





***A cura del Gruppo di Lavoro AIOM – SIAPEC-IAP***

*Mattia Barbareschi, Massimo Barberis, Fiamma Buttitta, Massimo Di Maio, Claudio Doglioni, Gabriella Fontanini, Renato Franco, Stefania Gori, Paolo Graziano, Antonio Marchetti, Silvia Novello, Mauro Papotti, Giulio Rossi, Antonio Russo, Anna Sapino, Giancarlo Troncone, Mauro Truini.*

***Ottobre 2019***



## INDICAZIONI CLINICHE E RIMBORSABILITA' DEI FARMACI

Nei pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio avanzato, “non-oncogene addicted” (ovvero privo di alterazioni geniche suscettibili di terapie a bersaglio molecolare) ha assunto negli ultimi anni importanza l'utilizzo di farmaci inibitori dei checkpoint immunitari, il cui impiego attuale si basa spesso sul livello di espressione di PD-L1.

**In Italia l'AIFA** (Agenzia Italiana del Farmaco) ha autorizzato l'ammissione alla rimborsabilità di tre farmaci anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab, durvalumab) e di un farmaco anti-PD-L1 (atezolizumab) per il trattamento sistemico del NSCLC:

- **pembrolizumab** sia in **prima** che in **seconda linea** metastatica.  
L'indicazione nel setting di seconda linea viene descritta come “trattamento di pazienti precedentemente trattati con carcinoma polmonare non a piccole cellule, avanzato o metastatico, i cui tumori esprimano PD-L1 (tumor proportion score o TPS)  $\geq 1\%$  e che abbiano ricevuto almeno una precedente chemioterapia”. In una seconda fase lo stesso farmaco ha ottenuto un'indicazione anche nel contesto della prima linea di trattamento e, specificatamente, come “trattamento in prima linea del carcinoma polmonare metastatico non a piccole cellule in pazienti adulti i cui tumori esprimano alti livelli di PDL-1 (TPS  $\geq 50\%$ ) e che non abbiano mutazioni EGFR o ALK”;
- **nivolumab** e **atezolizumab** in **seconda linea** metastatica.  
Entrambi attualmente disponibili “in monoterapia per il trattamento di pazienti adulti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule localmente avanzato o metastatico, precedentemente sottoposti a chemioterapia”, indipendentemente dall'espressione tumorale di PD-L1, sulla base dei risultati degli studi CHECKMATE-017, CHECKMATE-057 e OAK.
- **durvalumab** nello stadio **localmente avanzato non resecabile**.  
L'indicazione attuale è per il “trattamento del carcinoma polmonare non a piccole cellule localmente avanzato, non resecabile, negli adulti i cui tumori esprimano PD-L1 in  $\geq 1\%$  delle cellule tumorali e la cui malattia non sia progredita dopo chemioterapia e radioterapia a base di platino”, alla luce dei risultati dello studio PACIFIC e dell'analisi post-hoc sui sottogruppi identificati in base ai livelli di espressione di PD-L1.

La definizione dell'**espressione immunoistochimica** della proteina **PD-L1** rappresenta pertanto in alcuni casi il biomarcatore necessario per accedere alla rimborsabilità del farmaco.

Riassumendo quanto già sopra indicato:

- **pembrolizumab** è registrato e rimborsato nei pazienti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato e con un'espressione nelle cellule tumorali di PD-L1  $\geq 50\%$  nel trattamento di prima linea; uguale o superiore all'1% nel trattamento di seconda linea;
- **nivolumab** e **atezolizumab** sono entrambi rimborsabili in seconda linea metastatica, indipendentemente dall'espressione immunoistochimica di PD-L1;
- **durvalumab** è registrato e rimborsato nei pazienti che esprimano PD-L1 con TPS  $\geq 1\%$  sulle cellule tumorali;



Più recentemente, il Comitato per Prodotti Medicinali di Uso Umano (CHMP) dell’Agenzia Regolatoria Europea **EMA** (European Medicines Agency) ha approvato, indipendentemente dall’espressione di PD-L1, l’impiego, di:

- pembrolizumab in associazione a chemioterapia sulla base degli studi prospettici randomizzati KEYNOTE-189 e KEYNOTE-407, che hanno dimostrato il beneficio dell’aggiunta di pembrolizumab alla chemioterapia contenente platino + pemetrexed e carboplatino + (nab)-paclitaxel nel trattamento di prima linea rispettivamente del **carcinoma polmonare non a piccole cellule metastatico non-squamoso** e **squamoso**,
- atezolizumab in associazione a carboplatino, paclitaxel e bevacizumab come **“trattamento in prima linea del carcinoma polmonare metastatico non a piccole cellule non-squamoso”**, sulla base dei risultati dello studio IMPOWER-150,
- atezolizumab in associazione a carboplatino e nab-paclitaxel come **“trattamento in prima linea del carcinoma polmonare metastatico non a piccole cellule non-squamoso in assenza di mutazioni EGFR o ALK”**, alla luce dello studio IMPOWER-130,
- atezolizumab in associazione a carboplatino ed etoposide come **“trattamento in prima linea del carcinoma polmonare metastatico a piccole cellule con malattia estesa”**.

## RAZIONALE BIOLOGICO

Nel corso degli ultimi venti anni, numerose evidenze hanno progressivamente condotto ad una migliore comprensione delle interazioni tra cellule tumorali e sistema immunitario mettendo in risalto il ruolo chiave del sistema immunitario nel reprimere lo sviluppo e la progressione del tumore.

Più specificatamente, in ragione dell’intensa instabilità genomica e della necrosi che si crea per la proliferazione incontrollata delle cellule neoplastiche in un tumore a rapida ed aggressiva crescita come quello polmonare, è tipica l’immissione in circolo di notevoli quantità di proteine antigeniche (“neo-antigeni”) che, una volta fagocitate da macrofagi e cellule dendritiche (*Antigen Presenting Cell, APC*), migrano verso i linfonodi regionali attraverso i vasi linfatici drenanti, dove vengono presentate a linfociti T *naive* tramite il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Oltre all’interazione tra il recettore dei linfociti T (T cell receptor, TCR) ed il complesso MHC-antigene, l’attivazione delle cellule T richiede un altro segnale co-stimolatorio rappresentato dal legame tra il recettore di membrana CD28 (espresso costitutivamente dalle cellule T) e le proteine della famiglia B7 (B7.1 e B7.2, espresse dalle APC) per promuoverne l’espansione clonale e la differenziazione in linfociti T CD4+, con memoria tumore-specifica ed in linfociti CD8+, con attività citotossica diretta.

Sebbene sistema immunitario e cellule tumorali possano coesistere in uno stato di equilibrio dinamico, la persistenza di tale fenomeno può condurre, specialmente negli stadi avanzati di malattia, ad un reale esaurimento dei linfociti T tumore-specifici (“*T-cell exhaustion*”), i quali vanno incontro ad una sorta di paralisi funzionale (“anergia”) esprimendo sulla propria superficie checkpoints immunitari inibitori ingaggiati dalle cellule tumorali stesse per eludere e sopprimere la risposta immunitaria. CTLA-4 e PD-1 sono due checkpoints immunitari espressi sulla superficie delle cellule T, i quali, in seguito al legame con i rispettivi ligandi (CD 80/CD86 e PD-L1/PD-L2) espressi sulla superficie delle cellule tumorali, determinano l’inibizione dell’attività dei linfociti T, svolgendo un ruolo centrale nella regolazione della risposta immune antitumorale. In



particolare, la fase di attivazione (“*priming*”) delle cellule T è modulata prevalentemente dal recettore *CTLA-4* (proteina 4 associata ai linfociti T citotossici, espressa dalle cellule T), che a

livello linfonodale contrasta l’attività di CD28 legandosi con maggiore affinità alle proteine della famiglia B7, mentre la funzione effettrice (“*killing*”) è mediata dal recettore di morte programmata 1 (*PD-1*, espresso dalle cellule T attivate) e dal suo ligando di morte cellulare programmata-1 (*PD-L1*, espresso dalle cellule tumorali e dalle cellule stromali) a livello del letto tumorale.

La comprensione di tali meccanismi di immuno-evasione tumorale ha portato allo sviluppo di specifici anticorpi monoclonali in grado di riconoscere e legare gli stessi checkpoints immunitari inibitori (soprattutto PD-1 e PD-L1) determinando, di conseguenza, il ripristino ed il potenziamento dell’attività antitumorale del sistema immunitario. Ciononostante, alla luce della variabilità interindividuale della risposta immunitaria in termini di specificità, tollerabilità e durata di azione, nell’era dell’oncologia di precisione, risulta di cruciale importanza l’identificazione di biomarcatori immuno-relati (fra cui l’espressione immunoistochimica di *PD-L1*), che abbiano valore prognostico e/o predittivo in grado di guidare la scelta personalizzata dei trattamenti.

