

Imunitní biomarkery pro predikci odpovědi na léčbu checkpoint inhibitory

Simona Bořilová^{1,2}, Peter Grell^{1,2}, Ondřej Bílek^{1,2}, Igor Kiss^{1,2}

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

²Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno

I přes velmi slibné terapeutické výsledky inhibitorů imunitních kontrolních bodů (ICIs) benefituje z této léčby asi 20–40 % pacientů. Od uvedení léčby ICIs do praxe jsou neustále zkoumány prediktory, které by mohly zamezit zbytečné toxicitě a také zmenšit finanční náklady vynaložené na léčbu. V praxi dnes pro predikci odpovědi na anti-PD1/PD-L1 imunoterapii využíváme expresi PD-L1. Její uplatnění v praxi ale stále zůstává velmi diskutabilní, a to kvůli těžce definovatelné mezní hodnotě a prostorové i časové heterogenitě. Dalším schváleným prediktorem se stala mikrosatelitní instabilita, která ačkoliv je silným prediktorem například u kolorektálního karcinomu, není ji možné pokládat za zcela tumor agnostický prediktor. Další slibné prediktory, uvedené v našem článku, jsou nyní předmětem zkoumání a testování (například střevní mikrobiom, imunoprofilování periferní krve nebo tumor infiltrující lymfocyty). Vzhledem ke komplexnosti imunitní protinádorové reakce nebude pravděpodobně možné určit jenom jeden biomarker, který by reflektoval všechny stupně imunitní protinádorové reakce, bez ohledu na histopatologický typ nádoru.

Klíčová slova: inhibitory imunitních kontrolních bodů, anti PD-1/PD-L1 protilátky, anti CTLA-4 protilátky, imunitní biomarkery.

Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors

Despite the very promising therapeutic results of checkpoint inhibitors (ICIs), only 20–40 % of patients benefit from this treatment. Since the introduction of ICIs into daily practice, predictors have been constantly investigated to avoid unnecessary toxicity and to reduce the financial expenses. Nowadays, we use PD-L1 expression to predict the response to anti-PD1 / PD-L1 immunotherapy. However, its usefulness is currently debatable because of its varied definition of threshold, and spatial/temporal heterogeneity. Another approved predictor is microsatellite instability. Although it is a strong predictor for colorectal cancer, cannot be considered a completely tumor agnostic predictor. Other promising predictors mentioned in our article are now under investigation and testing (e.g. intestinal microbiome, peripheral blood immunoprofiling, or tumor infiltrating lymphocytes). Due to the complexity of the immune antitumor response, it may not be possible to identify a single biomarker that reflects all stages of the immune antitumor response, regardless of the histopathological type of tumor.

Key words: immune checkpoint inhibitors, anti PD-1/PD-L1 antibodies, anti CTLA-4 antibodies, immune biomarkers.

Úvod

Imunoterapie a zejména použití inhibitorů imunitního kontrolního bodu, (ICIs, immune checkpoint inhibitors) způsobila v posledních letech revoluci v léčbě několika typů nádorů. V roce 2011 byl FDA (Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) schválen první checkpoint inhibitor – anti CTLA-4 protilátka (ipilimumab) pro léčbu metastatického maligního

melanomu. Od té doby bylo schváleno několik dalších molekul a účinnost anti-PD-1/PD-L1 protilátek byla prokázána nejen u melanomu, ale také u devíti různých typů nádorů (1) a ICIs jsou dnes předmětem více než 150 klinických studií jak v monoterapii, tak i v rámci kombinačních režimů (1). Přestože ICIs prokázaly u některých pacientů dlouhodobé přežití, efekt léčby je pozorován pouze u 20–40 % všech pacientů

(2). Neúčinná léčba ICIs vede nejen k nežádoucím účinkům imunoterapie, ale i k významné finanční toxicitě. Proto je vyvíjeno nemalé úsilí ke zkoumání interakcí mezi nádorovými buňkami a imunitním systémem, které by vedly k personalizaci léčby ICIs. Tento přehledový článek shrnuje potenciální biomarkery na třech úrovních: prediktory z nádorové tkáně (mutační nálož nádoru, mikrosatelitní instabilita), mikroprostředí (PD-L1



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: MUDr. Simona Bořilová, s.borilova@gmail.com
Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno
Žlutý Kopec 7, 656 53 Brno

Cit. zkr: Onkologie 2020; 14(5): 205–212
Článek přijat redakcí: 3. 9. 2020
Článek přijat k publikaci: 10. 9. 2020

expres, tumor-infiltrující lymfocyty) a faktory spojené s hostitelem (mikrobiom, imunoprofilování periferní krve).

Tumor mutational burden (TMB, mutační nálož nádoru)

TMB je definován jako celkový počet somatických nesynonymních mutací v kódujících oblastech genů (3). Nesynonymní mutace narozdíl od těch synonymních mají za následek změnu jedné nebo více aminokyselin a vedou ke změně funkce a struktury proteinu. Takto pozměněné proteiny mohou sloužit jako neoantigeny a po prezentaci na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) i indukovat odpověď T-buněk (4). Předpoklad, že vyšší počet mutací v nádoru může korelovat s větší produkcí neoantigenů a tím zvyšovat imunogenicitu nádoru, vedl ke zkoumání TMB jako možného prediktivního faktoru léčby ICIs. První studie prokazující spojitost mezi TMB a účinností imunoterapie (anti-CTLA-4 protilátky) publikovali Snyder a kol. u maligního melanomu v roce 2014 (5). Za poslední roky byla tato hypotéza podpořena celou řadou dalších prací (6–13). Z výsledků klinických studií vyplývá, že vysoká mutační nálož vede k lepší odpovědi na terapii ICIs, avšak ne u všech nádorů zaručí vysoká TMB významnou léčebnou odpověď. Otázkou vztahu mezi vysokou TMB a produkcí imunogenních epitopů se zabývali ve své práci Yadav a kol. S využitím celoxomového sekvenování, sekvenování transkriptomu a hmotností spektrometrie testovali nádory z myších modelů. Z celkových 4285 nesynonymních alterací bylo identifikováno 170 pravděpodobných neoepitopů. Avšak k úspěšné protinádorové imunitní reakci je nutné, aby byl daný neoantigen prezentovaný na MHC I komplexu a rozpoznán CD8+ T lymfocyty. Yadav a kol. zjistili, že ze všech 170 přepokládaných neoepitopů jenom 7 bylo prezentováno na MHC I komplexu a z nich pouze 3 byly rozpoznány CD8+ T lymfocyty (14). Můžeme tedy říct, že vysoká mutační nálož zvyšuje pravděpodobnost vzniku imunogenního epitopu, ale ne všechny mutace jsou schopné generovat imunogenní neoantigeny.

