



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización de los eventos inmunológicos diferenciales en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña tratados con quimioterapia con o sin ipilimumab

Max Hardy-Werbin

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



Institut Hospital del Mar
d'Investigacions Mèdiques

Caracterización de los eventos inmunológicos diferenciales en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña tratados con quimioterapia con o sin ipilimumab

Memoria presentada por Max Hardy-Werbin para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

**Programa de Doctorado en Biomedicina
Barcelona, 2019**

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Edurne Arriola Aperribay, del departamento de Oncología Médica del Hospital del Mar, y bajo la tutorización de la Dra. María Teresa Mampel Astals, del departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la Universidad de Barcelona

Dra Edurne Arriola Aperribay

Dra María Teresa Mampel Astals

Max Hardy-Werbin

La Dra. Edurne Arriola Aperribay, jefa de sección del departamento de Oncología Médica del Hospital del Mar e Investigadora Principal del Programa de Cáncer del Instituto Hospital del Mar de investigaciones médicas

Certifica

Que la tesis doctoral titulada **“Caracterización de los eventos inmunológicos diferenciales en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña tratados con quimioterapia con o sin ipilimumab”**, presentada por Max Hardy-Werbin para acceder al título de Doctor en Biomedicina por la Universidad de Barcelona, se ha llevado a cabo bajo su supervisión y cumple los requisitos formales y científicos para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

El trabajo se ha realizado en el laboratorio de terapia molecular del cáncer, perteneciente al programa de cáncer, en el Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas.

Barcelona, 2019

Dra Edurne Arriola Aperribay

« Qui cherche l'infini n'a qu'à fermer les yeux. »
— **Milan Kundera**

« We are what we pretend to be, so we must be careful about what we pretend to be. »
— **Kurt Vonnegut**

FINANCIACIÓN

Este proyecto de tesis se ha llevado a cabo en el marco del proyecto FIS P16/00591 otorgado por el Instituto de Salud Carlos III y gracias a la colaboración de la Fundación Cellex.

SINOPSIS

Small cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive type of lung cancer. More than half of patients are diagnosed at extensive stage, where platinum-based chemotherapy has been the systemic standard treatment since the mid '80s. Although robust and often dramatic clinical responses are achieved after first-line treatment, disease progression takes place soon and it is usually resistant to available treatments. In this scenario, outcomes remain poor, with a median overall survival that rarely exceeds one year.

SCLC is characterized by the presence of autoimmunity, reflected by the incidence of autoimmune paraneoplastic immune. This fact, as well as the high tumor mutational burden found in this disease suggest that immune modulation might be a promising strategy in SCLC. Anti-CTLA-4 antibodies and anti-PD-1/L1 antibodies have shown activity and durable responses. In fact, an anti-PD-L1 agent has been recently approved as first line treatment in addition to standard chemotherapy.

The aim of this project was to identify the differential immunological events observed in patients treated with chemotherapy and ipilimumab (anti-CTLA-4 antibody) vs. those in patients treated with standard chemotherapy, and in those patients treated with ipilimumab with long survival vs. those with short survival. To this end we had availability of serial samples from patients treated with ipilimumab + chemotherapy and chemotherapy alone over time. We assessed cytokine and autoantibody profiles in serum samples, and peripheral lymphocyte populations by flow cytometry.

We found that unlike autoantibodies, serum cytokines and specific lymphocyte peripheral subpopulations were modulated after CTLA-4 blockade. We were able to verify the prognostic role of autoantibodies, and to confirm the predictive role of cytokines. Lastly, we detected particular patterns of peripheral T and NK cells populations linked to survival and toxicity in SCLC.

With this project we were able to depict a comprehensive scene of the relevant immunological events in SCLC undergoing standard treatment and immunotherapy, which may aid us to better select patients who could benefit from immunotherapy and thus to design appropriate clinical trials.

INTRODUCCIÓN	1
EPIDEMIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN.....	3
CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CPCP	5
ESTADIFICACIÓN DEL CPCP	6
FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CPCP	7
TRATAMIENTO CLÁSICO DEL CPCP	7
SUPERVIVENCIA.....	9
EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	9
INMUNOTERAPIA.....	10
<i>CTLA4</i>	10
<i>PD-1</i>	12
TOXICIDAD DE LOS INHIBIDORES DE PUNTO DE CONTROL	15
RACIONAL DEL ROL DE LA INMUNOTERAPIA EN EL CPCP.....	16
<i>Síndromes paraneoplásicos</i>	16
<i>Relación con hábito tabáquico</i>	19
INMUNOTERAPIA EN EL CPCP	20
BIOMARCADORES DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA	25
<i>Biomarcadores asociados con eficacia</i>	25
<i>Biomarcadores asociados con toxicidad</i>	32
IMPORTANCIA DE LOS MARCADORES EN SANGRE PERIFÉRICA EN CPCP	33
ENSAYO CLÍNICO ICE	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVO PRINCIPAL	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
POBLACIONES DEL ESTUDIO	43
ANÁLISIS DE BIOMARCADORES.....	44
RESULTADOS	47
PRIMERA PARTE: ANÁLISIS DE AUTOANTICUERPOS.....	51
SEGUNDA PARTE: ANÁLISIS DE CITOQUINAS	65
TERCERA PARTE: FENOTIPADO DE PBMCS	85
DISCUSIÓN	93
ESTUDIO Y ANÁLISIS DE AUTOANTICUERPOS NEURONALES.....	96
ESTUDIO Y ANÁLISIS DE CITOQUINAS	103
FENOTIPADO DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS PERIFÉRICAS	108
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA.....	117

1. INTRODUCCIÓN

Epidemiología y clasificación del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón (CP) es el cáncer más frecuente a nivel mundial¹. La agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC en sus iniciales en inglés), órgano que forma parte de la organización mundial de la salud, desarrolló el proyecto GLOBOCAN en el que logró agrupar datos de 36 tipos de cáncer en 185 países. Los últimos datos, del año 2018², arrojan la cifra de 17,036,901 casos nuevos de cáncer al año, encabezados por el cáncer de pulmón con 2,093,876 casos (12,3%). En España las cifras varían, ocupando el cáncer de pulmón el cuarto puesto en la lista detrás del cáncer colorrectal, el de mama, y el de próstata (Figura 1).

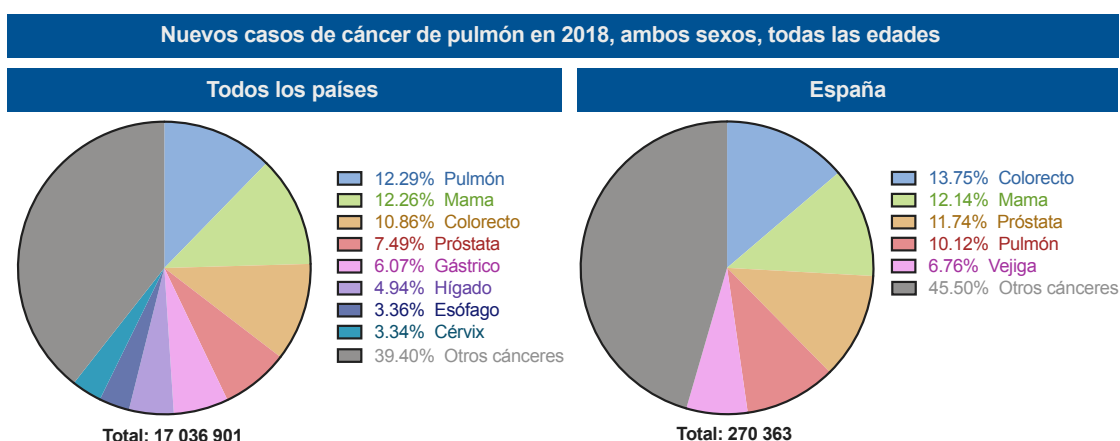


Figura 1. Incidencia del cáncer de pulmón en el mundo y en España en 2018

En cuanto a mortalidad, sin embargo, el CP constituye la primera causa de muerte por cáncer tanto a nivel mundial como en España, con 1,761,007 y 22,896 muertes en 2018 respectivamente (Figura 2). Estos datos reflejan que el CP constituye un grave problema sanitario a nivel global.

El CP se clasifica en dos grandes grupos: el cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP), y el cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP). El inicio del proceso de la segregación del CP en estas dos entidades tiene su origen en 1926, cuando W. G.

Barnard reportó por primera vez que los llamados sarcomas “oat-cell” del mediastino, eran realmente tumores bronquiales³. Posteriormente fue Azzopardi en 1959⁴ quien distinguió este tipo de tumor de los adenocarcinomas y de los carcinomas de células escamosas de pulmón, estableciendo al CPCP como una entidad propia.

El CPCP constituye entre un 13 y un 15% de todos los casos de CP^{5,6} y está estrechamente ligado al consumo tabáquico^{7,8}. En 2014, Varghese y cols. publicaron la serie de casos de CPCP en pacientes no fumadores más grande hasta la fecha⁹. En este estudio se incluyeron 1040 pacientes con CPCP y solo el 2% (23 pacientes) de ellos eran no fumadores. Sin embargo, en población exclusivamente asiática se han reportado series con cifras de pacientes no fumadores con CPCP de entre un 13% y un 23%^{10,11}.

Aunque la proporción del CPCP ha disminuido entre un 4 y un 5% en los últimos 20 años del siglo XX⁵, su incidencia ha ido en aumento de la mano del incremento global de la incidencia del CP². A esto se le suma el hecho de que la incidencia del diagnóstico del CPCP se ha incrementado en las mujeres, llevando la ratio mujer : hombre a casi 1 a 1^{5,6} (Figura 2).

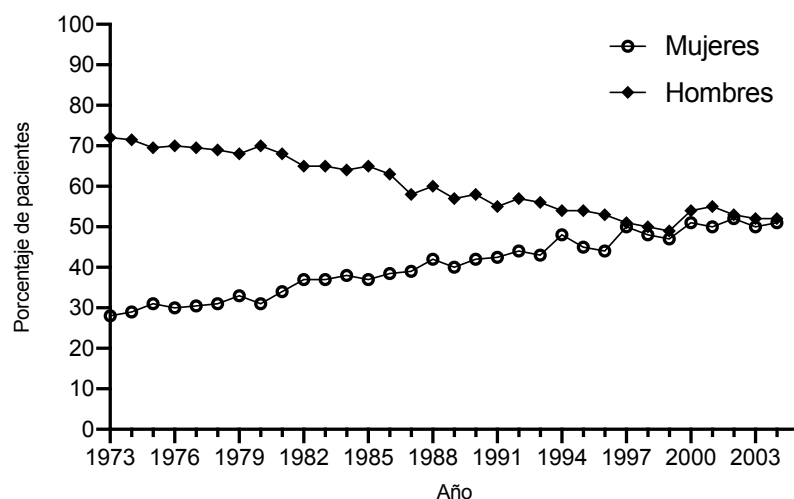


Figura 2. Distribución del CPCP por sexo a lo largo del tiempo. Adaptado de Govindan y cols.⁵

Características generales del CPCP

El CPCP es un tumor neuroendocrino pobremente diferenciado de alto grado¹². Su origen neuroendocrino se hace evidente por la presencia de marcadores histológicos típicos tales como sinaptofisina, cromogranina-A y NCAM¹³, y por la expresión de los factores de transcripción de diferenciación neuroendocrina *NEUROD1* y *ASCL1*, que juegan un papel fundamental en la supervivencia celular^{14,15}. Se caracteriza por presentar un elevado índice de duplicación, una alta tasa de crecimiento y una rápida diseminación a otros órganos. A consecuencia de esto, la mayoría de los pacientes se diagnostican en estadio avanzado: más del 50% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico^{5,16,17} (Figura 3).

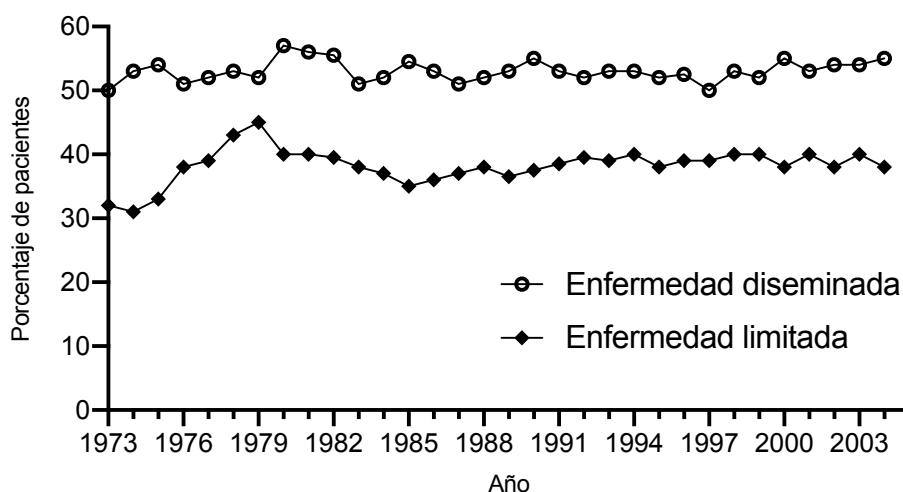


Figura 3. Diagnóstico de CPCP por estadios a lo largo del tiempo. Adaptado de Govindan y cols.⁵

Estos tumores se caracterizan por presentar una espectacular respuesta inicial a la quimioterapia, con unas tasas de respuesta que ascienden hasta casi el 80%¹⁸⁻²¹. Sin embargo los pacientes generalmente sufren una recaída de la enfermedad de manera precoz²².

Estadificación del CPCP

El estadio es uno de los factores pronósticos más relevantes en CPCP²³. El enfoque inicial para la estadificación del CPCP fue desarrollado por el “grupo de estudio de cáncer de pulmón de veteranos” (VALSG en sus iniciales en inglés) entre 1968 y 1973 y se basó en un sistema binario donde se dividía a los pacientes con enfermedad limitada (EL) o con enfermedad diseminada (ED)²⁴. Esta clasificación define el estadio con EL como aquellos tumores confinados a un hemitórax, con afectación de la cadena linfática supraclavicular ipsilateral, y que sean abarcables en un único campo de radiación; también se incluyen en este estadio el derrame pleural unilateral y la afectación del nervio recurrente y la vena cava superior. En cambio, se consideran como ED aquellos casos con afectación pulmonar bilateral, afectación del pericardio o evidencia de enfermedad fuera de la cavidad torácica. Clasificar a los pacientes con derrame pleural bilateral como si presentaran ED, sin embargo, ha sido motivo de controversia, dado que en series relativamente grandes se ha visto un beneficio de la aplicación de tratamiento radical con radioterapia en estos pacientes²⁵.

En 1982 diversos autores sugirieron la modificación de la estadificación del CPCP según la clasificación TNM (tamaño del tumor, afectación de nódulos linfáticos, presencia de metástasis distantes). Sin embargo, un panel de expertos de la IASLC (asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón) dio la recomendación de continuar con el sistema binario dado que el tratamiento no variaría al seguir una estadificación más específica²⁶. Este planteamiento se justifica en parte porque el sistema de estadificación TNM se basa en una estratificación más fina en los casos de pacientes con EL, que requiere en la mayoría de los casos una confirmación quirúrgica, que contrasta con la mínima cantidad de pacientes con CPCP tributarios de cirugía. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la clasificación TNM aporta datos pronósticos

precisos que podrían modificar la estrategia terapéutica^{17,27} y se recomienda su aplicación.

Factores pronósticos en el CPCP

Existen algunos factores que pueden estimar a priori el curso de la evolución del CPCP. Se ha comprobado en diversos estudios que un buen estado funcional previo (performance status 0-2), la edad inferior a 70 años, el sexo femenino y el estadio localizado confieren un buen pronóstico al CPCP²⁸⁻³³. Otros estudios aislados han identificado también como marcadores pronósticos relevantes la concentración sérica de lactato deshidrogenasa (LDH), de albúmina y de creatinina, así como la cantidad de sitios metastásicos^{34,35}.

Tratamiento clásico del CPCP

La quimioterapia ha sido clásicamente el pilar fundamental en el tratamiento del CPCP. A lo largo del tiempo, diferentes esquemas de tratamiento en monoterapia y con combinación de fármacos han demostrado eficacia en el CPCP. Sin embargo, el esquema más ampliamente utilizado y el que es considerado de elección es el doblete de platino (cisplatino o carboplatino), con etopósido³⁶ (PE), que reemplazó a los esquemas previos basados en antraciclinas, dada su superioridad en cuanto a respuesta y mejor perfil de toxicidad³⁷. Sin embargo, en cuanto a eficacia, diversos ensayos clínicos aleatorizados³⁸⁻⁴⁰ y un meta-análisis con más de 660 pacientes⁴¹ demostraron que ambos esquemas presentan una eficacia equivalente, con similares tasas de respuesta, supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG).

En los casos con EL, el tratamiento de elección es la quimioterapia (PE) concomitante con radioterapia^{42,43}.

Como se ha comentado previamente, una de las características del CPCP es su gran respuesta inicial frente al tratamiento con quimioterapia. Sin embargo esto se continúa de una rápida progresión al tratamiento, presentando una alta resistencia a tratamientos subsiguientes⁴⁴. Una vez que el paciente ha finalizado la primera línea de tratamiento, se pueden distinguir tres tipos de escenarios⁴⁵:

- i) aquellos que mantienen una respuesta durante más de 3 meses (enfermedad platino-sensible);
- ii) aquellos que no consiguen respuesta alguna al tratamiento (enfermedad refractaria);
- iii) aquellos que, tras una respuesta inicial, progresan durante los primeros 3 meses tras completar la primera línea de tratamiento (enfermedad platino-resistente).

En el último caso, la tasa de respuesta con terapias subsiguientes es de menos del 10%.

En los casos de pacientes que progresan tras mantener una respuesta duradera de más de 3 meses, se puede plantear reintroducir el mismo tratamiento inicial dada la sensibilidad que se asume al platino. El único fármaco aprobado en segunda línea en CPCP en nuestro medio por más de 20 años ha sido el topotecan⁴⁶.

En estadio avanzado, recientemente un ensayo clínico fase 3 demostró un beneficio en términos de SG y SLP con atezolizumab, un agente inmunoestimulador (anti-PD-L1) en combinación con carboplatino y etopósido y mantenimiento con atezolizumab en primera línea⁴⁷. Este estudio ha llevado a la aprobación del fármaco en Estados Unidos y en Europa, y significa el primer gran cambio en el manejo de esta enfermedad en primera línea.

Por último, a diferencia del CPCNP, en el CPCP las terapias dirigidas no han demostrado ningún beneficio en los diferentes ensayos clínicos realizados por lo que ningún inhibidor molecular ha llegado a la clínica^{48,49}.

Supervivencia

El CPCP es una enfermedad con mal pronóstico y con una supervivencia extremadamente corta si no se trata⁵⁰. En los últimos 40 años, solo dos ensayos clínicos aleatorizados compararon el uso de tratamiento quimioterápico frente a placebo en pacientes con CPCP^{51,52}. En estos se pudo ver que la SG en pacientes que no recibían tratamiento era de 2 a 3 meses en pacientes con ED y de 5 meses en pacientes con EL.

En EL, aquellos pacientes que reciben tratamiento con quimioterapia (PE) combinado con radioterapia logran obtener una mediana de supervivencia de 24 a 30 meses, con una supervivencia a los 5 años de entre el 25 y el 30%⁵³. En ED, sin embargo, los pacientes que realizan una primera línea de tratamiento presentan una mediana de supervivencia de 7-12 meses, con una supervivencia a los 5 años que se sitúan en torno al 3%^{6,16}. Los pacientes que progresan tras haber completado una primera línea de tratamiento suelen tener una SG que no supera los 4 o 5 meses de vida.

El sistema inmunológico

El sistema inmunológico se compone de dos sistemas íntimamente interconectados: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo⁵⁴. El primero se basa en un sistema de protección rápida frente a elementos extraños, pero que no es específico ni guarda memoria. Las células involucradas son macrófagos, granulocitos, células dendríticas y células natural killer (NK). El segundo, por el contrario, ejecuta una respuesta inmune frente a antígenos específicos que es más robusta y que confiere

memoria inmunológica; esta se lleva a cabo básicamente con los linfocitos B y T. Estos dos sistemas actúan de manera conjunta, entre otras cosas, para detectar la presencia de un proceso tumoral incipiente y destruirlo antes de que sea clínicamente aparente⁵⁵.

Prácticamente todas las células nucleadas expresan en su superficie el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). El CMH tipo I se encarga de exhibir en la superficie celular pequeños péptidos derivados de epítomos (tanto patógenos como tumorales), para presentárselos a los linfocitos T CD8+. Una vez que la célula T ha reconocido el antígeno presentado por el CMH tipo I, esta se activará, proliferará, y destruirá aquellas células que presenten ese antígeno reconocido. EL CMH tipo II, por otro lado, se expresa en células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), y exhiben péptidos en la superficie para presentárselos a los linfocitos T CD4+⁵⁶⁻⁵⁸. De esta manera se activarán los linfocitos T CD4+ helper, que a su vez reclutarán otras poblaciones inmunológicas al tumor mediante la secreción sobretodo de citoquinas, y de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) que atacarán de manera directa y específica a las células tumorales a través de la unión de su receptor (TCR) y el complejo mayor de histocompatibilidad de las células tumorales^{59,60}.

Inmunoterapia

La última década se ha visto marcada por el estudio de los llamados “puntos de control inmunológico” y por el desarrollo de los fármacos que logran bloquearlos para permitir al sistema inmune ejercer sus funciones sobre el tumor ⁶¹.

CTLA4

El primer punto de control inmunológico que se intentó bloquear fue el CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), un receptor con función inhibitoria, expresado en

los linfocitos T⁶². El CTLA4 se encarga de la homeostasis de la activación de células T, principalmente contrarrestando la actividad del receptor co-estimulador CD28⁶³. Para la activación del linfocito T por parte de CD28, es necesaria la unión del TCR a un antígeno a través del CMH. Cuando esto ocurre, CD28 amplifica la intensidad de la señalización del TCR para conseguir la activación celular⁶⁴. CTLA4 y B28 comparten los mismos ligandos: B7.1 (o CD80) y B7.2 (o CD86), teniendo CTLA4 una mayor afinidad por ambos⁶⁵. Por lo tanto, la función de CTLA4 en la superficie celular del linfocito T es suprimir su activación al competir con CD28 para unirse con B7.1 y B7.2⁶⁶. El resultado final es la supresión de la señalización inducida por el TCR y el CD28⁶⁷. Aunque CTLA4 se exprese en linfocitos T efectores CD8+, el papel primordial de CTLA4 es ejercido sobre los dos tipos principales de linfocitos T CD4+. Por un lado, la unión de CTLA4 a sus ligandos produce la pérdida de función de los linfocitos T CD4+ helper. Por otro lado, CTLA4 se encuentra expresado de manera constitutiva en las células T CD4+ reguladoras, dado que el gen *CTLA4* es una diana del factor de transcripción Foxp3 (presente en este tipo celular)^{68,69}. Existen diferentes hipótesis acerca de la acción directa que tiene CTLA4 sobre los linfocitos T reguladores, aumentando su actividad inmunosupresora⁶³, aunque estos hallazgos no han sido del todo validados⁷⁰. El bloqueo de CTLA4, por tanto, tiene como resultado final un aumento de la actividad de las células T efectoras y una inhibición de las células T reguladoras⁶³, restableciendo de esta manera la respuesta inmune.

Estos hallazgos estimularon la producción y la puesta en marcha de ensayos clínicos con inhibidores de CTLA4. Se empezaron a testar paralelamente dos anticuerpos monoclonales totalmente humanizados: ipilimumab, de tipo IgG1κ⁷¹, y tremelimumab, de tipo IgG2κ⁷². El primer ensayo clínico fase III en completarse evaluaba tremelimumab en melanoma metastásico, pero no mostró ningún beneficio en

comparación con quimioterapia⁷². Ipilimumab, sin embargo, fue el primer inhibidor de CTLA4 en demostrar un beneficio en términos de supervivencia en pacientes con melanoma, y a consecuencia de esto fue aprobado en 2011 por la FDA⁷³.

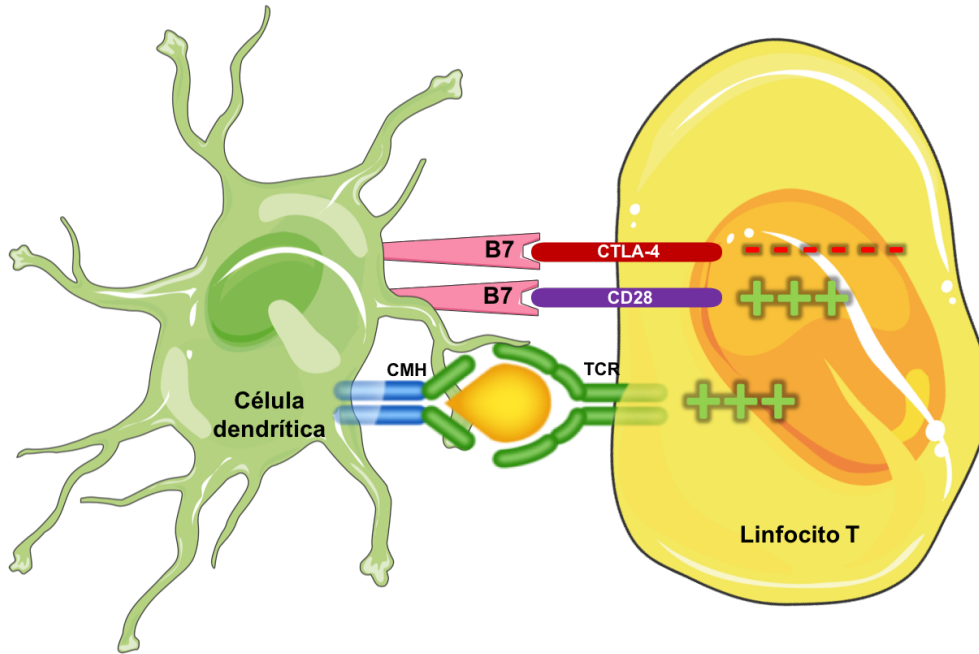


Figura 4. Unión de CTLA4 con su ligando

PD-1

El otro punto de control inhibitorio que ha surgido como un candidato prometedor para reactivar el sistema inmune es el PD-1 (programmed death-1). PD-1 es un receptor que se expresa en la superficie de los linfocitos T y B una vez han sido activados^{74,75}, y posee dos ligandos: PD-L1 y PD-L2⁷⁶. Su función principal es el mantenimiento de la tolerancia inmunológica periférica, para mantener la respuesta de células T dentro de un rango fisiológico. PD-L1 y PD-L2 se expresan en presencia de mediadores inflamatorios como $IFN\gamma$ ⁷⁷. Además, el PD-1 se encuentra ampliamente expresado en los linfocitos T reguladores, y se ha reportado que en presencia de su ligando podría aumentar su proliferación⁷⁸. Cuando PD-1 se une a uno de sus ligandos, envía una señal

inhibidora para atenuar la activación celular al bloquear la señalización del TCR⁷⁹. El bloqueo de PD-1, o PD-L1, por tanto, contribuiría a una reactivación de los linfocitos T citotóxicos CD8+.