## L’ALGORITMO DIAGNOSTICO E IL MATERIALE BIOLOGICO

L’introduzione dell’immunoterapia fra i trattamenti oncologici per i pazienti con carcinoma polmonare non-a piccole cellule (NSCLC) e del test immunoistochimico per valutare l’espressione di PD-L1 in funzione della selezione dei pazienti da destinare a farmaci anti-PD1/anti-PD-L1 ha modificato sostanzialmente l’algoritmo diagnostico-terapeutico in questa forma neoplastica. Per quanto concerne l’inquadramento diagnostico, è fondamentale che il tumore sia ben caratterizzato sia sotto il profilo morfologico/immunofenotipico, che molecolare. La caratterizzazione molecolare si basa sulla determinazione dell’espressione immunoistochimica di PD-L1 e sulla valutazione delle alterazioni di vari marcatori genetici (mutazioni di EGFR e BRAF, riarrangiamenti di ALK e ROS1). Tale caratterizzazione può essere potenzialmente effettuata su qualsiasi tipo di campione istologico (biopsia e pezzo operatorio da tumore primitivo o metastasi) ed anche su materiale citologico (agoaspirati con o senza guida ecografica/TAC, versamenti), purché il campione contenga una quantità di cellule tumorali vitali sufficiente per l’indagine richiesta. Non è stato definito un criterio assoluto per quantificare l’adeguatezza del materiale neoplastico, ma il reperto di 100 cellule tumorali vitali viene indicato come riferimento minimo per l’esecuzione e l’attendibilità di test molecolari nel NSCLC, in relazione anche alla sensibilità delle varie metodiche molecolari utilizzate.

Quando si dispone soltanto di materiale biotico e/o citologico risulta di particolare rilevanza che il Patologo si faccia carico della gestione dei campioni disponibili. Pertanto, è cruciale che i vari biomateriali di un paziente siano valutati contestualmente e in modo integrato, per evitare il rapido esaurimento del materiale tissutale/cellulare e riuscire a fornire sia una caratterizzazione morfologica, sia informazioni su tutti i biomarcatori predittivi necessari. Per tale motivo, potrebbe essere opportuno utilizzare per analisi su DNA gli strisci convenzionali, se ricchi di componente cellulare neoplastica vitale, preservando il materiale istologico e i citoinclusi per caratterizzazioni che richiedano indagini predittive immunofenotipiche. In particolare, il materiale citologico da destinare al test immunoistochimico per PD-L1 deve essere citoincluso dopo fissazione standard in formalina per ottenere risultati riproducibili con quanto ottenuto su tessuto.

La necessità di gestire in modo ottimale il materiale biologico del paziente, per poter fornire all’oncologo informazioni su tutto il pannello di biomarcatori utili per definire la migliore scelta terapeutica, risulta evidente sulla base delle seguenti considerazioni.



L'approccio terapeutico nei pazienti con NSCLC non operabile, rivoluzionato dall'avvento delle terapie a bersaglio molecolare per i tumori con mutazioni driver (cosiddetti tumori oncogene-addicted), è stato ulteriormente modificato dall'inserimento degli inibitori dei checkpoints immunitari (ICI) per il trattamento in prima o seconda linea. Nonostante gli ICI rappresentino un

trattamento innovativo ed efficace su un ampio spettro di NSCLC, la loro utilità nell'algoritmo terapeutico dei tumori "oncogenic-addicted" è ancora da dimostrare. Infatti, talora anche forme tumorali "oncogene-addicted" possono esprimere PD-L1. E' stato riportato come l'iperespressione di PD-L1 con TPS (Tumor Proportion Score) > del 50% delle cellule tumorali si possa osservare in tumori riarrangiati per ROS1 e, con minore frequenza, anche in tumori con riarrangiamento di ALK. Talora, anche tumori con mutazione di EGFR possono presentare una marcata espressione di PD-L1. In questi casi, l'iper-espressione di PD-L1 non consente l'eleggibilità del paziente agli ICI, potendo risultare questi ultimi non efficaci e, al contrario, di grande beneficio gli inibitori tirosino- chinasi. Da quanto detto risulta chiaro come, per la migliore scelta terapeutica, la valutazione dell'espressione di PD-L1 debba essere effettuata nel contesto di un algoritmo diagnostico completo e come, in funzione di questo, risulti cruciale una corretta gestione del materiale biologico.