Pro zařazení prediktivního faktoru do běžné praxe musí být jeho test běžně dostupný a cenově přijatelný. TMB byla původně ve studiích stanovována pomocí celoxomového sekvenování, (whole-exome sequencing, WES). Využití WES má v současné době velmi omezené využití v kli-

nické praxi, a to díky dlouhému sekvenačnímu času, vysoké ceně a velkým nárokům na množství materiálu. WES vyžaduje minimálně 150 až 250 ng genomické DNA, což může být obtížné získat bioticky (15). Proto se nyní atraktivními alternativami pro výpočet TMB stávají panely cílené na geny v rámci komplexního genomického profilování (CGP). Cílené CGP panely na rozdíl od WES, který umožňuje detekci somatických mutací přítomných v celém exomu (~ 2 % lidského genomu, tj. 30 až 50 Mb kódujících sekvencí) (16), pokrývají jenom skupinu předem vybraných genů, případně genomových oblastí. Hlavními přednostmi cílených sekvenačních panelů jsou tedy nižší cena, kratší doba testování, potřeba menšího množství DNA a také díky větší hloubce čtení i větší senzitivita. Největší limitací cílených panelů je nízká šíře pokrytí (počet genů), která může vést k nezachycení potenciálně klinicky významné varianty. Šíře pokrytí zásadně určuje přesnost měření TMB založeného na cílených NGS panelech. Chalmers et al. prokázali, že sekvenování přibližně 1,1 Mb (≥ 315 genů) vedlo k podobnému výsledku TMB jako u WES. Naopak sekvenování $\leq 0,5$ Mb již vedlo k neakceptovatelným rozdílům v hodnotě TMB mezi CGP panely a WES (17). Proto v klinické praxi lze použít CGP panely pro výpočet TMB provést pouze v případech, že panel pokrývá 300 a více genů, co odpovídá přibližně 1 milionu bází = 1 Mb (18).

TMB v roli prediktoru imunitní odpovědi čelí v postanalytické fázi podobným výzvám jako například exprese PD-L1. Hlavním problémem nadále zůstává definice nádorů s vysokou mutační náloží, které budou reagovat na léčbu checkpoint inhibitory. Objektivní mezní (cut-off) hodnoty pro TMB nejsou dosud všeobecně stanoveny, a to i přes obrovské množství studií dokazujících souvislost mezi vysokou TMB a odpovědí na léčbu checkpoint inhibitory. Problémem je právě velká heterogenita klinických studií v hodnocení TMB, a to nejenom v analytické části (využití WES nebo CGP panelů), ale také v interpretaci výsledků. V některých studiích byl za cut-off hodnotu stanoven medián TMB, v jiných byli pacienti rozdělení do tertilií nebo kvartilů dle rozložení TMB ve zkoumaném souboru. Další odlišnosti zjistíme porovnáváním cut-off hodnot pro vysokou TMB napříč histologickými typy nádorů. Například ve studiích s NSCLC využívající celoxomové sekvenování (WES) byly stanovené mezní hodnoty

pro TMB 158 (medián) (19), 200 (medián) (6) a 243 (horní tercil) (20) mutací na exom. Studie s SCLC si stanovila jako horní tercil TMB 248 mutací na exom (21), což je do značné míry srovnatelné s NSCLC. Na druhé straně ve studii s uroteliálním karcinomem byla mutační nálož potřebná k signifikantnímu prodloužení PFS výrazně nižší – v horním tertili 167 mutací na nádor (22). Velmi zajímavým příkladem, že i nádory s nízkým TMB mohou mít výraznou odpověď na imunoterapii, je karcinom z Merkelových buněk (23). Důvodem jsou genové změny způsobené integrací DNA sekvencí Merkelůvho polyomaviru do buněčného genomu, které jsou snadněji identifikované jako cizí antigeny a tím s větší pravděpodobností indukují robustní protinádorovou imunitní odpověď (15, 24). Z výše uvedených příkladů je zjevné, že TMB nebude možné pokládat za tumor agnostický biomarker a jeho stanovení cut-off by mělo zohledňovat i další vlastnosti nádoru. I proto bylo ne zcela jednoznačně přijato nedávné rozhodnutí FDA o schválení indikace terapie pembrolizumabem u pacientů se solidními tumory s TMB ≥ 10 (25).

Mikrosatelitní instabilita

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA (obvykle 1–6 nukleotidů dlouhé) tandemově se opakující v celém genomu. Mikrosatelitní nestabilita (MSI – microsatellite instability) nastává, když genom získá nebo ztratí ≥ 1 opakující se DNA úsek. DNA opravný mechanismus zodpovědný za opravy těchto chyb se nazývá mismatch repair systém (MMR, reparační systém chybného párování). MMR neopravuje pouze chybně zařazené nukleotidy, ale je schopný opravit i inserce a delece v délce několika nukleotidů. Mutace v MMR systému vedou k nemožnosti opravit chyby v mikrosatelitních oblastech a takový nádor se stane mikrosatelitně nestabilní. Kolorektální karcinom (CRC) s defektním MMR systémem má tedy 10–100x více somatických mutací než mikrosatelitně stabilní (MSS – microsatellite stable) CRC (26). První náznak, že by MSI mohla predikovat klinickou odpověď na ICIs vycházela z pozorování, že navzdory obecně nízké míře léčebné odpovědi na ICIs u kolorektálního nádoru, byla u pacienta s metastatickým CRC (mCRC) léčeným nivolumabem ve studii fáze I pozorována úplná a dlouhodobá léčebná odpověď. Pozdější analýza tohoto nádoru odhalila jeho mikrosatelitní instabilitu (27, 28).

Další molekulární a genetické analýzy prokázaly, že mCRC s vysokou mikrosatelitní nestabilitou (MSI-H) vykazovaly vyšší infiltraci cytotoxickými T-buňkami ve srovnání mikrosatelitně stabilními (MSS) nádory tlustého střeva (29). Analýzou exprese kódujících genů pro receptory kontrolních bodů: CTLA-4, PD-1 a LAG-3 byly exprimované ve statisticky významně vyšších hladinách v MSI-H nádorech ve srovnání s MSS nádory (30). V neposlední řadě genetická analýza celoxomovým sekvenováním ukázala statisticky vyšší průměrný počet mutací (1 782 mutací) u MSI-H nádorů ve srovnání s MSS nádory (73 mutací), $p=0,007$. MSI-H nádory také vykazují vyšší neoantigenní potenciál. Průměrný počet potenciálních neoantigenů u MSI-H nádorů byl 578, což je signifikantně vyšší počet ve srovnání s MSS nádory, u kterých bylo identifikováno jenom 21 potenciálních neoantigenů (31). Klinická studie II. fáze KEYNOTE 164 potvrdila výborný efekt ICIs u pacientů s MSI-H metastatickým kolorektálním karcinomem. V obou kohortách (vyměněné kohorty: $A \geq 2$ a $B \geq 1$) při průměrné době sledování 31,3 měsíců (skupina A) a 24,2 měsíců (skupina B) byl dosažen ORR 33 % (overall response rate, celková četnost odpovědi) (32).