Para conseguir el bloqueo farmacológico de la unión de PD-1 con su ligando PD-L1 se han desarrollado tanto fármacos anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) como anti-PD-L1 (atezolizumab, durvalumab, avelumab). El primero en ser aprobado por parte de la FDA fue nivolumab para melanoma metastásico en el año 2014⁸⁰ y posteriormente para CPCNP en 2015⁸¹.

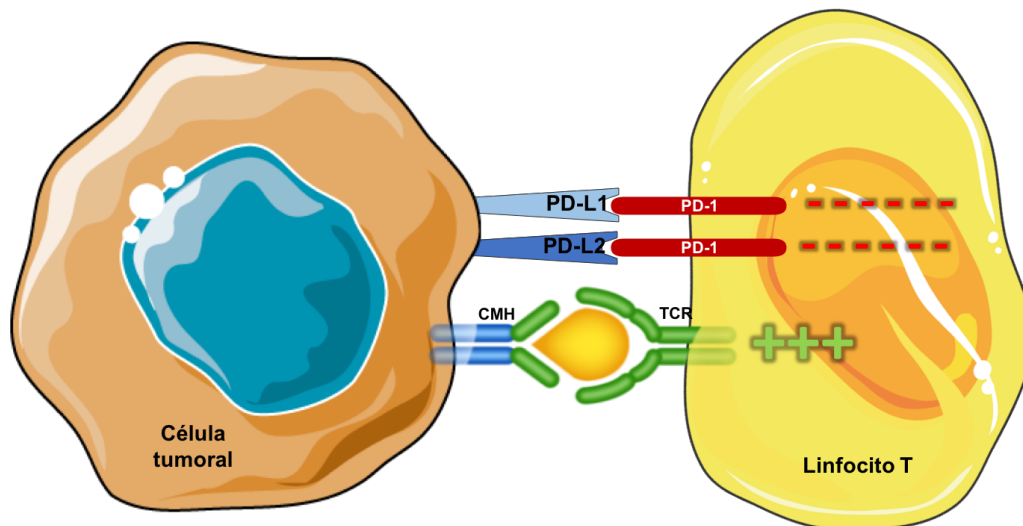


Figura 5. Unión de PD-1 con sus ligandos

A continuación, se detalla una tabla con todos los inhibidores de punto de control aprobados hasta octubre de 2019.

Diana	Fármaco	Indicación	Año de aprobación FDA		
CTLA-4	Ipilimumab	Melanoma	2011		
		Melanoma (adyuvancia)	2015		
		Melanoma pediátrico	2017		
	Ipi + nivo	Melanoma BRAF wt	2015		
		Melanoma any BRAF	2016		
		Cáncer renal	2018		
		Cáncer colo-rectal MSI-high	2018		
PD-1	Nivolumab	Melanoma	2014		
		CPCNP	2015		
		Cáncer renal	2015		
		Linfoma de Hodgkin	2016		
		Ca escamoso de cabeza y cuello	2016		
		Carcinoma urotelial	2017		
		Cáncer colo-rectal MSI-high	2017		
		Carcinoma hepatocelular	2017		
		Melanoma (adyuvancia)	2017		
		CPCP tercera línea	2018		
		Pembrolizumab	Melanoma	2014	
	CPCNP		2015		
	Ca escamoso de cabeza y cuello		2016		
	Linfoma de Hodgkin		2017		
	Carcinoma urotelial		2017		
	Cáncer gástrico y de la UGE		2017		
	Cáncer colo-rectal MSI-high		2017		
	Cáncer de cérvix		2018		
	Linfoma B de células grandes		2018		
	CPCNP (+ quimio)		2018		
	Carcinoma hepatocelular		2018		
	Carcinoma de células de Merkel		2018		
	Melanoma (adyuvancia)		2018		
	Cáncer renal (+ axitinib)		2019		
	Ca escamoso de cabeza y cuello		2019		
	CPCP segunda línea		2019		
	Carcinoma de esófago		2019		
	Carcinoma de endometrio (+lenvatinib)		2019		
	PD-L1		Atezolizumab	Carcinoma urotelial	2016
				CPCNP	2016
				Cáncer de mama triple negativo	2019
				CPCP primera línea (+ quimio)	2019
		Avelumab	Carcinoma de células de Merkel	2017	
Carcinoma urotelial			2017		
Cáncer renal			2019		
Durvalumab		Carcinoma urotelial	2017		
		CPCNP	2018		

Tabla 1. Inhibidores de punto de control. Se describen los diferentes fármacos aprobados, y sus indicaciones por año de aprobación. MSI, microsatellite instability; wt, wild-type; Ca, carcinoma; UGE, unión gastro-esofágica.

Toxicidad de los inhibidores de punto de control

A pesar de que los nuevos inhibidores de punto de control han cambiado el paradigma del tratamiento del cáncer con resultados sin precedentes, no están exentos de toxicidad. Los efectos adversos (EA) relacionados con estos tratamientos ocurren por un defecto de la tolerancia inmune a consecuencia de la pérdida de la inhibición de las células T. Estos EA pueden aparecer en cualquier órgano, pero lo hacen de manera más frecuente a nivel digestivo, dermatológico, hepático o endocrino. En la mayoría de los casos, los EA relacionados con la inmunoterapia son reversibles y manejables cuando se hace un diagnóstico precoz, pero en algunos casos pueden llegar a ser fatales⁸²⁻⁸⁴.

Los puntos de control inmunológicos (CTLA4, PD-1) modulan la respuesta inmune a diferentes niveles: mientras que CTLA4 controla el alcance de la respuesta inmune en estadios tempranos de la activación de células T⁸⁵, PD-1 actúa en etapas más tardías, limitando la activación T en tejidos periféricos^{86,87}. Estas diferencias podrían, en parte, explicar los diferentes perfiles de toxicidad de cada uno de los inhibidores, según sea su diana terapéutica. De hecho, la incidencia de EA severos (grados 3-5) en relación al uso de ipilimumab puede llegar al 30% mientras no asciende del 15% con los agentes anti-PD-1; cuando se combinan ambas terapias la cifra puede aumentar hasta un 55%⁸⁸.

Los inhibidores de CTLA4 se han relacionado más con colitis, hipofisitis y rash, mientras que los anti-PD-1 con neumonitis, alteraciones tiroideas, artralgias y vitíligo⁸⁹⁻⁹¹. Cabe destacar que se ha observado que la toxicidad secundaria al bloqueo de CTLA4 es dosis dependiente, cosa que no ocurre con el bloqueo de PD-1⁸⁹.

Se han reportado casos de toxicidad neurológica, aunque estos EA ocurren en menos del 5% de los pacientes⁸⁹, siendo el síntoma más frecuente la cefalea. Se pueden dar casos de neuropatía periférica (sensitiva o motora), pero en menos del 1% de los pacientes^{92,93}. Otros cuadros neurológicos que se han reportado en forma de toxicidad

secundaria a la inmunoterapia son casos de miastenia gravis y síndrome de Guillain-Barré^{94,95}. Por último, casos de toxicidad a nivel central incluyen meningitis aséptica, encefalitis autoinmune, encefalopatía posterior reversible y mielitis transversa^{89,92,96,97}.

Racional del rol de la inmunoterapia en el CPCP

Algunas características propias del CPCP lo hacen un candidato prometedor para evaluar tratamientos con inmunoterapia⁹⁸.

Síndromes paraneoplásicos

Existe evidencia acumulada que propone que el sistema inmunológico tiene un papel fundamental en la fisiopatología del CPCP⁹⁹⁻¹⁰¹. Se ha considerado un tumor muy inmunogénico, y esto se debe sobre todo a la alta prevalencia de los síndromes paraneoplásicos (SP), en especial los SP neurológicos (SPN)¹⁰². Estos se producen como consecuencia de la generación de una respuesta inmune contra antígenos neuronales que se expresan de manera ectópica en las células tumorales pero de manera fisiológica en el sistema nervioso central^{99,103,104}. El motivo fundamental por el que el CPCP está implicado en este mecanismo es que, al tener características neuroendocrinas, expresa diversos antígenos neuronales¹⁰⁵. El primero en identificar la naturaleza inmunomediada de estos síndromes paraneoplásicos neurológicos fue el Dr. Posner en la década de los '80s al hallar en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con cuadros neurológicos atípicos anticuerpos que se unían a antígenos onconeuronales localizados tanto en el tumor como en las células de Purkinje¹⁰⁶. El mecanismo propuesto consiste en que las células tumorales apoptóticas son fagocitadas por células dendríticas que migran hacia los ganglios linfáticos, donde se producirá una activación tanto de células B como de células T. Los linfocitos B sufrirán posteriormente una

diferenciación hacia células plasmáticas que se encargarán de la secreción de anticuerpos contra las células tumorales. Esta respuesta inmune contribuirá al control del crecimiento tumoral, pero al atravesar la barrera hematoencefálica, ejercerá también su acción contra las neuronas que comparten de manera fisiológica los antígenos reconocidos, efectuando una respuesta inmune T CD8 citotóxica contra ellas.

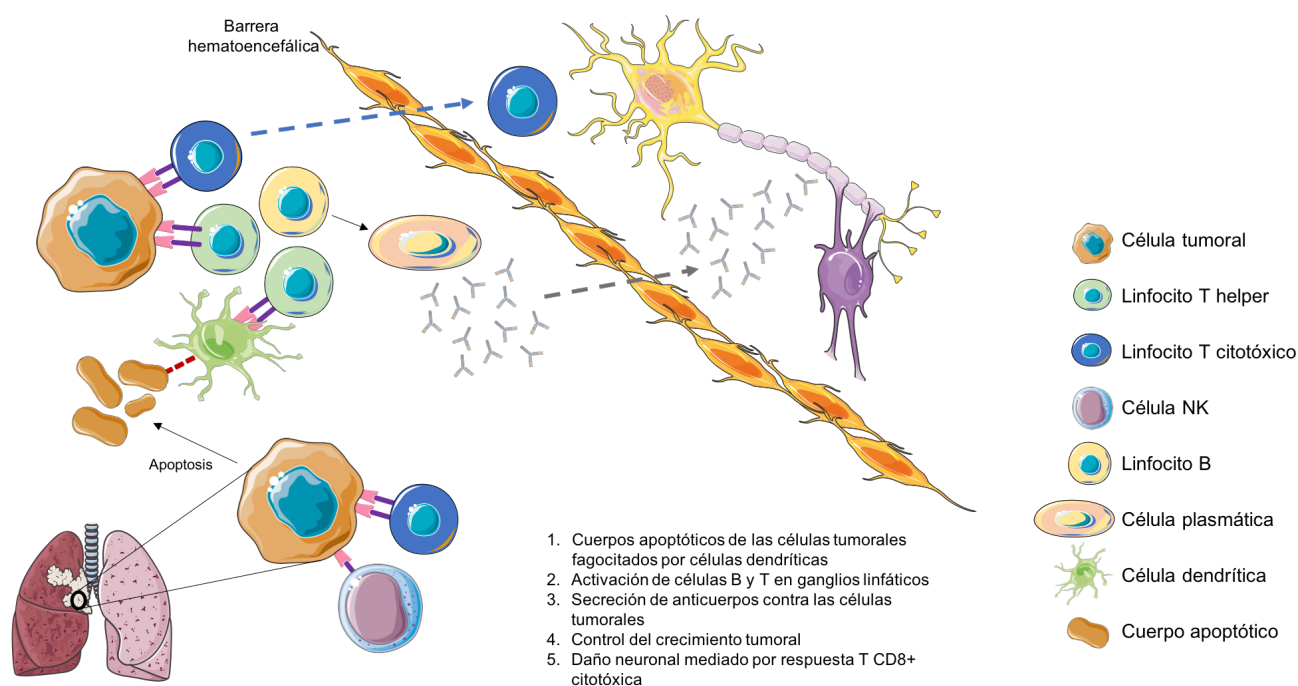


Figura 6. Secuencia de activación de la respuesta inmune en los SPN

Los autoanticuerpos neuronales que se asocian a estos síndromes se pueden agrupar en dos categorías¹⁰⁷. Por un lado, los anticuerpos onconeuronales, que están dirigidos contra antígenos neuronales intracelulares¹⁰⁸; estos anticuerpos no son patogénicos *per se*, sino que existe una disfunción neuronal mediada por células T citotóxicas, que pueden llegar a causar daño neuronal irreversible^{109,110}. De esta manera, estos autoanticuerpos no ejercen un efecto directo, sino que constituyen más bien un surrogado de la respuesta inmune. Por otro lado, existen otros anticuerpos que están

dirigidos hacia proteínas ancladas en la membrana neuronal o que residen en el complejo sináptico; estos anticuerpos generan un daño directo, provocando disfunción neuronal al contactar directamente con el antígeno involucrado^{111,112}.

En la siguiente tabla se describen los principales autoanticuerpos neuronales relacionados con los SPN.

Anticuerpo	Síndrome paraneoplásico	Tumor asociado	Ref
Anticuerpos contra antígenos intracelulares	Anti-Hu (ANNA-1)	Encefalitis límbica (14%) Degeneración cerebelar (18%) Neuropatía sensorial (40%) LEMS (6%) Opsoclonus (1%)	CPCP (93%) 113
	Anti-CV2/CRMP5	Encefalitis tronco encéfalo (5%) Degeneración cerebelar (26%) Neuropatía sensorial (27%) Opsoclonus (5%) LEMS (9%) Miastenia gravis (3%)	CPCP (77%) Timoma (8%) 114
	Anti-Yo (PCA-1)	Degeneración cerebelar (100%) Opsoclonus (5%)	Cáncer de ovario (47%) Cáncer de mama (25%) Cá. de endometrio (13%) 115
	Anti-Ri (ANNA-2)	Degeneración cerebelar (50%) Opsoclonus (36%) LEMS (4%) Encefalitis tronco encéfalo (71%)	CPCP (24%) Cáncer de mama (43%) CPCNP (24%) 116
	Anti-Tr	Encefalitis límbica (4%) Degeneración cerebelar (96%)	Linfoma Hodgkin (100%) 117
	Anti-Ma1/Ma2	Encefalitis límbica (71%) Degeneración cerebelar (5%)	Carcinoma testicular (55%) CPCNP (21%) 118
	Anti-Anfifisina	Encefalitis límbica (6%) Degeneración cerebelar (17%) Neuropatía sensorial (22%) Opsoclonus (9%) LEMS (8%)	CPCP (59%) Cáncer de mama (35%) 119
	Anti-GAD65	Encefalitis límbica (33%) Degeneración cerebelar (6%) Opsoclonus (6%)	CPCP (26%) CPCNP (12%) Ca neuroendocrino (26%) 107,120
	Anti-Sox1	LEMS (64%)	CPCP (43%) 121
	Anticuerpos contra antígenos de superficie	Anti-NMDA	Encefalitis límbica
Anti-VGKC		Encefalitis límbica (71%) Encefalitis tronco encéfalo (19%) Degeneración cerebelar (8%)	CPCP (21%) Timoma (21%) ADC próstata (17%) 123
Anti-VGCC		Degeneración cerebelar (16%) LEMS (100%)	CPCP (98%) 123
Anti-AchR		Encefalitis límbica (<10%) Miastenia gravis (100%)	Timoma (100%) 124

Tabla 2. Autoanticuerpos relacionados con SPN (entre paréntesis, porcentaje de pacientes positivos para el anticuerpo correspondiente que desarrolla el cuadro clínico, y porcentaje de casos de cáncer específico en el que se encuentra positividad del anticuerpo). ANNA1, anti-neuronal nuclear antibody type 1; Cv2/CRMP5, crossveinless-2/collapsing response mediated protein 5; PCA, Purkinje cell antibody; ANNA2, anti-neuronal nuclear antibody type 2; anti-GAD, anti-glutamate acid decarboxylase antibody; NMDA, N-methyl-D-aspartic; VGKC, voltage gated potassium channel; VGCC, voltage gated calcium channel; AchR, acetylcholine receptor.

Como se ha comentado previamente, el CPCP es el tumor que más se asocia a los SPN. En un estudio longitudinal multicéntrico se incluyeron 968 pacientes diagnosticados de un SPN¹⁰⁷, de los cuales un 92% se asoció a un tumor. El tumor que más frecuentemente se asoció fue el CPCP, acumulando casi un 40% de los casos. Dentro de los pacientes diagnosticados con CPCP, la incidencia de SPN se ha estimado en series pequeñas, obteniendo una frecuencia del 2-3%¹²⁵⁻¹²⁷. Sin embargo, un estudio más detallado involucrando neurólogos de Gozzard y cols., evaluó la aparición de SPN en 264 pacientes con CPCP, hallando una prevalencia del 9.1%¹²⁸, sugiriendo que existen numerosos casos que no se diagnostican. En la mayoría de los casos (entre en 65 y el 70%) los síntomas neurológicos secundarios al síndrome paraneoplásico aparecen antes de la detección del tumor^{129,130}.

Relación con hábito tabáquico

Se estima que el cáncer de pulmón asociado a tabaco se desarrolla tras haber fumado aproximadamente 50 paquetes-año (esto es, por ejemplo, 1 paquete diario durante 50 años, o bien 2 paquetes diarios durante 25 años)¹³¹. Las alteraciones más habituales que diferencian la población no fumadora de la fumadora son mutaciones en *TP53* y *KRAS*. Asimismo el espectro mutacional en estos pacientes es mucho más amplio¹³²⁻¹³⁴.

En 2010 se publicó un estudio¹³⁵ donde realizaban secuenciación masiva del ADN de una línea celular derivada de una metástasis de médula ósea de CPCP, para analizar las firmas mutacionales generadas por la exposición a los carcinógenos del humo del tabaco. Identificaron más de 22,000 mutaciones somáticas, de las cuales 134 se encontraban en exones codificantes. Posteriormente en 2013 se reportó que el CPCP presentaba una de las cargas mutacionales tumorales (TMB, en sus cifras en inglés) más elevadas (después del melanoma, del CPCNP y del cáncer de vejiga), con dos firmas

mutacionales validadas, una de las cuales se encontraba presente también en otros tumores asociados al tabaco¹³⁶.

Por último, en 2015 se publicaron los datos de secuenciación masiva donde se analizó el perfil genómico de 110 muestras de CPCP. En este estudio se corroboró la elevada TMB, con una media de 8.62 mutaciones no-sinónimas por megabase de ADN analizado¹³⁷.

En diferentes estudios en cáncer urotelial, melanoma y CPCNP se ha observado una asociación entre una elevada TMB y una mayor eficacia a la inmunoterapia¹³⁸⁻¹⁴⁴. En el contexto del CPCP, el ensayo clínico Checkmate 032¹⁴⁵ evaluó la eficacia de nivolumab en monoterapia y en combinación con ipilimumab en enfermedad metastásica refractaria a tratamiento de primera línea. En un subanálisis posterior de este estudio¹⁴⁶ se realizó la secuenciación del exoma de las muestras de los pacientes para ver si en CPCP se cumplía la relación entre la carga mutacional y la eficacia de la inmunoterapia. Se observó que en los pacientes tanto tratados con nivolumab en monoterapia como con la combinación con ipilimumab, que presentaban un TMB elevado, se obtenía una respuesta objetiva superior (21.3% y 46.2%, respectivamente) que en aquellos pacientes con una TMB media (6.8% y 16%, respectivamente) o baja (4.8% y 22.2%, respectivamente).

En conclusión, el CPCP se relaciona íntimamente con el consumo tabáquico, que a su vez le confiere una alta carga mutacional, factor que se relaciona con una mejor respuesta al tratamiento con inmunoterapia en los datos retrospectivos disponibles.

Inmunoterapia en el CPCP

En los últimos diez años se ha evaluado la eficacia de la inmunoterapia en el CPCP con diferentes fármacos y en diferentes esquemas de tratamiento. El primer ensayo clínico

(EC) que lo hizo incluía tanto pacientes con CPCP como con CPCNP con enfermedad avanzada, pero contaba con capacidad para poder analizar ambas cohortes de pacientes por separado¹⁴⁷. Se randomizaba a los pacientes para que recibieran quimioterapia (platino + paclitaxel) con placebo o con ipilimumab en dos modos diferentes: concomitante con la quimioterapia, o de manera secuencial. Se observó que la adición de ipilimumab (se manera secuencial) ofrecía un aumento en la SG en pacientes que recibían ipilimumab tras la quimioterapia, pero la diferencia con el brazo control no alcanzó la significación estadística. Posteriormente, el fase III confirmatorio, específico para CPCP fue negativo al no poder demostrar un beneficio ni en SG ni en SLP al añadir ipilimumab a la quimioterapia estándar (PE)¹⁴⁸. Sin embargo, casi paralelamente a este último ensayo clínico, un EC fase II ¹⁴⁹ de un único brazo que evaluaba ipilimumab en combinación con PE en primera línea de tratamiento, reportó una SG que ascendía hasta los 17 meses. Estos ensayos plantearon la premisa de que habría algunos pacientes con CPCP que se benefician de la inmunoterapia con ipilimumab.

En 2013 se comenzaron a reclutar pacientes para el Checkmate-032¹⁴⁵. En este ensayo se trataron un total de 216 pacientes con nivolumab en monoterapia o con la combinación de nivolumab e ipilimumab en dos diferentes dosis en pacientes con enfermedad refractaria al doblete de platino. En un análisis preliminar se observó una SG a los dos años de un 14% en la cohorte de pacientes tratados con nivolumab en monoterapia, y de un 26% en pacientes tratados con nivolumab + ipilimumab¹⁵⁰. Esto llevó a la inclusión de nivolumab con o sin ipilimumab como una recomendación de tratamiento de segunda línea en las guías americanas de oncología de la NCCN en 2017. Posteriormente, basándose en las respuestas duraderas observadas en este mismo EC en el subgrupo de 109 pacientes tratados con nivolumab a 3mg/kg (tasa de respuesta del 11.9% y una duración de respuesta de 6 meses o más en el 77% de los pacientes, y de

12 meses o más en el 62% de los pacientes), se obtuvo la aprobación de nivolumab en tercera línea por parte de la FDA.

Posteriormente se testó nivolumab en otros dos ensayos clínicos, ambos negativos. El Checkmate-331 fue un EC fase III que evaluó nivolumab en segunda línea de tratamiento en comparación con el tratamiento estándar (topotecan)¹⁵¹ y no pudo cumplir el objetivo primario de SG. Sin embargo, la presencia de algunos largos supervivientes con respuestas duraderas a nivolumab apoyaba el papel de este fármaco en segunda línea de tratamiento. El otro EC fue el Checkmate 451¹⁵² que evaluó el papel de la inmunoterapia en mantenimiento tras una primera línea de tratamiento. Consistía en dos brazos de tratamiento tras quimioterapia estándar: nivolumab + ipilimumab vs nivolumab monoterapia. No hubo diferencias entre ambos brazos.

Pembrolizumab se ha evaluado en cuatro EC en CPCP. El primero fue un basket trial¹⁵³ en el que se trataron 16 pacientes con CPCP PD-L1+ con pembrolizumab en monoterapia en segunda línea de tratamiento. Se obtuvo una tasa de respuesta del 25% con respuesta duraderas de más de 4 meses. Tras este estudio se llevó a cabo el Keynote 158¹⁵⁴, evaluando pembrolizumab en monoterapia y estratificando los pacientes según la expresión de PD-L1. En los pacientes con PD-L1 positivo se observó una SG de 14.6 meses y una tasa de respuesta del 37.5%, mientras que en el subgrupo de pacientes PD-L1 negativo la SG fue de 7.7 meses, con una tasa de respuesta del 6%. Posteriormente un pequeño fase II¹⁵⁵ con 26 pacientes con CPCP testó pembrolizumab en segunda línea de tratamiento en combinación con paclitaxel obteniendo una tasa de respuesta del 23%. Por último, se llevó a cabo un EC fase II con pembrolizumab de mantenimiento en aquellos pacientes que no habían progresado a PE en primera línea. Este fue negativo, con una SLP de 1.4 meses¹⁵⁶. Recientemente, al analizar los 83 pacientes con CPCP incluidos en los EC Keynote 028 y Keynote 158, se observó una tasa de respuesta del

29%, con un 61% de los pacientes que mostraron una duración de respuesta superior a 18 meses. Estos datos motivaron la aprobación de Pembrolizumab en segunda línea de tratamiento en CPCP por parte de la FDA¹⁵⁷.

El anti-PD-L1 atezolizumab fue evaluado en dos ensayos clínicos en CPCP. El primero fue un fase II que comparaba atezolizumab vs topotecán en segunda línea de tratamiento y fue negativo, con una TR del 2.3% vs 10% respectivamente¹⁵⁸. El segundo EC fue el IMpower-133⁴⁷, un fase III que evaluaba la adición de atezolizumab a quimioterapia estándar (PE) frente a placebo en primera línea de tratamiento. Se observó una SG de 12.3 meses en los pacientes que habían recibido atezolizumab + quimioterapia y de 10 meses en aquellos que había recibido quimioterapia sola, y esta diferencia fue estadísticamente significativa; la SLP fue de 5.2 meses vs 4.3 meses respectivamente. La tasa de respuesta fue de 60.5% vs 64.4% respectivamente. Este resultado llevó a la aprobación de este esquema de tratamiento como primera línea en CPCP por parte de la FDA y EMA, consiguiendo cambiar el estándar de tratamiento por primera vez en más de 35 años.

El otro anti-PD-L1 que se está testando en CPCP es durvalumab; actualmente se ha llevado a cabo un EC fase III de tres brazos comparando durvalumab +/- tremelimumab (anti-CTLA4) concomitante con quimioterapia vs quimioterapia sola en primera línea de tratamiento. Recientemente se han reportado los datos correspondientes a la comparativa entre el grupo de durvalumab + quimioterapia vs quimioterapia sola¹⁵⁹. En el brazo de la combinatoria se observó una SG de 13 meses, frente a 10.3 meses en el grupo de quimioterapia sola, y esta diferencia fue significativamente estadística; la supervivencia media a los 18 meses fue de 34% vs 25% respectivamente.