## I TEST IMMUNOISTOCHEMICI

La determinazione dell'espressione di PD-L1 nelle cellule tumorali è un test diagnostico necessario per l'utilizzo degli immunoterapici che, nell'ambito di trials clinici, sono stati approvati per i pazienti, con NSCLC in stadio avanzato (IIIB/IV), positivi al test stesso.

Il giudizio di positività dipende dalla linea di trattamento. Infatti, per l'utilizzo del farmaco pembrolizumab in prima linea, il paziente (con tumore EGFR "wild type" ed ALK non riarrangiato) è eleggibile quando il livello di espressione di PD-L1 nelle cellule tumorali è  $\geq 50\%$ , mentre in seconda linea il farmaco può essere somministrato ai pazienti non più responsivi alle precedenti terapie e limitatamente ai casi in cui l'espressione di PD-L1 è  $\geq 1\%$ . Più recentemente, il farmaco durvalumab è stato introdotto nella pratica clinica per il trattamento dei pazienti in stadio III, non resecabile, il cui tumore presenta espressione di PD-L1  $\geq 1\%$  e la cui malattia non è progredita a seguito di chemio-radioterapia a base di platino.

Il livello di espressione di PD-L1 viene valutato mediante immunistochemica con cloni anticorpali anti-PD-L1, determinando accuratamente la percentuale di cellule neoplastiche vitali (tumor proportion score, TPS), che mostrano una immunoreattività a livello di membrana (non deve essere considerata l'immunoreattività citoplasmatica) completa o parziale e di qualsiasi intensità, quindi entrano nel computo anche cellule con debole e parziale immunoreattività.

Una accurata valutazione della percentuale di espressione di PD-L1 spesso comporta un esame indaginoso. Quando l'espressione di PD-L1 è molto bassa, la percentuale di cellule che mostrano una immunoreattività dipende dalla sensibilità dell'anticorpo utilizzato. Se si utilizza un test IHC con bassa sensibilità, questo potrebbe più facilmente portare il patologo a collocare una neoplasia con espressione di PD-L1 a cavallo di un cut-off (es. intorno a 50% oppure intorno all'1%) in una categoria più bassa. E' quindi necessario ricorrere ad anticorpi validati nell'ambito degli studi clinici registrativi. Gli studi clinici che hanno portato all'approvazione del farmaco pembrolizumab hanno utilizzato il test PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Agilent-Dako) come test diagnostico su piattaforma DAKO. Gli studi che hanno portato all'approvazione di durvalumab hanno invece utilizzato il test SP263 (Ventana) su piattaforma Ventana Benchmark. Una serie di studi hanno comparato i test PD-L1 sviluppati per la diagnostica in vitro (IVD), che utilizzano i cloni 22C3 e SP263 ed hanno dimostrato come questi abbiano prestazioni molto simili e possano



pertanto essere considerati equivalenti. Tali cloni, inoltre, sono disponibili commercialmente nell'ambito di kit che, utilizzando appropriati sistemi di amplificazione del segnale, garantiscono una buona sensibilità. Trattandosi di analisi utili per la predittività, risulta opportuno l'utilizzo di test robusti e validati (CE-IVD) in grado di fornire un risultato riproducibile, piuttosto che il ricorso a procedure da mettere a punto nel singolo laboratorio (definiti come Laboratory Developed Test; LDT), che necessitano accurate validazioni anche per garantire l'affidabilità del test nel tempo.