V květnu 2017 FDA schválila léčbu anti PD-1 protilátkou (pembrolizumabem) pro všechny MSI-H nádory. Poprvé v historii byl lék schválen jenom na základě molekulární charakteristiky bez ohledu na histopatologický typ nádoru. Data, která vedla k tomuto urychlenému schválení, pocházela z 5 klinických studií fáze II, které zahrnovaly celkem 149 pacientů s 15 typy nádorů. Z nich pouze 59 pacientů mělo ne-kolorektální typ nádoru. Ostatních 14 typů nádorů bylo ve studiích prezentováno výrazně menším počtem pacientů a 7 typů nádorů bylo dokonce zastoupeno pouze jedním pacientem (33, 34).

Z výše uvedeného vyplynula potřeba další studie zaměřené na MSI-H ne-kolorektální druhy nádorů. Na tuto oblast se zaměřila studie KEYNOTE-158, která hodnotila léčebný efekt pembrolizumabu u 27 typů solidních MSI-H nádorů (vyjma CRC). Celkem bylo do studie zahrnuto 233 pacientů, kteří byli léčeni pembrolizumabem v 3týdenních intervalech maximálně 48 měsíců. Při mediánu sledování 13,4 měsíců, 33,4 % pacientů dosáhlo objektivní odpovědi. Avšak ORR se statisticky významně lišilo dle

histopatologického typu primárního nádoru. Například pacientky s endometriálním karcinomem měly výrazně vyšší ORR (57,1 %) v porovnání s pacienty s karcinomem pankreatu (18,2 %) a CNS nádory (0 %). Nízké ORR se projevilo i v celkovém přežití těchto pacientů (medián OS u pacientů s karcinomem pankreatu 4,0 měsíce a 5,6 měsíců u pacientů s nádory CNS) (35). Tyto výsledky potvrzují, že většina pacientů s MSI-H solidními nádory bude profitovat z léčby ICIs, ale významně nižší ORR a OS (overall survival, celkové přežití) u pacientů s karcinomem pankreatu a nádory CNS popírají přesvědčení, že MSI může sloužit jako tumor agnostický biomarker.

Tumor infiltrující lymfocyty (TILs)

Bez ohledu na léčbu ICIs může infiltrace tumoru lymfocyty výrazně ovlivnit prognózu pacienta. Například vyšší stupeň infiltrace primárního melanomu lymfocyty je spojen s nižším rizikem úmrtí v důsledku melanomu (36). Protože terapie ICIs je založená na opětovné aktivaci již preexistujících T-lymfocytů, je možné považovat tumor infiltrující lymfocyty (TILs) za další potenciální biomarker pro terapii ICIs. Imunohistochemické hodnocení infiltrace CD8+ T lymfocyty u 46 pacientů s maligním melanomem před zahájením léčby pembrolizumabem prokázalo, že pacienti odpovídající na léčbu měli vyšší hustotu CD8+ lymfocytů uvnitř a na invazivních okrajích nádoru (37). Korelace mezi infiltrací CD8+ a zlepšením ORR byla také prokázána i ve studiích zkoumajících RCC (renal cell carcinoma, renální karcinom) u pacientů léčených protilátkami anti-PD-L1 a anti-VEGF (38). Pacientky léčené atezolizumabem pro TNBC (triple negative breast cancer), které měly nádorovou infiltraci lymfocyty $> 10\%$ nebo infiltraci tumoru CD8+ T lymfocyty $\geq 1,35\%$ dosáhly vyššího ORR a delšího OS (39). Tento prediktivní potenciál TILs u pacientek s TNBC léčených atezolizumabem byl prokázán i ve studii KEYNOTE-086 (40).

Dle rozložení a hustoty infiltrace nádoru T lymfocyty mohou být nádory velmi zjednodušeně rozděleny do tří fenotypických skupin (41).

Imunitně zánětlivý fenotyp (immune-inflamed)

Imunitně zánětlivý typ nádoru je charakterizován přítomností obou CD8+ a CD4+ T buněk, které se nacházejí v blízkosti nádorových bu-

něk. Tento typ je obvykle doprovázen expresí PD-L1 na TILs a na nádorových buňkách (41). Tyto nádory jsou spojené s lepší odpovědí na léčbu ICIs (37).

Imunitně „vyloučený“ fenotyp (immune-excluded)

Tento fenotyp je charakterizován přítomností různých typů imunitních buněk, které ale nepronikají do parenchymu nádorů, a místo toho se nacházejí v okolním stromatu nádoru (41). Po anti-PD-1/ PD-L1 léčbě dochází k určitým známám aktivace T lymfocytů, nikoliv však k jejich pronikání do nádorových struktur a odpověď na imunoterapii je vzácná.

Imunitně „vyprahlý“ fenotyp

Imunitně „pouštní“ fenotyp je charakterizován malou hustotou T buněk v parenchymu nebo ve stromatu nádoru (41). Není tedy překvapivé, že tyto nádory nereagují dobře na terapii ICIs (42).

I když pouhá přítomnost zánětlivých elementů sama o sobě může reflektovat určitý stav protinádorové imunitní odpovědi, přibývají důkazy, že složení zánětlivého infiltrátu má pro léčbu ICIs větší prediktivní hodnotu. Například u pacientů s maligním melanomem léčených nivolumabem po předchozí léčbě anti-CTLA4 hustota TIL nekorelovala s odpovědí na léčbu, ale v té samé skupině byla léčebná odpověď na nivolumab spojena se zvýšenými hladinami efektorových CD8+ buněk v nádoru (43). Dnes víme, že nádorové CD8+ T lymfocyty hrají základní roli v protinádorové imunitě, avšak jejich podrobnější zkoumání vede k lepšímu pochopení imunitní reakce a nalezení nových prediktorů. Analýza subpopulací CD8+ T lymfocytů u pacientů s NSCLC odhalila 3 různé podskupiny CD8+ T lymfocytů na základě exprese PD-1. Kromě CD8+ T-lymfocytů s nízkou a střední expresí PD-1, byli nalezeni CD8+ T lymfocyty s vysokou expresí PD-1 (PD-1+ T lymfocyty). Právě tyto lymfocyty produkují chemokin CXCL13, který usnadňuje přísun folikulárních pomocných T a B lymfocytů do nádorového mikroprostředí a tím podporuje tvorbu nádorových terciárních lymfoidních struktur (TLS), které mají zásadní význam pro efektivní protinádorovou odpověď. Přítomnost PD-1+ T lymfocytů se tedy ukázala jako silný prediktor léčebné odpovědi u pacientů s NSCLC léčených anti-PD-1 protilátkou (44).

V další studii byly u pacientů s maligním melanomem léčených ICIs (31 pacientů) identifikovány 2 velké fenotypové skupiny CD8+ T lymfocytů: paměťové CD8+ (exprese transkripčního faktoru TCF7) a vyčerpané CD8+ T lymfocyty. Poměr paměťových a vyčerpaných tumor infiltrujících CD8+ T lymfocytů větší než 1 byl asociován s lepší léčebnou odpovědí i když nebyly nalezeny žádné významné rozdíly v celkové infiltraci nádoru TILs (45).