Ensayo clínico	Fase	Línea	Tratamiento	N	Resultados
Reck y cols. NCT00527735 2008	II	1ra	Ipilimumab + Platino + Paclitaxel Placebo + Platino + Paclitaxel	130	OS 12.9m vs 9.9 P=0.13
Arriola y cols. NCT01331525 2011	II	1ra	Ipilimumab + PE	39	PFS 6.9m, OS 17m
Reck y cols. NCT01450761 2011	III	1ra	Ipilimumab + Platino-Etopósido Placebo + Platino-Etopósido	1132	OS 11m vs 10.0 P=0.37
Checkmate-032 NCT01928394 2013	I/II	2/3era	Nivolumab +/- Ipilimumab (1 or 3 mg/kg)	216	ORR 11.9% nivo, 23% nivo-ipi 3, 18% nivo-ipi 1
Checkmate-331 NCT02481830 2015	III	2da	Nivolumab vs topotecán/amrubicina	569	OS 7.5 vs 8.4 P=0.11
Checkmate-451 NCT02538666 2015	III	1era	Mantenimiento con nivolumab 1mg/kg + ipilimumab 3mg/kg or nivolumab 1mg/kg vs placebo	834	OS 9.2 vs 9.6 (nivo/ipi vs placebo) OS 10.4 vs 9.6 (nivo vs placebo)
Keynote-028 NCT02054806 2014	Ib	2da	Pembrolizumab en CPCP PD-L1+	16	ORR 25%
Keynote-158 NCT02628067 2015	II	2da	Pembrolizumab	107	ORR 18.7% (37.5% en los PD-L1+ y 6% en los PD-L1-)
MISP-MK3475 NCT02551432 2015	II	2da	Pembrolizumab + Paclitaxel	26	ORR 23.1%
Gadgeel y cols. NCT02359019 2015	II	1era	Pembrolizumab mantenimiento	45	Negative PFS 1.4m, OS 9.6m
IFCT-1603 NCT03059667 2017	II	2da	Atezolizumab Topotecán	73	ORR 20.9% vs 65%
IMpower-133 NCT02763579 2016	III	1era	Atezolizumab + Platino-Etopósido Placebo + Platino-Etopósido	403	OS 12,3 vs 10,3 p=0.007
Caspian NCT03043872 2017	III	1era	Durvalumab + Tremelimumab + PE Durvalumab + PE Placebo + PE	988	OS 13 vs 10.3m p=0.0047

Tabla 3. Ensayos clínicos en inmunoterapia en CPCP

Biomarcadores de respuesta a inmunoterapia

Los inhibidores de punto de control han demostrado ser eficaces y aportar un beneficio en CPCP tanto en monoterapia y en combinación, como asociados a quimioterapia. Sin embargo, por un lado, este beneficio se observa solo en un grupo de pacientes, y por el otro, en determinados casos se han asociado a un perfil de toxicidad específico: por eso la determinación de marcadores tanto predictivos de respuesta como de toxicidad es fundamental. En particular, ipilimumab solo o en combinación con nivolumab, ha demostrado en los diversos estudios añadir beneficio y contribuir a la existencia de largos supervivientes. Sin embargo, su desarrollo en esta patología está en duda debido a las dificultades de identificar los pacientes que se benefician de esta estrategia.

Biomarcadores asociados con eficacia

Existen múltiples biomarcadores potenciales de beneficio frente a ipilimumab y agentes anti-PD-1/PD-L1 que se han reportado en diferentes estudios.

Recuento de células sanguíneas circulantes

Linfocitos. En diferentes estudios se ha observado que en pacientes tratados con anti-CTLA4 se produce un aumento de los linfocitos circulantes¹⁶⁰, y que esto se asocia con mejores respuestas al tratamiento en pacientes con melanoma^{71,161}. De hecho en un estudio realizado en cooperación entre Holanda y el Reino Unido, se observó que cifras elevadas de linfocitos circulantes antes de empezar el tratamiento, se relacionaban con una SG más prolongada¹⁶². En otro estudio, en pacientes con melanoma tratados con ipilimumab se observó que una disminución del ratio neutrófilo/linfocito por debajo de la media durante el curso de tratamiento, se relacionaba con una mejor SG¹⁶³.

Neutrófilos. Se ha observado que en pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, cifras elevadas de neutrófilos antes de iniciar el tratamiento se correlacionan con una peor SG^{164,165}.

Eosinófilos. Los datos referentes a la relación entre el recuento de eosinófilos y eficacia de la inmunoterapia difieren entre los diferentes inhibidores. En una cohorte de pacientes con melanoma tratados con ipilimumab se observó que un recuento bajo de eosinófilos antes de iniciar el tratamiento se asociaba con una SG superior¹⁶⁶. Sin embargo en pacientes tratados con pembrolizumab, un recuento bajo de eosinófilos se relacionó con una peor supervivencia¹⁶⁷.

Fenotipado de PBMCs (células sanguíneas circulantes periféricas)

Células T CD4+ ICOS^{hi}. ICOS es un receptor co-estimulador presente en las células T¹⁶⁸. Se ha observado un aumento de células T CD4+ ICOS^{hi} tanto en sangre periférica como en el microambiente tumoral en pacientes con cáncer de vejiga, de mama y de próstata tratados con inhibidores de CTLA4¹⁶⁹⁻¹⁷¹. En una pequeña cohorte de 6 pacientes con cáncer de vejiga, se ha reportado que niveles mantenidos de CD4+ ICOS^{hi} durante el tratamiento con ipilimumab se asociaba con mejores respuestas y una SG más prolongada¹⁷².

Células T reguladoras. Los datos relativos a la modulación de los porcentaje de Tregs y su asociación con eficacia en pacientes tratados con ipilimumab son contradictorios¹⁷³. Por un lado, algunos estudios demostraron un descenso de Tregs tanto circulatorios como peritumorales tras tratamiento con ipilimumab^{170,174,175}, mientras que otros no evidenciaron esta variación^{172,176,177}. Por otro lado, si bien algunos estudios reportaron que el descenso de los Tregs tras tratamiento con ipilimumab se

asociaba a una mejor supervivencia¹⁷⁸, otros estudios asociaban un aumento de la SLP con un aumento en el número de estos¹⁷⁹.

Monocitos CD16+. En un análisis de las PBMCs de 29 pacientes con melanoma tratados con ipilimumab se evaluó si la cantidad de monocitos tenía relación con datos de eficacia¹⁸⁰. Se observó que ipilimumab era capaz de estimular monocitos CD16+ (y no los monocitos clásicos CD14+CD16-) que a su vez eran capaces de provocar una depleción de las células T CD4+ reguladoras. Estos hallazgos se relacionaron con una mejor respuesta al tratamiento.

Células mieloides supresoras. Las células mieloides supresoras (MDSC, en sus iniciales en inglés) constituyen una estirpe celular heterogénea que se expande bajo estados patológicos como puede ser una infección o el cáncer y que tienen una función supresora, sobretodo sobre células T¹⁸¹. Se ha demostrado en diversos estudios que en pacientes tratados con ipilimumab, existe una reducción en el recuento de las MDSCs tras el tratamiento^{179,182}. En pacientes con melanoma tratados con el anti-CTLA4 se observó que en aquellos pacientes donde había una reducción de MDSCs tras tratamiento tenían una SG^{183,184} y una SLP más prolongadas¹⁷⁹.

Diversidad del repertorio de células T

En un estudio con 12 pacientes con melanoma metastásico tratados con ipilimumab se analizó el espectro de receptores TCR y se observó que una mayor diversidad de células T antes del tratamiento se relacionaba con una mayor tasa de respuesta¹⁸⁵. Otro estudio que evaluaba parámetros similares en pacientes con melanoma y cáncer de próstata, reportó que una estabilidad en el clonotipo del receptor TCR, antes y después del tratamiento con anti-CLTA4 se asociaba con una mejor supervivencia¹⁸⁶.

Respuesta celular y humoral frente a antígenos tumorales

El antígeno NY-ESO-1 es un antígeno tumoral que se encuentra en diferentes tumores sólidos¹⁸⁷. Se ha observado que la presencia de anticuerpos dirigidos contra NY-ESO-1 en pacientes con melanoma antes de iniciar tratamiento con ipilimumab, se asociaba con una mejor respuesta al tratamiento. Por otro lado, los pacientes que eran seropositivos para el antígeno, alcanzaban una mayor SG si se detectaban células T CD8+ dirigidas frente a este¹⁸⁸.

Receptor soluble CD25

El CD25 está presente en las Tregs y es la proteína receptora de IL-2¹⁸⁹. Se ha observado que pacientes tratados con ipilimumab eran resistentes al tratamiento cuando presentaban niveles altos de CD25 soluble pre tratamiento¹⁹⁰.

Citoquinas

Las citoquinas cumplen un papel fundamental en el estado de activación inmunitaria y algunas de ellas han demostrado tener un papel pronóstico en CPCNP^{191,192}. En pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, se ha observado que unos valores basales elevados de CXCL11 se asociaban a peores respuestas¹⁹³.

Lactato deshidrogenasa (LDH)

En diferentes estudios en pacientes con melanoma metastásico se ha visto que una LDH sérica elevada antes de iniciar el tratamiento con anti-CTLA4 se asociaba a una resistencia al tratamiento^{161,162,194}.

Proteína C Reactiva (PCR)

La PCR es un marcador de carga tumoral y se ha relacionado con el pronóstico de diversos tipos de cánceres¹⁹⁵. En un estudio retrospectivo se observó que pacientes con melanoma tratados con ipilimumab (n=196) presentaban una mejor OS si se detectaba una PCR dentro de cifras normales antes de iniciar el tratamiento. En otro estudio se observó que una descenso de las cifras de PCR en relación al inicio del tratamiento con ipilimumab se relacionaban con una mejor SLP y OS en melanoma avanzado¹⁷⁸.

Linfocitos infiltrantes

La presencia de linfocitos infiltrantes de tumor es un factor de buen pronóstico en varios tipos de cánceres^{196,197}. En pacientes con melanoma metastásico, un aumento en el recuento de linfocitos peritumorales se ha relacionado con una mejor tasa de respuesta en pacientes tratados con ipilimumab¹⁹⁸ y con pembrolizumab¹⁹⁹. En biopsias post-tratamiento con ipilimumab, un aumento de granzima B (proteasas citotóxicas contenidas en gránulos de linfocitos T CD8 efectoras) se relacionó con respuesta al tratamiento en pacientes con melanoma metastásico¹⁹⁹.

Carga mutacional tumoral

El término ‘carga mutacional tumoral’ (TMB) hace referencia al número de mutaciones no-sinónimas presentes en el exoma de un tumor¹³⁶. La cantidad de éstas es proporcional a la generación de péptidos inmunogénicos y por eso se relaciona con la respuesta de los inhibidores de puntos de control inmunológicos en los tumores. Los primeros estudios que demostraron una relación entre una elevada TMB y respuesta a inmunoterapia evaluaba pacientes con melanoma metastásico y observaron que aquellos pacientes que presentaban un beneficio duradero a ipilimumab presentaban una TMB

pre-tratamiento superior^{200,201}. Posteriormente se vieron asociaciones similares en pacientes con CPCNP tratados con Pembrolizumab²⁰². Tras estas observaciones iniciales en melanoma y CPCNP, se fueron reportando asociaciones significativas entre una elevada TMB y respuesta a inhibidores de punto de control en diversos tipos de cánceres^{141,203}. Concretamente en CPCP, como se ha mencionado previamente, se ha observado que la eficacia de nivolumab con y particularmente con ipilimumab aumentaba en pacientes con una elevada TMB¹⁴⁶.

Expresión de PD-L1

Expresión tumoral. El mecanismo de acción de los fármacos anti-PD-1 y anti-PD-L1 ha llevado a varios grupos a intentar determinar si la expresión de PD-L1 en el tumor se correlacionaba con la eficacia de los inhibidores. Se ha reportado una relación entre la expresión de PD-L1 y la respuesta frente a inhibidores de PD-1 en melanoma y CPCNP^{204,205}. Aunque se ha estimado que la expresión de PD-L1 en células tumorales en CPCP es baja, diferentes estudios han reportado porcentajes que van desde 2.5 a 51.8%²⁰⁶⁻²⁰⁹. En el Checkmate 032¹⁴⁵, donde se evaluó nivolumab en monoterapia o en combinación con ipilimumab en CPCP con enfermedad diseminada refractario a tratamiento, se observó una expresión de PD-L1 del 17%. En este estudio no se observó una correlación entre PD-L1 en el tumor y respuesta a inhibidores de punto de control. Sin embargo, en un fase II con pembrolizumab en mantenimiento en CPCP con enfermedad diseminada¹⁵⁶, se observó que aquellos pacientes con expresión de PD-L1 tenían una SG más prolongada; en este estudio en lugar de llevar a cabo la evaluación de PD-L1 mediante el sistema de puntuación de células tumorales (tumor proportion score)²⁰⁵, se utilizó un sistema de puntuación combinado (combined proportion score), que se basa en el número de células PD-L1 positivas (incluyendo tumor, linfocitos y macrófagos),

en relación al número total de células tumorales²¹⁰. Esto podría explicar las diferencias en el valor predictivo de PD-L1.

Expresión PD-L1 en linfocitos circulantes. En pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, una expresión elevada de PD-L1 en células T CD4+ y CD8+ se asociaron con una peor SLP y SG²¹¹.

Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)

La IDO es una enzima que degrada el triptófano²¹²; se ha observado que tiene una acción inmunosupresora al disminuir la proliferación de células T²¹³. Se ha reportado una asociación entre la expresión de IDO en tumor y respuesta a ipilimumab en melanoma metastásico¹⁹⁸.

Perfiles de expresión génica

Se ha observado que el tratamiento con anti-CTLA4 induce un perfil de expresión génica relacionado con la proliferación de células T¹⁸⁶. Al analizar el transcriptoma de 45 pacientes con melanoma, se observó que un patrón relacionado con genes inmunes era predictivo de respuesta a ipilimumab²¹⁴.

Microbiota intestinal

En los últimos años se ha documentado que la microbiota intestinal tiene un efecto sobre la respuesta anti-tumoral²¹⁵. En modelos de ratones con sarcoma, melanoma y cáncer de colon se ha observado que el bloqueo de CTLA-4 no era efectivo en aquellos ratones libres de gérmenes, o bien en aquellos ratones que habían sido tratados con antibióticos de amplio espectro previamente²¹⁶. Esta falta de respuesta anti-tumoral se solventaba por transferencia de *Bacteroides Fragilis* o mediante células T específicas

frente a este germen. Sin embargo, en un estudio con 26 pacientes con melanoma metastásico tratados con ipilimumab analizaron la composición de la microbiota y observaron que los pacientes con un predominio de *Faecalibacterium* genus en las muestras previas a iniciarse el tratamiento tenían una mejor SLP y SG que aquellos con un predominio de *Bacterioides*²¹⁷.

Toxicidad secundaria a inmunoterapia como predictor de respuesta

Se han publicado diferentes trabajos que sugieren que la aparición de EA relacionados con la inmunoterapia se podría asociar a respuesta al tratamiento con ipilimumab²¹⁸⁻²²¹. Sin embargo, esta asociación no es directa, y existen muchos pacientes que responden al tratamiento sin sufrir EA²²².

Biomarcadores asociados con toxicidad

Interleukina-17 (IL-17)

En un estudio con 52 pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, se observaron 13 casos de colitis. En estos pacientes, los valores de IL-17 fueron significativamente superiores durante el evento de colitis, y la resolución del cuadro se asoció a una normalización de sus valores²²³.

Perfil de expresión génica

Un aumento de la expresión de CD177 y CEACAM1, marcadores de activación de neutrófilos, en pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, se asoció a EA gastrointestinales inmunomediados²²⁴.

Microbiota intestinal

En un estudio de 26 pacientes con melanoma metastásico, se ha observado que aquellos pacientes con una microbiota enriquecida con Firmicutes antes de iniciar el tratamiento con ipilimumab, tenían una probabilidad más alta de desarrollar colitis²¹⁷.

Importancia de los marcadores en sangre periférica en CPCP

Uno de los mayores problemas en el diagnóstico del CPCP es el acceso limitado al tejido tumoral, dado que se diagnostica a partir de pequeñas biopsias o citologías en más del 90% de los casos²²⁵. Tras el diagnóstico inicial, el tejido remanente la mayoría de las veces es escaso, lo cual constituye una limitación para análisis subsiguientes. Una evidencia de este hecho es el tejido disponible para análisis de biomarcadores en ensayos clínicos con inmunoterapia en CPCP. Por ejemplo, Hellmann y cols.¹⁴⁶ analizaron la TMB en muestras de tumor del EC Checkmate 032¹⁴⁵: solo el 61% de los pacientes tenían disponible muestras pareadas de tumor y sangre, y de estos solo el 86% fue apto para análisis (por lo tanto, sólo el 53% del total). Por este motivo, la búsqueda de biomarcadores en sangre periférica tiene un especial interés en el CPCP.

Con el estudio de muestras de sangre periférica se logra también, desde una perspectiva técnica, la obtención de muestras de una manera poco cruenta y de manera repetida en el tiempo a lo largo de la enfermedad. Por otro lado, desde una perspectiva más académica, se puede obtener una visión amplia del efecto del tumor sobre el sistema inmunológico.

Ensayo clínico ICE

La relevancia de este ensayo clínico dentro del actual proyecto radica en que sus resultados fueron los que llevaron a la formulación de la hipótesis que se describe a continuación. Las muestras de los pacientes del ensayo clínico ICE forman parte del sustrato que se analizará en el trabajo de la tesis actual y serán un punto de partida fundamental para realizar las comparaciones correspondientes e inferir las conclusiones.

El ensayo clínico ICE (Ipilimumab-Carboplatino-Etoposido) ¹⁴⁹ fue el primer estudio en el que se evaluaron marcadores de respuesta a inmunoterapia en CPCP. Fue un ensayo fase II de un brazo único que incluyó 42 pacientes con CPCP con enfermedad diseminada que aún no habían recibido tratamiento. El objetivo era evaluar la eficacia y toxicidad de la combinación de ipilimumab (10 mg/kg) con carboplatino y etopósido. Posteriormente se llevó a cabo un análisis exploratorio para la búsqueda de biomarcadores tanto de respuesta como de toxicidad, mediante la evaluación de autoanticuerpos en suero (autoanticuerpos anti-membrana y anti-nucleares).

Se observó que con la combinación de quimioterapia con ipilimumab se obtenía un beneficio, pero a cambio de una gran toxicidad. Se observaron EA grado 3 relacionados con ipilimumab en el 69% de los pacientes; el 8% de los pacientes experimento un EA neurológico relacionado con ipilimumab. Dos pacientes sufrieron síntomas neurológicos que imitaban un SPN, en forma de encefalopatía y síndrome cerebelar, respectivamente. Se observó que aquellos pacientes que habían presentado EA de grado 3 o superior relacionados con ipilimumab tenían una peor supervivencia, aunque esta asociación no alcanzó la significación estadística.

En este estudio se ha identificado un subgrupo de pacientes largos supervivientes (>12 meses, incluyendo pacientes con supervivencias superiores a 30 meses) que contrasta

con la mediana de supervivencia de 9 meses en esta población tratada con quimioterapia.

Por último, en el análisis de biomarcadores se observó que en los pacientes donde se detectaba por lo menos la presencia de un autoanticuerpo en suero, tenían una tendencia a una mejor respuesta.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El tratamiento con ipilimumab ha demostrado eficacia en forma de largos supervivientes en pacientes con CPCP avanzado. Sin embargo, su aplicación clínica en esta enfermedad está en duda debido a los ensayos clínicos negativos en población no seleccionada. La identificación de biomarcadores de beneficio de ipilimumab en CPCP nos permitirá la adecuada selección de pacientes para dicho tratamiento, pudiendo ofrecer ipilimumab a los pacientes que se beneficiarán de manera relevante y minimizando de esta manera un coste en toxicidad e ineficacia en los pacientes que no se benefician. El uso de muestras de sangre periférica permitirá llevar a cabo esta valoración de una manera eficiente, cómoda y con posibilidad de aplicación en el seguimiento y en la detección de resistencias.

Objetivo principal

Caracterización de los eventos inmunológicos diferenciales en pacientes con CPCP tratados con quimioinmunoterapia (carboplatino + etopósido + ipilimumab) con beneficio del tratamiento vs aquellos sin beneficio en muestras seriadas, y su comparación con pacientes tratados con quimioterapia sola (carboplatino + etopósido).

Objetivos concretos:

1. Evaluación de la prevalencia de los AAN en CPCP y estudio de su modulación en pacientes tratados con quimioinmunoterapia y con quimioterapia sola
2. Análisis de la correlación de la presencia de AAN con beneficio del tratamiento, toxicidad y supervivencia global.

3. Evaluación de los niveles basales séricos de citoquinas inmunomoduladoras en CPCP y estudio de la modulación de estas en pacientes tratados con quimioinmunoterapia y con quimioterapia sola.
4. Análisis de la asociación de los niveles de citoquinas y sus variaciones con beneficio del tratamiento, toxicidad y supervivencia global.
5. Evaluación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias periféricas en CPCP y su modulación en pacientes tratados con quimioinmunoterapia y con quimioterapia sola.
6. Análisis de la asociación entre la modulación de las subpoblaciones periféricas de linfocitos T y células NK, y supervivencia en CPCP.
7. Evaluación de la asociación entre el fenotipo linfocitario periférico y toxicidad por ipilimumab en CPCP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Poblaciones del estudio

Cohorte hospital del Mar (cohorte 1)

En esta cohorte se incluyen 47 pacientes con CPCP tratados con quimioterapia convencional, reclutados en el contexto de proyectos de investigación del Hospital del Mar. Se han recogido muestras de sangre periférica previo al inicio del tratamiento, en el momento de la respuesta al tratamiento y a la progresión de la enfermedad. Se dispone de muestras de suero y plasma.

Cohorte ensayo clínico ICE (cohorte 2)

El ensayo ICE, incluye 37 pacientes con CPCP diseminado tratados con carboplatino + etopósido + ipilimumab. En el ensayo se han recogido muestras de sangre periférica previo al inicio del tratamiento con ipilimumab y secuencialmente durante la evolución de la enfermedad. Se dispone de muestras de suero, de plasma y de PBMCs.

Cohorte prospectiva hospital del Mar (cohorte 3)

Desde octubre de 2016 en el hospital del Mar se ha iniciado la recogida de muestras seriadas de suero, plasma y PBMCs de pacientes con CPCP metastásico tratados con quimioterapia convencional, en el momento del diagnóstico, a la respuesta al tratamiento y a la progresión de la enfermedad. En el momento de la elaboración de este documento se han reclutado 31 pacientes, y se han obtenido datos de supervivencia de 16 de ellos.

Análisis de biomarcadores

Detección de autoanticuerpos en sangre periférica

Se ha utilizado la técnica de inmunoensayo en línea que permite la detección simultánea y en una sola reacción de anticuerpos contra numerosos antígenos mediante un Kit comercial (RAVO kit™) que permite identificar una batería de autoanticuerpos típicamente detectables en CPCP (anti-HuD, anti-Yo, anti-Ri, anti-CV2/CRMP5, anti-Amphiphysin, anti-Ma1, anti-Ma2, SOX1 y GAD65).

Estudio de citoquinas en sangre periférica

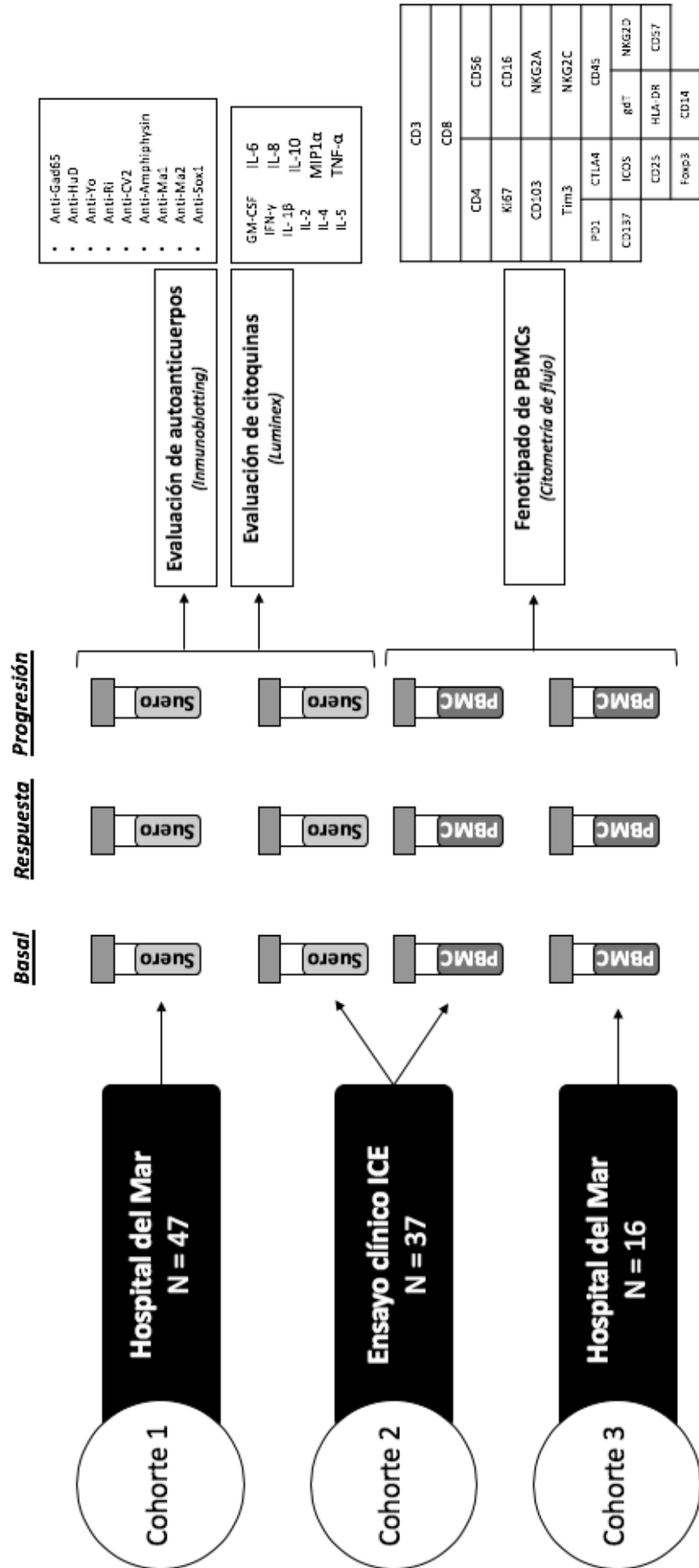
Se ha utilizado un kit de ensayo multiplex de Merck Millipore (Cytokine Human Magnetic 10-Plex Panel) para la plataforma de tecnología Luminex xMAP que cuantifica GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α y MIP1 α en suero o plasma humanos.

Análisis fenotípico de PBMCs

Se ha diseñado un panel de marcadores para el fenotipado de PBMCs mediante citometría de flujo. Se aislaron las células circulantes inmunológicas para centrarse en la detección de poblaciones linfocitarias efectoras, reguladoras y NK, mediante un panel de anticuerpos que incluye CD3, CD4, CD8, CD45, Foxp3, CD25, CD103, Tim-3, Ki67, HLA-DR, CD56, NKG2C, NKG2A, NKG2D, CD137, PD-1, CTLA, CD57 y $\gamma\delta$ T.

La tinción se llevó a cabo en PBMCs criopreservadas. Tras la descongelación las células se incubaron con un marcador de viabilidad durante 30 minutos. Tras el bloque con inmunoglobulina G humana durante 20 minutos, se llevó a cabo la tinción de marcadores de membrana durante otros 20 minutos. Tras cada incubación se realizaron

dos lavados con PBS 1X. Posteriormente se fijaron las células mediante el kit de permeabilización Foxp3 Fix/Perm para realizar la tinción de los marcadores intranucleares durante 30 minutos. Tras cada incubación se realizaron dos lavados con buffer especial de lavado para tinciones intranucleares según las recomendaciones del fabricante. La detección de las células se llevó a cabo con tecnología de citometría digital equipada con 4 láseres y 16 detectores (BD LSRFortessa analyser). Para la adquisición se utilizó el software Diva, y para el análisis de datos, el FlowJo X.



4. RESULTADOS

Esta memoria de tesis doctoral titulada “Caracterización de los eventos inmunológicos diferenciales en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña tratados con quimioterapia con o sin ipilimumab”, se presenta como compendio de publicaciones en las que el doctorando Max Hardy-Werbin figura como primer autor y son fruto directo del proyecto de tesis.