## **METODOLOGIA DI ANALISI**

L'analisi consiste in un saggio immunoistochimico. Come già sottolineato nel paragrafo precedente, l'interpretazione del test per il biomarcatore PD-L1 si basa sulla valutazione di numerosi aspetti e fini dettagli dell'immunoreazione, che in parte dipendono anche dalla fase preanalitica oltre che da una corretta procedura di fissazione. Si raccomanda, pertanto, di curare il processo di fissazione, riducendo al massimo possibile il tempo di ischemia fredda, registrando i tempi di fissazione e mantenendoli possibilmente negli standard comunemente accettati (12-48 ore), tenendo conto anche della natura e dimensione del materiale biologico, che può richiedere, al fine di un ottimale procedura, opportune riduzioni e campionamenti. Inoltre, numerosi studi hanno posto l'accento sulla possibile marcata eterogeneità di espressione di PD-L1 nel contesto di una medesima lesione tumorale. Questo ha una ricaduta sia nei casi in cui si debba esprimere un giudizio su un minuto frustolo biotico, sia nei casi in cui si disponga di abbondante materiale biologico ottenuto da pazienti resecati. Nel primo caso, qualora non si realizzino condizioni che favoriscono un sanguinamento sarebbe opportuno il prelievo di più frammenti biotici. Nel secondo caso, è consigliabile procedere con un campionamento differenziato a seconda delle dimensioni della lesione neoplastica. Nel caso di tumori di grandi dimensioni, è opportuno effettuare prelievi in porzioni differenti del tumore da includere nella medesima biocassetta: questa modalità di prelievo può consentire una valutazione più accurata e rappresentativa dell'espressione di PDL1.

Le sezioni di tessuto da destinare alla valutazione dell'espressione di PDL1 dovrebbero essere allestite in stretta vicinanza temporale con la programmata esecuzione del test immunoistochimico e si dovrebbe inoltre assolutamente evitare l'impiego di sezioni di tessuto archiviate per un periodo superiore a una settimana in quanto questo comporta potenzialmente un sensibile decremento dell'antigenicità. Inoltre, è opportuno che le sezioni da destinare al test PDL1 siano contigue alla sezione colorata con ematossilina/eosina, per discriminare meglio fra componente neoplastica e componente immunitaria, soprattutto qualora quest'ultima sia esuberante. Infatti, nella pratica clinica, un'altra situazione che genera criticità interpretative è la valutazione del livello di espressione di PD-L1 nel contesto di forme tumorali particolarmente ricche di cellule immunitarie che esprimono comunque alti livelli di PD-L1, quali macrofagi attivati, linfociti e cellule dendritiche. In queste situazioni potrebbe, infatti, non essere facile attribuire ad una neoplasia una categoria <1%, così come potrebbe non essere semplice assegnare l'esatta categoria per espressioni di PD-L1 intorno al 50%. In questi casi, qualora si disponga di sufficiente quantità di tessuto, è consigliabile ricorrere ad immunocolorazioni (CD68 per istiociti e pan-citocheratine per cellule tumorali) volte a definire con maggior precisione la popolazione cellulare in analisi.



## REFERTAZIONE E TEMPISTICA

La refertazione del test per PD-L1 nei pazienti con NSCLC prevede l'indicazione di una serie di informazioni da strutturare in 6 campi principali: a) dati anagrafici e richiedente; b) notizie clinico-anamnestiche e sede del prelievo in esame; c) tipologia del materiale utilizzato per il test; d) clone e piattaforma strumentale utilizzata; e) dato analitico sull'espressione di PD-L1; f) nota sul significato clinico del dato.

a) Dati Anagrafici del paziente e dei richiedenti: come in ogni referto, dovranno essere riportati le generalità del paziente, del medico richiedente, della struttura di provenienza della richiesta.

b) Notizie clinico-anamnestiche: le informazioni cliniche del paziente devono essere pertinenti all'indagine effettuata, e devono contenere informazioni relative all'anamnesi. In particolare andrebbero inserite le informazioni in merito all'abitudine al fumo di tabacco, allo stadio clinico, all'istotipo tumorale, alla sede del prelievo, primitiva o secondaria, all'eventuale stato mutazionale degli altri marcatori predittivi nel NSCLC.

c) Materiale in esame: è importante specificare la tipologia di campione in esame, campione chirurgico, biopsia, campione citologico. Per quanto concerne quest'ultimo, andranno riportate le informazioni relative all'adeguatezza descritte nel capitolo precedente, ossia se il test sia stato effettuato su campione citoincluso/cell-block, se lo stesso sia stato processato con modalità e tempi previsti per i piccoli campioni biotici e pertanto fissato in formalina e incluso in paraffina, unitamente alla quota minima di cellule neoplastiche vitali, che deve essere pari o superiore a 100.

d) Clone utilizzato: è necessario specificare il tipo di clone anticorpale utilizzato, facendo riferimento alla tipologia di test adottata (IVD o LDT).

e) dato analitico sull'espressione di PD-L1: riportare la percentuale di positività immunoistochimica, utilizzando il "Tumor Proportion Score (TPS)" rispetto alla totalità della popolazione neoplastica presente nel campione in esame.