Účinnost ICIs může ovlivnit mnoho dalších typů imunitních buněk. Například u adenokarcinomu pankreatu léčba ICIs vedla pouze k omezenému klinickému efektu (46, 47). I když k rezistenci adenokarcinomu pankreatu na ICIs může přispět několik faktorů, jedním z dominantních důvodů může být přítomnost imunosupresivního mikroprostředí. Mezi hlavní složky tohoto imunosupresivního mikroprostředí patří s nádorem asociované makrofágy (TAM), monocytární myeloidní supresorové buňky (M-MDSC) a polymorfonukleární MDSC (PMN-MDSC). Předchozí výzkumy prokázaly, že kombinace cytotoxické chemoterapie s blokádou receptoru kolonie stimulujícího faktoru 1 (CSF1R), který je vysoce exprimován na monocitech, M-MDSC buňkách a makrofázích, vede ke zlepšení protinádorové T lymfocytární reakce (48, 49). Také analýza nádorových vzorků maligního melanomu před a po cca 29 dnech léčby ICIs odhalila, že odpověď na léčbu anti-PD1 protilátkou byla spojena nejenom se zvýšenou infiltrací nádoru CD8+ T lymfocyty, NK buňkami (natural killer cells, přirození zabijáci) ale také s poklesem makrofágů (50). Obdobné výsledky ukázala i další studie u pacientů s maligním melanomem léčených anti-PD-1 protilátkou, kde vysoký poměr mezi CD8+ a TAM (relativně vyšší hustota CD8+ oproti TAM) byl spojen s lepší odpovědí na léčbu ICIs (51).

Hodnocení zánětlivé nádorové celulózy je slibným prediktorem pro terapii ICIs, avšak jeho současné využití v klinické praxi není zatím podloženo dostatkem důkazů. Také naráží další problémy, jak metodické, tak i na velkou komplexnost imunitní odpovědi s velkým množstvím subpopulací nejenom T lymfocytů ale i imunosupresivních buněk.

PD-L1 exprese

PD-L1 je hlavním ligandem PD-1 receptoru, je exprimován na různých typech buněk, a to jak na antigen prezentujících buňkách (dendritické buňky

a makrofágy), tak také konstitutivně na dalších tkáních jako jsou srdce, plíce, játra, endotel, neurony, keratinocyty, pankreas atd. (52, 53). Vazba PD-1/PD-L1 inhibuje funkci aktivovaných T-buněk, což je důležitý negativní zpětnovazební mechanismus pro kontrolu zánětu a autoimunity v efektorové fázi aktivace T-lymfocytů (53). Některé nádorové buňky převzaly tento regulační mechanismus a exprimují na svém povrchu PD-L1, jehož následná vazba na PD-1 vede k inhibici aktivace T-lymfocytů, což umožňuje nádoru vyhnout se imunitnímu útoku. Expres PD-L1 může být řízená jak cestami adaptivní imunity (prostřednictvím signální cesty IFN- γ), tak také onkogenními mechanismy (např. amplifikací genů) (28).

PD-L1 exprese se stala jedním z prvních biomarkerů pro predikci léčby ICIs a nadále zůstává jedním z nejrozsáhlejších prediktorů (54). V roce 2010 byly publikovány výsledky první studie, která poskytla data o korelaci mezi expresí proteinu PD-L1 v nádorových buňkách a odpovědí na anti-PD-1 terapii (nivolumab) (55). Následující roky byly publikovány další studie dokazující prediktivní hodnotu exprese PD-L1. V roce 2012 Topalian et al. publikovali studii hodnotící vztah mezi PD-L1 expresí a účinností imunoterapie. Ze 42 pacientů, kteří byli léčeni anti-PD-1 protilátkou, mělo 25 pacientů nádor s pozitivní expresí PD-L1 (5 % hranice pozitivita) a z nich 9 pacientů dosáhlo léčby odpovědi na imunoterapii. U žádného pacienta ze 17 pacientů s negativní expresí PD-L1 nebyla zaznamenána léčebná odpověď (56). Studie KEYNOTE-001 prokázala, že pacienti s NSCLC léčení pembrolizumabem s expresí PD-L1 ≥ 50 % na nádorových buňkách dosahují lepší léčebné odpovědi. U pacientů v expresí PD-L1 v nádoru ≥ 50 % byl medián OS u nepředléčených 34,9 měsíců vs. 19,5 měsíců (expres PD-L1 < 50 %) a u předléčených pacientů 15,4 vs. 8,5 měsíců (expres PD-L1 < 50 %) (57). Také pacienti s mRCC (metastatickým renálním karcinomem) léčení nivolumabem dosáhli vyšší léčby odpovědi, pokud jejich nádor vykazoval expresí PD-L1 ≥ 5 % (58).

Avšak i pacienti s PD-L1 negativním tumorem mohou dosáhnout klinického benefitu z terapie ICIs (59, 60). Jedna z nekomplexnějších studií zkoumající prediktivní hodnotu exprese PD-L1 byla metaanalýza 8 prospektivních randomizovaných studií, která zahrnovala 4 174 pacientů u 5 různých typů pokročilých nebo metastatických nádorů (61). Tato analýza ukázala, že ve srovnání s chemoterapií bylo podávání

ICIs spojeno s významně vyšším OS u obou skupin pacientů jak PD-L1 pozitivních (HR 0,66; 95 % CI, 0,59–0,74) tak i u PD-L1 negativních (HR 0,80; 95 % CI, 0,71–0,90). Přestože účinnost ICIs byla vyšší u pacientů, kteří byli PD-L1 pozitivní ($p = 0,02$), stále významné procento PD-L1 negativních pacientů odpovídalo na léčbu ICIs. V této metaanalýze byla za cut-off hodnotu pro definici pozitivitu PD-L1 stanovená 1 % exprese PD-L1 v nádorových buňkách. Kromě tohoto se PD-L1 exprese jako prediktivní faktor terapie ICIs potýká s i dalšími problémy jako (62).

- Standardizace imunohistochemických esejí.
- Stanovení optimální cut-off hodnoty pro definici pozitivitu.
- Určení závislosti optimální cut-off hodnoty na typu nádoru nebo na typu léčebné protilátky (PD-1/PD-L1).
- Vliv nádorové heterogenity na prediktivní schopnost PD-L1 exprese.
- Kontinuální změny exprese PD-L1 v nádorové tkáni.
- Vliv místa detekce PD-L1 exprese prediktivní sílu testu:
 - v metastatických ložiscích nebo v primárním nádoru,
 - v nádorových buňkách, ve stromálních buňkách nebo kombinace obou.

I přes vynikající prediktivní výsledky PD-L1 exprese ve studii KEYNOTE-001 je důležité si uvědomit, že PD-L1 jako prediktivní biomarker má ještě řadu nevyřešených otázek a samotná PD-L1 negativita neznamená, že pacient nemůže profitovat z terapie ICIs.

Biomarkery z periferní krve

Biomarkery z periferní krve mají několik významných charakteristik. Za prvé jsou snadno dostupné, což umožňuje analýzu v časových odstupu. Za druhé jsou nezávislé na heterogenitě nádoru a za třetí mohou reprezentovat více zajímavých míst, jako jsou nádorové buňky, mikroprostředí a imunitní systém pacienta.