Artículo 1:

Hardy-Werbin M, et al. Assessment of neuronal autoantibodies in patients with small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without ipilimumab. Oncoimmunology. 2017 Nov 27;7(2):e1395125

DOI: 10.1080/2162402X.2017.1395125

PMID: 29308329

Índice de calidad: IF 2017 = 5.503; 1Q Oncología; 1Q Inmunología

Artículo 2:

Hardy-Werbin M, et al. Serum cytokine levels as predictive biomarkers of benefit from ipilimumab in small cell lung cancer. Oncoimmunology. 2019 Mar 27;8(6):e1593810.

DOI: 10.1080/2162402X.2019.1593810

PMID: 31069160

Índice de calidad: IF 2018 = 5.333; 1Q Oncología; 1Q Inmunología

Dra. Edurne Arriola Aperribay

Primera parte: análisis de autoanticuerpos

Artículo 1.

Título:

Assessment of neuronal autoantibodies in patients with small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without ipilimumab

Autores:

M. Hardy-Werbin, O. Arpí, A. Taus, P. Rocha, D. Joseph-Pietras, L. Nolan, S. Danson, R. Griffiths, M. Lopez-Botet, A. Rovira, J. Albanell, C. H. Ottensmeier, E. Arriola

Resumen:

El objetivo de esta primera parte del proyecto era evaluar las diferencias en la presencia o no de autoanticuerpos neurológicos (AAN) entre pacientes tratados con quimioterapia sola (cohorte 1) y con quimioterapia e ipilimumab (cohorte 2), y evaluar la relación de estos hallazgos con beneficio en supervivencia.

Del total de los pacientes evaluados, 12 presentaban CPCP con enfermedad localizada al diagnóstico de la enfermedad. De estos, el 75% tenían la presencia de AAN en las muestras basales, frente a un 50% de pacientes con enfermedad diseminada ($p = 0.096$). Esta tendencia se replicó para la presencia de anti-Sox1 de manera individual (58.3% vs 33.3%; $p = 0.092$), pero no para la presencia de anti-HuD y anti-Yo.

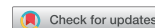
Al estudiar la asociación de AAN con datos de supervivencia, se observó que aquellos pacientes en los que se detectaba la presencia de al menos un AAN al diagnóstico presentaban una mayor supervivencia global [14.8 meses (m) vs 12.1 m; $p = 0.089$]. Esta asociación se mantuvo al analizar individualmente los pacientes tratados con

quimioterapia (15.1 m vs 11.7 m; $p=0.032$), probablemente debido a la prevalencia en esta cohorte de pacientes con enfermedad localizada.

Posteriormente se segregaron los pacientes entre aquellos con reactividad a 1 AAN frente aquellos con reactividad frente a 2 AAN o más. Se observó que la presencia de sólo 1 AAN frente a 2 o más en pacientes tratados con quimioinmunoterapia, se asociaba con una supervivencia libre de progresión superior (7.3 m vs 5.5 m; $p=0.005$). La detección de múltiples reactividades de AAN, sin embargo, no se asoció a ningún tipo de reacción adversa provocada por ipilimumab (colitis, astenia, rash) ni a eventos neurológicos.

Por último, se analizó la variación del título sérico de AAN en las muestras seriadas y su asociación con beneficio del tratamiento. De los 45 pacientes con detección basal de AAN, el 93% presentó una respuesta inicial al tratamiento, y en el 60% de estos se evidenció una bajada del título de NAA. Del resto de los pacientes que no presentaron una respuesta inicial al tratamiento, todos sufrieron un ascenso en el título del anticuerpo ($p=0.080$). En cuanto a supervivencia, un aumento en el título de AAN en pacientes tratados con quimioterapia convencional se relacionó con un aumento de la supervivencia libre de progresión (12 m vs 6.9m; $p=0.016$), y un descenso o estabilización del título de AAN al final del tratamiento se relacionó con un aumento de la supervivencia global (18.5m vs 12.3m; $p=0.049$), independientemente del tratamiento recibido. No se observaron cambios diferenciales en el título de AAN con la adición de ipilimumab al tratamiento en las muestras seriadas.

ORIGINAL RESEARCH



Assessment of neuronal autoantibodies in patients with small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without ipilimumab

M. Hardy-Werbin^{a,i}, O. Arpi^a, A. Taus^b, P. Rocha^b, D. Joseph-Pietras^e, L. Nolan^f, S. Danson^g, R. Griffiths^h, M. Lopez-Botet^c, A. Rovira^a, J. Albanell^{a,b}, C. H. Ottensmeier^{d,e}, and E. Arriola^{a,b}

^aCancer Research Program, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain; ^bMedical Oncology Department, Hospital del Mar-CIBERONC, Barcelona, Spain; ^cImmunology unit, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain; ^dCancer Science Unit, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton, United Kingdom; ^eNIHR Experimental Cancer Medicine Centre, Southampton, United Kingdom; ^fMedical Oncology Department, University Hospital Southampton, Southampton, United Kingdom; ^gSheffield Experimental Cancer Medicine Centre, Weston Park Hospital, Sheffield, United Kingdom; ^hMedical Oncology Department, The Clatterbridge Cancer Centre NHS Foundation Trust, Wirral, United Kingdom; ⁱUniversitat de Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Small-cell lung cancer (SCLC) is often associated with paraneoplastic syndromes. To assess the role of anti-neuronal autoantibodies (NAAs) as biomarkers of treatment outcome, we assessed NAAs in serial samples from SCLC patients treated with chemoimmunotherapy compared to chemotherapy alone. We evaluated 2 cohorts: in cohort 1 (C1), 47 patients received standard platinum/etoposide, and in cohort 2 (C2), 38 patients received ipilimumab, carboplatin and etoposide. Serum samples at baseline and subsequent time points were analyzed for the presence of NAAs. NAAs were detected at baseline in 25 patients (53.2%) in C1 and in 20 patients (52.6%) in C2 (most frequently anti-Sox1). NAA at baseline was associated with limited disease (75% vs 50%; $p = 0.096$) and better overall survival (15.1 m vs 11.7 m; $p = 0.032$) in C1. Thirteen patients (28.9%) showed 2 or more reactivities before treatment; this was associated with worse PFS (5.5 m vs 7.3 m; $p = 0.005$) in patients treated with chemoimmunotherapy. NAA titers decreased after therapy in 68.9% patients, with no differential patterns of change between cohorts. Patients whose NAA titer decreased after treatment, showed longer OS [18.5 m (95% CI: 15.8 – 21.2)] compared with those whose NAA increased [12.3 m (95% CI: 8.1 – 16.5; $p = 0.049$)], suggesting that antibody levels correlate to tumor load. Our findings reinforce the role of NAAs as prognostic markers and tumor activity/burden in SCLC, warrant further investigation in their predictive role for immunotherapy and raise concern over the use of immunotherapy in patients with more than one anti-NAA reactivity.

ARTICLE HISTORY

Received 23 August 2017
Accepted 17 October 2017

KEYWORDS

anti-Hu; anti-Yo; autoantibodies; anti-SOX-1; ipilimumab; paraneoplastic syndrome; Small cell lung cancer

Introduction

Small-cell lung cancer (SCLC) accounts for approximately 15% of all lung cancer.^{1,2} Although robust and often dramatic clinical responses are achieved with platinum-based first-line treatment, recurrence/progression usually occurs early and is resistant to available treatments.³ Outcomes in patients with stage IV disease remain poor with a median overall survival that rarely exceeds one year.^{1,4}


Immunotherapy has led to a paradigm-shift in the treatment of solid tumors.^{5,6} SCLC seems a particularly attractive target for immunotherapy. Paraneoplastic neurological syndromes (PNSs) are common in SCLC and are characterized by anti-cancer immune responses, which become clinically visible by off-tumor immune consequences against neuronal antigens, ectopically expressed by cancer cells and physiologically by the normal nervous system.⁷ The better cancer specific survival outcomes in patients with autoimmune disease points to a protective effect, linked to these cross-reactive immune responses.^{8,9} Moreover, high mutational load has been linked

to benefit from immunotherapy¹⁰ and SCLC falls into this category,^{2,11,12} most likely as a result of the tight association with tobacco smoking. Therefore, harnessing the immune system to fight SCLC seems a potentially promising strategy, although the best approach is currently uncertain.

Ipilimumab is a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody that blocks CTLA-4¹³, and has been tested in SCLC. A phase II trial,¹⁴ showed a trend to improved overall survival with phased ipilimumab added to a platinum doublet. However, the confirmatory phase III trial¹⁵ comparing ipilimumab and chemotherapy vs chemotherapy did not confirm better overall survival after chemoimmunotherapy. More recently, anti-PD-1 agents have also been tested in SCLC. Nivolumab (alone and in combination with ipilimumab) showed antitumor activity in SCLC patients with relapsed disease.¹⁶ In a phase I trial, Pembrolizumab use led to objective responses greater than 30% of patients.¹⁷

Nonetheless, the majority of patients with SCLC do not benefit from checkpoint inhibitors and the absence of

CONTACT Dr. E. Arriola  earriola@parcdesalutmar.cat  Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim de la Barceloneta, 25–29, 08003 Barcelona, Spain.

 Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2017 Taylor & Francis Group, LLC

predictive biomarkers for patient selection may have contributed to negative trial results.¹⁵ Additionally, clinically relevant autoimmune toxicity has been reported, including severe neurological PNS^{14,16,18} increasing the level of caution that is needed when investigating immunotherapy in SCLC. PD-L1 immunohistochemical expression, which is predictive for benefit from modulation of PD1/PDL1 in Non-Small Cell Lung cancer, does not appear to correlate with outcome in SCLC.^{16,17} A confounding effect for the evaluation of PD-L1 status in the tumor is limited access to tissue due to small biopsy material or cytology diagnostic specimens, a well-recognized problem in SCLC.¹⁹ Therefore, the need to develop predictive biomarkers remains an urgent priority in SCLC.

With the aim of identifying potential biomarkers, we previously performed an exploratory analysis of the phase II ICE trial with a single cohort of patients treated with chemotherapy and ipilimumab. In this single arm study, positivity of autoantibodies at baseline was associated with improved outcomes.¹⁸

In the current study we added a 'control' cohort treated with standard chemotherapy in order to assess the predictive vs. prognostic role of the neuronal autoantibodies. We also analyzed changes in autoantibody detection during treatment to evaluate the potential utility of serial sampling.

Results

Patients' characteristics and outcomes

We included 85 SCLC patients: 47 treated with standard chemotherapy (cohort 1 herein) and 38 with standard chemotherapy plus ipilimumab (cohort 2 herein). Patients' characteristics are shown in Table 1. The main differences between both cohorts were that cohort 1 (C1) included more men (74.5% vs 65.8%), 25% patients had limited stage and 15% patients presented with performance status (PS) 2 versus none in cohort 2. None of the patients had any neurological symptoms at diagnosis.

Objective response rate (ORR) was 93.6% in C1 and 81.6% in C2. Median progression free survival (PFS) was 6.8 months (m) (95% CI: 6.1-7.6) in C1 and 6.9 m (95% CI: 6.3-7.6) in C2 ($p = 0.847$). Overall survival (OS) was 13.3 m (95% CI: 10.1-16.5) in C1 vs 17 m (95% CI: 4.5-29.5) in C2 ($p = 0.987$).

Table 1. Patients' characteristics.

	Cohort 1 Chemotherapy N = 47	Cohort 2 Chemotherapy + Ipilimumab N = 38
Gender		
Female	12 (25.5%)	13 (34.2%)
Male	35 (74.5%)	25 (65.8%)
Age		
Mean	62.6	62.5
Range	(45 – 86)	(44 – 84)
PS		
0	26 (55.3%)	11 (28.9%)
1	14 (29.8%)	21 (55.3%)
2	7 (14.9%)	0
NA	0	6 (15.8%)
Stage		
I-III	12 (25.5%)	0
IV	35 (74.5%)	38 (100%)

PS: performance status; NA: not available

Table 2. Univariate analysis for overall survival including both cohorts (Log-Rank test).

Clinical variables	OS (months)	95% Confidence interval		p-value
		Lower	Upper	
Gender				
Male	12.1	7.7	16.5	0.960
Female	15.4	11.4	19.3	
Age				
< 60	15.4	10.3	20.4	0.651
≥ 60y	12.2	9.5	15.7	
PS				
0	15.4	11.7	19.1	0.019
1 or 2	9.2	6.6	11.8	
Stage				
I-III	23.7	11.9	35.6	0.003
IV	12.1	8.9	15.3	
Response to 1 st line treatment				
No	6.2	5.4	7.1	< 0.001
Yes	15.1	12	18.2	

PS: Performance status; OS: Overall survival; y: years

When we selected patients with stage IV in C1, OS was 11.7 m (95% CI: 7.6 – 15.7).

We assessed the impact of clinical variables on survival. Table 2 illustrates the association between clinical variables and OS combining both cohorts. PS:0 vs. PS>0 ($p = 0.019$), limited stage ($p = 0.003$) and response to first line chemotherapy ($p < 0.001$) were associated with a significantly improved survival (Table 2).

Neuronal autoantibody detection

Neuronal autoantibodies (NAA) were detected at baseline in 25 patients (53.2%) in C1 and in 20 patients (52.6%) in C2. In both cohorts, the most prevalent autoantibody was anti-Sox1 (38.3% in C1 and 34.2% in C2), followed by anti-HuD and anti-Yo (Table 3, Fig. 1 – left).

Globally, 13 patients out of the 45 with baseline NAA (28.9%) showed 2 or more reactivities at any time-point (Supplementary Table 1); of these, 11 patients (24.5%), had 2 or more types of autoantibody at baseline. Eight patients (17.8%) in C1 showed 2 or more reactivities; one of these patients was positive at baseline for anti-Sox1, but became also positive for anti-Yo after 3 cycles of chemotherapy. Five patients (11.1%) in C2 showed 2 or more reactivities; one of these patients was positive at baseline for anti-Yo, and became also positive for anti-Gad65 after 8 weeks of treatment. Anti-Yo and Anti-Sox1 detection were associated with another NAA in 7/12 patients (58.3%) and 9/32 patients (28.1%), respectively. One patient showed reactivity for 4 NAA: anti-Sox1, anti-amphiphysin, anti-Ri and anti-HuD. In Fig. 1 (right) we illustrate the different multi-reactivities of NAA in patients of both cohorts.

Association between neuronal autoantibodies and clinical characteristics and outcomes

We next evaluated the association of the detection of NAA with clinical variables. Of 12 patients with limited stage, 9 patients (75%) had detectable NAAs at baseline versus 36/72 (50%) of patients with stage IV disease ($p = 0.096$). This trend was also observed for anti-Sox1 where 7/12 (58.3%) of patients with

Table 3. Neuronal autoantibody detection at baseline.

	Cohort 1 Chemotherapy N = 47	Cohort 2 Chemotherapy + Ipilimumab N = 38
Anti-Sox1		
Positive	18 (38.3%)	13 (34.2%)
Negative	29 (61.7%)	24 (63.2%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Yo		
Positive	8 (17%)	3 (7.9%)
Negative	39 (83%)	34 (89.5%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-HuD		
Positive	4 (8.5%)	4 (10.5%)
Negative	43 (91.5%)	33 (86.8%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Gad65		
Positive	3 (6.4%)	2 (5.3%)
Negative	44 (93.6%)	35 (92.1%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Ri		
Positive	2 (4.3%)	0
Negative	45 (95.7%)	37 (100%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Cv2		
Positive	0	1 (2.6%)
Negative	47 (100%)	36 (94.7%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Amphiphysin		
Positive	0	1 (2.6%)
Negative	47 (100%)	36 (94.7%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Ma1		
Positive	0	0
Negative	47 (100%)	37 (100%)
NA	0	1 (2.6%)
Anti-Ma2		
Positive	0	0
Negative	47 (100%)	37 (100%)
NA	0	1 (2.6%)

NA: not available

limited stage had detectable anti-Sox1 at baseline compared to 24/72 (33.3%) patients with stage IV ($p = 0.092$). The presence of anti-HuD and anti-Yo did not show any correlation with stage. There was no association between sex, age or PS and detection of neither any baseline NAA nor specific autoantibodies.

We assessed the association of NAAs with clinical outcomes. In patients with pre-treatment NAAs we observed a trend for better overall survival when both cohorts were analyzed together [14.8 m (95% CI: 10.6-19) vs 12.1 m (95% CI: 8.2-16); $p = 0.089$]. In patients treated with chemotherapy alone, this association was significant [15.1 m (95% CI: 10.2-20) vs 11.7 m (95% CI: 7.5-15.9); $p = 0.032$] (Fig. 2). This association was lost when the analysis was restricted to stage IV patients and was not observed in patients from C2. No effect from baseline autoantibody presence was observed on objective response rates or PFS (Table 4).

We then tried to gain insight whether the breadth rather than simply examining presence or absence of reactivity against NAAs might link to outcomes. We segregated patients with reactivity to exactly one, as opposed to >1 NAA. Unexpectedly, the presence of only 1 NAA vs >1 NAA was associated with better PFS [7.3 m (95% CI: 5.9-8.6) vs 5.5 m (95% CI: 2.8-8.2); $p = 0.005$] in patients treated with chemo-immunotherapy (Fig. 3); a trend was also visible in OS [12.3 m (95% CI: 4.7-19.9) vs 7.9 m (95% CI: 4.9-11); $p = 0.180$]. No such association was observed in the chemotherapy only cohort. The detection of multiple vs. single reactivities was not associated with ipilimumab-related adverse events in cohort 2 (colitis, fatigue and rash) nor neurological events.

We then evaluated the association between NAA against individual antigens and clinical outcomes. In patients treated with ipilimumab and chemotherapy, OS was 7.8 m (95% CI 2.2-13.4) when anti-Yo was positive, and 17 m (8.7-25.4) when it was negative ($p = 0.015$); PFS was 4.3 m (95% CI: 2.5-6) when anti-Yo was positive, and 6.9 m (95% CI: 6.4-7.5) when anti-Yo was negative ($p = 0.081$). No other associations were observed between other individual NAAs and clinical outcomes.

In the multivariate analysis in C2 for OS, including poor PS and lack of response to first line treatment, having 2 or more vs 1 NAA, remained independently associated with poor outcome (HR: 3.4; p -value: 0.033).

Titers of NAA change upon response to treatment

We quantified the titers of NAAs at each time point (Supplementary Fig. 1). Overall in 31 (68.9%) of the 45 patients with

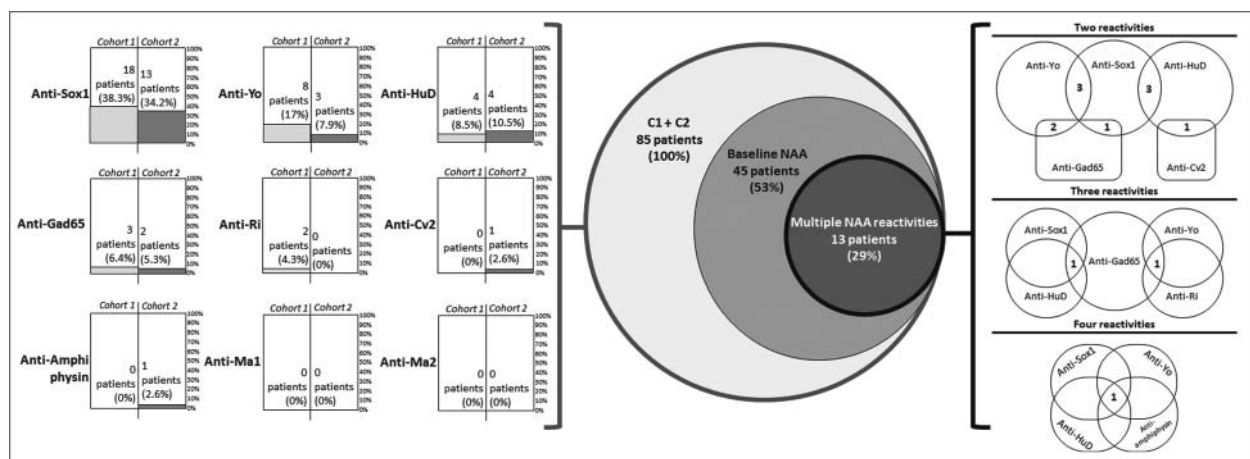


Figure 1. Neuronal autoantibodies prevalence in patients with SCLC. On the left, percentage and absolute numbers of neuronal autoantibody detected at baseline in each cohort. In the center, Venn's diagrams illustrating the different NAA multi reactivities in patients from both cohorts. On the right we show the combination of NAA with 2, 3 or 4 reactivities. Numbers at the intersection of Venn's diagrams are number of patients with that combination.

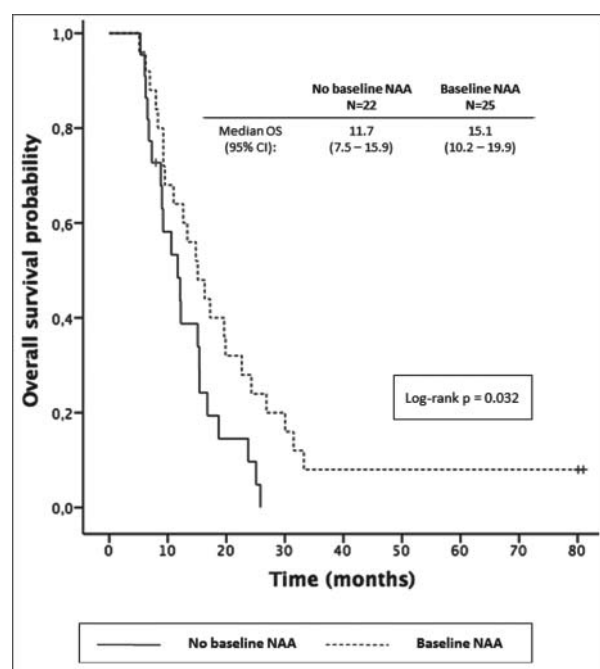


Figure 2. Overall survival in patients treated with chemotherapy alone ($n = 47$) with or without any baseline NAA.

NAA at baseline, titers decreased after treatment initiation (Fig. 4). In 22 out of these (48.9%), titers remained lower than baseline at the 3rd time point (progression) and in 9 patients (20%) they increased again. In 6 patients (13.4%), titers increased after treatment; of these, 2 patients (4.5%) maintained higher titers at progression and in 4 patients (8.9%) titers decreased. Autoantibody titers remained unchanged in 2 patients (4.5%). Variable patterns of change were observed in the 6 (13.4%) remaining patients (example shown in Supplementary Fig. 2).

We then assessed the correlation between the pattern of change of NAAs and response to treatment. Of 45 patients with baseline NAA, 42 (93.3%) responded to treatment while 3 (6.7%) did not. At progression, 25 (59.5%) of previous treatment responders showed an ongoing decrease in NAA; all 3 primary non-responder patients showed an increase of titer of NAA ($p = 0.080$).

Next, we evaluated the correlation between survival and evolution of NAA's titers. In patients treated with chemotherapy alone, those whose NAAs increased from baseline to first response assessment ($N = 6$), showed a longer PFS [12 m (95%

Table 4. Objective response rate, progression free survival and overall survival in patients with at least 1 baseline positive NAA vs those with no detectable NAAs.

	ORR	PFS	OS
Cohort 1			
NAAs+	96%	7.4 m (6.2-8.6)	15.1 m (10.2-20)
NAAs-	91%	6.2 m (5.5-7)	11.7 m (7.5-15.9)
p-value	0.451	0.279	0.032
Cohort 2			
NAAs+	90%	6.9 m (6.6-7.2)	12.3 m (5.3-19.3)
NAAs-	93%	6.9 m (2.7-11.1)	17 m (0-36.1)
p-value	0.635	0.762	0.796

ORR: objective response rate; PFS: progression free survival; OS: overall survival; NAAs: neuronal autoantibodies; +: positive; -: negative

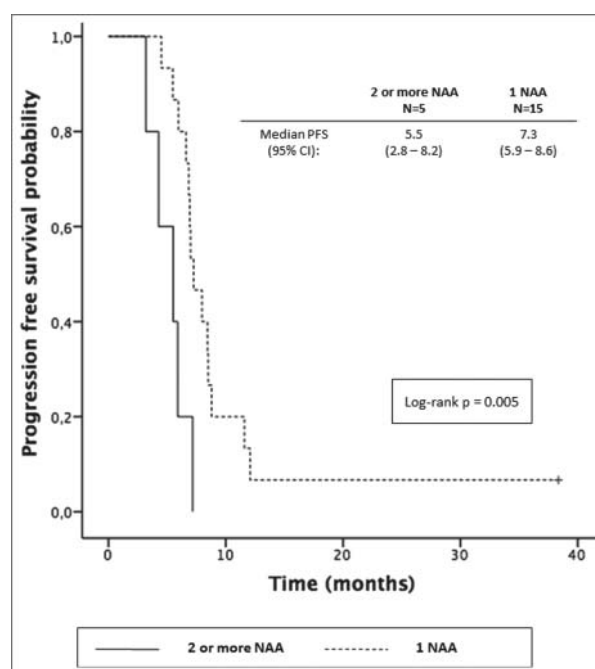


Figure 3. Progression free survival in patients treated with ipilimumab plus chemotherapy with presence of 1 NAA vs 2 or more ($n = 20$).

CI: 11.4-12.6]) compared to those showing a decrease in titers ($N = 15$) [6.9 m (95% CI: 6.1-7.6)] ($p = 0.016$). This difference was not observed in the chemoimmunotherapy cohort. Patients of both cohorts, whose NAA had decreased or remained stable at the end of the treatment (third time point) showed an OS of 18.5 m (95% CI: 15.8 - 21.2) and those whose NAA had increased showed an OS of 12.3 m (95% CI: 8.1 - 16.5; $p = 0.049$). When analyzed separately by treatment, this trend was present in the ipilimumab plus chemotherapy [18.5 m (95% CI: 9.1-27.8) vs 9.5 m (95% CI: 7.0-12.0); $p = 0.143$] and in the chemotherapy alone group [17.2 m (95% CI: 12.4-22.1) vs 12.6 m (95% CI: 8.3-17); $p = 0.090$].

