPS, o que potencialmente teria maior relevância clínica, uma vez que a imunoterapia isolada é uma opção terapêutica robusta neste cenário. Além disso,

houve 100% de concordância entre os dois patologistas em relação às amostras com alta expressão, pelos dois métodos. Também não houve diferença em relação à probabilidade de resposta ao tratamento com o uso de TPS ou CPS. Assim, a reprodutibilidade externa e interna é alta para os dois métodos e o uso de CPS não parece demonstrar uma melhor correlação com a resposta à terapia baseada em agentes anti-PD-(L)1. No entanto, podem existir vieses relacionados a outros tratamentos administrados concomitantemente à imunoterapia, o que é uma limitação deste estudo.

A expressão de PD-L1 em células inflamatórias pode ter algum papel na predição de resposta à imunoterapia. No entanto, apenas seis pacientes foram classificados como TPS<1% e CPS>1 em nossa coorte, portanto, limitando qualquer conclusão. Este é um ponto que merece uma investigação mais aprofundada no futuro.

Quanto à análise de instabilidade de microsatélite, após nenhum paciente com MSI-H ter sido identificado dentre os 79 pacientes testado no estudo, essa coorte analisada em conjunto com uma coorte adicional ao estudo totalizando 526 pacientes testados para presença de MSI. Isso configura a maior coorte de pacientes com CPCNP testada para MSI no Brasil. Apenas um caso foi classificado como MSI-H. A maioria dos pacientes nesta coorte era do sexo masculino e apresentava doença em estágio avançado. No entanto, nota-se que a população é predominantemente constituída por adenocarcinomas e enriquecida para não tabagistas. Isso pode ser explicado porque as amostras selecionadas foram aquelas enviadas para sequenciamento genético, que é indicado justamente para pacientes com histologia não escamosa ou não tabagistas. Esse fato também justifica a baixa frequência de mutações no *KRAS*, que são sabidamente mais prevalentes entre tabagistas.¹⁶¹⁻¹⁶³

A frequência extremamente baixa de MSI observada neste estudo está de acordo com outra grande série relatada na literatura. Um estudo alemão¹⁶⁴ avaliou o status de MSI em 480 adenocarcinomas de pulmão ressecados e os autores encontraram 0,8% de casos positivos (97% estágio clínico I-III). Os quatro casos positivos encontrados eram tabagistas e apresentavam estágio inicial (I ou II), o que não permitiu nenhuma conclusão acerca de doença avançada. Nossos resultados de certa forma complementam esses do estudo alemão, indicando que a frequência de MSI-H é baixa tanto em estágios iniciais quanto avançados de CPCNP. Pelo menos três outros estudos realizados especificamente em pacientes com CPCNP mostraram frequências mais altas de MSI: 5,5%¹⁶⁵, 36%¹⁶⁶ e 41,2%¹⁶⁷. Essa discrepância se deve em grande parte às diferentes metodologias e valores de corte

utilizados na definição de instabilidade de microssatélites¹⁶⁴. Esses estudos envolvem um número bem reduzido de pacientes (36 a 68 no total) e apresentam maior proporção de histologia escamosa, o que pode estar parcialmente contribuindo com os diferentes resultados encontrados.

Vários recentes estudos de grande escala demonstraram frequência de MSI em diferentes tipos de tumor sólido sendo que alguns deles incluíram amostras de câncer de pulmão¹⁶⁸⁻¹⁷¹. O número total de amostras de tumores sólidos incluídos nesses estudos variou de 2.717 a 64.774. A frequência de MSI-H encontrada foi de 1,14% a 2,2%. O estudo com o maior número de pacientes com câncer de pulmão incluiu 13.491¹⁷⁰ e a maior frequência de MSI relatada foi de 0,54%¹⁶⁹. Nem todos esses estudos fizeram distinção entre câncer de pulmão de células pequenas e não-pequenas, e apenas um deles discriminou a frequência de MSI entre os subtipos histológicos (adenocarcinoma: 0,6% e carcinoma de células escamosas: 0,45%)¹⁶⁹. No entanto, esses estudos utilizaram NGS como metodologia, com *pipelines* e algoritmos específicos, não estando claro se os resultados são equivalentes àqueles de testes convencionais de MSI¹⁷². A esse respeito, por exemplo, um estudo japonês com dados de mundo real, utilizando NGS, encontrou 3,72% de MSI em 26.237 pacientes com diferentes tumores sólidos. O subconjunto de CPCNP apresentou frequência de MSI maior do que o observado nos estudos anteriores (1,72%)¹⁷². Cabe salientar que esses estudos mencionados acima incluíram apenas pacientes asiáticos e norte-americanos, o que difere da nossa população brasileira, altamente miscigenada.

Não foi possível realizar nenhuma análise de sobrevida devido ao baixo número de casos de MSI-H não permitindo nenhuma conclusão a esse respeito. Quanto a características clínicas, em câncer colorretal, MSI positivo está associado a tabagismo¹⁷³, o que se observou no nosso único caso encontrado. Por fim, a testagem de MSI tem sido realizada tradicionalmente em pacientes com câncer colorretal e câncer de endométrio como triagem para síndrome de Lynch (SL). Entretanto, até 50% dos pacientes com SL e MSI-H podem desenvolver outros tumores primários. Muitos desses pacientes não atendem aos critérios de teste genético para SL com base em história pessoal ou familiar. MSI-H é preditivo de SL em um espectro tumoral muito mais amplo e a avaliação genética germinativa deve ser considerada para esses pacientes independente do tumor primário ou histórico familiar de câncer¹⁷¹. Infelizmente, para o caso identificado no presente estudo, nenhuma amostra germinativa estava disponível para teste genético.

Dentre os casos testados quanto ao infiltrado tumoral inflamatório, composto por linfócitos T citotóxicos, linfócitos T regulatórios e macrófagos, nenhuma associação com sobrevida foi observada. Esse resultado está em desacordo com um recente estudo retrospectivo de pacientes com CPCNP que avaliou a associação entre infiltrado linfocitário e resposta à imunoterapia e à quimioterapia. Nesse estudo foram avaliadas duas coortes, uma com 221 pacientes tratados com nivolumabe entre os anos de 2012 e 2017 e outra com 189 pacientes tratados com quimioterapia entre os anos de 2009 e 2016. Amostras de tumor foram analisadas quanto à densidade de células inflamatórias, tendo sido definido como amostras com alto infiltrado inflamatório aquelas com densidade linfocitária $\geq 10\%$. Dentre os pacientes da coorte tratada com nivolumabe, 22% apresentava alta densidade e esses pacientes apresentaram maior sobrevida global (mediana não alcançada versus 8,4 meses; HR 0,48; IC95%; 0,28-0,81), maior sobrevida livre de progressão (mediana 13 versus 2,2 meses; HR 0,40; IC95%; 0,25-0,64) e maior taxa de resposta ($p < 0,001$). Nenhuma diferença foi observada na coorte de pacientes tratados com quimioterapia, o que sugere que a densidade de células inflamatórias possa ser utilizada para seleção de candidatos à imunoterapia¹⁷⁴.

Pode-se destacar alguns fatores que potencialmente tenham levado a esses resultados conflitantes. Primeiro, o número reduzido de pacientes incluídos no presente estudo. Esse foi um importante fator limitante em relação à análise dos diferentes biomarcadores, considerando que frequentemente a amostra tumoral disponível era proveniente de pequenas biópsias realizadas com intuito diagnóstico. Isso explica a grande diferença entre o número de pacientes tratados com ICI no estudo e o número de pacientes incluídos nas análises dos diferentes biomarcadores. Além disso, com intenção de priorizar a análise de expressão gênica e expressão de PD-L1 as lâminas destinadas ao infiltrado inflamatório eram sempre as últimas a serem cortadas, aumentando a chance de não haver amostragem suficiente para realização do teste. Segundo a metodologia utilizada para a leitura do infiltrado foi distinta em dois principais aspectos: (1) foram consideradas apenas três subpopulações específicas de células inflamatórias; (2) utilizou-se o número de células por mm^2 ao invés de uma avaliação proporcional (densidade). Terceiro, a heterogeneidade tumoral pode ter contribuído com essa diferença uma vez que diferentes métodos de amostragem do tumor podem produzir resultados de densidade inflamatória discordantes e diferentes estratificações para avaliação de risco. Biópsias pequenas podem ser

particularmente não representativas¹⁷⁵. Por fim, outro importante ponto a ser destacado é o fato de no presente estudo uma parcela dos pacientes ter sido tratada com esquemas de combinação de ICI e quimioterapia. A quimioterapia citotóxica além ter atividade contra a célula neoplásica, também pode levar à depleção das células imunes do microambiente tumoral e assim comprometer a sua utilização como um biomarcador preditivo de resposta aos ICIs.

A escassez de amostra tumoral também limitou o número de inclusões na avaliação de expressão gênica. Dos 135 pacientes do estudo 78 foram incluídos nessa análise, no entanto 12 amostras ainda precisaram ser excluídas devido a baixas contagens observadas na etapa de controle de qualidade. As características clínico-patológicas e terapêuticas dos 66 pacientes restantes são semelhantes à população total do estudo, predominando sexo masculino, histologia adenocarcinoma, bom *performance status*, poucos pacientes com mutações acionáveis, predomínio de baixa expressão de PD-L1 e tratamento imunoterápico em monoterapia a partir da segunda linha paliativa.

No total, 48 assinaturas genéticas foram avaliadas. Dessas, 30 estão relacionadas à imunidade, 14 relacionadas ao tumor e quatro relacionadas ao microambiente tumoral. Dentre elas há cinco assinaturas de perda de expressão. São elas: *MMR Loss*, *MSI Predictor*, *Hypermutation*, *APM Loss* e *JAKSTAT*. As três primeiras são assinaturas complementares entre si, e estão diretamente relacionadas à perda da capacidade de reparo do DNA, instabilidade de microssatélites e acúmulo de mutações somáticas (carga mutacional). Essas assinaturas não foram associadas aos desfechos clínicos de sobrevida ou taxa de resposta estando esse resultado alinhado com o que foi observado na análise de instabilidade de microssatélite por PCR (validação ortogonal). As outras duas assinaturas estão inversamente relacionadas a resistência aos ICIs. Apesar de não ter havido casos com perda de expressão de *APM Loss*, houve casos com perda de expressão de *JAKSTAT*, e como esperado, esses casos apresentaram melhores resultados clínicos, apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa. Talvez com um maior número de pacientes alguma diferença pudesse ser observada.

Dentre as outras 43 assinaturas, 14 foram capazes de discriminar duas populações diferentes quanto à sobrevida pós-imunoterapia. Três delas são compostas por apenas um gene em cada e são bastante conhecidas e diretamente relacionadas aos mecanismos de ação dos atuais imunoterápicos: assinaturas *PD-L1*, *PD-L2* e *CTLA-4*. Esses genes codificam

proteínas relacionadas a vias de sinalização inibitórias do sistema imune e foram previamente abordados no item 1.2.9.

Outras duas assinaturas também são compostas por genes isolados e da mesma forma estão relacionadas a proteínas inibitórias de linfócitos T: assinaturas *IDO1* e *TIGIT*. Há inclusive novos imunoterápicos em desenvolvimento que têm como alvo as proteínas codificadas por esses genes e estudos clínicos iniciais demonstram atividade promissora dessas drogas, tanto em monoterapia quanto em combinação com outros agentes¹⁷⁶⁻¹⁷⁹.

Três assinaturas estão diretamente relacionadas ao infiltrado linfocitário e são compostas por três conjuntos distintos de genes relacionados a abundância de células citotóxicas e moléculas ligadas a essas células no microambiente tumoral. São elas: *Cytotoxicity*, *Cytotoxic cells* e *Exhausted CD8*. A associação dessas assinaturas com sobrevida reforçam a importância do infiltrado linfocitário na resposta imune anti-tumoral secundária à utilização dos novos agentes imunoterápicos. Apesar desse resultado positivo, nossa avaliação direta do infiltrado linfocitário não encontrou qualquer associação com desfechos clínicos. No entanto, conforme discutido acima, houve limitações nas análises e novos estudos a esse respeito merecem ser realizados no futuro.