Sérové markery

Solubilní sérové proteiny se v roli biomarkeru na imunoterapii objevily v 90. letech minulého století, kdy se prokázalo, že u pacientů s RCC léčených interleukinem-2 vedla vysoká hladina CRP (C-reaktivní protein) a IL-6 (interleukin 6) k výrazně nižší ORR (63). Zvýšené sérové hladiny

CRP, VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor) a LDH (laktátdehydrogenáza) byly spojeny s horšími klinickými výsledky u pacientů s maligním melanomem léčených ipilimumabem. Analýza sér od 176 pacientů provedená před léčbou antiCTLA4 protilátkou prokázala, že hladiny VEGF ≥ 43 pg/ml jsou spojeny se signifikantně nižším OS (64). Zvýšená hladina LDH v séru také prokázala svůj negativní prognostický potenciál. Pacienti s maligním melanomem léčení antiCTLA4 protilátkou, kteří měli hladiny LDH $>$ ULN (upper limit of normal, horní hranice normy), dosáhli výrazně kratšího mediánu celkového přežití (medián OS 14,7 měsíců pro normální hladinu LDH vs. 3,7 měsíců pro LDH $>$ ULN; $p < 0,001$) (65). Také klesající hladiny LDH a CRP po 12 týdnech léčby ipilimumabem u pacientů s maligním melanomem významně korelovaly s celkovým přežitím pacientů (66). I u pacientů s NSCLC léčených anti PD-1 protilátkou byly hladiny CRP nad 50 mg/l před léčbou spojené horším OS (67). Ačkoli jsou tyto biomarkery často komerčně dostupné, v současné době není jasné, zda tyto biomarkery mají prediktivní nebo pouze prognostickou hodnotu.

Imunoprofilování periferní krve

Podobně jako sérové solubilní markery, jsou imunitní buňky v periferní krvi, jako T lymfocyty, NK buňky, dendritické buňky a makrofágy studovány jako prediktivní faktory léčby ICIs. Protože terapie ICIs zvyšuje protinádorovou imunitní odpověď aktivací a proliferací T buněk, představuje ALC (absolute lymphocytes count, absolutní počet lymfocytů) potenciální farmakodynamický biomarker. Tato teorie byla potvrzena několika studiemi. U pacientů s NSCLC se ALC po 6 týdnech léčby nivolumabem ukázal jako pozitivní prediktivní faktor pro OS (68). Na druhé straně lymfopenie ($ALC < 1000$) před zahájením léčby ICIs byla spojena se signifikantně kratší dobou do progresu (PFS, progression-free survival) u pacientů léčených ICIs (69). Martens a kol. objevili nárůst počtu CD8+, CD4+ a CD3- (NK buňky a B lymfocyty) lymfocytů u pacientů odpovídajících na léčbu ICIs. Pokud ale byla analyzována každá podskupina těchto lymfocytů samostatně, nárůst jejich počtu nebyl statisticky významný (70). Zdá se tedy, že všechny tři zkoumané buněčné subpopulace přispívají k časnému zvýšení ALC asociovaného s delším OS. Vzhledem k tomu, že ALC obsahuje velkou variabilitu lymfocytární

podskupin je velký zájem charakterizovat změny během léčby ICIs v konkrétních podskupinách lymfocytů.

T lymfocyty rozdělujeme na dvě velké skupiny: CD8+ cytotoxické lymfocyty a pomocné CD4+ lymfocyty. Cytotoxické CD8+ T lymfocyty (CTL) jsou považovány za hlavní efekторы protinádorové imunitní odpovědi. CTL vznikají z naivních CD8+ T lymfocytů aktivovaných pomocí antigen prezentující buňky (APC) v lymfoidních orgánech. Další CTL mohou vznikat aktivací efektorových paměťových T lymfocytů. Tento mechanismus umožňuje rychlejší aktivaci imunitní odpovědi po opětovném setkání s nádorovými antigeny. Naivní CD4+ T lymfocyty rozpoznávají nádorové antigeny podobně jako CD8+ T lymfocyty, ale k prezentaci APC využívají MHC-II na rozdíl od CD8+, které používají MHC-I. Po aktivaci CD4+ T lymfocyty proliferují a diferencují do pomocných podskupin (Th1, Th2, Th9 a Th17) nebo regulačních T (Treg) buněk v závislosti na cytokinech.

Vzhledem k tomu, že aktivace CD8+ a některých skupin CD4+ T lymfocytů vede k protinádorové odpovědi, není překvapující, že počet CD8+ nebo CD4+ je pokládán za potenciální prediktor pro terapiích ICIs. Například ve studii s maligním melanomem u pacientů léčených ipilimumabem, Martens a kol. zjistili, že procentuální nárůst CD4+ a CD8+ T lymfocytů (8–14 týdnů po zahájení léčby) koreloval s delším celkovým přežitím pacientů (70). Opět u pacientů s maligním melanomem léčených ipilimumabem analýza paměťových efektorových CD8+ T lymfocytů prokázala, že zvýšení výchozí hladiny paměťových efektorových T lymfocytů korelovalo s lepší odpovědí na léčbu a delším OS (71, 72). Na druhou stranu u pacientů s maligním melanomem léčených pembrolizumabem neprokázala hladina těchto buněk pozitivní prediktivní hodnotu (71).

CD4+ T lymfocyty jsou velmi heterogenní skupinou s velkým spektrem imunitních účinků. Například jednou ze subpopulací CD4+ lymfocytů jsou Th9 lymfocyty produkující IL-9 a jejich role v protinádorové imunitě zůstává protichůdná. Na jedné straně IL-9 podporuje proliferaci, migraci a adhezi nádorových buněk (73), ale dle pokusů na myších modelech měla sekrece IL-9 negativní účinek na proliferaci a migraci melanomových nádorových buněk (74). Efekt IL-9 produkujících lymfocytů zkoumala studie u 46 pacientů s maligním melanomem

léčených nivolumabem. A přesto, že v této studii nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v LDH, ALC, CD8+ ani CD4+ T lymfocyty mezi respondery a non-respondery, byla hladina Th9 CD4+ po 3 týdnech léčby ICIs významně vyšší u responderů (75).

Neméně zajímavou podskupinou T lymfocytů jsou ICOS+ CD4+ T buňky. ICOS (inducible T-cell costimulator) je exprimován na buněčném povrchu čerstvě aktivovaných T buněk, které hrají roli v expanzi a zrání B lymfocytů (76). U pacientů s maligním melanomem, karcinomem močového měchýře, karcinomem prsu a mezoteliomem se po léčbě antiCTLA-4 protilátkou zvýšila četnost ICOS+ CD4+ T buněk (77–81). Kromě toho byl pozorován taky trvalý nárůst CD4+ ICOS+ T buněk během terapie anti CTLA-4 protilátkou, který koreloval s prodloužením přežitím (77, 79).