Discussion

SCLC is an aggressive disease with poor outcome. Tumor-associated immunological events have been classically described in SCLC in the form of paraneoplastic syndromes, which clinically lead to neurological adverse events.²⁰ Autoantibodies directed to neuronal antigens abnormally expressed in the tumor are detected in patients with PNS and are used as a diagnostic tool in this setting.^{21,22} NAAs have been described to be immune effectors of neurological dysfunction in the case of membranous antigens (i.e. calcium channel antibodies).²³ Intracellular antigens may also be subject to a cytotoxic T-cell response, where the accompanying antibody production may not be *per se* pathogenic.²⁴⁻²⁷ Notably, a proportion of patients have detectable NAAs in absence of neurological symptoms, although generally at lower titers. Dalmau et al. had previously reported a prevalence of around 16% of SCLC patients without neurological PNS who have detectable titers of anti-Hu.²⁸ Around 1% of positivity of anti-HuD was reported in patients diagnosed of PNS.^{28,29} In a more recent study, Gozzard et al. found 9.6% of SCLC patients without neurological PNS with positivity for anti-Hu, but when testing also for other NAAs

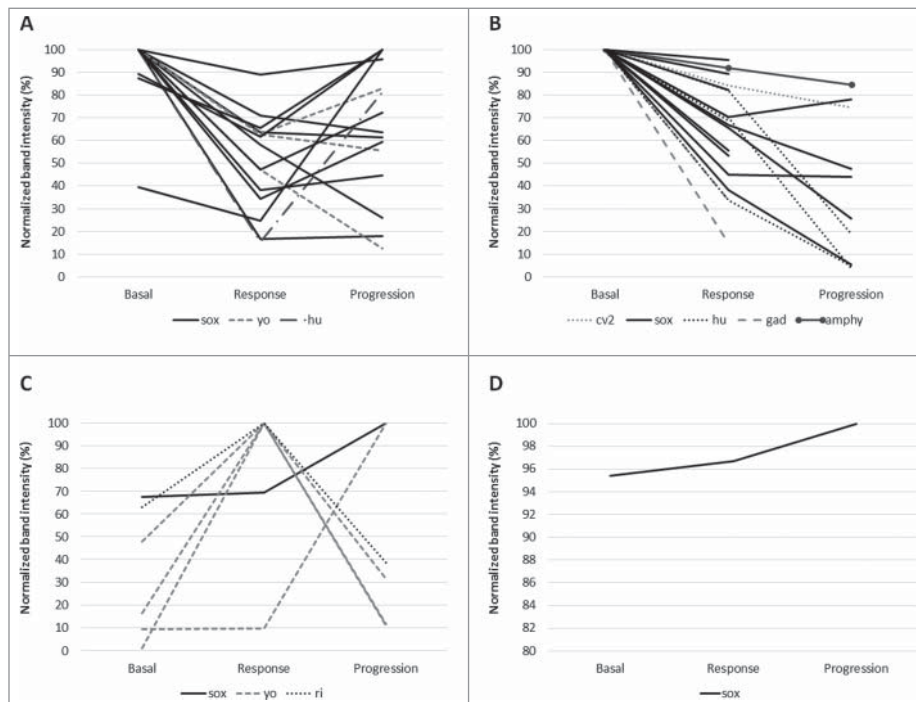


Figure 4. Changes in autoantibody titers at different time-points in both cohorts. A: Patients treated with chemotherapy, whose NAA titers decreased after treatment was started. B: Patients treated with chemotherapy and ipilimumab, whose NAA titers decreased after treatment was started. C: Patients treated with chemotherapy, whose NAA titers increased after treatment was started. D: Patients treated with chemotherapy and ipilimumab, whose NAA titers increased after treatment was started.

(Sox2, HuD, Gad65, Amphyphisin, Ri, Cv2, Ma2 and Yo), 41% patients harbored at least one NAA.³⁰ Consistent with these observations and in line with previous evidence, 53% of our patients had detectable levels of at least one NAA and none had neurological symptoms.^{22,28-33} All but one patient with positive detection of anti-HuD, showed lower titers of NAAs in comparison with the patient with known anti-HuD related PNS (positive control) (data not shown).

Consistent with previously reported series,^{22,30} in the current study anti-Sox1 was the most prevalent tumor-associated NAA. Unexpectedly, anti-Yo was the second most prevalent NAA; although it is usually associated with ovarian and breast cancer, it has also been described in lung cancer.^{34,35} Moreover, anti-Gad65, usually linked to autoimmune diabetes,³⁶ was detected in 3 patients in C1 and in 2 patients in C2. None of these patients had a history of type 1 diabetes in our study. It could be argued that these detections could be due to technical issues with the immune-blot assay. However, this method has been used in previous studies and shows good performance in 'screening' settings such as our work.^{37,38} Furthermore, the fact of having serial samples for the same patient allowed us to use these as internal controls for the positive cases (Supplementary Fig. 1).

The presence of NAAs has been linked to early stages and in turn to better outcome.^{28,29,32,39} The concomitant cytotoxic T cell response^{27,40-42} might contribute to a degree of tumor control, sparing the immune privileged nervous system.^{43,44} In the case of SCLC-associated PNS, the diagnosis of the neurological disease often antedates that of the tumor,^{20,45} suggesting that the immune system is able to detect the presence of SCLC before the cancer develops metastases.^{39,46} This concept is also supported in other studies where the presence of

autoantibodies was independently associated with earlier stages.^{29,47} Accordingly, in our series we observed a trend towards an association of NAAs (specifically anti-Sox1) with earlier stage.

When we analyzed the presence of multiple against single NAA reactivities, we observed that 28% of patients had more than one reactivity. This is consistent with previous literature. In a large series of 60,000 subjects with suspicion of PNS, 553 (0.9%) were positive for any NAA²¹; among these, 31% had more than 1 autoantibody. Intriguingly, in our series, patients with multiple reactivities had a significantly shorter PFS and OS when treated with the combination of chemotherapy and ipilimumab. The presence of coexisting autoantibodies reflects a multifaceted response to the different immunogenic onconeural proteins expressed in tumors. The impact of multiple vs. single reactivities has not been reported previously. Although small numbers are included in this analysis, if multiple reactivities reflected heterogeneity within the tumor and consequently subclonal T cell responses, it has been described that checkpoint inhibitor treatment might be less effective in this scenario,⁴⁸ but this is hypothesis generating and requires validation.

We analyzed the patterns of change in NAA titers in patients treated with chemotherapy vs. those treated with chemioimmunotherapy. In most patients the NAA titers decreased after initiation of therapy. We note that the addition of ipilimumab to chemotherapy did not appear to affect this outcome; this is in contrast with boosting of humoral response to vaccination against infectious agents that has previously been reported⁴⁹ and also to the effect of ipilimumab on tumor-specific T cells that appear to be induced de novo.⁵⁰ Our data are in line with clinical observations in patients with cancer-

associated PNS, where in treatment-responders antibodies can decrease or even normalize.^{51,52} In a series of 50 cancer patients with PCD and at least one NAA, Shams'ili et al. report resolution of PCD in 9/42 patients (21.4%) after successful tumor treatment.⁵³ In 5 neurological responder patients where the authors evaluated changes in NAA-titer no consistent pattern was observed. Additional immunosuppressants for PNS may have also confounded the interpretation in this study. In patients with anti-Yo related PNS, antibody titers decreased after surgical removal of the tumor without resolution of the neurological symptoms.^{54,55} Overall NAA levels appear to decrease following removal of tumor antigen; the observation of worsening PNS with disease recurrence^{32,56} and increase risk of relapse in HPV+ patients whose HPV antibodies persist⁵⁷ both support this conclusion. Whether levels of NAA are important clinically or simply 'bystanders' of cellular immune consequences of treatment is uncertain.

An intriguing question arises over the location of the antibody forming cells that drive the production of NAA. More widely in oncology, for example in patients with thymoma, improvement of paraneoplastic myasthenia is observed after, and is the clinical aim of surgical thymectomy. These data point to the production of antibody within the tumor microenvironment and there is indeed an emerging literature that identifies B-cells and tertiary lymphatic structures as common constituents in the cancer mass in a wide variety of solid tumors.⁵⁸⁻⁶¹ In contrast, persistence of the neurological paraneoplasia in some cases even after radiological complete removal of cancer by treatment both in thymomas and SCLC suggests that the antibody forming cells may not be located in the cancer tissue (only) in all cases. In line with this, one immunohistochemical study assessing the presence of T and B-cells in SCLC surgical specimens, demonstrated a small numbers of B-cells infiltrating the tissue with 40% of cases with absence of this cell subtype,⁶² although this might change in extensive disease. Moreover, we cannot rule out here that the SCLC chemotherapy may have also removed B-cells that are producing the NAA irrespective of the effect on tumor load.

Consistent with the concept that removal of immunogen is linked with a decrease in antibody titer, we observed a trend to a longer OS in those patients whose titer of NAA decreased progressively after treatment with chemotherapy; this was irrespective of whether ipilimumab was administered.

Intriguingly however, our data also raise the possibility of a quite different immunological consequence: subgroup analysis of the small number of patients with increasing titers after initiation of chemotherapy identified a longer than median PFS; this raises the question of whether enhanced immune response due to intracellular antigen exposure after cytotoxic chemotherapy may lead to a better T-cell response and in turn to increased antibody production. A dataset in melanoma reported by the Wolchok group is consistent with this concept, as the presence or development of antibodies and T-cell responses to NyEso1 appeared to identify a group of patients, who did well after ipilimumab treatment.⁶³ We conclude that further detailed studies are needed, which link the humoral responses and cellular responses in cancer patients, both after standard treatment and immunotherapy.

In summary, we were able to confirm the prognostic role of NAA probably related with disease control in early stage derived from tumor directed immune response. To our knowledge, we demonstrate for the first time that treatment with ipilimumab combined with chemotherapy in SCLC does not induce differential changes in NAA titers and their levels appear to mainly reflect the disease burden. The predictive role of NAAs and B cell immune response warrants further investigation in SCLC.

Patients and methods

Study populations

We retrospectively analyzed the data and serum from 85 SCLC patients from two independent cohorts. The first cohort included 47 patients with SCLC treated with first-line standard chemotherapy (platinum – etoposide), recruited within research projects in Hospital del Mar, Barcelona, and previously reported.⁶⁴⁻⁶⁶ We included patients with early and locally advanced disease as well as stage IV patients, in order to investigate the impact of stage in the detection of NAAs. From this series we had a control population, from age- and sex-matched healthy donors (N: 30) to the study population. The second cohort were patients included in the ICE trial,¹⁸ where 38 chemo-naïve stage IV SCLC patients were treated with ipilimumab in combination with carboplatin-etoposide. Serum samples at baseline and subsequent time points (before, during and after treatment) were collected from each patient. Complete clinical data and follow up information was available for every patient.

Sample analysis was approved for the cohort 1 by the local ethics committee and for cohort 2 within the trial ethics committee.

Sampling

Serum samples were collected for C1 before treatment initiation (baseline), at first response assessment and at progression. For C2, samples were collected at baseline, at 3 and 6 months when feasible. All patients in C1 had 3 serial serum samples (baseline, first response assessment and progression timepoints). Out of the 38 patients in C2, 20 had 2, 11 had 3, and 6 had 4 serial timepoints (all included baseline). One patient in C2 had no available serum samples. Serum from 3 healthy volunteers was used as negative controls and serum from a SCLC patient with a known anti-HuD associated PNS as a positive control.

Whole blood samples were collected by standard venipuncture techniques using serum separator tubes. Samples were allowed to clot for 30 minutes at room temperature before centrifugation for 10 minutes at 1000 g at 4°C. Following centrifugation, the supernatant (serum) was immediately removed and assayed immediately or aliquoted and stored frozen at –80°C until further use.

Assessment of autoantibodies

A commercial immunoblotting assay (Ravo PNS-Blot, Ravo Diagnostika) consisting of a membrane strip coated with the

recombinant intracellular neuronal antigens Gad65, Sox1, Ma1, Ma2, Amphiphysin, CRMP5, Ri, Yo and HuD was used. Patient and control sera were diluted 1:200 as established in the current version of the instructions for use (01/2017) and processed following manufacturer's protocol.

Incubated line blots were scanned and processed for quantification with ImageJ 1.51 h (NIH). A distinctive band corresponding to the actual position of the antigen in the line blot was considered as a positive signal. Background was subtracted from band intensity. This value was normalized with the positive control and the percentage of variation between each time-point was calculated. A percentage of variation of more than 5% was considered as change (increase/decrease) of titer of NAA. Prism 6.0 (GraphPad) was used for plot construction.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) and Stata/MP 14 (StataCorp LLC, Texas, USA) together with the Statistical Assessment Service from IMIM (Hospital del Mar). To analyze associations between categorical variables we used the Chi-square test or the Fisher's exact test as appropriate. Overall survival was plotted by Kaplan–Meier method and curves were compared by the log-rank test. Multivariate analysis was performed with the Cox regression method. All tests were conducted at the two-sided 0.05 level of significance.

Abbreviations

CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ICE	Ipilimumab-Carboplatin-Etoposide
NAA	Neuronal auto-antibody
ORR	Objective response rate
OS	Overall survival
PCD	Paraneoplastic cerebellar degeneration
PD-1	Programmed cell death protein 1
PFS	Progression free survival
PNS	Paraneoplastic neurological syndrome
pRB	Retinoblastoma protein
PS	Performance status
SCLC	Small cell lung cancer

Disclosure statement

E.A. and C.O. have received honoraria for consultancy and lectures from Bristol-Myers Squibb outside of the current work. The rest of authors report no conflict of interest.

Funding details

This work was supported in part by a grant from (1) Fundació La Marató de TV3 (666/C/2013); (2) ISCIII/FEDER (CIBERONC CB16/12/00241, RD12/0036/0051, PIE15/00008, PI15/00146, PI16/00591, PI13/00140); (3) Xarxa de Bancs de Tumors (XBTC); (4) Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya (2014SGR740), (5) Fundació Cellex and (6) Cancer Research UK grant: C491/A12135

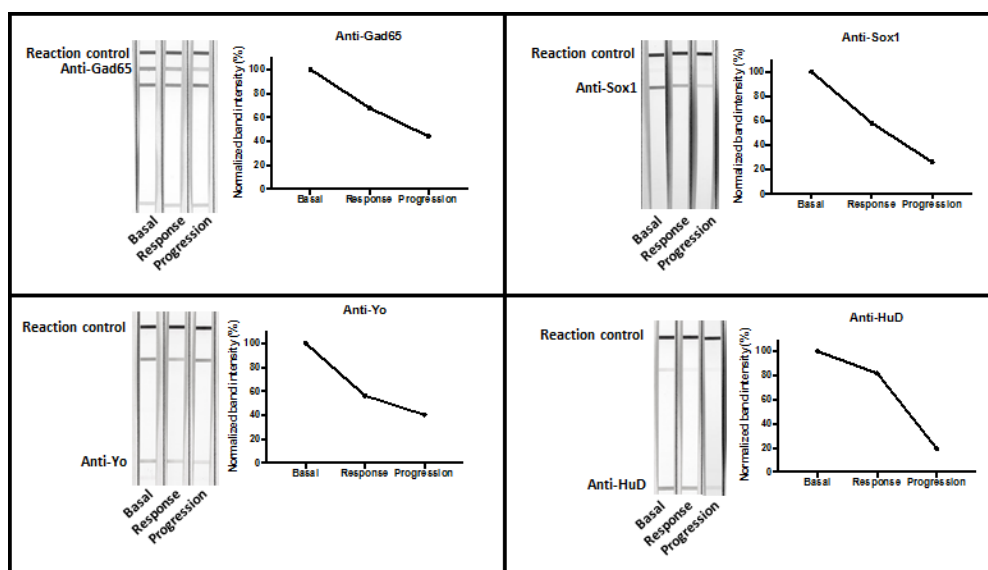
References

- Oze I, Hotta K, Kiura K, Ochi N, Takigawa N, Fujiwara Y, Tabata M, Tanimoto M. Twenty-seven years of phase III trials for patients with extensive disease small-cell lung cancer: disappointing results. *PLoS One*. 2009;4:e7835. doi:10.1371/journal.pone.0007835. PMID:19915681.
- Byers LA, Rudin CM. Small cell lung cancer: Where do we go from here? *Cancer*. 2014;121:664–72.
- Hanna N, Bunn PA, Langer C, Einhorn L, Guthrie T, Beck T, Ansari R, Ellis P, Byrne M, Morrison M, et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:2038–43.
- Puglisi M, Dolly S, Faria A, Myerson JS, Popat S, O'Brien MER. Treatment options for small cell lung cancer – do we have more choice? *Breast J Cancer*. 2010;102:629–38. doi:10.1038/sj.bjc.6605527.
- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711–23. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
- Brahmer J, Reckamp K, Baas P, Crinò L, Eberhardt W, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes E, Holgado E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373:1627–39. doi:10.1056/NEJMoa1504627.
- Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes and the nervous system. *N Engl J Med*. 2003;35:287–8.
- Maddison P, Newsom-Davis J, Mills K, Souhami R. Favourable prognosis in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and small-cell lung carcinoma. *Lancet*. 1999;353:117–8. doi:10.1016/S0140-6736(05)76153-5. PMID:10209997.
- Wirtz PW, Lang B, Graus F, Van Den Maagdenberg AMJM, Saiz A, De Koning Gans PA, Twijnstra A, Verschuuren JJGM. P/Q-type calcium channel antibodies, Lambert-Eaton myasthenic syndrome and survival in small cell lung cancer. *J Neuroimmunol*. 2005;164:161–5. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.04.001.
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124–8. doi:10.1126/science.aaa1348. PMID:26068851.
- Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, Yung R, Parmigiani G, Dorsch M, Peacock CD, et al. A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res*. 2009;69:3364–73. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4210.
- Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CHCM, Terada M, Koeffler HP. p53 Mutations in Human Lung Tumors. *Cancer Res*. 1992;52:1695–8.
- Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, Chapman PB, Schwartz GK, Allison JP, Wolchok JD. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer*. 2010;116:1767–75. doi:10.1002/cncr.24951.
- Reck M, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, Sebastian M, Lu H, Cuillerot JM, Lynch TJ. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: Results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Ann Oncol*. 2013;24:75–83. doi:10.1093/annonc/mds213.
- Reck M, Luft A, Szczesna A, Havel L, Kim SW, Akerley W, Pietanza MC, Wu YL, Zielinski C, Thomas M, et al. Phase III randomized trial of ipilimumab plus etoposide and platinum versus placebo plus etoposide and platinum in extensive-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34:3740–8. doi:10.1200/JCO.2016.67.6601.
- Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, Ott PA, Taylor M, Eder JP, Jäger D, Pietanza MC, Le DT, de Braud F, et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17:883–95. doi:10.1016/S1470-2045(16)30098-5.

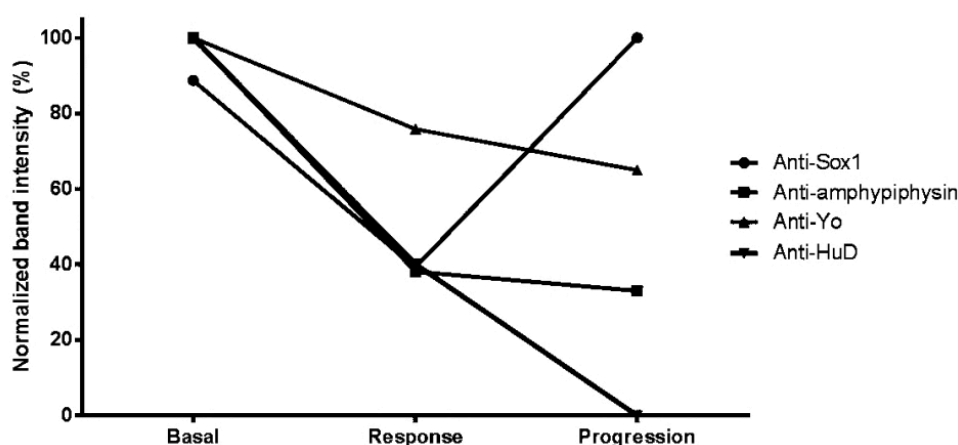
17. Ott PA, Elez E, Hirt S, Kim D-W, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, Mehnert JM. Pembrolizumab in Patients With Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: Results From the Phase Ib KEYNOTE-028 Study. *J Clin Oncol* 2017;:JCO. 2017;72.506.
18. Arriola E, Wheeler M, Galea I, Cross N, Maishman T, Hamid D, Stanton L, Cave J, Geldart T, Mulatero C, et al. Outcome and Biomarker Analysis from a Multicenter Phase 2 Study of Ipilimumab in Combination with Carboplatin and Etoposide as First-Line Therapy for Extensive-Stage SCLC. *J Thorac Oncol*. 2016;11:1511–21. doi:10.1016/j.jtho.2016.05.028.
19. Travis WD. Pathology and Diagnosis of Neuroendocrine Tumors: Lung Neuroendocrine. *Thorac Surg Clin*. 2014;24:257–66. doi:10.1016/j.thorsurg.2014.04.001.
20. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol*. 2006;33:270–98. doi:10.1053/j.seminoncol.2006.03.008.
21. Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol*. 2004;56:715–9. doi:10.1002/ana.20269.
22. Titulaer MJ, Klooster R, Potman M, Sabater L, Graus F, Hegeman IM, Thijssen PE, Wirtz PW, Twijnstra A, Smitt PAES, et al. SOX antibodies in small-cell lung cancer and Lambert-Eaton myasthenic syndrome: frequency and relation with survival. *J Clin Oncol*. 2009;27:4260–7. doi:10.1200/JCO.2008.20.6169.
23. Fukunaga H, Engel AG, Lang B, Newsom-Davis J, Vincent A. Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with IgG from man to mouse depletes the presynaptic membrane active zones. *Pnas*. 1983;80:7636–40. doi:10.1073/pnas.80.24.7636.
24. Bach JF, Koutouzov S, Van Ender PM. Are there unique autoantigens triggering autoimmune diseases? *Immunol Rev*. 1998;164:139–55. doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01216.x.
25. Kai W. Wucherpfennig. Autoimmunity in the Central Nervous System: Mechanisms of Antigen Presentation and Recognition. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994;72:293–306.
26. De Beukelaar JW, Smitt PAS, Hop WC, Kraan J, Hooijkaas H, Verjans GMGM, Gratama JW. Imbalances in circulating lymphocyte subsets in Hu antibody associated paraneoplastic neurological syndromes. *Eur J Neurol*. 2007;14:1383–91. doi:10.1111/j.1468-1331.2007.01986.x.
27. Albert ML, Darnell JC, Bender a, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med*. 1998;4:1321–4. doi:10.1038/3315.
28. Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer—a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol*. 1990;27:544–52. doi:10.1002/ana.410270515.
29. Graus F, Dalmau J, Reñé R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardinal F, Viñolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, et al. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol*. 1997;15:2866–72. doi:10.1200/JCO.1997.15.8.2866.
30. Gozzard P, Woodhall M, Chapman C, Nibber A, Waters P, Vincent A, Lang B, Maddison P. Paraneoplastic neurologic disorders in small cell lung carcinoma: A prospective study. *Neurology*. 2015;85:235–9. doi:10.1212/WNL.0000000000001721.
31. Sodeyama N, Ishida K, Jaeckle KA, Zhang L, Azuma A, Yamada M, Mizusawa H, Wada Y. Pattern of epitopic reactivity of the anti-Hu antibody on HuD with and without paraneoplastic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66:97–9. doi:10.1136/jnnp.66.1.97.
32. Atakan S, Bayiz H, Sak S, Poyraz A, Vural B, Yildirim AS, Demirag F, Gure AO. Autologous anti-SOX2 antibody responses reflect intensity but not frequency of antigen expression in small cell lung cancer. *BMC Clin Pathol*. 2014;14:24. doi:10.1186/1472-6890-14-24. PMID:24940116.
33. Tsou JA, Kazarian M, Ankur Patel M, Janice S, Galler M., Laird-Offringa A, Carpenter CL, J. SL. Low level anti-Hu reactivity: a risk marker for small cell lung cancer? *Cancer Detect Prev*. 2010;32:292–9. doi:10.1016/j.cdp.2008.06.006.
34. Hasadsri L, Lee J, Wang BH, Yekkirala L, Wang M. Anti-yo associated paraneoplastic cerebellar degeneration in a man with large cell cancer of the lung. *Case Rep Neurol Med*. 2013;2013:725936. PMID:24167748.
35. Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology*. 1992;42:1931–7.
36. Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem*. 2011;57:168–75. doi:10.1373/clinchem.2010.148205.
37. Gozzard P, Chapman C, Vincent A, Lang B, Maddison P. Novel Humoral Prognostic Markers in Small-Cell Lung Carcinoma: A Prospective Study. 2015;430:1–14.
38. Berger B, Bischler P, Dersch R, Hottenrott T, Rauer S, Stich O. “Non-classical” paraneoplastic neurological syndromes associated with well-characterized antineuronal antibodies as compared to “classical” syndromes – More frequent than expected. *J Neurol Sci*. 2015;352:58–61. doi:10.1016/j.jns.2015.03.027.
39. Verschuuren JJ, Perquin M, ten Velde G, De Baets M, Vriesman PB, Twijnstra A. Anti-Hu antibody titre and brain metastases before and after treatment for small cell lung cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;67:353–7. doi:10.1136/jnnp.67.3.353.
40. Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, Whalen RG, Posner JB, Dalmau J. DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice. *Clin Cancer Res*. 1998;4:2819–24.
41. Musunuru K, Darnell RB. Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-Binding Proteins and Signaling Proteins in Neuronal Degeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:239–62. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.239.
42. Tanaka M, Maruyama Y, Sugie M, Motizuki H, Kamakura K, Tanaka K. Cytotoxic T cell activity against peptides of Hu protein in anti-Hu syndrome. *J Neurol Sci*. 2002;201:9–12. doi:10.1016/S0022-510X(02)00157-0.
43. Dalmau J, Graus F, Cheung N-K V., Rosenblum MK, Ho A, Cañete A, Delattre J-Y, Thompson SJ, Posner JB. Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer. *Cancer*. 1995;75:99–109. doi:10.1002/1097-0142(19950101)75:1%3c99::AID-CNCR2820750117%3e3.0.CO;2-I.
44. DeLuca I, Blachère NE, Santomaso B, Darnell RB. Tolerance to the neuron-specific paraneoplastic HuD antigen. *PLoS One*. 2009;4:e5739. doi:10.1371/journal.pone.0005739. PMID:19492067.
45. Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:723–9. doi:10.1016/S0952-7915(97)80055-6.
46. Winter SF, Sekido Y, Minna JD, McIntire D, Johnson BE, Gazdar AF, Carbone DP. Antibodies against autologous tumor cell proteins in patients with small-cell lung cancer: association with improved survival. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:2012–8. doi:10.1093/jnci/85.24.2012.
47. Maddison P, Thorpe A, Silcocks P, Robertson JFR, Chapman CJ. Autoimmunity to SOX2, clinical phenotype and survival in patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;70:335–9. doi:10.1016/j.lungcan.2010.03.002.
48. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Birkbak NJ, Hiley CT, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016;351:1463–9. doi:10.1126/science.aaf1490.
49. Weber JS, Hamid O, Chasalow SD, Wu DY, Parker SM, Galbraith S, Gnjatic S, Berman D. Ipilimumab Increases Activated T Cells and Enhances Humoral Immunity in Patients With Advanced Melanoma. *J Immunother*. 2012;35:89–97. doi:10.1097/CJI.0b013e31823aa41c.
50. Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, Welters MJP, van der Burg S, Kapiteijn E, Michielin O, et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8+ T cell response. *Sci Transl Med*. 2014;6:254ra128. doi:10.1126/scitranslmed.3008918. PMID:25232180.
51. Morita M, Fukuhara T, Takahashi H, Maemondo M. Small cell lung cancer and progressive retinopathy. *BMJ Case Rep*. 2014;2014:2–5. doi:10.1136/bcr-2014-205888.
52. Hiasa Y, Kunishige M, Mitsui T, Kondo S, Kuriwaka R, Shigekiyo S, Kanematsu T, Satake N, Bando Y, Kondo A, et al. Complicated paraneoplastic neurological syndromes: A report of two patients with small cell or non-small cell lung cancer. *Clin Neurol Neurosurg*. 2003;106:47–9. doi:10.1016/S0303-8467(03)00059-3.