As assinaturas relacionadas ao interferon gama (*IFN Gamma* e *IFN Downstream*) também foram associados a sobrevida. A assinatura de *IFN Gamma*, inclusive, foi aquela com maior significância estatística e já foi previamente relacionada a melhores desfechos clínicos em pacientes com CPCNP tratados com imunoterapia. Estudo com 92 pacientes tratados com durvalumabe demonstrou maior taxa de resposta, sobrevida livre de progressão e sobrevida global dentre pacientes cujos tumores apresentavam assinatura *IFN Gamma*, sendo independente da expressão de PD-L1¹⁸⁰. O mesmo já foi observado em outros tumores sólidos¹⁴¹. Esse resultado demonstra consistência dos dados do presente estudo, reproduzindo os principais achados de estudos prévios.

Outras duas assinaturas, *TIS* e *Lymphoid*, combinam genes relacionadas a células inflamatórias do microambiente tumoral e citocinas pró-inflamatórias. Discriminam assim um fenótipo de tumores inflamados (quentes), propensos a responderem aos ICIs. A assinatura *TIS* é composta por 18 genes. Foi a segunda assinatura com maior significância estatística no estudo, e já foi relacionada a resposta a imunoterápicos em diferentes tumores sólidos¹⁸¹.

As últimas duas assinaturas relacionadas a sobrevida, *Immunoproteassome* e *APM*, são complementares entre si e relacionadas à imunogenicidade tumoral. A primeira relaciona-se à atividade proteolítica do proteossoma, que aumenta a quantidade de moléculas (antígenos) a serem apresentadas pelo complexo MHC de classe I às células T CD8+. Já a assinatura *APM* mede justamente a abundância de genes relacionados ao complexo MHC classe I. Um estudo retrospectivo incluiu 51 portadores de CPCNP refratários à quimioterapia em tratamento com ICIs em monoterapia e avaliou o perfil de expressão gênica associado ao maquinário de apresentação de antígenos, sendo observada resposta significativamente maior entre aqueles com alta expressão desses genes ($p=0,0001$). Também foi observada melhor sobrevida livre de progressão (HR 0,34; $p=0,001$) e sobrevida global (HR 0,44; $p=0,006$). Nesse mesmo estudo o escore de *APM* se demonstrou inclusive melhor que assinaturas de tumor inflamado. Esses mesmos resultados também foram observados dentre pacientes com melanoma¹⁸².

Através do método estatístico LASSO, uma nova assinatura também pôde ser definida, a partir dos mesmos 66 casos incluídos nas análises das assinaturas anteriores. Essa nova assinatura é composta por seis diferentes genes (*LungTS*). Quando se analisa o *heatmap* que incluiu todos os casos e os seis genes da assinatura identificada, fica evidente duas subpopulações de pacientes discriminadas a partir de um escore de risco calculado através da expressão diferencial desses genes. Pacientes com alto escore (alto risco para morte) apresentaram menor sobrevida pós-imunoterapia, menor sobrevida livre de progressão e menor taxa de resposta em relação aos pacientes de com baixo escore (baixo risco para morte). A proporção de pacientes vivos na data de corte de análise dos dados também é maior em relação àqueles de alto risco. A curva ROC demonstra AUC para o corte utilizado de 18 meses semelhante por exemplo ao AUC da curva ROC que foi utilizada para seleção do corte de 50% de expressão de PD-L1 nos estudos com pembrolizumabe¹⁸³.

Dentre os seis genes da *LungTS*, os genes A, B e C fazem parte de uma superfamília de citocinas pró-inflamatórias. O gene C codifica proteínas envolvidas em processos imunorregulatórios e inflamatórios. A proteína codificada também pode estar envolvida no tráfico de células T e é um quimiotático para linfócitos, mas não para neutrófilos^{ref. ocultada}. O gene A codifica uma citocina pró-inflamatória que está envolvida em uma ampla variedade de processos, como quimiotaxia, diferenciação e ativação de células imunes periféricas (células T, monócitos e células NK), regulação do crescimento celular, apoptose e modulação

de efeitos angiostáticos. Este gene também pode ser um regulador chave da resposta imune da “tempestade de citocinas” à infecção por SARS-CoV-2^{ref. ocultadas}. Já o gene B codifica uma citocina quimiotática para células T ativadas mas não para células T não estimuladas, neutrófilos ou monócitos. O IFN-gama é um potente indutor da transcrição desse gene. Pode desempenhar um papel importante nas doenças do SNC que envolvem o recrutamento de células T e em respostas imunológicas na pele^{ref. ocultada}.

O gene D codifica uma proteína que desempenha papel no metabolismo de aminoácidos e nos ciclos da uréia e do ácido tricarbóxico. Tem papel fundamental no equilíbrio redox intracelular. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo DNA^{ref. ocultada}.

O gene E codifica uma proteína que atua dentro do retículo endoplasmático e desempenha um papel na biossíntese do colágeno. Auto-anticorpos contra essa proteína já foram encontrados em pacientes com artrite reumatóide. A expressão desse gene pode ser um marcador de câncer, e polimorfismos de nucleotídeos nesse gene podem estar associados ao nascimento prematuro causado por ruptura prematura de membranas^{ref. ocultada}.

O gene F codifica uma proteína associada ao processamento de antígenos, sendo um membro da superfamília de transportadores de moléculas através das membranas extra e intracelulares. Combinada à TAP2 medeia o transporte de peptídeos citosólicos para interação com o complexo MHC de classe I^{ref. ocultada}. Normalmente transporta antígenos peptídicos intracelulares de 8 a 13 aminoácidos que surgem da proteólise citosólica via imunoproteassoma^{ref. ocultadas}. Dessa forma atua como um arcabouço molecular essencial para a montagem do complexo MHC de classe I e apresentação do antígeno^{ref. ocultadas}. Também está envolvida com resistência a múltiplas drogas e relacionada à via JAK-STAT^{ref. ocultada}.

A assinatura *LungTS*, portanto, avalia de forma combinada a atividade de genes relacionados tanto com o componente imune (genes A, B e C), quanto componente do tumor (genes D e F) e do microambiente tumoral (gene E). É a única das assinaturas avaliadas que abrange os três componentes. Fazendo um paralelo com as demais a assinatura, a *LungTS* abrange aspectos de outras 10 assinaturas: *IFN Gamma*, *IFN*

Downstream, IL10, Inflammatory chemokines, APM; APM Loss; Immunoproteasome; JAKSTAT e JACKSTAT Loss.

Os resultados encontrados foram validados em uma população externa que apresentava características clínicas semelhantes, porém proveniente de outro continente e que foi tratada sob responsabilidade de outra equipe de saúde, reforçando o potencial papel preditivo da assinatura *LungTS*. Apesar disso, a heterogeneidade da nossa amostra em relação aos tipos de tratamento pode, pelo menos em teoria, afetar a validade desse perfil. Ou seja, o poder discriminatório pode ser diferente entre pacientes tratados em primeira linha *versus* linhas subsequentes, ou entre pacientes tratados com ICI isolado *versus* tratamentos combinados. Assim, futuros estudos serão necessários para estender esta assinatura em casuísticas mais robustas e avaliar o seu papel preditivo através de estudos prospectivos.

Por fim, esta assinatura sendo constituída por um número reduzido de genes, pode ser adequada a um ensaio NanoString customizado, que será muito mais econômico do que o atual painel IO-360. Além disso, os genes identificados poderão futuramente ser validados por imunistoquímica, permitindo alargar ainda mais a sua exequibilidade prática.

7. CONCLUSÃO

Os inibidores de *checkpoint* imunológicos revolucionaram o tratamento do CPCNP e elevaram a sobrevida a patamares não imaginados à época da quimioterapia. Novos avanços seguem surgindo como as atuais combinações de imunoterápicos, combinados ou não à quimioterapia.

Os pacientes com CPCNP tratados no contexto de saúde pública no estudo, apresentaram resultados semelhantes ao observado nos ensaios clínicos, sugerindo que há capacidade técnica dos profissionais de saúde brasileiros no manejo desses pacientes tratados com esses novos agentes. A seleção adequada de pacientes baseada em biomarcadores pode minimizar o impacto financeiro e estendem os benefícios da imunoterapia a uma população ainda carente de avanços tecnológicos.

MSI-H se mostrou demasiado raro na população com CPCNP não sendo útil para seleção de pacientes. Infiltrado tumoral inflamatório por sua vez, não foi capaz de discriminar melhores candidatos à imunoterapia, no entanto, novas análises merecem ser realizadas utilizando-se metodologia distinta que não limite a análise a sub populações específicas de células.

Quatorze assinaturas genéticas foram relacionadas a sobrevida de pacientes com CPCNP tratados com imunoterapia, inclusive assinaturas bastante conhecidas como IFN Gamma e TIS. Isso demonstra solidez da coorte avaliada.

Uma nova assinatura foi identificada (*LungTS*) sendo representativa dos componentes imune, tumoral e do microambiente tumoral. É assim, mais abrangente que as demais assinaturas avaliadas, embora seja composta por um número reduzido de genes. Pacientes com baixo escore *LungTS* apresentaram melhores desfecho clínicos e em combinação com expressão de PD-L1 foi possível discriminar duas populações distintas em relação à sobrevida pós-imunoterapia dentre os pacientes PD-L1 positivos. Novos estudos com essa assinatura são desejados.

8. REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2021.
2. Lai VW. *Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. Invited commentary*. **Tob Control**. 2012;21(2):101-2.
3. (INCA) BMdSINdCJAGdS. *Incidência de Câncer no Brasil*. [Internet] 2020 [cited 21 de abril de 2021]; Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.
4. Boing AF, Rossi TF. *Temporal trend in and spatial distribution of lung cancer mortality in Brazil between 1979 and 2004: magnitude, regional patterns, and gender-related differences*. **J Bras Pneumol**. 2007;33(5):544-51.
5. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. *Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis*. **Cancer**. 1995;75(12):2844-52.
6. Zappa C, Mousa SA. *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. **Transl Lung Cancer Res**. 2016;5(3):288-300.
7. Clark SB, Alsubait S. *Non Small Cell Lung Cancer*. **StatPearls. Treasure Island (FL)**2021.
8. Travis WD, Travis LB, Devesa SS. *Lung cancer*. **Cancer**. 1995;75(1 Suppl):191-202.
9. Stellman SD, Muscat JE, Hoffmann D, Wynder EL. *Impact of filter cigarette smoking on lung cancer histology*. **Prev Med**. 1997;26(4):451-6.
10. Kenfield SA, Wei EK, Stampfer MJ, Rosner BA, Colditz GA. *Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer*. **Tob Control**. 2008;17(3):198-204.
11. Muscat JE, Stellman SD, Zhang ZF, Neugut AI, Wynder EL. *Cigarette smoking and large cell carcinoma of the lung*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 1997;6(7):477-80.
12. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017*. [Internet] 2017 [cited 10/03/2018]; Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.

13. Marino P, Pampallona S, Preatoni A, Cantoni A, Invernizzi F. *Chemotherapy vs supportive care in advanced non-small-cell lung cancer. Results of a meta-analysis of the literature.* **Chest.** 1994;106(3):861-5.
14. *Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group.* **BMJ.** 1995;311(7010):899-909.
15. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer.* **N Engl J Med.** 2002;346(2):92-8.
16. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. *Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer.* **N Engl J Med.** 2006;355(24):2542-50.
17. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. *Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer.* **J Clin Oncol.** 2008;26(21):3543-51.
18. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. *Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update.* **J Clin Oncol.** 2018;36(9):911-9.
19. Oncology NCPGi. *Non-small Cell Lung Cancer Version 4.2021 - March 3, 2021.* [Internet] 2021 [cited 21-APR-2021]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.
20. Bubendorf L, Lantuejoul S, de Langen AJ, Thunnissen E. *Non-small cell lung carcinoma: diagnostic difficulties in small biopsies and cytological specimens: Number 2 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza.* **Eur Respir Rev.** 2017;26(144).
21. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial.* **Lancet Oncol.** 2012;13(3):239-46.
22. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. *Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations.* **J Clin Oncol.** 2013;31(27):3327-34.

23. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. *Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial.* **Lancet Oncol.** 2014;15(2):213-22.
24. Wu YL, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S, et al. *Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial.* **Lancet Oncol.** 2017;18(11):1454-66.
25. Haspinger ER, Agustoni F, Torri V, Gelsomino F, Platania M, Zilembo N, et al. *Is there evidence for different effects among EGFR-TKIs? Systematic review and meta-analysis of EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) versus chemotherapy as first-line treatment for patients harboring EGFR mutations.* **Crit Rev Oncol Hematol.** 2015;94(2):213-27.
26. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. *Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers.* **Clin Cancer Res.** 2013;19(8):2240-7.
27. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. *Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer.* **N Engl J Med.** 2017;376(7):629-40.
28. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. *Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC.* **N Engl J Med.** 2020;382(1):41-50.
29. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. *First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer.* **N Engl J Med.** 2014;371(23):2167-77.
30. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS, Felip E, Chow LQ, et al. *Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer.* **N Engl J Med.** 2014;370(13):1189-97.
31. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ, Cetnar J, West H, et al. *Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial.* **Lancet Oncol.** 2016;17(2):234-42.
32. Kim DW, Tiseo M, Ahn MJ, Reckamp KL, Hansen KH, Kim SW, et al. *Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase II Trial.* **J Clin Oncol.** 2017;35(22):2490-8.
33. Yang Y, Zhou J, Zhou J, Feng J, Zhuang W, Chen J, et al. *Efficacy, safety, and biomarker analysis of ensartinib in crizotinib-resistant, ALK-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, phase 2 trial.* **Lancet Respir Med.** 2020;8(1):45-53.

34. Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, et al. *Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial*. **Lancet**. 2017;390(10089):29-39.
35. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, et al. *Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2017;377(9):829-38.
36. Zhou C, Kim SW, Reungwetwattana T, Zhou J, Zhang Y, He J, et al. *Alectinib versus crizotinib in untreated Asian patients with anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer (ALESIA): a randomised phase 3 study*. **Lancet Respir Med**. 2019;7(5):437-46.
37. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JC, Han JY, Lee JS, et al. *Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2018;379(21):2027-39.
38. Selvaggi GW, H.A.; Mok, T.; Reck, M.; Chiappori, A.; Cicin, I.; Lee, D.H. *Phase III Randomized Study of Ensartinib vs Crizotinib in Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) POSITIVE NSCLC Patients: eXalt3*. **Virtual Presidential Symposium, WCLC 2020**. 2020.
39. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, Felip E, Goto Y, Liu G, et al. *First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2020;383(21):2018-29.
40. Tony Mok ea. *Overall Survival (OS) for First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK+ Lung Cancer: Updated Results from PROFILE 1014*. In: **ESMO 2017**; Madri; 2017. **Annals of Oncology (2017) 28 (suppl_5): v605-v649. 10.1093/annonc/mdx440**.
41. Camidge DR. *Lorlatinib Should Not be Considered as the Preferred First-Line Option in Patients With Advanced ALK Rearranged NSCLC*. **J Thorac Oncol**. 2021;16(4):528-31.
42. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland A, et al. *Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial*. **Lancet Oncol**. 2017;18(10):1307-16.
43. Drlon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, et al. *Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2020;383(9):813-24.
44. Markham A. *Pralsetinib: First Approval*. **Drugs**. 2020;80(17):1865-70.
45. Wolf J, Seto T, Han JY, Reguart N, Garon EB, Groen HJM, et al. *Capmatinib in MET Exon 14-Mutated or MET-Amplified Non-Small-Cell Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2020;383(10):944-57.
46. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. *Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer*. **N Engl J Med**. 2014;371(21):1963-71.

47. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. *Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials*. **Lancet Oncol**. 2020;21(2):271-82.
48. Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, Barlesi F, Krebs MG, Shaw AT, et al. *Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1-2 trials*. **Lancet Oncol**. 2020;21(2):261-70.
49. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. *Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children*. **N Engl J Med**. 2018;378(8):731-9.
50. Paik PK, Felip E, Veillon R, Sakai H, Cortot AB, Garassino MC, et al. *Tepotinib in Non-Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations*. **N Engl J Med**. 2020;383(10):931-43.
51. Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al. *The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality*. **N Engl J Med**. 2020;383(7):640-9.
52. Decker WK, Safdar A. *Bioimmunoadjuvants for the treatment of neoplastic and infectious disease: Coley's legacy revisited*. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2009;20(4):271-81.
53. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. **Nat Immunol**. 2002;3(11):991-8.
54. Golub ES. *A History of Immunology*. Arthur M. Silverstein. Academic Press, San Diego, CA, 1989. xxii, 422 pp., illus. \$39.95; *Immunology, 1930-1980. Essays on the History of Immunology*. Pauline M. H. Mazumdar, Ed. Wall and Thompson, Toronto, 1989. x, 307 pp., illus. \$39.95. Based on a congress, Toronto, July 1986. **Science**. 1990;247(4940):347.
55. Old LJ, Boyse EA. *Immunology of Experimental Tumors*. **Annu Rev Med**. 1964;15:167-86.
56. Klein G. *Tumor antigens*. **Annu Rev Microbiol**. 1966;20:223-52.
57. Burnet M. *Cancer: a biological approach*. III. *Viruses associated with neoplastic conditions*. IV. *Practical applications*. **Br Med J**. 1957;1(5023):841-7.
58. Burnet FM. *The concept of immunological surveillance*. **Prog Exp Tumor Res**. 1970;13:1-27.
59. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. **J Urol**. 1976;116(2):180-3.

60. Veenema RJ, Dean AL, Jr., Uson AC, Roberts M, Longo F. *Thiotepa bladder instillations: therapy and prophylaxis for superficial bladder tumors*. **J Urol**. 1969;101(5):711-5.
61. Riddle PR. *The Management of Superficial Bladder Tumours with Intravesical Epodyl*. **British Journal of Urology**. 1973;45:84-7.
62. Durrant KR, Laing AH. *Treatment of multiple superficial papillary tumors of the bladder by intracavitary yttrium-90*. **J Urol**. 1975;113(4):480-2.
63. Bubenik JP, P.; Helmstein, K.; Moberger, G. *Immune response to urinary bladder tumours in man*. **Int J Cancer**. 1970;5:39-46.
64. Catalona WJ. *Correlation Among Host Immunocompetence and Tumor Stage, Tumor Grade and Vascular Permeation in Transitional Carcinoma*. **The Journal of Urology**. 1973;110(5):526-8.
65. Bohle A, Jocham D, Bock PR. *Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity*. **J Urol**. 2003;169(1):90-5.
66. Han RF, Pan JG. *Can intravesical bacillus Calmette-Guerin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials*. **Urology**. 2006;67(6):1216-23.
67. Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, et al. *A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer*. **BJU Int**. 2001;88(3):209-16.
68. Shelley MD, Wilt TJ, Court J, Coles B, Kynaston H, Mason MD. *Intravesical bacillus Calmette-Guerin is superior to mitomycin C in reducing tumour recurrence in high-risk superficial bladder cancer: a meta-analysis of randomized trials*. **BJU Int**. 2004;93(4):485-90.
69. Network NCC. *Bladder Cancer (Version 2.2021)*. [Internet] 2021 [cited 21 de abril de 2021]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf.
70. Dinarello CA. *Historical insights into cytokines*. **Eur J Immunol**. 2007;37 Suppl 1:S34-45.
71. Isaacs A, Lindenmann J. *Virus interference. I. The interferon*. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**. 1957;147(927):258-67.
72. Goldstein D, Laszlo J. *The role of interferon in cancer therapy: a current perspective*. **CA Cancer J Clin**. 1988;38(5):258-77.
73. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. *Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use*. **Biochimie**. 2007;89(6-7):884-93.

74. Jonasch E, Haluska FG. *Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities*. **Oncologist**. 2001;6(1):34-55.
75. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*. **Science**. 1976;193(4257):1007-8.
76. Welte K, Wang CY, Mertelsmann R, Venuta S, Feldman SP, Moore MA. *Purification of human interleukin 2 to apparent homogeneity and its molecular heterogeneity*. **J Exp Med**. 1982;156(2):454-64.
77. Allison JP. *A Brief History of Immunotherapy*. [Internet] 2014 [cited 10 de fevereiro de 2018]; Available from: <http://www.targetedonc.com/publications/special-reports/2014/immunotherapy-issue3/a-brief-history-of-immunotherapy>.
78. Kohler G, Milstein C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. **Nature**. 1975;256(5517):495-7.
79. Marques CH. *Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica*. . Instituto Oswaldo Cruz; 2005.
80. Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. *Vaccines for tumour prevention*. **Nat Rev Cancer**. 2006;6(3):204-16.
81. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. *Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future*. **Adv Cancer Res**. 2013;119:421-75.
82. Hanna MG, Jr., Peters LC. *Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery*. **Cancer**. 1978;42(6):2613-25.
83. Berger M, Kreutz FT, Horst JL, Baldi AC, Koff WJ. *Phase I study with an autologous tumor cell vaccine for locally advanced or metastatic prostate cancer*. **J Pharm Pharm Sci**. 2007;10(2):144-52.
84. Harris JE, Ryan L, Hoover HC, Jr., Stuart RK, Oken MM, Benson AB, 3rd, et al. *Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283*. **J Clin Oncol**. 2000;18(1):148-57.
85. Maver C, McKneally M. *Preparation of autologous tumor cell vaccine from human lung cancer*. **Cancer Res**. 1979;39(8):3276.
86. Schulof RS, Mai D, Nelson MA, Paxton HM, Cox JW, Jr., Turner ML, et al. *Active specific immunotherapy with an autologous tumor cell vaccine in patients with resected non-small cell lung cancer*. **Mol Biother**. 1988;1(1):30-6.

87. Nemunaitis J, Nemunaitis J. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-transfected autologous tumor cell vaccine: focus[correction to fcous] on non-small-cell lung cancer*. **Clin Lung Cancer**. 2003;5(3):148-57.
88. Ruttinger D, van den Engel NK, Winter H, Schlemmer M, Pohla H, Grutzner S, et al. *Adjuvant therapeutic vaccination in patients with non-small cell lung cancer made lymphopenic and reconstituted with autologous PBMC: first clinical experience and evidence of an immune response*. **J Transl Med**. 2007;5:43.
89. de Weger VA, Turksma AW, Voorham QJ, Euler Z, Bril H, van den Eertwegh AJ, et al. *Clinical effects of adjuvant active specific immunotherapy differ between patients with microsatellite-stable and microsatellite-unstable colon cancer*. **Clin Cancer Res**. 2012;18(3):882-9.
90. Hanna MG, Jr., Hoover HC, Jr., Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM. *Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise*. **Vaccine**. 2001;19(17-19):2576-82.
91. Ockert D, Schirmacher V, Beck N, Stoelben E, Ahlert T, Flechtenmacher J, et al. *Newcastle disease virus-infected intact autologous tumor cell vaccine for adjuvant active specific immunotherapy of resected colorectal carcinoma*. **Clin Cancer Res**. 1996;2(1):21-8.
92. Baars A, van Riel JM, Cuesta MA, Jaspars EH, Pinedo HM, van den Eertwegh AJ. *Metastasectomy and active specific immunotherapy for a large single melanoma metastasis*. **Hepatogastroenterology**. 2002;49(45):691-3.
93. Berd D, Maguire HC, Jr., McCue P, Mastrangelo MJ. *Treatment of metastatic melanoma with an autologous tumor-cell vaccine: clinical and immunologic results in 64 patients*. **J Clin Oncol**. 1990;8(11):1858-67.
94. Mendez R, Ruiz-Cabello F, Rodriguez T, Del Campo A, Paschen A, Schadendorf D, et al. *Identification of different tumor escape mechanisms in several metastases from a melanoma patient undergoing immunotherapy*. **Cancer Immunol Immunother**. 2007;56(1):88-94.
95. Antonia SJ, Seigne J, Diaz J, Muro-Cacho C, Extermann M, Farmelo MJ, et al. *Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma*. **J Urol**. 2002;167(5):1995-2000.
96. Fishman M, Hunter TB, Soliman H, Thompson P, Dunn M, Smilee R, et al. *Phase II trial of B7-1 (CD86) transduced, cultured autologous tumor cell vaccine plus subcutaneous interleukin-2 for treatment of stage IV renal cell carcinoma*. **J Immunother**. 2008;31(1):72-80.
97. Kinoshita Y, Kono T, Yasumoto R, Kishimoto T, Wang CY, Haas GP, et al. *Antitumor effect on murine renal cell carcinoma by autologous tumor vaccines genetically modified with*

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 cells. J Immunother. 2001;24(3):205-11.