CD4+ FoxP3+ neboli regulační T lymfocyty mají v imunitním systému nezastupitelnou roli v regulaci imunitní odpovědi, protože přispívají k potlačování periferní autoreaktivity, avšak v nádorovém mikroprostředí se podílejí na inhibici protinádorové imunitní odpovědi. V souladu s tímto bylo prokázáno, že pokles Treg periferní krvi po léčbě ipilimumabem u pacientů s maligním melanomem byl spojen s lepší léčebnou odpovědí a delším OS (82) a procento CD25+ FoxP3+ CD4 (Treg) v celé populaci CD4+ lymfocytů bylo u pacientů s NSCLC léčených nivolumabem vyšší u non-responderů (83). V rozporu s těmito výsledky Martens a kol. analyzovali startovní hladiny imunitních buněk v periferní krvi a zjistili, že vyšší procentuální zastoupení Treg bylo asociováno s delším OS (84) u pacientů s maligním melanomem léčených ipilimumabem. Tento protichůdný výsledek ukázala i další studie u pacientů s maligním melanomem léčených ipilimumabem, která ukázala, že počáteční vyšší exprese FoxP3 v nádorové tkáni koreluje s delším OS (85). Tento paradox je možné vysvětlit buď expresí FoxP3 i jinými populacemi T buněk než Tregs, nebo exprese Treg může být indukována prozánětlivými cytokiny přítomnými v mikroprostředí nádoru (85).

MDSC jsou heterogenní skupinou, která inhibuje funkci lymfocytů indukci regulačních T lymfocytů, produkci TGF- β (transforming growth factor) a sekvestrací aminokyselin (argininu, tryptofanu nebo cysteinu) potřebných pro funkci T lymfocytů (86). MDSC sestávají ze dvou hlavních podskupin: polymorfonukleární MDSC (PMN-MDSC), jejich fenotyp je podobný granulocytům a monocytární MDSC (M-MDSC), které jsou feno-

typově podobné monocytům (87) Meyer a kol. prokázali u pacientů s maligním melanomem vyšší zastoupení M-MDSC mezi monocytárními CD14+ buňkami v porovnání se zdravou populací (88). Tato vyšší frekvence M-MDSC byla spojena i s vyšší metastatickou náloží (88). Autoři také u té samé skupiny pacientů hodnotili prediktivní sílu zastoupení M-MDSC v monocytech na léčbu ipilimumabem a prokázali, že pacienti odpovídající na léčbu antiCTLA-4 protilátkou vykazovali signifikantně nižší zastoupením M-MDSC (88). Již na začátku léčby ICIs nastávají změny v zastoupení jednotlivých imunitních parametrů, které mohou predikovat odpověď na léčbu ICIs. Například pacienti s dobrou klinickou odpovědí dosahovali významného snížení frekvence M-MDSC po první dávce ipilimumabu (po 3 týdnech). Je zajímavé, že v tomto souboru u všech pacientů s klinickým přínosem, kteří vykazovali M-MDSC nad stanoveným mezním bodem 13,05 %, došlo po první dávce ipilimumabu ke snížení M-MDSC (89). Ve skupině pacientů s NSCLC léčených nivolumabem vykazovali respondéři před zahájením léčby vyšší procento Tregs, ale nebyl nalezen žádný významný rozdíl v PMN-MDSC. To se ale změnilo hned po první dávce. Medián procentuálního zastoupení Tregs zůstal u respondérů bez signifikantní změny, zatímco medián procentuálního zastoupení PMN-MDSC byl u respondérů významně nižší než u non-respondérů (90).

Díky velmi jednoduché dostupnosti vzorků periferní krve a možnosti jejich opakovaného získávání během léčby, se stávají periferní krevní elementy velmi lákavým biomarkerem. Avšak potýkají se s podobnými problémy jako sérové biomarkery. Za prvé není jasné nakolik se jedná o prediktivní nebo prognostický marker. Za druhé kvůli obrovské komplexnosti imunitní protinádorové reakce, nebude možné za prediktivní faktor označit jenom jeden imunitní parametr, ale spíše na základě více parametrů a jejich vzájemných poměrů budeme moci určit míru efektivity pacientovy protinádorové imunity. Během léčby ICIs se v praxi při CT (computed tomography) hodnocení odpovědi setkáváme s dilematem mezi progresí a tzv. pseudoprogresí nádoru. Znalost dynamiky periferních imunitních elementů a jejich prediktivní hodnoty by v klinické praxi mohla napomoci k určení léčebního efektu ICIs a také v diagnostice toxicity imunoterapie.

Mikrobiom

Komensální bakterie jsou užitečné při udržování imunitní homeostázy hostitele, proto tyto bakterie v současnosti přitahují pozornost jako nový biomarker lidského zdraví. Zejména střevní mikrobiota (vážíci přibližně 1,5 kg) je nejdůležitějším typem mikrobiomu (91). Střevní mikrobiom ovlivňuje imunitu lokálně na slizniční úrovni i systémově.

Studie prokázaly, že gastrointestinální sliznice může regulovat imunitní odpovědi i ve vzdálených orgánech prostřednictvím migrace lymfoidních buněk nebo zánětlivých mediátorů (91). Podobně jako u jiných onkologických terapií existuje mezi pacienty značná variabilita odpovědi na ICIs. Předchozí studie naznačují, že právě střevní mikrobiom může vysvětlit interindividuální variabilitu v léčebné odpovědi na ICIs (92).

Například studie zkoumající dopad léčby antibiotiky na terapeutický efekt imunoterapie u 249 pacientů (NSCLC, RCC nebo uroteliální karcinom) léčených anti PD-1/PD-L1 protilátkou prokázala významně kratší PFS a OS ve skupině léčené antibiotiky bez ohledu na histopatologický typ nádoru i v rámci jednoho typu nádoru. Vzhledem k tomu, že antibiotika mohou přechodně změnit složení střevního mikrobiomu, můžeme z těchto výsledků usuzovat, že střevní mikrobiom může ovlivnit terapeutickou účinnost imunoterapie (93). Přímý důkaz o souvislosti mezi mikrobiálním složením střevní mikrobioty a klinickou odpovědí poskytla studie Matsona a kol. Ti analyzovali vzorky stolice před zahájením léčby u 42 pacientů s maligním melanomem léčených anti PD-L1 protilátkou. Prokázali, že bakteriální druhy hojně se vyskytující u respondentů zahrnovaly *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens* a *Enterococcus faecium*. Zajímavé bylo, že transplantace stolice od responderů myším zbavených bakterií vedla u myší k větší účinnosti anti-PD-L1 terapie a také ke zvýšení protinádorové T buněčné odpovědi (94). Další pokusy na myších modelech ukázaly, že 11 specifických bakteriálních kmenů získaných ze stolice zdravých lidských dárců působí indukci IFN- γ CD8+ T buněk, čímž se zvyšuje účinnost ICIs (95). Tyto pokusy na myších prokázaly, že účinek mikrobiomu na efektorové T-buňky, může být mechanismem, kterým střevní mikrobiom vede ke zlepšení terapeutického účinku ICI.