f) Nota sul significato clinico del dato:

- Indicazione dell'indirizzo terapeutico in relazione alla positività riportata per l'utilizzo del farmaco pembrolizumab in prima o seconda linea di trattamento dei pazienti con NSCLC in stadio IIIb/IV:
  - Score  $< 1\%$  (negativo): paziente non eleggibile al trattamento;
  - Score  $\geq 1\%$ : paziente eleggibile al trattamento in seconda linea;
  - Score  $\geq 50\%$ : paziente eleggibile al trattamento in prima linea.
- Indicazione dell'indirizzo terapeutico in relazione alla positività riportata per l'utilizzo del farmaco durvalumab nei pazienti con NSCLC in stadio III non operabile:
  - Score  $< 1\%$  (negativo): paziente non eleggibile al trattamento;
  - Score  $\geq 1\%$ : paziente eleggibile al trattamento con anti-PD-L1 durvalumab.

Tempi di refertazione. Per quanto enunciato precedentemente, il test immunoistochimico per PD-L1 fa parte di un algoritmo diagnostico, che deve essere considerato nell'insieme al fine di un corretto trattamento del paziente e i tempi per l'esecuzione del test devono esser quelli relativi all'intero algoritmo diagnostico. Si suggerisce di non fornire un referto su PD-L1 in attesa della valutazione di altri marcatori, ma di effettuare contestualmente i vari test necessari per





l'inquadramento terapeutico. E' buona pratica clinica la caratterizzazione morfo-molecolare del paziente entro due settimane dal momento della richiesta.

## PROSPETTIVE FUTURE

Ad oggi l'unico biomarcatore predittivo usato come companion test per l'immunoterapia in prima linea è l'espressione immunocitochimica di PD-L1 su sezioni tumorali tessutali o su cyto-block. E' ben noto che tale marcatore ha importanti limiti di eterogeneità di espressione e di variabilità spazio-temporale, che possono determinare valutazioni falso positive o negative su piccole

biopsie, di difficile valutazione dovuta alla commistione di elementi infiammatori con quelli tumorali.

Recentemente il tumor mutational burden (TMB) è stato proposto come nuovo marcatore predittivo in diversi tumori solidi. Tuttavia, la determinazione di questo parametro necessita di lavori di standardizzazione e di validazione clinica e analitica prima di essere inserito in pratica clinica. Inoltre, è stato dimostrato come l'immunoterapia possa fallire anche in pazienti i cui tumori abbiano un elevato carico mutazionale e una intensa espressione immunocitochimica di PD-L1. Indipendentemente da queste considerazioni, è evidente che i biomarcatori predittivi debbano essere disponibili in molti laboratori diagnostici, essere economicamente sostenibili e usati anche ripetutamente sullo stesso paziente.

Nel prossimo futuro la biopsia liquida (LB) potrebbe rispondere a questi requisiti. La LB utilizza plasma, liquido cefalo-rachidiano e urine. Su queste matrici possono essere valutate diverse componenti quali il circulating cell-free DNA (cfDNA), cellule tumorali circolanti (CTC), proteine, vescicole esosomiali. Da campioni di sangue possono essere isolate le cellule T e valutate come fenotipo e come espressione genica.

In particolare la valutazione quantitativa del cfDNA e del "numero di instabilità genomica" (GIN), un parametro che indica il numero di copie di alterazioni, sembrano predittive di risposta.

Inoltre con cfDNA saranno possibili molte valutazioni genomiche (mutazioni, fusioni, variazione del numero di copie) e la determinazione dello stesso TMB i cui valori su plasma possono essere diversi da quelli ottenuti su tessuto. Pertanto si dovranno determinare nuove soglie di predittività. Un parametro molto semplice da valutare, ma altamente predittivo è la ricerca di mutazioni di STK11 su cfDNA: la presenza di mutazioni in questo gene si correla con una mancata risposta terapeutica. Anche l'instabilità dei microsatelliti può essere valutata su cfDNA ed è predittiva di risposta nei pazienti MSI-high.

Sono stati eseguiti studi sulla quantificazione proteica di PD-1 e PD-L1 su plasma e siero. Tuttavia, l'interferenza di fattori come malattie infettive, allergiche, autoimmuni e diabete ha determinato il loro abbandono.