98. Cheever MA, Higano CS. *PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. Clin Cancer Res.* 2011;17(11):3520-6.

99. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. N Engl J Med.* 2010;363(5):411-22.

100. Pardoll DM. *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64.

101. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med.* 2010;363(8):711-23.

102. Hamid O, Carvajal RD. *Anti-programmed death-1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(6):847-61.

103. Freeman GJ. *Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10275-6.

104. Korman AJ, Peggs KS, Allison JP. *Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. Adv Immunol.* 2006;90:297-339.

105. Thallinger C, Fureder T, Preusser M, Heller G, Mullauer L, Holler C, et al. *Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors : Current concepts, expectations, limitations and pitfalls. Wien Klin Wochenschr.* 2017.

106. Kim CHS, R. J. . *Immunotherapy for Gynecologic Malignancies: The Way Forward.* [Internet] 2014 [cited Acesso em 15 de fevereiro de 2018];Available from: <http://www.gotoper.com/publications/aiho/2014/2014may/immunotherapy-for-gynecologic-malignancies-the-way-forward>.

107. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.

108. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med.* 2015;373(17):1627-39.

109. Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, Chow LQM, Burgio MA, de Castro Carpeno J, et al. *Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol.* 2021;39(7):723-33.

110. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, 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):1540-50.
111. I.Monnet; S.Novello; P. Baas RHEGDKBCCRGJLPGJHMMMD. *5-Year Survival Update From KEYNOTE-010: Pembrolizumab Versus Docetaxel in Previously Treated, PD-L1-Positive Advanced NSCLC*. In: **WCLC 2020**; 2020.
112. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. *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):255-65.
113. Mazieres J, Rittmeyer A, Gadgeel S, Hida T, Gandara DR, Cortinovis DL, et al. *Atezolizumab Versus Docetaxel in Pretreated Patients With NSCLC: Final Results From the Randomized Phase 2 POPLAR and Phase 3 OAK Clinical Trials*. **J Thorac Oncol**. 2021;16(1):140-50.
114. Caicun Zhou DH, Xinmin Yu, Yunpeng Liu, Yun Fan, Yongqian Shu, Zhiyong Ma, Ziping Wang, Ying Cheng, Jie Wang, Sheng Hu, Zhihua Liu, Mikhail Dvorkin, Elena Poddubskaya, Umut Disel, Andrey Akopov, Yiyuan Ma, Yan Wang, Zhenyu Pan, Cunjing Yu, Gareth Rivalland. *Results from RATIONALE 303: A global phase 3 study of tislelizumab (TIS) vs docetaxel (TAX) as second- or third-line therapy for patients with locally advanced or metastatic NSCLC*. In: **AACR 2021**; 2021.
115. Yuankai Shi LW, Xinmin Yu, Yan Wang, Puyuan Xing, Jianying Zhou, Airong Wang, Jianhua Shi, Yi Hu, Ziping Wang, Guangyu An, Yong Fang, Sanyuan Sun, Caicun Zhou, Changli Wang, Feng Ye, Xingya Li, Junye Wang, Mengzhao Wang, Yunpeng Liu, Yanqiu Zhao, Jifeng Feng. *ORIENT-3: A randomized, open-label, phase 3 study of sintilimab versus docetaxel in previously treated advanced/metastatic squamous non-small-cell lung cancer (sqNSCLC)*. In: **AACR 2021**; 2021.
116. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Czoszi T, Fulop A, et al. *Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2016;375(19):1823-33.
117. Reck JRBDR-AAGRRHTCAFMGJEM. *KEYNOTE-024 5-year OS update: First-line (1L) pembrolizumab (pembro) vs platinum-based chemotherapy (chemo) in patients (pts) with metastatic NSCLC and PD-L1 tumour proportion score (TPS) \geq 50%*. In: **ESMO 2020**; 2020.
118. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. *Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC*. **N Engl J Med**. 2020;383(14):1328-39.
119. al. HRdMFGGe. *IMpower110: updated OS analysis of atezolizumab vs platinum-based hemothrapy as first-line treatment in PD-L1-selected NSCLC*. In: **2020 World Conference on Lung Cancer**; Singapore; 2021. January 28-31, 2021.

120. Sezer A, Kilickap S, Gumus M, Bondarenko I, Ozguroglu M, Gogishvili M, et al. *Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial.* **Lancet.** 2021;397(10274):592-604.
121. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. *Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial.* **Lancet.** 2019;393(10183):1819-30.
122. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim SW, Carcereny Costa E, et al. *Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.* **N Engl J Med.** 2019;381(21):2020-31.
123. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. *Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer.* **N Engl J Med.** 2018;378(22):2078-92.
124. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gumus M, Mazieres J, et al. *Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer.* **N Engl J Med.** 2018;379(21):2040-51.
125. Administration USFaD. *FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature.* [Internet] 2017 [cited 25/03/2018]; Available from: <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm560167.htm>.
126. Lim SM, Hong MH, Kim HR. *Immunotherapy for Non-small Cell Lung Cancer: Current Landscape and Future Perspectives.* **Immune Netw.** 2020;20(1):e10.
127. Bodor JN, Bumber Y, Borghaei H. *Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC).* **Cancer.** 2020;126(2):260-70.
128. Mansfield AS, Aubry MC, Moser JC, Harrington SM, Dronca RS, Park SS, et al. *Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer.* **Ann Oncol.** 2016;27(10):1953-8.
129. Zhou J, Gong Z, Jia Q, Wu Y, Yang ZZ, Zhu B. *Programmed death ligand 1 expression and CD8(+) tumor-infiltrating lymphocyte density differences between paired primary and brain metastatic lesions in non-small cell lung cancer.* **Biochem Biophys Res Commun.** 2018;498(4):751-7.
130. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, 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):208-22.

131. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. *PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project*. **J Thorac Oncol**. 2018;13(9):1302-11.
132. Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, Mazzarella L. *Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges*. **J Immunother Cancer**. 2019;7(1):183.
133. Turnbull C, Scott RH, Thomas E, Jones L, Murugaesu N, Pretty FB, et al. *The 100 000 Genomes Project: bringing whole genome sequencing to the NHS*. **BMJ**. 2018;361:k1687.
134. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. *Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition*. **N Engl J Med**. 2017;377(25):2500-1.
135. Richard C, Fumet JD, Chevrier S, Derangere V, Ledys F, Lagrange A, et al. *Exome Analysis Reveals Genomic Markers Associated with Better Efficacy of Nivolumab in Lung Cancer Patients*. **Clin Cancer Res**. 2019;25(3):957-66.
136. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. *Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types*. **Nat Genet**. 2019;51(2):202-6.
137. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. *Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden*. **N Engl J Med**. 2018;378(22):2093-104.
138. Willis C, Fiander M, Tran D, Korytowsky B, Thomas JM, Calderon F, et al. *Tumor mutational burden in lung cancer: a systematic literature review*. **Oncotarget**. 2019;10(61):6604-22.
139. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S, et al. *Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer*. **J Clin Oncol**. 2016;34(11):1223-30.
140. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients*. **Nature**. 2014;515(7528):563-7.
141. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. *IFN-gamma-related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade*. **J Clin Invest**. 2017;127(8):2930-40.
142. Prat A, Navarro A, Pare L, Reguart N, Galvan P, Pascual T, et al. *Immune-Related Gene Expression Profiling After PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, and Melanoma*. **Cancer Res**. 2017;77(13):3540-50.

143. Ji RR, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. *An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab*. **Cancer Immunol Immunother**. 2012;61(7):1019-31.
144. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. *Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial*. **Lancet**. 2016;387(10030):1837-46.
145. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. *Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC*. **N Engl J Med**. 2018;378(24):2288-301.
146. Damotte D, Warren S, Arrondeau J, Boudou-Rouquette P, Mansuet-Lupo A, Biton J, et al. *The tumor inflammation signature (TIS) is associated with anti-PD-1 treatment benefit in the CERTIM pan-cancer cohort*. **J Transl Med**. 2019;17(1):357.
147. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. *New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)*. **Eur J Cancer**. 2009;45(2):228-47.
148. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. **Nat Biotechnol**. 2008;26(3):317-25.
149. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Duraes R, Antonio de Oliveira M, Guimaraes D, Reis RM. *Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients*. **Oncotarget**. 2018;9(47):28691-701.
150. Campanella NC, Scapulatempo-Neto C, Abrahao-Machado LF, Torres De Oliveira AT, Berardinelli GN, Guimaraes DP, et al. *Lack of microsatellite instability in gastrointestinal stromal tumors*. **Oncol Lett**. 2017;14(5):5221-8.
151. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. *The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis*. **APMIS**. 1988;96(10):857-81.
152. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. **APMIS**. 1988;96(5):379-94.
153. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. *Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer*. **Arch Pathol Lab Med**. 2019;143(3):330-7.

154. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. *Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent*. **J Stat Softw**. 2010;33(1):1-22.
155. Simon N, Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. *Regularization Paths for Cox's Proportional Hazards Model via Coordinate Descent*. **J Stat Softw**. 2011;39(5):1-13.
156. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. *First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2021;22(2):198-211.
157. Ruiz-Patino A, Arrieta O, Cardona AF, Martin C, Raez LE, Zatarain-Barron ZL, et al. *Immunotherapy at any line of treatment improves survival in patients with advanced metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) compared with chemotherapy (Quijote-CLICaP)*. **Thorac Cancer**. 2020;11(2):353-61.
158. Paz-Ares L, Vicente D, Tafreshi A, Robinson A, Soto Parra H, Mazieres J, et al. *A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Patients With Metastatic Squamous NSCLC: Protocol-Specified Final Analysis of KEYNOTE-407*. **J Thorac Oncol**. 2020;15(10):1657-69.
159. Torlakovic E, Albadine R, Bigras G, Boag A, Bojarski A, Cabanero M, et al. *Canadian Multicenter Project on Standardization of Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry 22C3 Laboratory-Developed Tests for Pembrolizumab Therapy in NSCLC*. **J Thorac Oncol**. 2020;15(8):1328-37.
160. Teixido C, Vilarino N, Reyes R, Reguart N. *PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer*. **Ther Adv Med Oncol**. 2018;10:1758835918763493.
161. Leal LF, de Paula FE, De Marchi P, de Souza Viana L, Pinto GDJ, Carlos CD, et al. *Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations*. **Sci Rep**. 2019;9(1):3209.
162. Novaes LAC, Sussuchi da Silva L, De Marchi P, Cavagna RO, de Paula FE, Zanon MF, et al. *Simultaneous analysis of ALK, RET, and ROS1 gene fusions by NanoString in Brazilian lung adenocarcinoma patients*. **Transl Lung Cancer Res**. 2021;10(1):292-303.
163. Cavagna R, Escremim de Paula F, Sant'Anna D, Santana I, da Silva VD, da Silva ECA, et al. *Frequency of KRAS p.Gly12Cys Mutation in Brazilian Patients With Lung Cancer*. **JCO Glob Oncol**. 2021;7:639-45.
164. Warth A, Korner S, Penzel R, Muley T, Dienemann H, Schirmacher P, et al. *Microsatellite instability in pulmonary adenocarcinomas: a comprehensive study of 480 cases*. **Virchows Arch**. 2016;468(3):313-9.