Fekální mikrobiální transplantace (FMT) představuje nejpřímější metodu pro modifikaci

střevní mikrobioty. Preparáty pro FMT lze podávat pacientům orálně formou lyofilizovaných nebo zmrazených pilulek nebo přímo pomocí kolonoskopie nebo gastroscopie. Na myších modelech vedla fekální transplantace stolice od pacientů s dobrou odpovědí na léčbu anti-CTLA-4 protilátkou ke zlepšení léčební odpovědi na ICIs (96). V současné době je FMT zkoumána v několika klinických studiích s ICIs, které sledují její vliv na léčebnou odpověď nebo zlepšení toxicity spojené s imunoterapií. I přes zajímavé prvotní výsledky, zůstává FMT zatím metodou experimentální a je potřeba dalších prospektivních studií (97).

Přestože několik klinických studií prokázalo spojitost určitého střevního mikrobiálního profilu s efektivitou ICIs (98–100), využití profilování střevního mikrobiomu v praxi zůstává zatím velmi omezené. Důvodem je malý počet zařazených pacientů ve studiích s velmi selektovanými populacemi pacientů a také různé techniky sběru s odlišnými metodami sekvenování, které omezují přesnost a možnosti srovnání těchto studií.

Závěr

Protinádorová imunitní reakce je složitý několika stupňový proces a hlavní úlohou ICIs je augmentace této reakce. Avšak její efektivita může být ovlivněna pozitivně nebo negativně mnoha faktory jako například imunitním stavem pacienta (podíl supresivních a efektorových buněk, jeho mikrobiom, medikace), nádorovým mikroprostedím a samotnými genetickými změnami v nádorové tkáni. Přestože v dnešní době jsou některé biomarkery denně používané (PD-L1 exprese, MSI) je nutné mít na paměti komplexnost protinádorové reakce a vždy daný biomarker požívat v individuálním kontextu pacienta. Nespočet dalších slibných biomarkerů je ve fázi zkoumání a testování, ale s největší pravděpodobností nebude možné určit jenom jeden tumor agnostický biomarker. V době personalizované medicíny a imunoterapie by měl být ideální biomarker složen z více markerů, které budou reflektovat několik různých faktorů imunitní protinádorové reakce a měl by být interpretovaný v kontextu individuálního pacienta. Proto v Masarykově onkologickém ústavu v rámci našeho projektu hledáme prediktory léčby ICIs na základě komplexní molekulární charakteristiky nádoru současně s imunoprofilováním nádorového mikroprostedí a periferní krve pacienta.

Práce byla podpořena grantem MZ AZV s reg.č. NV18–03–00339.

LITERATURA

1. Wolchok JD. PD-1 Blockers. *Cell* 2015; 162(5): 937.
2. Espinosa E, Márquez-Rodas I, Soria A, et al. Predictive factors of response to immunotherapy – a review from the Spanish Melanoma Group (GEM). *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(19): 389–389.
3. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013; 500(7463): 415–421.
4. Braun DA, Burke KP, Van Allen EM. Genomic approaches to understanding response and resistance to immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(23): 5642–5650.
5. Nyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(23): 2189–2199.
6. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* (80-.). 2015; 348(6230):1 24–128.
7. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 2015; 160(1–2): 48–61.
8. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016; 387(10031): 1909–1920.
9. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2017; 389(10064): 67–76.
10. Seiwert TY, Cristescu R, Mogg R, et al. Genomic biomarkers in relation to PD-1 checkpoint blockade response. *J. Clin. Oncol.* 2018; 36(Suppl. 5): 25–25.
11. 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(25): 2415–2426.
12. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(22): 2093–2104.
13. Forde PM, Chaft JE, Smith KN, et al. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(21): 1976–1986.
14. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 2014; 515(7528): 572–576.
15. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: Utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* 2019; 30(1): 44–56.
16. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009; 461(7261): 272–276.
17. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017; 9(1): 34.
18. Galuppini F, Dal Pozzo CA, Deckert J, et al. Tumor mutation burden: From comprehensive mutational screening to the clinic. *Cancer Cell Int.* 2019; 19(1): 209.
19. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, et al. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 2018; 33(5): 843–852.e4.
20. 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(25): 2415–2426.
21. Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 2018; 33(5): 853–861.e4.
22. Galsky MD, Saci A, Szabo PM, et al. Impact of tumor mutation burden on nivolumab efficacy in second-line urothelial carcinoma patients: Exploratory analysis of the phase II checkmate 275 study. *Abstr. B. 42nd ESMO Congr. (ESMO)* 2017 8–12 Sept. 2017, Madrid, Spain 2017; 28: v296–v297.
23. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(25): 2500–2501.
24. Goh G, Walradt T, Markarov V, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget* 2016; 7(3): 3403–3415.
25. FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors. [https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors].
26. Ryan E, Sheahan K, Creavin B, et al. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2017; 116: 38–57.
27. Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin. Cancer Res.* 2013; 19(2): 462–468.
28. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2016; 16(5): 275–287.
29. Drescher KM, Sharma P, Watson P, et al. Lymphocyte recruitment into the tumor site is altered in patients with MSI-H colon cancer. *Fam. Cancer* 2009; 8(3): 231–239.
30. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015; 5(1): 43–51.
31. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(26): 2509–2520.
32. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, et al. Phase II open-label study of pembrolizumab in treatment-refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: KEYNOTE-164. *J. Clin. Oncol., American Society of Clinical Oncology*, 2020; 38(1): 11–19.
33. FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature | FDA. [https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-cancer-treatment-any-solid-tumor-specific-genetic-feature].
34. Lee M, Samstein RM, Valero C, et al. Tumor mutational burden as a predictive biomarker for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 2020; 16(1): 112–115.
35. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: Results from the phase II KEYNOTE-158 study. *J. Clin. Oncol.* 2020; 38(1): 1–10.
36. Thomas NE, Busam KJ, From L, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31(33): 4252–4259.
37. Tume PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014; 515(7528): 568–571.
38. Plescia I, Tunger A, Müller L, et al. Characteristics of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Prior to and During Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Front. Immunol.* 2020; 11: 364.
39. Schmid P, Cruz C, Braithe FS, et al. Abstract 2986: Atezolizumab in metastatic TNBC (mTNBC): Long-term clinical outcomes and biomarker analyses. *Cancer Res., American Association for Cancer Research (AACR)*, 2017; 77(Supplement 13): 2986–2986.
40. Loi S, Adams S, Schmid P, et al. Relationship between tumor infiltrating lymphocyte (TIL) levels and response to pembrolizumab (pembro) in metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Results from KEYNOTE-086. *Ann. Oncol.* 2017; 28: v608.
41. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 2017; 541(7637): 321–330.
42. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515(7528): 563–567.
43. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* 2017; 171(4): 934–949.e15.
44. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, et al. A transcriptionally and functionally distinct pd-1 + cd8 + t cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with pd-1 blockade. *Nat. Med.* 2018; 24(7): 994.
45. Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, et al. Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell* 2018; 175(4): 998–1013.e20.
46. Le DT, Lutz E, Uram JN, et al. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J. Immunother.* 2013; 36(7): 382–389.
47. Royal RE, Levy C, Turner K, et al. Phase 2 trial of single agent ipilimumab (Anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J. Immunother.* 2010; 33(8): 828–833.
48. Mok S, Koya RC, Tsui C, et al. Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res.* 2014; 74(1): 153–161.
49. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res.* 2013; 73(3): 1128–1141.
50. Riaz N, Havel JJ, Makarov V, et al. Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* 2017; 171(4): 934–949.e15.
51. Neubert NJ, Schmittnaegel M, Bordry N, et al. T cell-induced CSF1 promotes melanoma resistance to PD1 blockade. *Sci. Transl. Med.* 2018. doi:10.1126/scitranslmed.aan3311.
52. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2008; 26: 677–704.
53. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 2015; 14(4): 847–856.
54. Chen Q, Li T, Yue W. Drug response to PD-1/PD-L1 blockade: Based on biomarkers. *Onco. Targets. Ther.* 2018; 11: 4673–4683.
55. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(19): 3167–3175.
56. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(26): 2443–2454.
57. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(21): 2018–2028.
58. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, et al. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase II trial. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33(13): 1430–1437.
59. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, 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): 255–265.
60. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(19): 1803–1813.
61. Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: Meta-analysis. *BMJ* 2018; 362: 3529.