Di grande interesse è invece lo studio funzionale dei linfociti T-periferici. In particolare il repertorio del T-cell receptor (TCR) cioè il numero di cellule T con diversi TCR. La variabilità della regione complementare-determinante 3 (CDR3) è unica per ciascun TCR ed il suo sequenziamento ci fornisce un perfetto studio funzionale.

I dati riguardanti la LB come assay predittivo sono iniziali, ma incoraggianti, e nel prossimo futuro saranno verosimilmente in grado di fornire quegli elementi in grado di portare ad una reale personalizzazione della immunoterapia.



### ***Bibliografia:***

1. Linee guida AIOM 2018 Neoplasie del polmone  
[https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/11/2018\\_LG\\_AIOM\\_Polmone.pdf](https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/11/2018_LG_AIOM_Polmone.pdf)
2. Herbst, Roy S et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet*, Volume 387, Issue 10027, 1540 – 1550
3. Determina n.109/2017; GU n.145 del 24-06-2017  
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2017/06/24/17A04134/sg>
4. Reck M, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016; 375:1823-1833
5. Determina AIFA n. 252/2017; GU n.43 del 21-02-2017  
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2017/02/21/17A01392/sg>
6. Determina AIFA n. 1017/2018; GU n.162 del 14-07-2018  
[https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie\\_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2018-07-14&atto.codiceRedazionale=18A04720&elenco30giorni=false](https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2018-07-14&atto.codiceRedazionale=18A04720&elenco30giorni=false)
7. Determina n. 1289/2019; GU n.209 del 06-09-2019  
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2019/09/06/19A05519/SG>
8. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/keytruda>
9. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-positive-opinion-tecentriq-ii/0019\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop/chmp-post-authorisation-summary-positive-opinion-tecentriq-ii/0019_en.pdf)
10. Klein G, Klein E. Surveillance against tumors-is it mainly immunological. *Immunology Letters*, 2005; 100(1): 29-332
11. Sancho D, Wculek SK et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 2019
12. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 2017; 541:321-330
13. Datta M. Reprogramming the Tumor Microenvironment to Improve Immunotherapy: Emerging Strategies and Combination Therapies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2019; 39:165-174
14. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Barraco N, Bono M, Corsini LR, Galvano A, Gristina V, Listì A, Vieni S, Gori S, Bazan V, Russo A. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) as a Predictive Biomarker for Pembrolizumab Therapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Adv Ther*, 2019
15. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thoracic Oncol* 13:1302-1311, 2018
16. Marchetti A, Barberis M, Franco R et al. Multicenter Comparison of 22C3 PharmDX (Agilent) and SP263 (Ventana) assays to test PD-L1 expression for NSCLC to be treated with Immune Checkpoint Inhibitors *J Thorac Oncol.*;12:1654-1663:2017
17. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA et al. Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Arch Pathol Lab Med* 138:1432-43:2014
18. Thunnissen E, Allen TC, Adam J, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Mar;142(3):408-419.
19. Wang H, Agulnik J, Kasymjanova G, et al. Cytology cell blocks are suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. *Ann Oncol*. 2018;29:1417-1422.



20. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, et al. IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer. Colorado, USA: International Association For the Study of Lung Cancer (IASLC);2017.
21. Munari E, Zamboni G, Lunardi G, et al. PD-L1 Expression Heterogeneity in Non-Small Cell Lung Cancer: Defining Criteria for Harmonization between Biopsy Specimens and Whole Sections. *J Thorac Oncol.* 2018 Aug;13(8):1113-1120.
22. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015 May 21;372(21):2018-28.
23. Teixidò C, Vilariño N, Reyes R and Reguart N, PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer *Ther Adv Med Oncol* 2018, Vol. 10: 1–17
24. Kerr KM, Nicolson MC. Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140:249–254
25. M Barbareschi, M Barberis, F Buttitta, C Doglioni, M Fiorentino, G Fontanini, R Franco, A Marchetti, G Rossi, G Troncone. Predictive markers in lung cancer: a few hints for the practicing pathologist. *Pathologica* 110 (1), 29-38
26. Anceviski Hunter K, Socinski M, Villaruz LC. PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2018 February; 22(1): 1–10
27. Califano R, Lal R, Lewaski C, Nicolson MC, Ottensmeie CH, Popat S, Hodgson M, Postmus PE. Patient selection for anti-PD-1/PD-L1 therapy in advanced non-small-cell lung cancer: implications for clinical practice. *Future Oncol.* (2018) 14(23), 2415–2431