165. Ninomiya H, Nomura K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Fujiwara M, et al. *Genetic instability in lung cancer: concurrent analysis of chromosomal, mini- and microsatellite instability and loss of heterozygosity*. **Br J Cancer**. 2006;94(10):1485-91.
166. Chang JW, Chen YC, Chen CY, Chen JT, Chen SK, Wang YC. *Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer*. **Clin Cancer Res**. 2000;6(5):1639-46.
167. Kim CH, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim YW. *Genetic instability of microsatellite sequences in non-small cell lung cancers*. **Lung Cancer**. 1998;21(1):21-5.
168. Fujimoto A, Fujita M, Hasegawa T, Wong JH, Maejima K, Oku-Sasaki A, et al. *Comprehensive analysis of indels in whole-genome microsatellite regions and microsatellite instability across 21 cancer types*. **Genome Res**. 2020.
169. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. *Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types*. **Nat Med**. 2016;22(11):1342-50.
170. Trabucco SE, Gowen K, Maund SL, Sanford E, Fabrizio DA, Hall MJ, et al. *A Novel Next-Generation Sequencing Approach to Detecting Microsatellite Instability and Pan-Tumor Characterization of 1000 Microsatellite Instability-High Cases in 67,000 Patient Samples*. **J Mol Diagn**. 2019;21(6):1053-66.
171. Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, Shia J, Bandlamudi C, Mandelker D, et al. *Microsatellite Instability Is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer*. **J Clin Oncol**. 2019;37(4):286-95.
172. Akagi K, Oki E, Taniguchi H, Nakatani K, Aoki D, Kuwata T, et al. *The real-world data on microsatellite instability status in various unresectable or metastatic solid tumors*. **Cancer Sci**. 2021.
173. Carr PR, Alwers E, Bienert S, Weberpals J, Kloor M, Brenner H, et al. *Lifestyle factors and risk of sporadic colorectal cancer by microsatellite instability status: a systematic review and meta-analyses*. **Ann Oncol**. 2018;29(4):825-34.
174. Gataa I, Mezquita L, Rossoni C, Auclin E, Kossai M, Aboubakar F, et al. *Tumour-infiltrating lymphocyte density is associated with favourable outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with immunotherapy*. **Eur J Cancer**. 2021;145:221-9.
175. Obeid JM, Wages NA, Hu Y, Deacon DH, Slingluff CL, Jr. *Heterogeneity of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in non-small-cell lung cancer: impact on patient prognostic assessments and comparison of quantification by different sampling strategies*. **Cancer Immunol Immunother**. 2017;66(1):33-43.

176. Volaric A, Gentzler R, Hall R, Mehaffey JH, Stelow EB, Bullock TN, et al. *Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Non-Small Cell Lung Cancer: A Targetable Mechanism of Immune Resistance Frequently Coexpressed With PD-L1*. **Am J Surg Pathol**. 2018;42(9):1216-23.
177. Jung KH, LoRusso P, Burris H, Gordon M, Bang YJ, Hellmann MD, et al. *Phase I Study of the Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) Inhibitor Navoximod (GDC-0919) Administered with PD-L1 Inhibitor (Atezolizumab) in Advanced Solid Tumors*. **Clin Cancer Res**. 2019;25(11):3220-8.
178. Hellmann MD, Gettinger S, Chow LQM, Gordon M, Awad MM, Cha E, et al. *Phase 1 study of epacadostat in combination with atezolizumab for patients with previously treated advanced nonsmall cell lung cancer*. **Int J Cancer**. 2020;147(7):1963-9.
179. Horvath L, Pircher A. *ASCO 2020 non-small lung cancer (NSCLC) personal highlights*. **Memo**. 2021:1-4.
180. Higgs BW, Morehouse CA, Streicher K, Brohawn PZ, Pilataxi F, Gupta A, et al. *Interferon Gamma Messenger RNA Signature in Tumor Biopsies Predicts Outcomes in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma or Urothelial Cancer Treated with Durvalumab*. **Clin Cancer Res**. 2018;24(16):3857-66.
181. Danaher P, Warren S, Lu R, Samayoa J, Sullivan A, Pekker I, et al. *Pan-cancer adaptive immune resistance as defined by the Tumor Inflammation Signature (TIS): results from The Cancer Genome Atlas (TCGA)*. **J Immunother Cancer**. 2018;6(1):63.
182. Thompson JC, Davis C, Deshpande C, Hwang WT, Jeffries S, Huang A, et al. *Gene signature of antigen processing and presentation machinery predicts response to checkpoint blockade in non-small cell lung cancer (NSCLC) and melanoma*. **J Immunother Cancer**. 2020;8(2).
183. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. **N Engl J Med**. 2015;372(21):2018-28.

ANEXOS

ANEXO A – Painel *PanCancer IO 360* (NanoString Technology) – lista de genes

A2M	CD300A	DEFB134	HIF1A	ITGB2	NGFR	RSAD2	TNFSF13
ACVR1C	CD36	DEPTOR	HK1	ITGB3	NID2	RUNX3	TNFSF13B
ADAM12	CD38	DKK1	HK2	ITGB8	NKG7	S100A12	TNFSF18
ADGRE1	CD3D	DLL1	HLA-A	ITPK1	NLRC5	S100A8	TNFSF4
ADM	CD3E	DLL4	HLA-B	JAG1	NLRP3	S100A9	TNFSF8
ADORA2A	CD3G	DNMT1	HLA-C	JAG2	NOD2	SAMD9	TNFSF9
AKT1	CD4	DPP4	HLA-DMA	JAK1	NOS2	SAMSN1	TNKS
ALDOA	CD40	DTX3L	HLA-DMB	JAK2	NOTCH1	SBNO2	TP53
ALDOC	CD40LG	DTX4	HLA-DOA	JAK3	NOTCH2	SELE	TPI1
ANGPT1	CD44	DUSP1	HLA-DOB	KAT2B	NRAS	SELL	TPM1
ANGPT2	CD45RA	DUSP2	HLA-DPA1	KDR	NT5E	SELP	TPSAB1/B2
ANGPTL4	CD45RB	DUSP5	HLA-DPB1	KIF2C	OAS1	SERPINA1	TRAF1
ANLN	CD45RO	E2F3	HLA-DQA1	KIR2DL3	OAS2	SERPINB5	TRAT1
APC	CD47	EDN1	HLA-DQA2	KIR3DL1	OAS3	SERPINH1	TREM1
APH1B	CD48	EGF	HLA-DQB1	KIR3DL2	OASL	SFRP1	TREM2
API5	CD5	EGFR	HLA-DRA	KIT	OLFML2B	SFRP4	TRIM21
APLNR	CD58	EGR1	HLA-DRB1	KLRB1	OLR1	SFXN1	TSLP
APOE	CD6	EIF2AK2	HLA-DRB5	KLRD1	OTOA	SGK1	TTC30A
APOL6	CD68	EIF2B4	HLA-E	KLRK1	P2RY13	SH2D1A	TWF1
AQP9	CD69	EIF4EBP1	HLA-F	KRAS	P4HA1	SHC2	TWIST1
AREG	CD7	EIF5AL1	HMGA1	LAG3	P4HA2	SIGLEC1	TWIST2
ARG1	CD70	ELOB	HMGB1	LAIR1	PALMD	SIGLEC5	TYMP
ARG2	CD74	ENO1	HNF1A	LAMA1	PARP12	SIGLEC8	TYMS
ARID1A	CD79A	ENTPD1	HRAS	LAMB3	PARP4	SIRPA	UBA7
ARNT2	CD79B	EOMES	HSD11B1	LAMC2	PARP9	SIRPB2	UBE2C
ATF3	CD80	EPCAM	ICAM1	LCK	PC	SLAMF7	UBE2T
ATM	CD84	EPM2AIP1	ICAM2	LDHA	PCK2	SLC11A1	ULBP2
AXIN1	CD86	ERBB2	ICAM3	LDHB	PDCD1	SLC16A1	VCAM1
AXL	CD8A	ERO1A	ICAM5	LGALS9	PDCD1LG2	SLC1A5	VCAN
B2M	CD8B	ESR1	ICOS	LIF	PDGFA	SLC2A1	VEGFA
BAD	CD96	EXO1	ICOSLG	LILRA1	PDGFB	SLC7A5	VEGFB
BAMBI	CDC20	EZH2	ID4	LILRA3	PDGFRB	SMAD5	VEGFC
BATF3	CDC25C	F2RL1	IDO1	LILRA5	PDK1	SMAP1	VHL
BAX	CDH1	FADD	IER3	LILRB2	PDZK1IP1	SNAI1	VSIR
BBC3	CDH11	FAM124B	IFI16	LILRB4	PECAM1	SNCA	VTCN1
BBS1	CDH2	FAM30A	IFI27	LOXL2	PF4	SOCS1	WDR76
BCAT1	CDH5	FANCA	IFI35	LRRC32	PFKFB3	SOX10	WNT10A
BCL2	CDK2	FAP	IFI6	LTB	PFKM	SOX11	WNT11
BCL2L1	CDK6	FAS	IFIH1	LTBP1	PGPEP1	SOX2	WNT2
BCL6B	CDKN1A	FASLG	IFIT1	LY9	PIAS4	SPIB	WNT2B
BID	CDKN1C	FBP1	IFIT2	LY96	PIK3CA	SPP1	WNT3A
BIRC3	CDKN2A	FCAR	IFIT3	LYZ	PIK3CD	SPRY4	WNT4
BIRC5	CDKN2B	FCGR1A	IFITM1	MAGEA1	PIK3CG	SREBF1	WNT5A
BLK	CEACAM3	FCGR2A	IFITM2	MAGEA12	PIK3R1	SRP54	WNT5B
BLM	CEBPB	FCGR2B	IFNA1	MAGEA3/A6	PIK3R2	STAT1	WNT7B
BMP2	CENPF	FCGR3A/B	IFNAR1	MAGEA4	PIK3R5	STAT2	XCL1/2
BNIP3	CEP55	FCGRT	IFNG	MAGEB2	PKM	STAT3	ZAP70
BNIP3L	CES3	FCN1	IFNGR1	MAGEC1	PLA1A	STAT4	ZC3H12A