53. Shams'ili S, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, Hooijkaas H, van der Holt B, Vecht C, Sillevs Smitt P. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain*. 2003;126:1409–18. doi:10.1093/brain/awg133.
54. Greenlee JE, Dalmau J, Lyons T, Clawson S, Smith RH, Pirch HR. Association of anti-Yo (type I) antibody with paraneoplastic cerebellar degeneration in the setting of transitional cell carcinoma of the bladder: detection of Yo antigen in tumor tissue and fall in antibody titers following tumor removal. *Ann Neurol*. 1999;45:805–9. doi:10.1002/1531-8249(199906)45:6%3c805::AID-ANA18%3e3.0.CO;2-G.
55. Selby KJ, Warner J, Klempner S, Konstantinopoulos PA, Hecht JL, Ph D. Case Report Anti-Yo Antibody Associated With Occult Fallopian Tube Carcinoma. 2011;:536–8.
56. Nagashima T, Mizutani Y, Kawahara H, Maguchi S, Terayama Y, Shinohara T, Orba Y, Chuma T, Mano Y, Itoh T, et al. Anti-Hu paraneoplastic syndrome presenting with brainstem-cerebellar symptoms and Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *Neuropathology*. 2003;23:230–8. doi:10.1046/j.1440-1789.2003.00501.x.
57. Hanna GJ, Sridharan V, Margalit DN, La Follette SK, Chau NG., Rabinowitz G, Lorch JH, Haddad RI, Tishler RB, Anderson KS, et al. Salivary and serum HPV antibody levels before and after definitive treatment in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2017;19:129–36. doi:10.3233/CBM-160071.
58. Wood O, Woo J, Seumois G, Savelyeva N, McCann KJ, Singh D, Jones T, Peel L, Breen MS, Ward M, et al. Gene expression analysis of TIL rich HPV-driven head and neck tumors reveals a distinct B-cell signature when compared to HPV independent tumors. *Oncotarget*. 2016;7:56781–97. doi:10.18632/oncotarget.10788.
59. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29:1093–102. doi:10.1038/onc.2009.416.
60. Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Cremer I, Fisson S, Dammotte D, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;344:1–24.
61. Poschke I, Faryna M, Bergmann F, Flossdorf M, Lauenstein C, Hermes J, Hinz U, Hank T, Ehrenberg R, Volkmar M, et al. Identification of a tumor-reactive T-cell repertoire in the immune infiltrate of patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1240859. doi:10.1080/2162402X.2016.1240859. PMID:28123878.
62. Eerola AK, Soini Y, Pääkkö P. A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6:1875–81.
63. Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, Rasalan TS, Ritter E, Gallardo HF. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Pnas*. 2011;108. doi:10.1073/pnas.1110814108.
64. Cañadas I, Taus A, Villanueva X, Arpí O, Pijuan L, Rodríguez Y, Menéndez S, Mojal S, Rojo F, Albanell J, et al. Angiopoietin-2 is a negative prognostic marker in small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2015;90:302–6. doi:10.1016/j.lungcan.2015.09.023.
65. Cañadas I, Taus A, González I, Villanueva X, Gimeno J, Pijuan L, Dómine M, Sánchez-Font A, Vollmer I, Menéndez S, et al. High circulating hepatocyte growth factor levels associate with epithelial to mesenchymal transition and poor outcome in small cell lung cancer patients. *Oncotarget*. 2014;5:5246–56. doi:10.18632/oncotarget.2124.
66. Cañadas I, Rojo F, Taus A, Arpí O, Arumí-Uría M, Pijuan L, Menéndez S, Zazo S, Dómine M, Salido M, et al. Targeting epithelial-to-mesenchymal transition with Met inhibitors reverts chemoresistance in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20:938–50. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1330.

Material suplementario correspondiente al artículo 1



Supplementary Figure 1. Example of quantification of autoantibodies in consecutive time-points. By means of image analysis (ImageJ 1.51h), we quantified the titers of NAA at each time point for every patient as the following examples. On the left side of each plot, a section of an immunoblot assay showing the reactivity against a specific autoantibody in different time-points of a given patient. On the right, plot showing the variation of intensity of the band normalized to the positive control.



Supplementary Figure 2. Plot showing an example of one patient (out of 6) with different patterns of change of different NAAs.

Segunda parte: análisis de citoquinas

Artículo 2.

Título:

Serum cytokine levels as predictive biomarkers of benefit from ipilimumab in small cell lung cancer

Autores:

Max Hardy-Werbin, Pedro Rocha, Oriol Arpi, Álvaro Taus, Lara Nonell, Xavier Durán, Xavier Villanueva, Deborah Joseph-Pietras, Luke Nolan, Sarah Danson, Richard Griffiths, Miguel Lopez-Botet, Ana Rovira, Joan Albanell, Christian Ottensmeier & Edurne Arriola

Resumen:

En esta parte del proyecto se ha analizado la detección de citoquinas en las distintas muestras seriadas de ambas cohortes para encontrar diferencias entre pacientes tratados con o sin ipilimumab.

Al comparar la detección de citoquinas en voluntarios sanos con enfermos con CPCP (antes de iniciar el tratamiento), se observó que el nivel de la mayoría de las citoquinas, excepto IL-6 estaban disminuidos.

Al evaluar los cambios en los niveles séricos de citoquinas a lo largo del tratamiento comparativamente entre una cohorte y otra se observó que en la cohorte de pacientes tratados con ipilimumab (cohorte 2), tras iniciar el tratamiento todas las citoquinas se elevaban, mientras que en la cohorte de pacientes tratados con quimioterapia (cohorte 1), si bien mayoría de los pacientes presentaban un descenso de los títulos de citoquinas

(GM-CSF, IFN γ , MIP1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8), otras se elevaban o se mantenían constantes (IL-4, IL-5, IL-10, TNF α).

Posteriormente se analizó la asociación entre la concentración de citoquinas antes de iniciar el tratamiento y los datos de supervivencia. Se observó que una concentración elevada de IL-8 se correlacionaba con una peor supervivencia global en ambas cohortes (9.2m vs 16.8, p= 0.028 en la cohorte 1; y 5.3m vs 17m, p= 0.031 en la cohorte 2). Asimismo, se vio que los pacientes tratados con quimioinmunoterapia que presentaban valores basales elevados de IL-2 tenían una supervivencia mayor (30.5m vs 8m, p= 0.015) mientras que esta diferencia no se evidenciaba en aquellos pacientes tratados con quimioterapia convencional. De manera similar, pacientes tratados con quimioinmunoterapia que presentaban valores elevados de IL-6 y TNF α antes de iniciar el tratamiento, presentaban una supervivencia desfavorable (9.5m vs 18.5m, p= 0.026; y 7.8m vs 18.5m, p= 0.004 respectivamente).

Por ultimo, se evaluó si los cambios en los niveles de las citoquinas a lo largo del tratamiento se podrían relacionar con la supervivencia. Se observó que aquellos que presentaban un aumento de la IL-4 una vez iniciado el tratamiento tenían una peor supervivencia si se habían tratado con quimioterapia convencional (9.5 m vs 16.3 m; p = 0.001), y una mejor supervivencia si se habían tratado con quimioinmunoterapia (18.5 m vs 8.8 m; p = 0.042).

ORIGINAL RESEARCH



Serum cytokine levels as predictive biomarkers of benefit from ipilimumab in small cell lung cancer

Max Hardy-Werbin^{a,b}, Pedro Rocha^c, Oriol Arpi^a, Álvaro Taus^c, Lara Nonell^d, Xavier Durán^e, Xavier Villanueva^c, Deborah Joseph-Pietras^f, Luke Nolan^g, Sarah Danson^h, Richard Griffithsⁱ, Miguel Lopez-Botet^{j,k}, Ana Rovira^{a,c}, Joan Albanell^{a,c,k}, Christian Ottensmeier^{f,l,*}, and Edurne Arriola^{a,c,*}

^aCancer Research Program, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Barcelona, Spain; ^bUniversitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ^cMedical Oncology Department, Hospital del Mar-CIBERONC, Barcelona, Spain; ^dMicroarrays analysis service, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Barcelona, Spain; ^eStatistics department, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Barcelona, Spain; ^fNIHR Experimental Cancer Medicine Centre, Southampton, UK; ^gMedical Oncology Department, University Hospital Southampton, Southampton, UK; ^hSheffield Experimental Cancer Medicine Centre, Weston Park Hospital, Sheffield, UK; ⁱThe Clatterbridge Cancer Centre NHS Foundation Trust, Wirral, UK; ^jImmunology unit, IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques), Barcelona, Spain; ^kUniversitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; ^lCancer Science Unit, Faculty of Medicine, University of Southampton, Southampton, UK

ABSTRACT

Background. Immunotherapy has shown efficacy in small cell lung cancer (SCLC), but only a subset of patients benefits. Surrogate biomarkers are urgently needed. Our aim was to evaluate serum Th1, Th2, and proinflammatory cytokines in two cohorts of SCLC patients before and during treatment with chemotherapy with or without ipilimumab and to correlate them with survival.

Patients and methods. Two cohorts of SCLC patients were studied: patients treated with chemotherapy (n = 47), and patients treated with chemotherapy plus ipilimumab (n = 37). Baseline, on-treatment and after-treatment serum samples were evaluated for the presence of IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-gamma, TNF-alpha, GM-CSF, and Mip-1alpha using a Luminex assay. Differential changes in cytokines between cohorts were analyzed. Associations between cytokine levels and their changes with overall survival were evaluated.

Results. Patients treated with ipilimumab showed a global increase of all cytokines after treatment initiation. A high level of IL-8 at baseline was associated with worse prognosis regardless of treatment. Baseline increased IL-2 levels predicted sensitivity to ipilimumab, while high IL-6 and TNF-alpha predicted resistance. An on-treatment increase in IL-4 levels in patients treated with immune-chemotherapy was associated with a better overall survival.

Conclusions. The addition of ipilimumab to standard chemotherapy in SCLC modulates the serum levels of cytokines. Baseline levels and their change over time relate to overall survival. Blood-based biomarkers are convenient for patients, and our results support prospective validation of cytokines as predictive biomarkers for ipilimumab in SCLC.

ARTICLE HISTORY

Received 19 December 2018
Revised 22 February 2019
Accepted 28 February 2019

KEYWORDS

small cell lung cancer;
ipilimumab; cytokines;
immunotherapy; biomarkers

Introduction

Small cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive type of lung cancer. Platinum-based chemotherapy has been the standard of care for the last three decades and unfortunately varying combinatorial systemic approaches have not improved survival.^{1,2} The substantial incidence of autoimmune paraneoplastic immune events³ and the high tumor mutational burden⁴ suggest that immune modulation is a promising strategy in SCLC.⁵


Consistent with these concepts, immune checkpoint inhibitors have shown some activity in SCLC.^{6–10} Ipilimumab, a fully human immunoglobulin G1 monoclonal that blocks CTLA-4,¹¹ showed a trend to improved overall survival (OS) when combined with standard chemotherapy in a phase II trial.⁶ Although the confirmatory phase III failed to confirm an improvement in OS,² combination of anti-CTLA4 and

anti-PD1 agents showed a significant antitumor activity in SCLC patients in second line of treatment, particularly when ipilimumab is included in the regime.⁷

However, two more recent studies of the combination in the maintenance and second line settings have failed to demonstrate benefit over standard approaches.^{12,13} These failed trials have not used any biomarkers for selection of patients with higher likelihood of benefit and unfortunately, this may preclude these drugs to get to the clinic. Despite this, there is a subset of patients who benefit from immunotherapy and have long-term outcomes when this strategy is used.^{2,9} Predictive biomarkers to select patients who will benefit from immunotherapy are therefore urgently needed. In SCLC additionally, the limited tissue available for biomarker studies¹⁴ makes blood-based tests particularly interesting and relevant.

CONTACT Edurne Arriola  earriola@parcdesalutmar.cat  Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim de la Barceloneta, 25–29, Barcelona 08003, Spain

*These authors contributed equally to this work

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#).

© 2019 Taylor & Francis Group, LLC

Cytokines are soluble molecular messengers with a crucial role in immune response signaling.¹⁵ While Th1 cytokines (IL-2, IFN γ and TNF α) elicit cell-mediated responses, Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-10) direct the T-cell response away from a protective Th1 phenotype.^{16,17} The Th1/Th2 cytokine balance is disrupted in malignant tumors¹⁸⁻²⁰ favoring an immunosuppressive microenvironment. There are preliminary data supporting a prognostic role of inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-8 in NSCLC.^{21,22} However, the biological impact of cytokine levels has to date not been evaluated in SCLC.

We analyzed serum Th1, Th2 and inflammatory cytokines in two independent cohorts of SCLC patients treated with standard chemotherapy with or without the anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) monoclonal antibody ipilimumab. Our goal was to evaluate if baseline levels of cytokines or changes induced by therapy would predict benefit from the addition of ipilimumab in SCLC and allow insights into the immunological consequence of the addition of a checkpoint inhibitor.

Results

Patients' characteristics and outcomes

We included 84 SCLC patients. Cohort 1 consisted of 47 patients treated with platinum – etoposide; cohort 2 included 37 patients treated with platinum – etoposide in combination with ipilimumab 10mg/kg. Patients' characteristics are summarized in Supplementary table S1. Cohort 1 included more men (74.5% vs 64.9%), patients with performance status (PS) = 2 (7% vs 0%) and patients with limited disease (25% vs 0%). Median progression-free survival (PFS) was 6.8 months (m) in cohort 1 and 6.9 m in cohort 2; median overall survival (OS) was 13.3 m in cohort 1 and 17 m in cohort 2.

Serum Th1, Th2, and pro-inflammatory cytokines are lower in SCLC patients than in a cohort of healthy individuals

We evaluated pre-treatment serum cytokine levels in SCLC patients (both cohorts combined) in comparison to healthy volunteers. IL-1 β , IL-5, Mip-1 α , and TNF α were significantly lower in SCLC patients compared with healthy volunteers (Figure 1; Supplementary Table S2). The remaining cytokines except IL-6 were also numerically lower in SCLC, but the difference was not statistically significant. When we restricted the analyses to patients with extensive disease, serum levels of IL-1 β , IL-4, IL-5, and Mip-1 α were significantly lower in SCLC patients when compared with healthy volunteers.

Baseline cytokine levels correlate with age, PS, and stage

We assessed the correlation between the level of cytokines (both cohorts) and clinical features. Baseline levels of TNF α were significantly higher in patients over 60 years old; IL-5 was significantly higher in patients with PS 0 vs PS 1/2, and IL-2 was significantly higher in female patients compared with male (Supplementary Figure S1). IL-4 and Mip-1 α were significantly

lower in patients with extensive disease when compared to those with limited disease (Supplementary Figure S2).

Ipilimumab globally increases Th1, Th2, and inflammatory cytokines

We next studied how cytokine levels changed once treatment had been started in each cohort. Patients treated with chemotherapy alone, showed a decrease of GM-CSF, IFN γ , Mip-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 and IL-8 median concentration from baseline to tumor response; TNF α , IL-5, and IL-10 showed an increase from baseline to tumor response; and IL-4 levels showed no significant changes. Patients treated with immunochemotherapy showed a global increase of all cytokines assessed (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IFN γ , TNF α , Mip-1 α , and GM-CSF) (Figure 2(a-b)) (Supplementary Table S3). These differences between cohorts were statistically significant for all cytokines except for GM-CSF and IL-8.

We calculated the percentages of cytokine variation from the first to the second time-point using previously log2 transformed data. A heatmap of the changes in cytokine levels after treatment, compared to baseline is displayed in Figure 2(c). In patients treated with immunochemotherapy, the dominant effect is an increase in cytokine levels in contrast to a reduction after chemotherapy alone. Consistent with this, a principal component analysis (PCA) of fold change of cytokine levels after treatment reveals that patients cluster according to the treatment received (chemotherapy alone vs immunotherapy) (Figure 2(d)).

Baseline IL-8 levels are an unfavorable prognostic marker in SCLC regardless of treatment

We inquired whether basal levels of cytokines correlated with survival in SCLC. In both cohorts, patients with serum IL-8 concentration above the cut-off had a worse OS. In cohort 1, patients with baseline IL-8 above cut-off had a median OS of 9.2 m vs 16.8 m of those with lower levels ($p = 0.028$); in cohort 2, patients with baseline IL-8 above cut-off had a median OS of 5.3 m vs 17 m of those with lower levels ($p = 0.031$) (Figure 3). When restricting the analyses to the advanced disease population we obtained the same outcome.

Baseline IL-2 levels predict sensitivity to ipilimumab, while IL-6 and TNF α predict resistance

We evaluated the potential predictive role of cytokines in patients treated with ipilimumab. Patients treated with immunochemotherapy with a serum IL-2 concentration above cut-off at baseline, had a median OS of 30.5 m while those with lower levels had a median OS of 8m ($p = 0.015$) (Figure 4(a)). In contrast, patients with a serum IL-6 above cut-off had a median OS of 9.5 m while those with lower levels had 18.5 m ($p = 0.026$) (Figure 4(b)). Patients with a serum TNF α concentration above cut-off had a median OS of 7.8 m while those with lower levels had 18.5 m ($p = 0.004$) (Figure 4(c)). These associations were not observed when patients were treated with chemotherapy alone. When we restricted the analyses to the advanced disease population, all these results were sustained. Similar results were

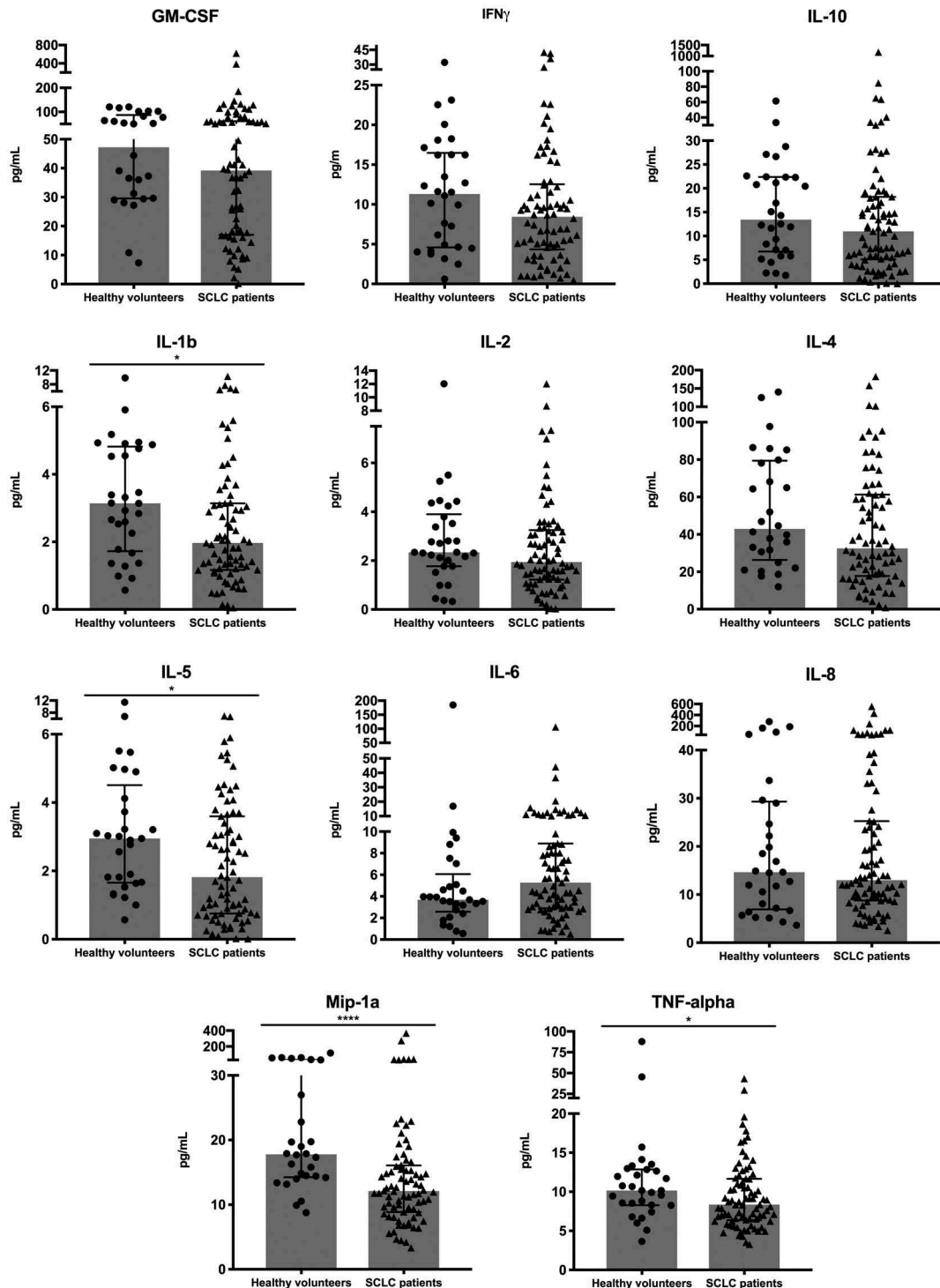


Figure 1. Baseline Th1, Th2, and pro-inflammatory cytokines are lower in SCLC patients than in healthy individuals.

Dot plots showing the difference in cytokine titers between healthy volunteers ($n = 30$) and patients with small cell lung cancer ($n = 84$). Top of the grey box shows the median value. All cytokines but IL-6 were decreased in SCLC patients when compared to a healthy population, although only in the case of IL-1 β ($p = 0.014$), IL-5 ($p = 0.0013$), Mip-1 α ($p = 0.0001$) and TNF α ($p = 0.042$) these differences were statistically significant. Error bars show the interquartile range. GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$.

found when the median cytokine serum level was used as a cut-off (Supplementary Table S4). The multivariate analyses showed that high levels of IL-2 were independently associated with sensitivity to ipilimumab and high levels of IL-6 and TNF α were independently associated with resistance to ipilimumab (Supplementary Table S5).

Changes in IL-4 levels during treatment link to outcome in SCLC

We hypothesized that quantitative changes in cytokine levels during treatment could be associated with survival. Patients treated with chemotherapy alone whose IL-4 increased more

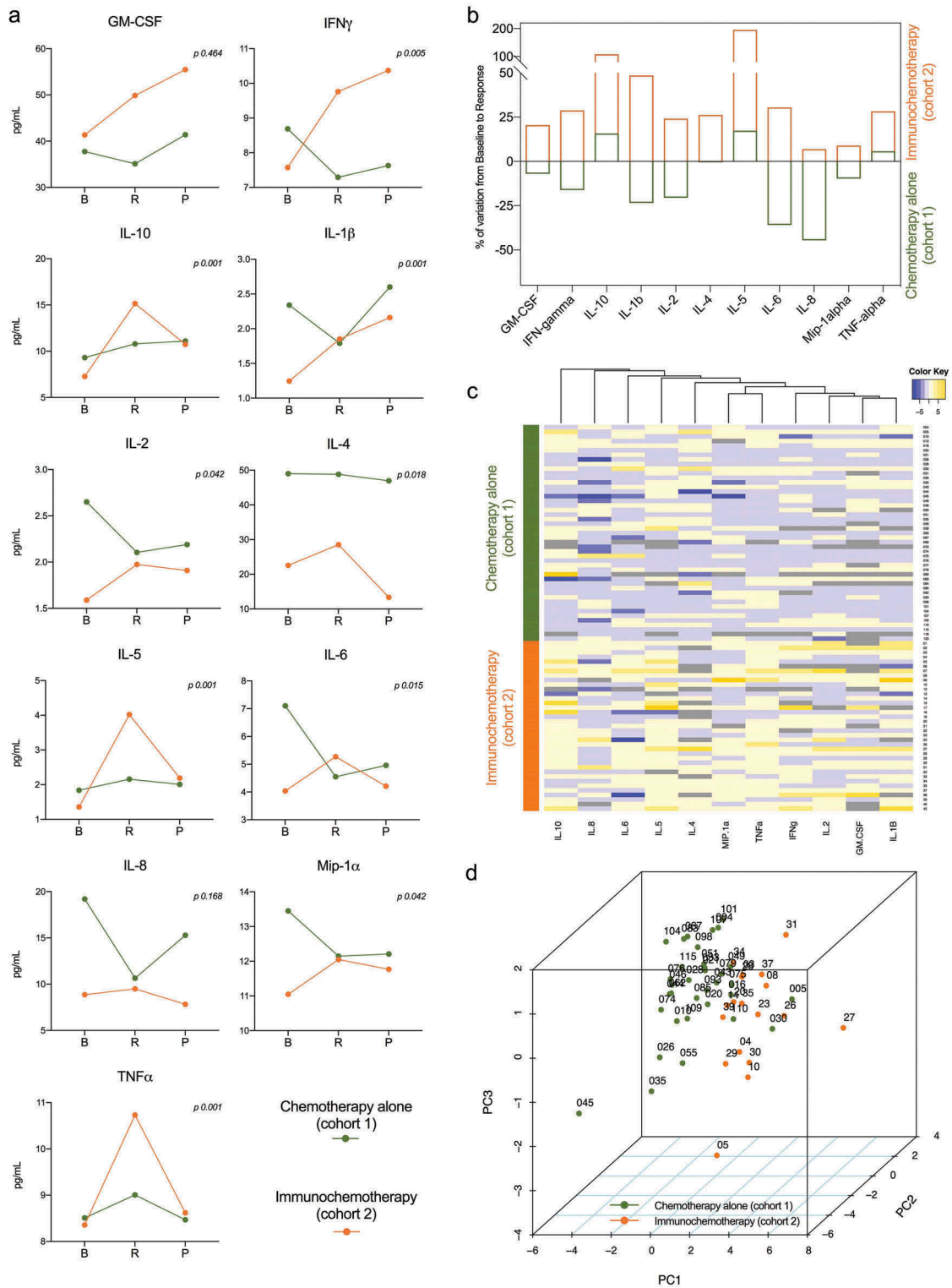


Figure 2. Evolution of cytokines levels in patients treated with chemotherapy in combination with ipilimumab.

(a) Values correspond to median cytokine concentration, and p values were obtained taking into account the difference in the number of patients showing an increase vs decrease of cytokines levels. B, baseline; R, response; P, progression (b) Bottom of green bars reflects the variation of change of cytokine concentration from baseline to second time-point of cohort 1. Top of orange bars reflects the variation of change of cytokine concentration from baseline to second time-point of cohort 2. (c) Hierarchical clustering of changes in cytokine levels in patients treated with chemotherapy alone (top) and immunochemotherapy (bottom). The heatmap depicts the fold-change of cytokines from first to second time-point, where blue represents a decrease, and yellow and red represent an increase compared to baseline. The dominant effect is of reduction of cytokines in patients exposed to chemotherapy alone, compared to an increase in patients after immunochemotherapy. (d) Principal component analysis (PCA) showing the distribution of patients in three-dimensional space, according to changes in cytokine levels after treatment. The PCA plot shows the clustering of patient according to treatment type (chemotherapy alone, green; immunochemotherapy, orange), visualizing similarities in patterns in changes in cytokine levels. GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor.