62. Duffy MJ, Crown J. Biomarkers for predicting response to immunotherapy with immune checkpoint inhibitors in cancer patients. *Clin. Chem.* 2019; 65(10): 1228–1238.
63. May JY, Negrier S, Combaret V, et al. Serum Level of Interleukin 6 as a Prognosis Factor in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 1992; 52(12): 3317–3322.
64. Yuan J, Zhou J, Dong Z, et al. Pretreatment serum VEGF is associated with clinical response and overall survival in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2(2): 127–132.
65. Kelderman S, Heemskerk B, Van Tinteren H, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014; 63(5): 449–458.
66. Simeone E, Gentile G, Giannarelli D, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014; 63(7): 675–683.
67. CRP may predict survival after immunotherapy for lung cancer | Oncology Practice. [https://www.mdedge.com/chestphysician/article/147564/immuno-oncology/crp-may-predict-survival-after-immunotherapy-lung].
68. Karantanos T, Karanika S, Seth B, Gignac G. The absolute lymphocyte count can predict the overall survival of patients with non-small cell lung cancer on nivolumab: a clinical study. *Clin. Transl. Oncol.* 2019; 21(2): 206–212.
69. Diehl A, Yarchoan M, Hopkins A, et al. Relationships between lymphocyte counts and treatment-related toxicities and clinical responses in patients with solid tumors treated with PD-1 checkpoint inhibitors. *Oncotarget* 2017; 8(69): 114268–114280.
70. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Yuan J, et al. Increases in absolute lymphocytes and circulating CD4+ and CD8+ T cells are associated with positive clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(19): 4848–4858.
71. Tietze JK, Angelova D, Heppt MV, et al. The proportion of circulating CD45RO+CD8+ memory T cells is correlated with clinical response in melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur. J. Cancer* 2017; 75: 268–279.
72. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Heubach F et al. Peripheral CD8 effector-memory type 1 T-cells correlate with outcome in ipilimumab-treated stage IV melanoma patients. *Eur. J. Cancer* 2017; 73: 61–70.
73. Matsushita K, Arima N, Ohtsubo H, et al. Frequent expression of interleukin-9 mRNA and infrequent involvement of interleukin-9 in proliferation of primary adult T-cell leukemia cells and HTLV-I infected T-cell lines. *Leuk. Res.* 1997; 21(3): 211–216.
74. Lu Y, Hong S, Li H, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(11):4160–4171.
75. Nonomura Y, Otsuka A, Nakashima C, et al. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology* 2016; 5(12): e1248327.
76. van Berkel MEAT, Oosterwegel MA. CD28 and ICOS: Similar or separate costimulators of T cells? *Immunol. Lett.* 2006; 105(2): 115–122.
77. Calabrò L, Maio M. Immune checkpoint blockade in malignant mesothelioma: A novel therapeutic strategy against a deadly disease? *Oncoimmunology* 2014. doi:10.4161/onci.27482.
78. Vonderheide RH, Lorusso PM, Khalil M, et al. Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16(13): 3485–3494.
79. Liakou CI, Kamat A, Tang DN, et al. CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4+ICOS hi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105(39): 14987–14992.
80. Weber JS, Hamid O, Chasalow SD, et al. Ipilimumab increases activated T cells and enhances humoral immunity in patients with advanced melanoma. *J. Immunother.* 2012; 35(1): 89–97.
81. Wang W, Yu D, Sarnaik AA, et al. Biomarkers on melanoma patient T Cells associated with ipilimumab treatment. *J. Transl. Med.* 2012; 10(1): 146.
82. Simeone E, Gentile G, Giannarelli D, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014; 63(7): 675–683.
83. Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, et al. CD4+ T-cell immunity in the peripheral blood correlates with response to Anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol. Res.* 2020; 8(3): 334–344.
84. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Foppen MG, et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(12): 2908–2918.
85. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J. Transl. Med.* 2011; 9(1): 204.
86. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (80-.). 2011; 331(6024): 1565–1570.
87. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *J. Immunol.* 2008; 181(8): 5791–5802.
88. Meyer C, Cagnon L, Costa-Nunes CM, et al. Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol. Immunother.* 2014; 63(3): 247–257.
89. de Coaña YP, Wolodarski M, Poschke I, et al. Ipilimumab treatment decreases monocytic MDSCs and increases CD8 effector memory T cells in long-term survivors with advanced melanoma. *Oncotarget* 2017; 8(13): 21539–21553.
90. Kim HR, Park SM, Seo SU, et al. The ratio of peripheral regulatory T cells to Lox-1 1 polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells predicts the early response to Anti-PD-1 therapy in patients with non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2019; 199(2): 243–246.
91. Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin. Transl. Immunol.* 2017. doi:10.1038/cti.2017.6.
92. Bhatt AP, Redinbo MR, Bultman SJ. The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA. Cancer J. Clin.* 2017; 67(4): 326–344.
93. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80-.). 2018; 359(6371): 91–97.
94. Matson V, Fessler J, Bao R, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (80-.). 2018; 359(6371): 104–108.
95. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature* 2019; 565(7741): 600–605.
96. Vétizou M, Pitt JM, Daillière R, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* (80-.). 2015; 350(6264): 1079–1084.
97. McQuade JL, Ologun GO, Arora R, Wargo JA. Gut Microbiome Modulation Via Fecal Microbiota Transplant to Augment Immunotherapy in Patients with Melanoma or Other Cancers. *Curr. Oncol. Rep.* 2020; 22(7): 1–9.
98. Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, et al. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia* (United States) 2017; 19(10): 848–855.
99. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80-.). 2018; 359(6371): 91–97.
100. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* (80-.). 2018; 359(6371): 97–103.