BRCA1	CHUK	FCRL2	IFNGR2	MAGEC2	PLA2G2A	STC1	ZEB1
BRCA2	CLEC14A	FGF13	IGF2R	MAML2	PLOD2	SYK	ZEB2
BRD3	CLEC4E	FGF18	IHH	MAP3K12	PMS2	TAF3	
BRD4	CLEC5A	FGF9	IKBKB	MAP3K5	PNOC	TAP1	
BRIP1	CLEC7A	FGFR1	IKBKG	MAP3K7	POLD1	TAP2	
BTLA	CLECL1	FLNB	IL10	MAP3K8	PPARG	TAPBP	
C1QA	CMKLR1	FLT1	IL10RA	MAPK10	PPARGC1B	TAPBPL	
C1QB	CNTFR	FOSL1	IL11	MARCO	PRF1	TBX21	
C2	COL11A1	FOXP3	IL11RA	MB21D1	PRKAA2	TBXAS1	
C5	COL11A2	FPR1	IL12RB2	MELK	PRKACB	TCF3	
C5AR1	COL17A1	FPR3	IL15	MET	PRKCA	TCL1A	
C7	COL4A5	FSTL3	IL16	MFGE8	PRKX	TDO2	
CASP1	COL5A1	FUT4	IL17A	MFNG	PRLR	TGFB1	
CASP3	COL6A3	FYN	IL18	MGMT	PROM1	TGFB2	
CASP8	COMP	FZD8	IL18R1	MICA	PRR5	TGFB3	
CASP9	CPA3	FZD9	IL1A	MICB	PSMB10	TGFBR1	
CBLC	CRABP2	GAS1	IL1B	MKI67	PSMB5	TGFBR2	
CCL13	CSF1	GBP1	IL1R2	MLANA	PSMB8	THBD	
CCL14	CSF1R	GBP2	IL1RN	MLH1	PSMB9	THBS1	
CCL18	CSF2	GBP4	IL2	MMP1	PTCD2	THY1	
CCL19	CSF2RB	GHR	IL21R	MMP7	PTEN	TICAM1	
CCL2	CSF3	GIMAP4	IL22RA1	MMP9	PTGER4	TIE1	
CCL20	CSF3R	GIMAP6	IL24	MMRN2	PTGS2	TIGIT	
CCL21	CST2	GLI1	IL2RA	MRC1	PTPN11	TLR1	
CCL22	CTAG1B	GLS	IL2RB	MRE11	PTPRC	TLR2	
CCL3/L1	CTLA4	GLUD1	IL2RG	MS4A1	PVR	TLR3	
CCL4	CTNNB1	GLUL	IL32	MS4A2	PVRIG	TLR4	
CCL5	CTSS	GMIP	IL33	MS4A4A	RAD50	TLR5	
CCL7	CTSW	GNG4	IL34	MS4A6A	RAD51	TLR7	
CCL8	CX3CL1	GNLY	IL4	MSH2	RAD51C	TLR8	
CCNA1	CX3CR1	GOT1	IL6	MSH6	RASAL1	TLR9	
CCNB1	CXCL1	GOT2	IL6R	MTOR	RASGRF1	TMEM140	
CCND1	CXCL10	GPC4	IL7R	MX1	RB1	TMEM173	
CCND2	CXCL11	GPR160	INHBA	MXI1	RBL2	TNF	
CCND3	CXCL12	GPSM3	IRF1	MYC	RELA	TNFAIP3	
CCNE1	CXCL13	GZMA	IRF2	MYCT1	RELB	TNFAIP6	
CCNO	CXCL14	GZMB	IRF3	MYD88	RELN	TNFRSF10B	
CCR2	CXCL16	GZMH	IRF4	NBN	REN	TNFRSF10C	
CCR4	CXCL2	GZMK	IRF5	NCAM1	RICTOR	TNFRSF10D	
CCR5	CXCL3	GZMM	IRF7	NCR1	RIPK1	TNFRSF11A	
CD14	CXCL5	H2AFX	IRF8	NDUFA4L2	RIPK2	TNFRSF11B	
CD163	CXCL6	HAVCR2	IRF9	NECTIN1	RIPK3	TNFRSF14	
CD19	CXCL8	HCK	ISG15	NECTIN2	RNLS	TNFRSF17	
CD1C	CXCL9	HDAC11	ITGA1	NEIL1	ROBO4	TNFRSF18	
CD2	CXCR2	HDAC3	ITGA2	NF1	ROCK1	TNFRSF1A	
CD209	CXCR3	HDAC4	ITGA4	NFAM1	ROR2	TNFRSF1B	
CD244	CXCR4	HDAC5	ITGA6	NFATC2	RORC	TNFRSF25	
CD247	CXCR6	HDC	ITGAE	NFIL3	RPL23	TNFRSF4	
CD27	CXorf36	HELLS	ITGAL	NFKB1	RPL7A	TNFRSF8	
CD274	CYBB	HERC6	ITGAM	NFKB2	RPS6KB1	TNFRSF9	
CD276	DAB2	HES1	ITGAV	NFKBIA	RPTOR	TNFSF10	
CD28	DDB2	HEY1	ITGAX	NFKBIE	RRM2	TNFSF12	

ANEXO B – Assinaturas de expressão gênicas

Assinaturas imunes:

- *TIS (Anti-Tumor Immune Activity)*: mede a supressão da resposta imune dentro do tumor. Esta assinatura originalmente prevê resposta à terapia anti-PD1 (pembrolizumabe). É composta por genes relacionados à sinalização do interferon gama (IFN γ), apresentação de antígenos, células *natural killer* (NK), células T e vias inibitórias. Esta assinatura é útil para prever a resposta à terapia anti-PD1 e determinar o fenótipo tumoral imunológico “quente” e “frio” em vários tipos de câncer.
- *ARG1 (Inhibitory Immune Signaling)*: mede a expressão do gene *Arginase-1 (ARG1)* que é expresso por células mielóides e catalisa a conversão de arginina em ornitina e uréia. Isso suprime a resposta de células T por inibir sua proliferação que é dependente da disponibilidade de arginina para síntese protéica.
- *B Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células B no microambiente tumoral. As células B são um dos principais componentes da resposta imune humoral tendo funções como produção de anticorpos e apresentação de antígenos às células T. Sua presença no microambiente tumoral pode estar associada a estruturas linfoides terciárias em alguns tipos de tumor.
- *CD45 (Immune Cell Population Abundance)*: mede a expressão do gene *CD45*. A CD45 é uma proteína do tipo tirosina-fosfatase (receptor tipo C) e é expresso em todas as células do sistema imunológico.
- *CD8 T Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células T CD8+ no microambiente tumoral.
- *CTLA4 (Inhibitory Immune Signaling)*: mede a expressão do gene da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4). CTLA-4 é uma molécula que inibe as

células T ligando-se competitivamente ao CD80 e CD86 para evitar a co-estimulação via CD28.

- *Cytotoxic Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células citotóxicas no microambiente tumoral. Células citotóxicas, como células NK e células T CD8+ usam várias moléculas, incluindo perforinas, granzimas e membros da família de receptores semelhantes à lectina de células assassinas (KLRG) para reconhecer, penetrar e destruir células tumorais.
- *Cytotoxicity (Anti-Tumor Immune Activity)*: essa assinatura mede as moléculas usadas pelas células T CD8+ e NK na atividade citolítica contra as células tumorais. As células citotóxicas, como as células NK e T CD8+, usam várias moléculas, incluindo perforinas, granzimas e granzulina para penetrar e destruir células tumorais.
- *DC (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células dendríticas no microambiente tumoral.
- *Exhausted CD8 (Immune Cell Population Abundance)*: esta assinatura mede a abundância de células CD8+ exauridas (menos funcionais) no microambiente tumoral. As células T no microambiente tumoral frequentemente se tornam exauridas após a exposição a fatores de células supressoras imunológicas, estromais e malignas. Essas células T exauridas perdem a capacidade de eliminar tumores. As células T exauridas expressam marcadores e genes que estão associados à redução da atividade antitumoral. Essa assinatura analisa a atividade funcional das células T no microambiente tumoral.
- *IFN Downstream (Anti-Tumor Immune Activity)*: essa assinatura mede a ativação de vias de sinalização ligadas ao interferon. Tanto interferons do tipo I quanto do tipo II estão implicados nas respostas imunes tumorais e regulam a atividade antitumoral. As células malignas e imunes no microambiente tumoral produzem interferon do tipo I, que desempenham papel na vigilância imunológica.

- *IFN Gamma (Anti-Tumor Immune Activity)*: essa assinatura rastreia a resposta canônica ao interferon tipo II, incluindo os componentes mais universais dessa resposta. O IFN γ induz a ativação de macrófagos e células NK, aumenta a apresentação de antígenos e induz padrões de transcrição gênica que podem levar ao recrutamento de células imunes para o tumor. A expressão de sinalização de IFN γ está associada à resposta à terapia anti-PD-(L)1.
- *IL10 (Inhibitory Immune Signaling)*: mede a expressão do gene da interleucina-10 (IL10). A IL10 é uma citocina pleiotrópica expressa predominantemente por monócitos. Ele impacta vários aspectos da resposta imune do tumor, incluindo apresentação de antígeno, ativação de células T e produção de citocinas.
- *Inflammatory Chemokines (Inhibitory Immune Signaling)*: essa assinatura mede as citocinas inflamatórias que são moléculas que possuem a capacidade de recrutar populações mieloides e linfóides para o microambiente tumoral.
- *Lymphoid (Anti-Tumor Immune Activity)*: essa assinatura mede um amplo conjunto de genes envolvidos no funcionamento das células linfóides, incluindo a abundância de células T, abundância de células B, abundância de células NK, atividade citotóxica, sinalização de IFN γ , sinalização JAK-STAT e moléculas co-estimulatórias e co-inibitórias de células T. Esta assinatura captura uma visão ampla do *status* imunológico linfóide de um tumor.
- *Macrophages (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de macrófagos no microambiente tumoral. Os macrófagos podem aumentar a imunidade tumoral (por exemplo, apresentando antígeno) ou suprimir a imunidade tumoral (por exemplo, liberando citocinas imunossupressoras).
- *Mast Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de mastócitos no microambiente tumoral.

- *MHC2 (Anti-Tumor Immune Activity)*: essa assinatura mede os principais antígenos leucocitários humanos (HLA) envolvidos na apresentação de antígenos MHC de classe II. As células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos e células B) usam o MHC de classe II para apresentar antígenos extracelulares às células T CD4+. A ativação de células T CD4+ induz a expressão de citocinas que promovem ativação de células T citotóxicas e respostas imunes adaptativas antitumorais.
- *Myeloid (Anti-Tumor Immune Activity)*: essa assinatura mede genes marcadores e efetores-chave de células imunológicas de linhagem mielóide. As células mielóides regulam as atividades antitumorais e pró-tumorais. Esta assinatura captura uma visão ampla do *status* imunológico mielóide de um tumor.
- *Myeloid Inflammation (Inhibitory Immune Signaling)*: essa assinatura mede a abundância de células de linhagem mielóide com funções pró e antitumorais. As células mielóides produzem várias citocinas e quimiocinas que promovem estado de inflamação. Dependendo do contexto, elas podem promover a tumorigênese ou respostas imunes antitumorais.
- *Neutrophils (Immune Cell Population Abundance)*: esta assinatura mede a abundância de neutrófilos no microambiente tumoral. No contexto do tumor, os neutrófilos tendem a ter atividade imunossupressora.
- *NK CD56dim (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de um subconjunto de células NK com a maior atividade citotóxica.
- *NK Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células NK no microambiente tumoral.
- *NOS2 (Inhibitory Immune Signaling)*: mede expressão do gene NOS2 (óxido nítrico-sintase isoforma 2). NOS2 é induzido por sinalização de IFN γ . Ele regula a expressão

de óxido nítrico, que em níveis baixos pode promover o crescimento do tumor, mas em níveis elevados pode ser citostático ou citotóxico para as células tumorais.

- *PD-1 (Inhibitory Immune Signaling)*: mede expressão do gene PD-1 que é expresso predominantemente por linfócitos. É um regulador negativo da ativação imune, evitando a proliferação e a secreção de citocinas.
- *PD-L2 (Inhibitory Immune Signaling)*: mede expressão do gene PD-L1 que é um ligante para PD-1 e regulador negativo da atividade de células T. É expresso principalmente por células apresentadoras de antígeno.
- *T Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células T no microambiente tumoral.
- *TH1 Cells (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células T TH1. Essas células promovem a atividade imune antitumoral através da produção de IFN γ .
- *TIGIT (Inhibitory Immune Signaling)*: essa assinatura mede a abundância de células espessoras de TIGIT, molécula que suprime a atividade imune antitumoral em células T CD8 $^{+}$ e células NK.
- *Treg (Immune Cell Population Abundance)*: essa assinatura mede a abundância de células T regulatórias. Treg é medido pela expressão gênica da *forkhead P3* (FOXP3). As células T reguladoras suprimem atividades das células T por meio de uma variedade de mecanismos.
- Assinaturas relacionadas ao tumor:
- *APM (Tumor Immunogenicity)*: essa assinatura mede a expressão de genes relacionados à apresentação de antígeno via complexo MHC de classe I e alguns

genes chaves envolvidos no processamento dos antígenos antes de sua apresentação. Normalmente, os antígenos do citoplasma da célula são apresentados na classe I e reconhecidos pelo TCR nas células T CD8+ citotóxicas. O MHC de classe I é expresso por todas as células nucleadas do corpo, mas a regulação negativa das vias do MHC de classe I é uma estratégia de evasão que pode ser empregada por células tumorais. Uma resposta imune antitumoral eficaz depende de células T citotóxicas que encontrem neoantígenos apresentados na superfície das células tumorais. Fortes respostas imunes antitumorais são tipicamente acompanhadas por alta expressão de genes apresentadores de antígenos.

- *APM Loss (Tumor Immunogenicity)*: essa assinatura mede a perda de expressão do maquinário de apresentação (ou processamento) de antígenos. A apresentação de antígenos via MHC de classe I em células tumorais é um mecanismo importante para o reconhecimento imunológico de tumores. Mutação ou perda de expressão de genes chaves do MHC de classe I conferem resistência à imunoterapia.
- *Apoptosis (Tumor Sensitivity to Immune Attack)*: essa assinatura captura genes associados a processos apoptóticos, especificamente genes envolvidos na integridade da membrana mitocondrial. Inclui genes pró e anti-apoptóticos.
- *B7-H3 (Inhibitory Tumor Mechanisms)*: expressão do gene *B7-H3 (CD276)*. B7-H3 é um regulador negativo da atividade das células T que é expresso em células tumorais e imunológicas.
- *Hypermutation (Tumor Immunogenicity)*: essa assinatura mede as alterações na expressão gênica associadas à perda da atividade MMR em tipos de tumor onde a perda MMR é mais prevalente.
- *IDO1 (Inhibitory Tumor Mechanisms)*: mede expressão do gene IDO1 (indoleamina 2,3-dioxigenase 1). IDO1 é expressa por células tumorais, imunológicas e estromais e é a enzima limitadora da taxa do catabolismo do triptofano. Ao catalisar a

degradação do triptofano, que é necessário para a proliferação e atividade das células T citotóxicas, a IDO1 inibe as respostas imunes antitumorais.

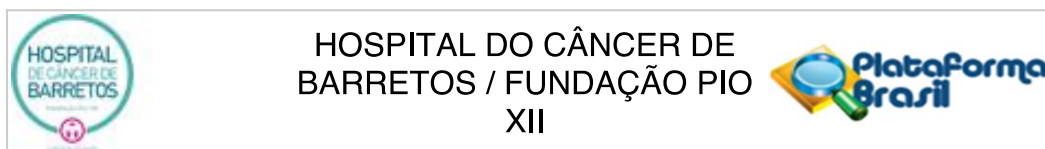
- *Immunoproteasome (Tumor Immunogenicity)*: essa assinatura mede os componentes principais do imunoproteassoma. O imunoproteassoma é uma variante do proteassoma clássico. Agrega células imunes e células não-imunes após exposição a citocinas pró-inflamatórias ou estresse oxidativo. O imunoproteassoma induz diferentes padrões de degradação de proteínas, gerando novos antígenos que são apresentados pelo complexo MHC de classe I. A expressão do gene do imunoproteassoma pode estar associada a aumento da imunogenicidade tumoral.
- *JAKSTAT Loss (Tumor Sensitivity to Immune Attack)*: perda de JAK-STAT se refere à perda de expressão da via JAK-STAT. Essa assinatura mede a perda de genes associados à sinalização JAK-STAT, que tem sido identificado como um mecanismo de resistência adquirido aos inibidores de *checkpoint* imune.
- *MAGEs (Tumor Immunogenicity)*: expressão gênica do antígeno associado ao melanoma (*Melanoma-Associated Antigen Gene Expression*). Esta assinatura mede vários antígenos que têm sido implicados na biologia tumoral e são frequentemente usados como alvos de imunoterapia.
- *MMR Loss (Tumor Immunogenicity)*: essa assinatura mede os níveis de expressão de vários genes de reparo chaves. A deficiência de reparo geralmente ocorre quando um desses genes tem perda significativa de expressão. Tumores deficientes nos mecanismos de reparo do DNA de reparo têm altas taxas de mutação. A perda de MMR está associada a um melhor reconhecimento imunológico em certos tipos de tumor. Altas pontuações nesta assinatura indicam deficiência de MMR. A deficiência de reparo de incompatibilidade e a instabilidade de microssatélites (MSI) predizem a resposta aos ICIs.
- *MSI Predictor (Tumor Immunogenicity)*: essa é uma assinatura que integra a assinatura *MMR Loss* e *Hypermutation* para prever a perda de atividade de MMR.

- *PD-L1 (Inhibitory Tumor Mechanisms)*: mede expressão de PD-L1 (CD274) que é o ligante do PD-1 e é um regulador negativo da atividade de células T. É expresso em células tumorais e imunes.
- *Proliferation (Tumor Sensitivity to Immune Attack)*: essa assinatura mede os genes envolvidos na proliferação tumoral. Um tumor altamente proliferativo pode superar uma resposta imune se a replicação exceder a detecção e eliminação mediada pelo sistema imunológico.
- *TGF-Beta (Inhibitory Tumor Mechanisms)*: essa é uma assinatura que mede expressão do gene *TGFB1* que codifica a TGF β (citocina pleotrópica que inibe a atividade imune antitumoral e promove o crescimento e a sobrevivência do tumor).
- Assinaturas relacionadas ao microambiente tumoral:
- *Endothelial Cells (Stromal Factors)*: essa assinatura mede a expressão de genes associados ao tecido vascular e à angiogênese. A angiogênese é importante para o tráfego de nutrientes e oxigenação adequada para o crescimento do tumor.
- *Glycolytic Activity (Inhibitory Metabolism)*: essa assinatura mede a expressão de genes que participam do consumo de energia. Glicólise hiper-regulada e aumento do consumo de glicose são quase universais em tumores. A glicólise pode inibir a resposta imune efetora, privando as células imunológicas de glicose no microambiente tumoral e alterando outras moléculas que normalmente sinalizariam ao sistema imunológico.
- *Hypoxia (Inhibitory Metabolism)*: essa assinatura mede a expressão de genes associados a redução de oxigenação no tumor. A hipóxia pode induzir vários processos de promoção do câncer como invasão, motilidade e reprogramação

metabólica. Também pode promover resistência à lise celular mediada por células imunes.

- *Stroma (Stromal Factors)*: essa assinatura mede a abundância de tecido estromal. Esta assinatura mede os componentes do estroma no microambiente tumoral. O estroma tumoral é a coleção de componentes de tecido não cancerosos e não imunes que cercam o tumor. O estroma pode atuar como uma barreira física que exclui as células imunes do tumor, impedindo a imunidade antitumoral eficaz, mesmo quando os antígenos associados ao tumor induziram o *priming* e a ativação das células imunes.

**ANEXO C – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)
da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de perfil molecular associado à resposta ao tratamento com inibidores de checkpoints imunológicos em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas.

Pesquisador: Pedro Rafael Martins De Marchi

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 87212918.5.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.671.048

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1092076.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 21/05/2018)

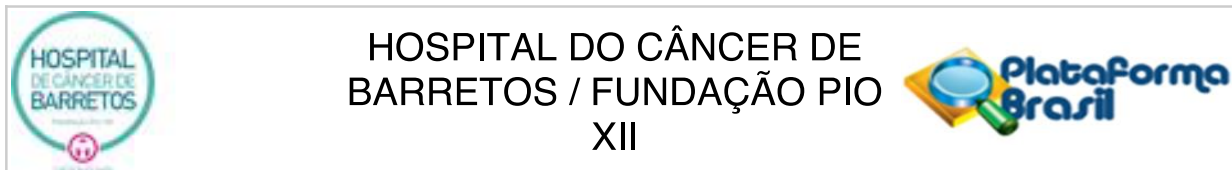
RESUMO:

Pacientes com câncer de pulmão estadio clínico IV têm sido tratados com imunoterapia (inibidores de checkpoints imunológicos). Biomarcadores como expressão de PD-L1, carga tumoral, presença de instabilidade de microssatélite têm sido utilizados, porém com baixo valor preditivo negativo. O presente estudo visa avaliar a expressão de 770 genes relacionados a imunologia em uma plataforma chamada NanoString, e correlacionar com desfechos clínicos. Também objetiva elaborar um score relacionado a predição de resposta aos inibidores de checkpoints imunológicos.

INTRODUÇÃO:

1. INTRODUÇÃO 1.1 Câncer de pulmão No mundo há cerca de 14,1 milhões de novos casos de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.671.048

câncer anualmente, excluídos os casos de câncer de pele não melanoma. Destes, 1,8 milhão são câncer de pulmão, o que o coloca como o câncer mais incidente no mundo¹. O câncer de pulmão é a causa mais comum de morte por câncer, sendo responsável por quase uma em cada cinco mortes (1,59 milhões de mortes, 19,4% do total). Devido à sua alta mortalidade (a proporção global mortalidade/incidência é de 0,87) e relativa falta de variabilidade na sobrevivência em diferentes regiões do mundo, os padrões geográficos na mortalidade acompanham de perto a incidência¹. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima incidência de 31.270 casos para o ano de 2018, sendo 18.740 homens (o segundo mais incidente) e 12.530 mulheres (quarto mais incidente)². Entre os anos de 1974 e 2004 a mortalidade no país aumentou de 10,6 para 31,1 mortes por 100.000 homens, e de 3,0 para 5,4 mortes por 100.000 mulheres³. Histologicamente existem dois grupos principais de câncer de pulmão, o de células não pequenas (CPCNP), que corresponde a 85% dos casos, e o de pequenas células (CPCP), que corresponde a 15% dos casos. O CPCNP é subdividido entre adenocarcinoma, carcinoma escamoso e o carcinoma de grandes células. O subtipo mais comum de câncer de pulmão é o adenocarcinoma, compreendendo cerca de 40% de todos os casos. Tem origem a partir das células alveolares tipo II, que secretam muco e outras substâncias^{4, 5}. Ele tende a ocorrer na periferia dos pulmões, o que pode ser devido à presença de filtros nos cigarros de papel, que previnem a inalação de partículas grandes. Isso resulta em uma inalação mais profunda da fumaça do cigarro, levando a lesões periféricas⁵⁻⁷. Comparado com outros tipos de câncer de pulmão, o adenocarcinoma tende a crescer mais devagar e mais frequentemente é diagnosticado em estádios iniciais⁵. O carcinoma de células escamosas compreende 25-30% de todos os casos de câncer de pulmão. Tem origem a partir das células escamosas no epitélio das vias aéreas e está fortemente relacionado com o tabagismo⁸. Já o carcinoma de grandes células corresponde a 5-10% dos casos, sendo um diagnóstico de exclusão (ausência de morfologia ou imunofenótipo característico de carcinoma epidermóide/adenocarcinoma/tumor neuroendócrino). Mais frequentemente se localiza em regiões centrais dos pulmões e está fortemente relacionado a altas cargas tabágicas^{5, 9}. Quanto ao estadiamento a maioria dos casos de câncer de pulmão apresenta-se em estádios avançados da doença, sendo 55% metastáticos ao diagnóstico. Neste contexto, os pacientes são tratados em caráter paliativo, sendo a expectativa de sobrevida em 5 anos de apenas 5,2%¹⁰. O tratamento da doença metastática vem evoluindo significativamente ao longo dos últimos anos. Em suma, apenas na década de 1990 houve comprovação do benefício do tratamento quimioterápico em relação a sobrevida global. Duas meta-análises demonstraram aumento relativo de cerca de 10% em 1 ano para aqueles pacientes tratado com quimioterapia^{11, 12}. A partir de então vários estudos

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.671.048

tentaram comparar diferentes esquemas de quimioterapia com intenção de definir o padrão de tratamento em primeira linha. Afortunadamente, em 2002, foram publicados os resultados de um ensaio clínico de fase III, do grupo ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group), que estabeleceu os esquemas de quimioterapia de terceira geração baseados em platina (platina com taxano ou platina com gencitabina) como padrões, não havendo diferença entre eles em relação à sobrevida global.¹³ Em 2006, pela primeira vez, foi observada sobrevida mediana maior que 1 ano, com uso de bevacizumabe, primeiro anticorpo monoclonal aprovado para o tratamento de câncer de pulmão, combinado com quimioterapia em pacientes com histologia não escamosa.¹⁴ Pemetrexede foi o último agente citotóxico aprovado, em combinação com platina, após estudo de fase III de não inferioridade demonstrar similar eficácia e menor toxicidade comparado ao esquema com cisplatina e gencitabina em histologia não escamosa¹⁵. Atualmente, a classificação histológica não é mais suficiente para se traçar um plano terapêutico, principalmente para aqueles pacientes com doença metastática (estádio clínico IV). Com o advento da medicina personalizada faz-se necessário também uma classificação molecular que tem por intenção identificar mutações relacionadas à oncogênese para as quais há terapias alvo moleculares disponíveis. O perfil molecular é variável conforme a histologia (Figura 1) e, importantemente, há terapias alvo já estabelecidas e aprovadas para pacientes com mutações em genes como EGFR (gefitinibe, erlotinibe, afatinibe e osimertinibe), ALK (crizotinibe, ceritinibe e alectinibe) e ROS1 (crizotinibe). Em relação aos genes BRAF, MET, RET e ERBB2 (HER2), embora não haja drogas aprovadas especificamente para tratamento do câncer de pulmão, há terapias aprovadas para outros tumores, e eventualmente podem ser utilizadas no tratamento desses pacientes.¹⁶ O estudo IPASS foi um estudo asiático de fase III, de não inferioridade que comparou gefitinibe (inibidor de tirosina quinase anti-EGFR – epidermal growth factor receptor) a carboplatina + paclitaxel em primeira linha de tratamento em população selecionada de acordo com características clínicas (não tabagistas ou tabagistas leves – até 100 cigarros ao longo da vida). Foram randomizados 1.217 pacientes, sendo um estudo positivo no qual o gefitinibe se mostrou não inferior à quimioterapia em relação à sobrevida livre de progressão (hazard ratio 0,74; 95% CI, 0,65 - 0,85; P< 0,001), desfecho primário do estudo. Esse estudo marca o início da era da terapia alvo molecular no tratamento do câncer de pulmão, não pelo resultado de seu desfecho primário, mas sim pela análise pré-planejada de pacientes portadores de mutações no gene EGFR (deleções no éxon 19 ou a mutação pontual no éxon 21, L858R). Do total, 437 pacientes foram testados, sendo 261 (59,7%) portadores de mutações no gene EGFR. Neste subgrupo a sobrevida livre de progressão (SLP) foi significativamente maior nos pacientes que receberam gefitinibe (hazard ratio 0,48; 95%

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.671.048

CI, 0,36 – 0,64; $P < 0,001$). Tais resultados estabeleceram osimertinibe como o padrão de tratamento em pacientes p.T790M positivos. Para a maioria dos casos T790M negativos a única opção é a quimioterapia. Outro avanço de suma importância foi o desenvolvimento dos TKIs anti-ALK (anaplastic lymphoma kinase).

HIPÓTESE:

Os inibidores de checkpoints imunológicos estão revolucionando o tratamento do câncer de pulmão. No entanto, apesar do aumento da sobrevida dos pacientes tratado com inibidores de checkpoints imunológicos, muitos pacientes não respondem a essas drogas. Apesar de existirem vários biomarcadores de resposta terapêutica, nenhum deles possui valor preditivo negativo adequado, o que limita a seleção de pacientes. Considerandose que o câncer de pulmão é uma neoplasia agressiva e que esse tipo de tratamento é oneroso, faz-se necessário o desenvolvimento de um biomarcador ou um score que permita uma melhor seleção dos pacientes candidatos a essa terapêutica. O desenvolvimento de biomarcadores com valor preditivo negativo adequado resultará uma diminuição dos custos com inibidores de checkpoints imunológicos para os pacientes que não se beneficiarão deste tipo de tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

Objetivo geral

Identificar um perfil de expressão gênica preditivo de resposta aos inibidores de checkpoints anti-PD-1/PD-L1 em portadores de câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP).

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

Objetivos específicos

1. Avaliar a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global dos pacientes tratados com anti-PD-1/PD-L1;
2. Avaliar a resposta ao tratamento com anti-PD-1/PD-L1, de acordo com RECIST 1.188;
3. Avaliar a expressão de mais de 700 genes imuno-oncológicos das amostras tumorais dos pacientes tratados com anti-PD-1/PD-L1 utilizando-se a

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.671.048

plataforma NanoString;

4. Avaliar a expressão tumoral de PD-L1;

5. Avaliar infiltrado linfocitário tumoral;

6. Quantificar a carga mutacional do tumor (Tumor Mutation Burden – TMB) e identificar a presença de instabilidade de microssatélites (Microsatellite

Instability – MSI);

7. Correlacionar os diferentes perfis genéticos identificados com sobrevida livre de progressão, sobrevida global e resposta ao tratamento com anti

PD-1/PD-L1;

8. Desenvolver um score de resposta imunológica aos inibidores de checkpoints anti-PD-1/PD-L1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

Trata-se de um estudo de risco mínimo, limitado à eventual possibilidade de quebra de confidencialidade. No entanto os pesquisadores se comprometem a tomar todas as medidas necessárias para isso não ocorra. Quanto à possibilidade de esgotamento do material parafinado, vide item “Esgotamento do material parafinado”. Não há risco de identificação de mutações germinativas.

BENEFÍCIOS:

Não haverá benefício direto aos participantes, pois trata-se de um estudo retrospectivo. Após conclusão do estudo, futuros participantes poderão se beneficiar.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

RESPOSTAS REFERENTES AS PENDÊNCIAS EMITIDAS NO PARECER N°1572/2018:

1. Referente ao Financiamento: Apresenta-se na Plataforma Brasil como recurso financeiro o PAIP no valor de R\$6.000,00 e, no documento Declaração de Financiamento também cita-se o uso de recursos particulares do pesquisador. Porém no Projeto, no item "Orçamento", pág. 33, relata-se que para realização da pesquisa será necessário o valor total de R\$R\$ 244.500,00 sendo os valores atestados anteriormente demasiadamente inferiores aos necessários. Solicita-se esclarecimento sobre como será obtida a diferença de valor necessária para que o projeto seja desenvolvido.

- RESPOSTA PESQUISADOR: "Esclareço que todo o material necessário para os testes, com exceção do TMB, já foi adquirido pela equipe de pesquisa, de modo que não há chance de qualquer

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.671.048

participante ser prejudicado por falta de financiamento. Quanto ao teste do TMB, o valor referido se trata do valor “de mercado”. No entanto estamos em negociação com a indústria para conseguir desconto de até 90%, além de estarmos tentando financiamento junto a agências de fomento. Esclareço ainda que o material biológico necessário para o teste do TMB é específico para o mesmo - diferente do material necessário para os outros testes. Mesmo que os outros testes já sejam realizados, o material utilizado para eles não serve para realização do TMB. Quando houver financiamento para o TMB, lâmina específica necessitará ser preparada. Assim, não haverá qualquer prejuízo a qualquer participante quanto a sub utilização de suas amostras."

- ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Solicita-se ainda, que seja transcrito de forma clara no projeto que haverá o comprometimento dos pesquisadores a iniciarem o uso dos materiais biológicos descritos no projeto somente APÓS confirmação de obtenção dos valores necessários para o desenvolvimento deste.

- RESPOSTA PESQUISADOR: "Esclareço que o material biológico necessário para o teste do TMB é específico para o mesmo - diferente do material necessário para os outros testes. Mesmo que os outros testes já sejam realizados, o material utilizado para eles não serve para realização do TMB. Quando houver financiamento para o TMB, lâmina específica necessitará ser preparada. Assim, não haverá qualquer prejuízo a qualquer participante quanto a sub utilização de suas amostras."

- ANÁLISE CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1 Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 24/11/2018.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.671.048

2 Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

3 Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

4 Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.

5 Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

6 Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1572/2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1092076.pdf	21/05/2018 16:01:01		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias.pdf	21/05/2018 16:00:31	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias.docx	21/05/2018 15:59:53	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Ciencia_Estudo.pdf	09/04/2018 15:19:18	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Cancer_Pulmao_NanoString.docx	02/04/2018 17:31:52	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Responsabilidade_Pesquisador.pdf	02/04/2018 17:14:25	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Mabin.pdf	02/04/2018 17:13:50	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Pesquisador_Externo.pdf	02/04/2018 17:13:03	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Coletanea_Cartas_Doutorado.docx	02/04/2018 17:12:46	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	02/04/2018 17:12:18	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	02/04/2018 17:12:02	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.671.048

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 23 de Maio de 2018

Assinado por:

**Maicon Fernando Zanon da Silva
(Coordenador)**

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

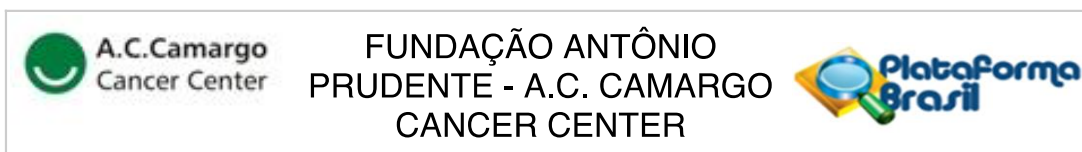
Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

**ANEXO D – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)
do Hospital A.C. Camargo**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO GÊNICA EM CÂNCER DE PULMÃO E RESPOSTA À TERAPIA COM INIBIDORES DE CHECKPOINTS IMUNOLÓGICOS

Pesquisador: Pedro Rafael Martins De Marchi

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 87212918.5.3001.5432

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.401.413

Apresentação do Projeto:

Pacientes com câncer de pulmão estadio clínico IV têm sido tratados com imunoterapia (inibidores de checkpoints imunológicos). Biomarcadores como expressão de PD-L1, carga tumoral, presença de instabilidade de microssatélite têm sido utilizados, porém com baixo valor preditivo negativo.

O presente estudo visa avaliar a expressão de 770 genes relacionados a imunologia em uma plataforma chamada NanoString, e correlacionar com desfechos clínicos. Também objetiva elaborar um score relacionado a predição de resposta aos inibidores de checkpoints imunológicos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Identificar um perfil de expressão gênica preditivo de resposta aos inibidores de checkpoints anti-PD-1/PD-L1 em portadores de câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP).

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 3.401.413

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Trata-se de um estudo de risco mínimo, limitado à eventual possibilidade de quebra de confidencialidade. No entanto os pesquisadores se comprometem a tomar todas as medidas necessárias para isso não ocorra. Quanto à possibilidade de esgotamento do material parafinado, vide item “Esgotamento do material parafinado”. Não há risco de identificação de mutações germinativas.

Benefícios:

Não haverá benefício direto aos participantes, pois trata-se de um estudo retrospectivo. Após conclusão do estudo, futuros participantes poderão se beneficiar

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Recomenda-se incluir o MTA (MAterial Transfer Agreement) entre as referidas instituições.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências e dúvidas foram resolvidas e devidamente sanadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1300767.pdf	16/05/2019 15:14:56		Aceito
Outros	Declaracao_Dpto_Anatomia_Patologica.pdf	16/05/2019 15:12:40	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Resumo_Material_Biologico.docx	16/05/2019 15:10:43	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Resumo_Material_Biologico.pdf	16/05/2019 15:09:10	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 3.401.413

Outros	Resposta_Pendencias.pdf	16/05/2019 15:08:28	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Resposta_Pendencias.doc	16/05/2019 15:06:59	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infra_estrutura.pdf	04/04/2019 15:55:17	Sandra Fabiana de Almeida	Aceito
Outros	Declaracoes_Comprometimento.pdf	28/03/2019 16:35:20	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Termos.pdf	28/03/2019 16:31:18	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Emenda_1_Dr_Pedro_De_Marchi.pdf	15/02/2019 13:01:42	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Emenda_1.docx	15/02/2019 11:46:00	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao_2_alt.docx	15/02/2019 11:45:16	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao_2.docx	14/02/2019 17:19:30	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias.pdf	21/05/2018 16:00:31	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias.docx	21/05/2018 15:59:53	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Ciencia_Estudo.pdf	09/04/2018 15:19:18	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Cancer_Pulmao_NanoString.docx	02/04/2018 17:31:52	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Responsabilidade_Pesquisador.pdf	02/04/2018 17:14:25	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Mabin.pdf	02/04/2018 17:13:50	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Pesquisador_Externo.pdf	02/04/2018 17:13:03	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Coletanea_Cartas_Doutorado.docx	02/04/2018 17:12:46	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	02/04/2018 17:12:18	Pedro Rafael Martins De Marchi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 3.401.413

SAO PAULO, 19 de Junho de 2019

Assinado por:
Sandra Caires Serrano
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br