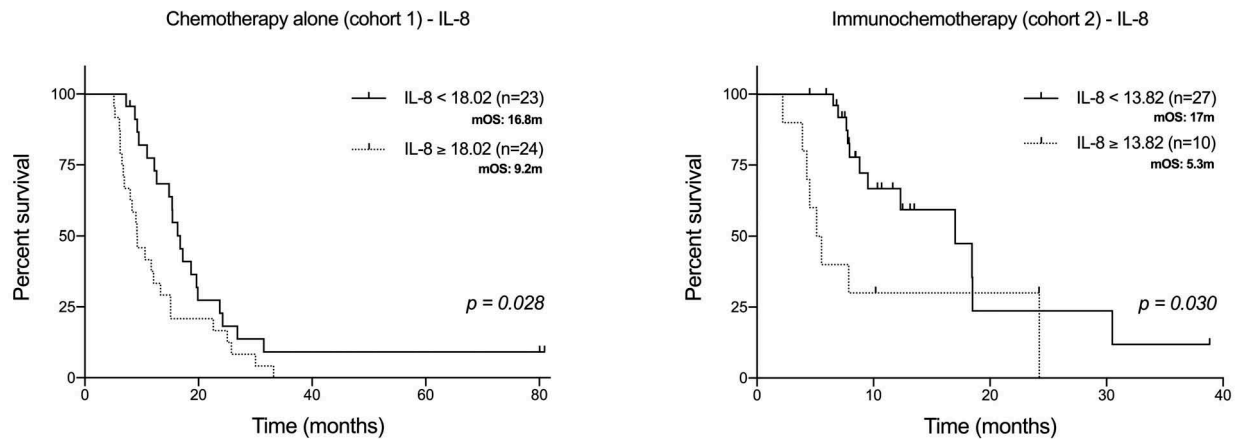


Figure 3. Baseline IL-8 may be an unfavorable prognostic marker of response to ipilimumab in SCLC.

Patients treated either with chemotherapy alone or with ipilimumab harboring a high baseline IL-8 had a worse OS than those with a low baseline IL-8. mOS: median overall survival.

than 23% from baseline to response, had a significant worse OS (9.5 m vs 16.3 m; $p = 0.001$). This finding was maintained when analyzing only the advanced patients, although it lost statistical significance ($p = 0.063$). However, those treated with immunochemotherapy whose IL-4 increased more than 32% had a significant better OS (18.5 m vs 8.8 m; $p = 0.042$) (Figure 5).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to assess how ipilimumab affects serum levels of immunomodulatory cytokines in SCLC. Our access to two cohorts of patients who were treated with either immunochemotherapy or chemotherapy alone allowed us to assess the biological effect of the addition of ipilimumab and to interrogate these data in the light of clinical outcomes.

An intriguing result is the observation of concordantly lower serum levels of multiple cytokines in SCLC patients compared to healthy controls. In the literature we only found three patients that had been evaluated in this way;²³ a functional study on whole blood stimulated *in vitro* revealed a lower cytokine release in cells from SCLC patients, perhaps offering an insight into the underpinning biology of our observation.²⁴ More data are available on circulating IL-6 levels: a study of 72 patients with SCLC identified that in both limited and extensive disease, elevated IL6 levels could be detected, consistent with our observation.²⁵

The modulation of cytokine levels after treatment with immunochemotherapy has not been previously reported in SCLC. We found that addition of ipilimumab increased concentrations of the evaluated cytokines globally and appeared to counteract the effect of chemotherapy that typically decreased cytokines. It is recognized that SCLC cells may be the source of cytokines and therefore successful treatment could reduce levels as observed for the majority of cytokines. This might not be the main source, except for IL-6, as the pretreatment levels in patients are already lower than in healthy controls. Immune cells are also sources of cytokines and can be affected by chemotherapy-induced apoptosis, likely contributing to the

observed decrease. Notably, however, patients treated with chemotherapy alone showed stabilization or increase in levels of TNF α and Th2 cytokines. These data suggest that the important compartment of cells contributing to the presence of these cytokines might not be affected by chemotherapy, for example, M2 macrophages in the tumor microenvironment.^{26,27} In the absence of paired samples of tumor tissue, we were unable to evaluate this directly. Ipilimumab has previously been reported to increase secretion of IFN- γ , IL-2R, IL-12, and IL-13 from PBMC *in vitro* exposure,²⁸ consistent with its proposed release of activated T-cells from inhibition.

Next, we explored the prognostic and predictive role of cytokine levels at baseline and during treatment. IL-8 is secreted by malignant cells and tumor stroma cells; anti-IL-8 antibodies have shown activity *in vitro* and *in vivo*²⁹ and it is being currently tested in clinical trials (NCT02536469). We found that high baseline levels of IL-8 were associated with worse OS regardless of treatment type. This is consistent with previous literature and is probably a surrogate of tumor burden as it showed a profound decrease with chemotherapy.³⁰ Interestingly, IL-8 was minimally affected by the addition of ipilimumab.

To evaluate the predictive value of cytokine levels after immunochemotherapy, we analyzed the changes in serum concentrations of each cytokine and compared the effect on outcome in both cohorts. Although the cohorts have differences in baseline clinical characteristics, the possibility of comparing the effects of the combination to chemotherapy alone (standard treatment in SCLC up to date) provided the opportunity to individualize the effects related to ipilimumab. Only associations that were significant for the ipilimumab treated cohort and were different from those observed in the chemotherapy only arm, were considered predictive of ipilimumab-linked effects. For instance, serum IL-2 behaved as a predictor of benefit to ipilimumab, and elevated baseline levels identified patients with a significant longer OS. No such difference was observed in patients treated with chemotherapy alone. IL-2 is a cytokine that promotes the proliferation of T cells, supporting the initiation and maintenance of immune response.³¹ Moreover, it stimulates the proliferation of natural killer cells and enhances

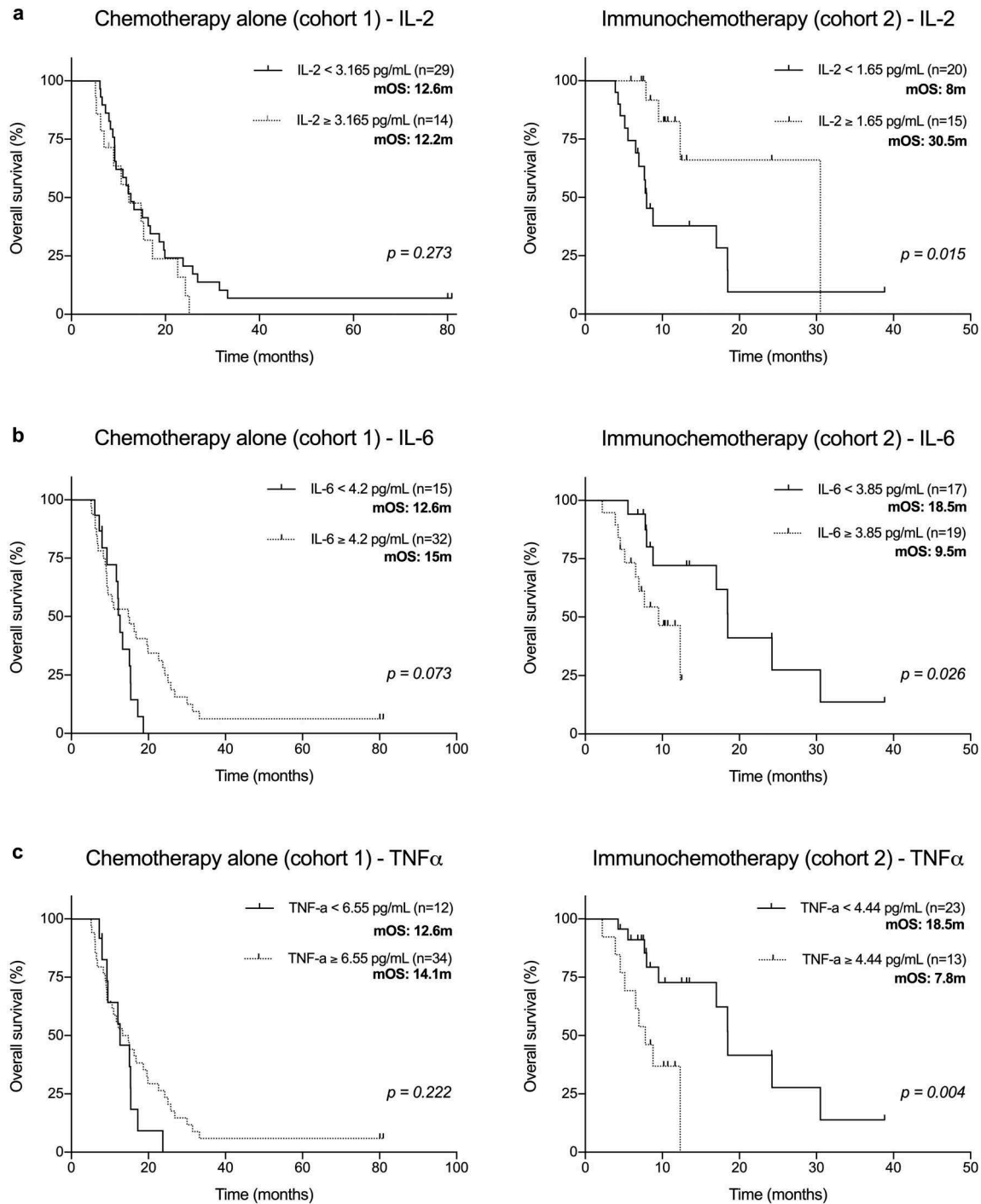


Figure 4. Baseline concentrations of cytokines may predict benefit from ipilimumab in SCLC patients.

(a) IL-2 appears to predict specific benefit from ipilimumab. (b) Patients with higher levels of IL-6 present worse OS when treated with chemoimmunotherapy but not with chemotherapy alone, suggesting a lack of benefit from ipilimumab in this subgroup. (c) Patients with higher levels of TNF α had a worse OS. This difference in survival was not replicated in patients treated with chemotherapy alone.

their activity.³² As the regulation of T-cell activation through binding of CTLA4 to B7 may affect IL-2 secretion,³³ the release of this blockade with ipilimumab would increase IL-2 concentration enhancing the immune response and could explain the observed better outcome. In contrast, IL-6 and TNF α behaved as predictors of resistance to ipilimumab: patients with higher baseline concentrations treated with immunochemotherapy had a shorter OS. Our data are consistent with observations in other solid cancers: IL-6 has been associated with tumor

progression in lung cancer³⁴ and to a lack of benefit from ipilimumab in melanoma.^{35,36} Moreover, it has been tested as a target in cancer in vivo.³⁷ TNF α has pro-tumorigenic activity in cancer³⁸ and has been linked to MAPK inhibitor resistance in melanoma when secreted by macrophages. Increased serum TNF α might reflect an immunosuppressive tumor microenvironment explaining the observed associated resistance to ipilimumab. Although these mechanisms seem plausible, they require further validation.

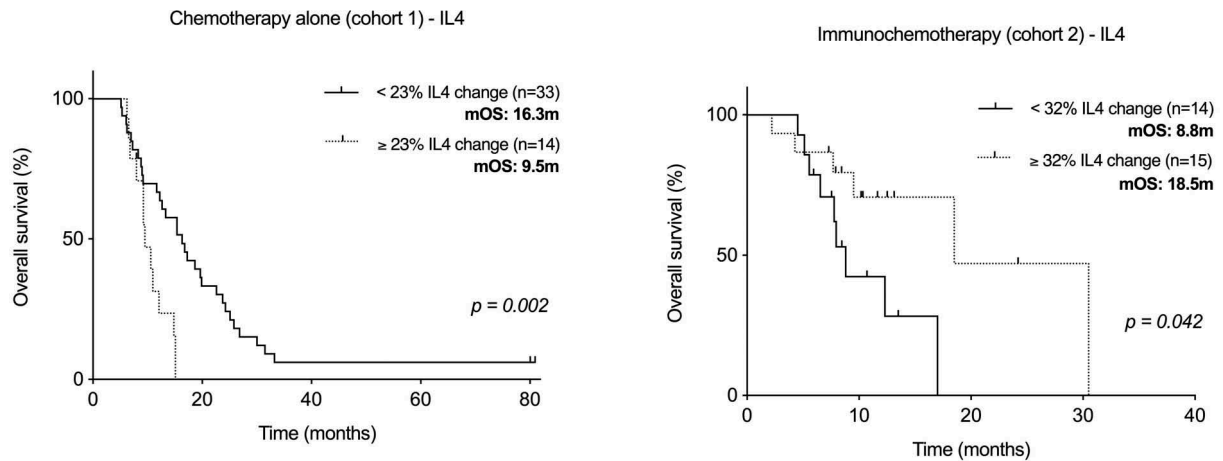


Figure 5. Modulation of IL-4 during treatment in SCLC could predict the outcome.

Patients treated with chemotherapy alone whose IL-4 increased more than 23% from first to second time-point had a shorter OS, while those treated with immunochemotherapy whose IL-4 increased more than 32% had a longer OS.

As serial sampling was available in both cohorts, we evaluated if changes in the cytokine serum levels could predict for benefit from ipilimumab. Our results showed that IL-4 levels were not significantly modified in patients treated with chemotherapy alone. In patients treated with chemotherapy in whom IL-4 increased we observed a worse overall survival. It is possible that this may be reflecting an effect on macrophage M2 polarization.³⁹ Interestingly, IL-4 increased in the ipilimumab treated cohort and patients experiencing this increase had a better outcome. This increase has been observed in mice treated with ipilimumab but an association with outcome is not observed after ipilimumab monotherapy.^{40,41} However, the evidence of the pro or antitumoral role of IL-4 in the literature is contradictory and its function seems to depend on IL-4 levels and its association with other immunological modulators.⁴² Globally, our results are novel and hypothesis generating, but warrant prospective validation.

In conclusion, we have observed differential impact of ipilimumab in serum cytokines in patients with SCLC. Baseline levels and changes on treatment might serve as convenient predictive biomarkers of benefit from adding ipilimumab to chemotherapy in a disease where tumor biomarkers studies are challenging.

Patients and methods

Patients and study design

We retrospectively evaluated two independent cohorts of SCLC patients whose outcomes we have previously reported.⁴³ Patients from cohort 1 were recruited between November of 2009 and January of 2014 at the Hospital del Mar, Barcelona and treated with platinum plus etoposide.^{44,45} Cohort 2 included patients recruited to a phase II trial of ipilimumab at 10mg/kg, platinum and etoposide (ICE-trial).⁹ We included a control donor population of healthy, age- and sex-matched individuals ($n = 30$). Sample collection and data analyses were approved by the local ethics committee of the participating institutions and informed consent of each study participant was obtained.

Sample collection

Serum samples were sequentially collected in each cohort: for cohort 1 at baseline (before starting treatment), at first response evaluation (at 3 months approximately) and at progression; for cohort 2 at baseline, at 3 and 6 months. Whole blood samples were collected by standard venipuncture techniques using serum separator tubes. Samples were allowed to clot for 30 min at room temperature before centrifugation for 10 min at 1000 g at 4 C. Following centrifugation, the supernatant (serum) was immediately removed and assayed immediately or aliquoted and stored frozen at -80 C until further use.

Cytokine assessment

Serum samples of all patients and healthy donors were evaluated using a commercially Milliplex map Human High Sensitivity T Cell magnetic bead panel (Millipore, Billerica, MA, USA) coupled with the Luminex xMAP platform. We measured a panel of Th1 (IFN γ , IL-2, TNF α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), and inflammatory cytokines (GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-g8) plus MIP-1 α in accordance with the manufacturer's instructions. Data were analyzed using five-parametric curve fitting and assay controls included kit standards and Multiplex controls. Intra-assay variabilities were less than 12%. Duplicate measurements with a variability higher than 35% were excluded. These experiments were supervised by technical personnel of the Luminex Core Facility at IMIM.

Cytokine cut-off calculation

To evaluate the association of cytokines levels with survival, we evaluated the impact of different cut-off methods, including medians (Supplementary Table S4) and ROC curves (Supplementary Table S6 and Supplementary Figure S3). Finally, as the endpoint for comparison was overall survival, we used the web-based software Cut-off Finder,⁴⁶ previously used in the literature.^{47,48} This method takes into account this endpoint outcome: for each cytokine, we identified the threshold level at which a log-rank test allowed segregation of

patients into groups with good and poor outcomes (Supplementary Table S7). Then, we calculated the percentage of cytokine median concentration variation from first to second time-point and considered >5% positive or negative variations as significant changes (Supplementary Table S8).

Statistical analyses

Statistical analysis was carried out using Stata/MP 14 (StataCorp LLC, Texas, USA) and Prism 7.0c (GraphPad Software, Inc.). Baseline values of cytokines were compared among cohorts and healthy volunteers using the non-parametric Mann–Whitney U-test. Overall survival, measured from the date of start of treatment until date of death or last visit, was plotted by the Kaplan–Meier method and curves were compared with the log-rank test. All tests were conducted at the two-sided test with a 0.05 level of significance. R (v 3.4.3) was used to log₂ transform data, compute cytokine variation and to generate heat maps (using package gplots) and principal component analysis (PCA).

Disclosure statement

E.A. and C.O. have received honoraria for consultancy and lectures from Bristol–Myers Squibb outside of the current work. The remaining authors report no conflict of interest.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Ethics approval and consent to participate:

Sample collection and data analyses were approved by the local ethics committee of the participating institutions and informed consent of each study participant. The study was conducted in accordance with the European Good Clinical Practice requirements (Declaration of Helsinki).

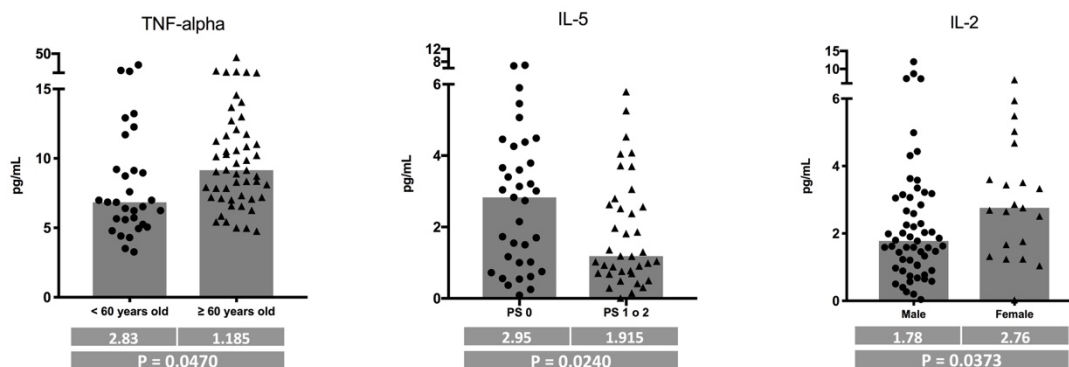
Funding

This work was supported in part by a grant from (1) Fundació La Marató de TV3 (666/C/2013); (2) ISCIII/FEDER (CIBERONC CB16/12/00241, RD12/0036/0051, PIE15/00008, PI15/00146, PI16/00591, PI13/00140); (3) Xarxa de Bancs de Tumors (XBTC); (4) Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya (2014SGR740), (5) Fundació Cellex and (6) Cancer Research UK grant: C491/A12135.

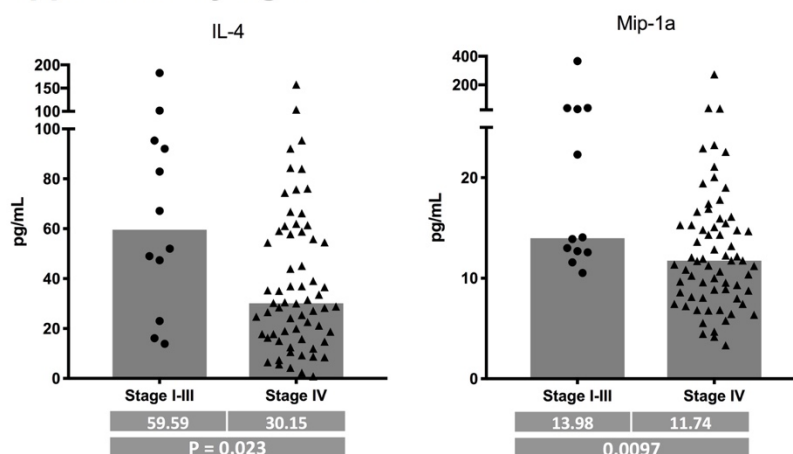
References

- Oze I, Hotta K, Kiura K, Ochi N, Takigawa N, Fujiwara Y, Tabata M, Tanimoto M. Twenty-seven years of phase III trials for patients with extensive disease small-cell lung cancer: disappointing results. *PLoS One*. 2009;4(11):e7835. doi:10.1371/journal.pone.0007835.
- Reck M, Luft A, Szczesna A, Havel L, Kim SW, Akerley W, Pietanza MC, Wu YL, Zielinski C, Thomas M, et al. Phase III randomized trial of ipilimumab plus etoposide and platinum versus placebo plus etoposide and platinum in extensive-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(31):3740–3748. doi:10.1200/JCO.2016.67.6601.
- Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes and the nervous system. *N Engl J Med*. 2003;3(4):287–288. doi:10.1056/NEJMra023009.
- Miller CW, Simon K, Aslo A, Kok K, Yokota J, Buys CH, Terada M, Koeffler HP. p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res*. 1992;52:1695–1698.
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124–128. doi:10.1126/science.aaa1348.
- Reck M, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, Sebastian M, Lu H, Cuillerot JM, Lynch TJ. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Ann Oncol*. 2013;24(1):75–83. doi:10.1093/annonc/mds213.
- Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, Ott PA, Taylor M, Eder JP, Jäger D, Pietanza MC, Le DT, de Braud F, et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(7):883–895. doi:10.1016/S1470-2045(16)30098-5.
- Ott PA, Elez E, Hirt S, Kim D-W, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, Mehnert JM. Pembrolizumab in patients with extensive-stage small-cell lung cancer: results from the phase Ib KEYNOTE-028 study. *J Clin Oncol*. 2017;35(34):3823–3829. doi:10.1200/JCO.2017.72.5069.
- Arriola E, Wheeler M, Galea I, Cross N, Maishman T, Hamid D, Stanton L, Cave J, Geldart T, Mulatero C, et al. Outcome and biomarker analysis from a multicenter phase 2 study of ipilimumab in combination with carboplatin and etoposide as first-line therapy for extensive-stage SCLC. *J Thorac Oncol*. 2016;11(9):1511–1521. doi:10.1016/j.jtho.2016.05.028.
- Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, F H, Losonczy G, Johnson ML, Nishio M, et al. First-line atezolizumab plus chemotherapy in extensive-stage small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2220–2229. doi:10.1056/NEJMoa1809064. NEJMoa1809064.
- Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, Chapman PB, Schwartz GK, Allison JP, Wolchok JD. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer*. 2010;116(7):1767–1775. doi:10.1002/cncr.24951.
- Bristol-myers squibb announces checkmate –451 study did not meet primary endpoint of overall survival with opdivo plus yervoy vs. placebo as a maintenance therapy in patients with extensive-stage small cell lung cancer after completion of first-line; [accessed 2018 Dec 18]. <https://news.bms.com/press-release/corporatefinancial-news/bristol-myers-squibb-announces-checkmate-451-study-did-not-mee>.
- Bristol-Myers Squibb announces phase 3 checkmate –331 study does not meet primary endpoint of overall survival with opdivo versus chemotherapy in patients with previously treated relapsed small cell lung cancer; [accessed 2018 Dec 18]. <https://news.bms.com/press-release/corporatefinancial-news/bristol-myers-squibb-announces-phase-3-checkmate-331-study-doe>.
- Travis WD. Pathology and diagnosis of neuroendocrine tumors: lung neuroendocrine. *Thorac Surg Clin*. 2014;24(3):257–266. doi:10.1016/j.thorsurg.2014.04.001.
- Lee S, Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2011;3(4):3856–3893. doi:10.3390/cancers3043856.
- Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76(2):241–251. doi:10.1016/0092-8674(94)90332-8.
- Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, Dubinett SM. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res*. 1995;55(17):3847–3853. doi:10.1016/0169-5002(96)85851-X.
- Hong CC, Yao S, McCann SE, Dolnick RY, Wallace PK, Gong Z, Quan L, Lee KP, Evans SS, Repasky EA, et al. Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):477–488. doi:10.1007/s10549-013-2549-3.

19. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1, and Type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(4):532–562. doi:10.1128/CMR.9.4.532.
20. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):218–228. doi:10.1016/S1470-2045(12)70582-X.
21. Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, Bowman ED, Engels EA, Caporaso NE, Harris CC. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, c-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(14):1112–1122. doi:10.1093/jnci/djr216.
22. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, Oñate C, Perez G, Alfaro C, Martín-Algarra S, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1988–1995. doi:10.1093/annonc/mdx190.
23. Matanić D, Beg-Zec Z, Stojanović D, Matakorić N, Flego V, Milevoj-Ribić F. Cytokines in patients with lung cancer. *Scand J Immunol.* 2003;57(2):173–178. doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01205.x.
24. Fischer JR, Schindel M, Stein N, Lahm H, Gallati H, Krammer PH, Drings P. Selective suppression of cytokine secretion in patients with small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 1995;6(9):921–926. doi:10.1093/oxfordjournals.annonc.a059360.
25. Wójcik E, Jakubowicz J, Skotnicki P, Sas-Korczyńska B, Kulpa JK. IL-6 and VEGF in small cell lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2010;30:1773–1778.
26. Kitajima M, Ziegler SF. Cutting edge: identification of the thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset critical for initiation of type 2 contact hypersensitivity. *J Immunol.* 2013;191(10):4903–4907. doi:10.4049/jimmunol.1302175.
27. Dijkgraaf EM, Heusinkveld M, Tummers B, Vogelpoel LTC, Goedemans R, Jha V, Nortier JWR, Welters MJP, Kroep JR, Van Der Burg SH. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting m2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013;73(8):2480–2492. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3542.
28. Yano H, Thakur A, Tomaszewski EN, Choi M, Deol A, Lum LG. Ipilimumab augments antitumor activity of bispecific antibody-armed T cells. *J Transl Med.* 2014;12(1):1–11. doi:10.1186/1479-5876-12-191.
29. Huang S, Mills L, B M, Tellez C, McCarty M, Yang X-D, Gudas JM, Bar-Eli M. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol.* 2002;161(1):125–134. doi:10.1016/S0002-9440(10)64164-8.
30. Young RJ, Tin AW, Brown NJ, Jital M, Lee SM, Woll PJ. Analysis of circulating angiogenic biomarkers from patients in two phase III trials in lung cancer of chemotherapy alone or chemotherapy and thalidomide. *Br J Cancer.* 2012;106(6):1153–1159. doi:10.1038/bjc.2012.50.
31. Dembic Z. Cytokines of the Immune System. *Cytokines Immune Syst.* 2015:143–239. doi:10.1016/B978-0-12-419998-9.00006-7.
32. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature.* 1981;291(5813):335–338. doi:10.1038/291335a0.
33. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 1996;183(6):2533–2540. doi:10.1084/jem.183.6.2533.
34. Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM, Chang GC, Tsai YH, Chen YM, Huang MS, Chen HL, Li YJ, Yang PC, et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer.* 2013;132(9):1977–1985. doi:10.1002/ijc.27892.
35. Damuzzo V, Solito S, Pinton L, Carrozzo E, Valpione S, Pigozzo J, Arboretti Giancristofaro R, Chiarion-Sileni V, Mandruzzato S. Clinical implication of tumor-associated and immunological parameters in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology.* 2016;5(12):e1249559. doi:10.1080/2162402X.2016.1249559.
36. Bjoern J, Juul Nitschke N, Zeeberg Iversen T, Schmidt H, Fode K, Svane IM. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology.* 2016;5(4):e1100788. doi:10.1080/2162402X.2015.1100788.
37. Gopinathan G, Milagre C, Pearce OMT, Reynolds LE, Hodivala-Dilke K, Leinster DA, Zhong H, Hollingsworth RE, Thompson R, Whiteford JR, et al. Interleukin-6 stimulates defective angiogenesis. *Cancer Res.* 2015;75(15):3098–3107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1227.
38. Martínez-Reza I, Díaz L, García-Becerra R. Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):1–8. doi:10.1186/s12929-017-0398-9.
39. Rahal OM, Wolfe AR, Mandal PK, Larson R, Tin S, Jimenez C, Zhang D, Horton J, Reuben JM, McMurray JS, et al. Blocking Interleukin (IL)4- and IL13-mediated phosphorylation of STAT6 (Tyr641) decreases M2 polarization of macrophages and protects against macrophage-mediated radioresistance of inflammatory breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2018;100(4):1034–1043. doi:10.1016/j.ijrobp.2017.11.043.
40. Redmond WL, Linch SN, Kasiewicz MJ. Combined targeting of costimulatory (OX40) and coinhibitory (CTLA-4) pathways elicits potent effector t cells capable of driving robust antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(2):142–153. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0031-T.
41. Linch SN, Redmond WL. Combined OX40 ligation plus CTLA-4 blockade: more than the sum of its parts. *Oncoimmunology.* 2014;3(3):11–13. doi:10.4161/onci.28245.
42. Li Z, Chen L, Qin Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell Mol Immunol.* 2009;6(6):415–422. doi:10.1038/cmi.2009.53.
43. Hardy-Werbin M, Arpi O, Taus A, Rocha P, Joseph-Pietras D, Nolan L, Danson S, Griffiths R, Lopez-Botet M, Rovira A, et al. Assessment of neuronal autoantibodies in patients with small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without ipilimumab. *Oncoimmunology.* 2018;7(2):e1395125. doi:10.1080/2162402X.2017.1395125.
44. Cañadas I, Taus Á, Villanueva X, Arpi O, Pijuan L, Rodríguez Y, Menéndez S, Mojal S, Rojo F, Albanell J, et al. Angiotensin-2 is a negative prognostic marker in small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2015;90(2):302–306. doi:10.1016/j.lungcan.2015.09.023.
45. Cañadas I, Taus A, González I, Villanueva X, Gimeno J, Pijuan L, Dómine M, Sánchez-Font A, Vollmer I, Menéndez S, et al. High circulating hepatocyte growth factor levels associate with epithelial to mesenchymal transition and poor outcome in small cell lung cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5(14):5246–5256. doi:10.18632/oncotarget.2124.
46. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S, Cutoff Finder: DC, Comprehensive A. Straightforward web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One.* 2012;7(12):1–7. doi:10.1371/journal.pone.0051862.
47. Lin F, Marcelo KL, Rajapakshe K, Coarfa C, Dean A, Wilganowski N, Robinson H, Sevick E, Bissig K-D, Goldie LC, et al. The camKK2/camKIV relay is an essential regulator of hepatic cancer. *Hepatology.* 2015;62(2):505–520. doi:10.1002/hep.27832.
48. Depeille P, Henricks LM, Rah VDV, Lemmens E, Wang C-Y, Matli M, Werb Z, Haigis KM, Donner D, Warren R, et al. RasGRP1 opposes proliferative EGFR–SOS1–ras signals and restricts intestinal epithelial cell growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(6):804–815. doi:10.1038/ncb3175.

Material suplementario correspondiente al artículo 2:**Supplementary figure S1**

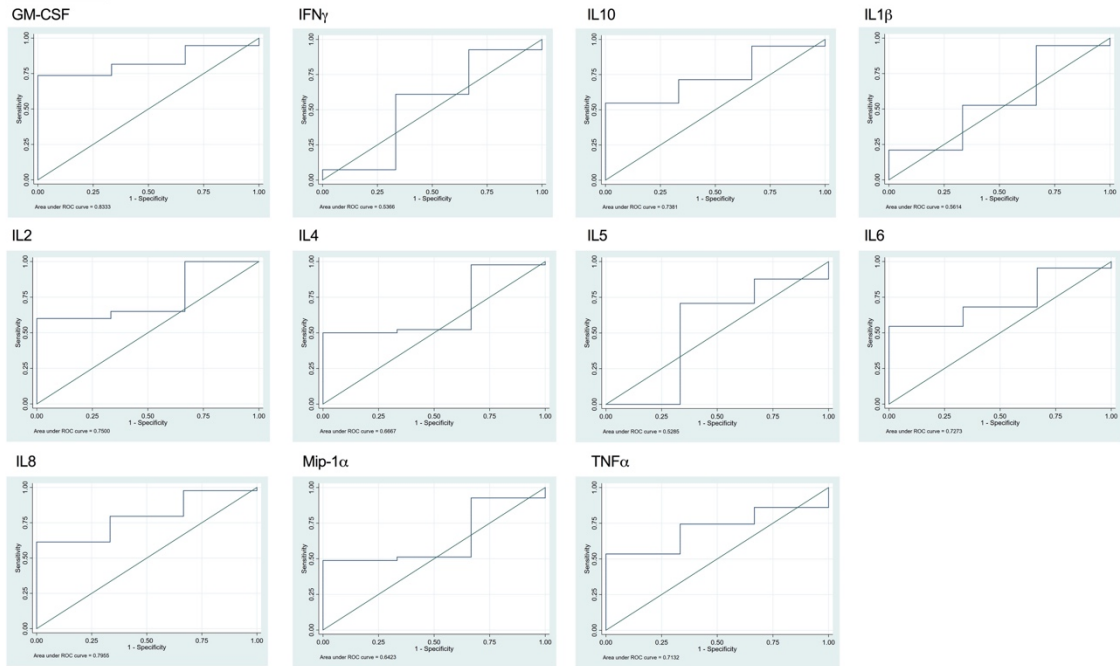
Supplementary figure S1. Baseline levels of TNF α were significantly increased in patients over 60 years old [9.15 pg/mL vs 6.84 pg/mL ($p=0.0067$)]; IL-5 was significantly increased in patients with PS 1 or 2 vs PS 0 [2.83 pg/mL vs 1.18 pg/mL ($p=0.047$)]; and IL-2 was significantly increased in female patients compared with male [2.76 pg/mL vs 1.78 pg/mL ($p=0.037$)].

Supplementary figure S2

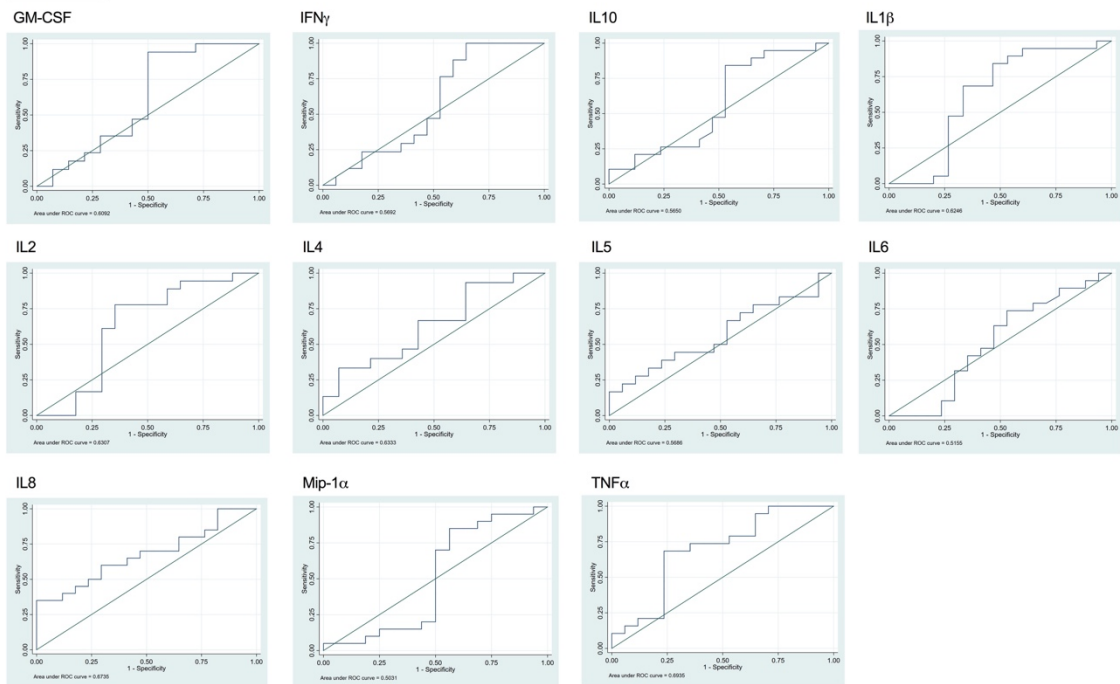
Supplementary figure S2. IL-4 and Mip-1 α were significantly decreased in patients with extensive disease when compared to those with limited disease.

Supplementary Figure S3

Cohort 1



Cohort 2



Supplementary figure S3. Among other methods, ROC curves were calculated to evaluate its impact as a cut off parameter (see Supplementary Table S6).

Supplementary table S1. Patients' characteristics

Characteristics	Cohort 1 Chemotherapy N = 47	Cohort 2 Chemotherapy + Ipilimumab N = 37
Sex, n (%)		
Female	12 (25.5)	13 (35.1)
Male	35 (74.5)	24 (64.9)
Age, mean (range)	62.6 (45 – 86)	62.6 (44 – 84)
PS, n (%)		
0	26 (55,3)	11 (29.7)
1	14 (29,8)	20 (54.1)
2	7 (14,9)	0
NA	0	6 (16.2)
Stage, n (%)		
I-III	12 (25,5)	0
IV	35 (74,5)	37 (100)
Smoking status, n (%)		
Smokers	33 (70.2%)	4 (10.8%)
Former smokers	9 (19.1%)	6 (16.2%)
Never smokers	0	0
NA	5 (10.6%)	27 (72.9%)
Mean serum albumin level (g/L)	39.8	38.4

NA, not available; PS, performance status

Supplementary table S2. Median cytokine concentration in healthy volunteers and SCLC patients (both cohorts).

	Healthy volunteers		SCLC patients (global)		p-value
	Median (pg/mL)	Q1 – Q3	Median (pg/mL)	Q1 – Q3	
GM-CSF	47.22	29.6 – 86.76	39.23	17.01 – 61.31	0.209
IFN γ	11.32	4.6 – 16.48	8.45	4.35 – 12.54	0.139
IL-10	13.42	6.73 – 22.37	10.97	5.1 – 18.19	0.181
IL-1 β	3.14	1.72 – 4.82	1.97	1.17 – 3.14	0.014
IL-2	2.34	1.77 – 3.9	1.945	1.22 – 3.25	0.156
IL-4	42.98	26.38 – 79.45	32.54	17.75 – 61.33	0.070
IL-5	2.95	1.65 – 4.51	1.82	0.75 – 3.6	0.013
IL-6	3.69	2.57 – 6.06	5.27	2.9 – 8.9	0.107
IL-8	14.66	6.93 – 29.31	12.99	8.76 – 25.25	0.715
MIP-1 α	17.79	14.25 – 30.49	12.12	8.87 – 16.08	0.0001
TNF α	10.17	8.29 – 12.87	8.355	6.36 – 11.66	0.042

GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor. Q1, first quartile; Q3, third quartile; significant p-values in bold.

Supplementary table S3. Median concentration of cytokines for each cohort and in each timepoint.

	Basal						Response						Progression					
	C1 (n=47)			C2 (n=37)			C1 (n=47)			C2 (n=37)			C1 (n=47)			C2 (n=18)		
	Median	Q1	Q3	Median	Q1	Q3	Median	Q1	Q3	Median	Q1	Q3	Median	Q1	Q3	Median	Q1	Q3
GM-CSF	37.76	18.38	60.76	41.37	16.72	78.02	35.11	17.11	67.59	49.87	27.02	99.59	41.40	26.14	59.39	55.47	42.14	98.63
IFN γ	8.69	5.06	11.97	5.58	2.173	15.54	7.29	3.49	11.92	9.76	5.05	19.97	7.63	3.30	13.53	10.37	3.81	15.44
IL-10	13.15	5.72	18.19	7.28	4.05	18.67	10.80	5.86	17.04	15.16	8.10	30.61	11.10	4.99	19.82	10.74	5.19	17.37
IL-1 β	2.34	1.66	3.27	1.245	0.80	2.51	1.79	1.17	3.17	1.85	1.29	3.52	2.60	1.71	3.98	2.16	0.85	3.78
IL-2	2.65	1.58	3.35	1.59	0.90	2.51	2.10	0.99	3.43	1.97	1.20	3.73	2.19	1.27	3.22	1.91	1.16	3.19
IL-4	48.99	28.51	75.77	22.59	9.95	30.14	48.84	15.22	76.81	28.54	14.40	54.16	46.93	28.58	76.79	13.35	4.96	39.64
IL-5	1.84	0.99	3.65	1.36	0.56	3.14	2.16	1.04	2.97	4.02	1.69	5.59	2.01	0.86	3.69	2.19	0.72	3.41
IL-6	7.10	3.04	11.21	4.06	2.81	7.17	4.55	3.05	8.22	5.27	3.15	10.44	4.96	2.65	11.07	4.21	3.03	5.58
IL-8	19.21	11.45	39.46	8.87	5.42	14.24	10.65	6.81	21.32	9.49	6.92	14.25	15.29	6.71	33.50	7.82	4.93	18.16
MIP-1 α	13.45	10.07	21.73	11.05	7.28	14.32	12.15	9.22	15.71	12.05	8.56	14.81	12.21	9.00	17.09	11.77	8.55	13.57
TNF α	8.51	6.45	12.14	8.36	6.30	10.43	9.01	6.02	10.99	10.73	8.40	18.31	8.47	6.11	12.01	8.62	5.85	10.65

C1, cohort 1; C2, cohort 2; GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor. Q1, first quartile; Q3, third quartile.

Supplementary table S4. Baseline cut-off values calculated using median cytokine concentrations. The Hazard Ratio for survival was calculated using the median as a cut-off for each cohort.

Cohort 1				
	Median	HR	95% CI	p-value
GM-CSF	37.76	0.68	0.35 – 1.3	0.24
IFN γ	8.69	0.59	0.32 – 1.1	0.096
IL-10	13.15	1.07	0.57 – 1.98	0.84
IL-1 β	2.34	0.65	0.34 – 1.25	0.2
IL-2	2.65	0.76	0.41 – 1.44	0.4
IL-4	48.99	0.69	0.37 – 1.26	0.22
IL-5	1.84	0.58	0.31 – 1.07	0.075
IL-6	7.10	1.17	0.64 – 2.14	0.62
IL-8	19.21	1.79	0.99 – 3.26	0.052
MIP-1 α	13.45	1.16	0.64 – 2.11	0.63
TNF α	8.51	1.12	0.61 – 2.02	0.72
Cohort 2				
	Median	HR	95% CI	p-value
GM-CSF	41.37	0.73	0.26 – 2.05	0.55
IFN γ	5.58	0.81	0.31 – 2.12	0.66
IL-10	7.28	1.43	0.56 – 3.67	0.45
IL-1 β	1.245	0.81	0.3 – 2.21	0.68
IL-2	1.59	0.4	0.14 – 1.17	0.083
IL-4	22.59	0.8	0.26 – 2.46	0.69
IL-5	1.36	0.95	0.36 – 2.48	0.92
IL-6	4.06	2.54	0.84 – 7.73	0.089
IL-8	8.87	1.44	0.59 – 3.55	0.42
MIP-1 α	11.05	0.9	0.37 – 2.18	0.82
TNF α	8.36	2.72	1.02 – 7.25	0.037

GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor; HR, Hazard Ratio; CI, confidence interval.

Supplementary Table S5. Multivariate analyses including the most relevant cytokines.

	Cohort 1			Cohort 2		
	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
IL2 high	1.06	0.55 – 2.05	0.848	0.01	0.00 – 0.17	0.001
IL6 high	0.86	0.34 – 2.18	0.758	32.03	2.64 – 387.66	0.006
TNF α high	0.77	0.29 – 2.02	0.591	5.09	1.02 – 25.3	0.047
PS	1.76	0.94 – 3.29	0.075	0.48	0.09 – 2.51	0.383
Stage	4.26	1.68 – 10.79	0.002	1	-	-

Supplementary table S6. Baseline cut-off values calculated using ROC curves.

Cytokine	Cut-off	
	Cohort 1 - Chemotherapy (pg/mL)	Cohort 2 - Chemoimmunotherapy (pg/mL)
GM-CSF	50.69	59.71
IFN γ	9.45	16.45
IL-10	13.15	13.42
IL-1 β	5.07	1.65
IL-2	2.76	1.63
IL-4	54.53	31.46
IL-5	3.04	0.31
IL-6	7.1	4.95
IL-8	15.94	17.2
MIP-1 α	14.77	7.99
TNF α	8.72	8.73

GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor.

Supplementary table S7. Baseline cut-off values for each cytokine and each cohort, using the web-based software Cutoff Finder.

Cytokine	Cut-off	
	Cohort 1 - Chemotherapy (pg/mL)	Cohort 2 - Chemoimmunotherapy (pg/mL)
GM-CSF	51.08	17.87
IFN γ	9.03	10.24
IL-10	14.84	6.08
IL-1 β	2.15	1.735
IL-2	3.165	1.65
IL-4	41.04	24.44
IL-5	2.92	2.97
IL-6	4.2	3.85
IL-8	18.02	13.82
MIP-1 α	14.42	7.72
TNF α	6.555	9.16

GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor.

Supplementary table S8. Cut-off values for each cytokine and each cohort, considering the percentage of cytokine level change from first to second time-point.

Cytokine	Cut-off	
	Cohort 1 – Chemotherapy (% of change)	Cohort 2 - Chemoimmunotherapy (% of change)
GM-CSF	6.823	25.58
IFN γ	-10,2	51.06
IL-10	26.43	185.2
IL-1 β	-2.385	52.63
IL-2	-4.704	-2.877
IL-4	23.34	32.57
IL-5	-24.29	44.63
IL-6	-4.292	-2.471
IL-8	-42.2	-27.46
MIP-1 α	-16.73	3.332
TNF α	-5.966	42.82

GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; MIP, Macrophage Inflammatory Protein; TNF, Tumor necrosis factor.

Tercera parte: fenotipado de PBMCs

Características de las poblaciones de estudio

En esta parte del proyecto se han incluido 53 pacientes con CPCP: 37 pacientes de la cohorte 2 (ensayo clínico ICE), tratados con quimioterapia e ipilimumab, y 16 pacientes de la cohorte 3 (recogidos de manera prospectiva en el Hospital del Mar), tratados con quimioterapia sola. El 100% de los pacientes de las dos cohortes tenían enfermedad diseminada al momento del diagnóstico (Tabla 4.1). La cohorte 3 incluyó una población con mayor proporción de hombres, con una edad media similar, y con pacientes con performance status (PS) 2 y 3, a diferencia de la cohorte 2, que solo incluyó pacientes con PS 0 y 1. La mediana de SG fue de 17m en la cohorte 2 y de 8.2m en la cohorte 3; la mediana de SLP fue de 6.8 meses (m) en la cohorte 2 y de 6.1m en la cohorte 3.

<u>Características</u>	Cohorte 2 Quimioterapia + Ipilimumab N = 37	Cohorte 3 Quimioterapia N = 16
Sexo, n (%)		
Femenino	13 (35.1)	5 (31.4)
Masculino	24 (64.9)	11 (68.6)
Edad, media (rango)	62.6 (44 – 84)	65.5 (56 – 83)
PS, n (%)		
0	11 (29.7)	1 (6.25)
1	20 (54.1)	12 (75)
2	0	2 (12.5)
3	0	1 (6.25)
NA	6 (16.2)	0
Estadio, n (%)		
I-III	0	0
IV	37 (100)	16 (100)
Tabaquismo, n (%)		
Fumadores	4 (10.8%)	9 (56.25%)
Ex-fumadores	6 (16.2%)	7 (43.75%)
No fumadores	0	0
NA	27 (72.9%)	0

Tabla 4.1. Características clínicas de los pacientes

Correlación de las diferentes subpoblaciones celulares circulantes con características clínicas

Analizamos de manera global si las diferentes subpoblaciones de CD4, CD8 y células NK se asociaban al sexo o a la edad, pero no hallamos correlaciones. Sin embargo, observamos una asociación estadísticamente significativa entre aquellos pacientes con una menor proporción de CD4+ Foxp3+ al diagnóstico de la enfermedad, y un mejor estado funcional (PS) (Figura 4.1).

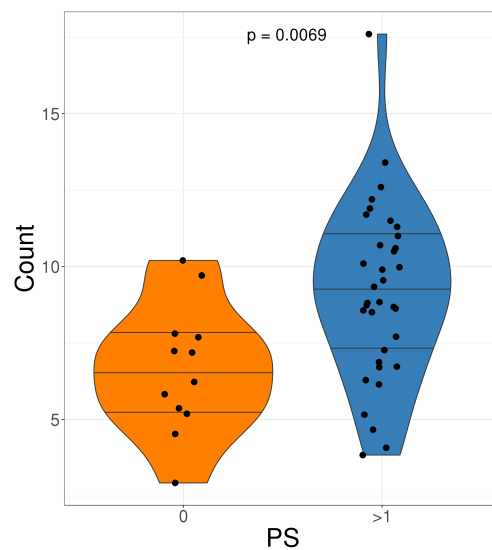


Figura 4.1. Células CD4+ Foxp3+ según PS 0 vs PS ≥ 1

Ipilimumab modula la expresión de diferentes subtipos celulares de manera diferencial

La adición de ipilimumab al tratamiento provocó el aumento del porcentaje de algunos subtipos celulares de manera significativa, contrarrestando el efecto de la quimioterapia sola, con la que se observó una disminución o invariabilidad de estos (Figura 4.2).

Se observó un aumento de la proporción de las siguientes subpoblaciones: linfocitos CD4+ y CD8+ con co-expresión Ki67; linfocitos T CD4+ Foxp3+; linfocitos T CD4+ PD-1+; linfocitos T CD8+ PD-1+ con co-expresión de Ki67; linfocitos CD4+ y CD8+

ICOS+; linfocitos T CD8+ ICOS, CD137 y CD103+ con co-expresión de Ki67. En la tabla 4.2 se resume la variación de cada subtipo linfocitario mencionado. El análisis se ha concentrado en las poblaciones que presentaban un comportamiento diferente en ambas cohortes de tratamiento, asumiendo así un efecto diferencial del ipilimumab.

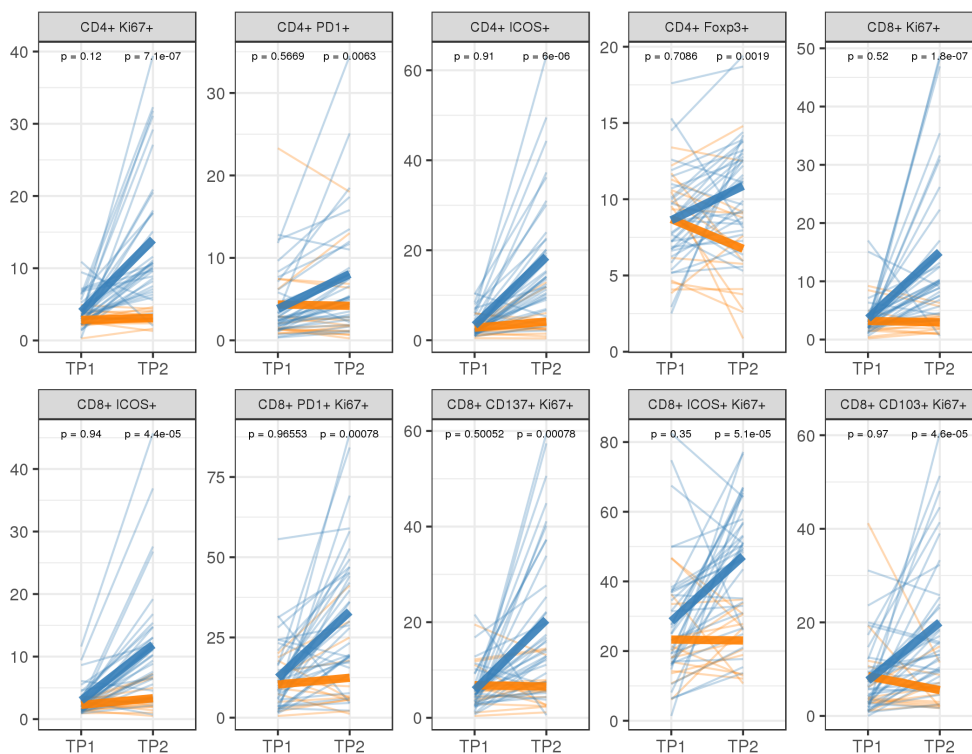


Figura 4.2. Modulación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias periféricas. En azul, pacientes tratados con quimioterapia + ipilimumab (cohorte 2); en naranja, pacientes tratados con quimioterapia sola (cohorte 3).

	Quimioterapia + ipilimumab	Quimioterapia sola
CD4 Ki67+	<i>incremento</i>	<i>no variación</i>
CD4 PD1+	<i>incremento</i>	<i>descenso</i>
CD4 ICOS+	<i>incremento</i>	<i>no variación</i>
CD4 Foxp3+	<i>incremento</i>	<i>descenso</i>
CD8 Ki67+	<i>incremento</i>	<i>descenso</i>
CD8 ICOS+	<i>incremento</i>	<i>no variación</i>
CD8 PD1 Ki67+	<i>incremento</i>	<i>no variación</i>
CD8 CD137 Ki67+	<i>incremento</i>	<i>no variación</i>
CD8 ICOS Ki67+	<i>incremento</i>	<i>no variación</i>
CD8 CD103 Ki67+	<i>incremento</i>	<i>descenso</i>

Tabla 4.2. Modulación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias periféricas.

La expresión de ICOS en los linfocitos circulantes aumenta tras el tratamiento con ipilimumab y predice beneficio de ipilimumab

Tras los hallazgos previos, y basándonos en la literatura¹⁷⁰, evaluamos si los cambios inducidos por ipilimumab en la presencia de las subpoblaciones que expresaban ICOS se asociaban a unos mejores resultados.

La distribución pre-tratamiento de ICOS tanto en linfocitos CD4+ como CD8+ fue similar en ambas cohortes. Como se ha mencionado previamente, se observó un aumento diferencial en la expresión de ICOS en linfocitos CD4+ y CD8+ en aquellos pacientes tratados con la adición de ipilimumab en comparación a aquellos que solo habían recibido quimioterapia (Figura 4.3).

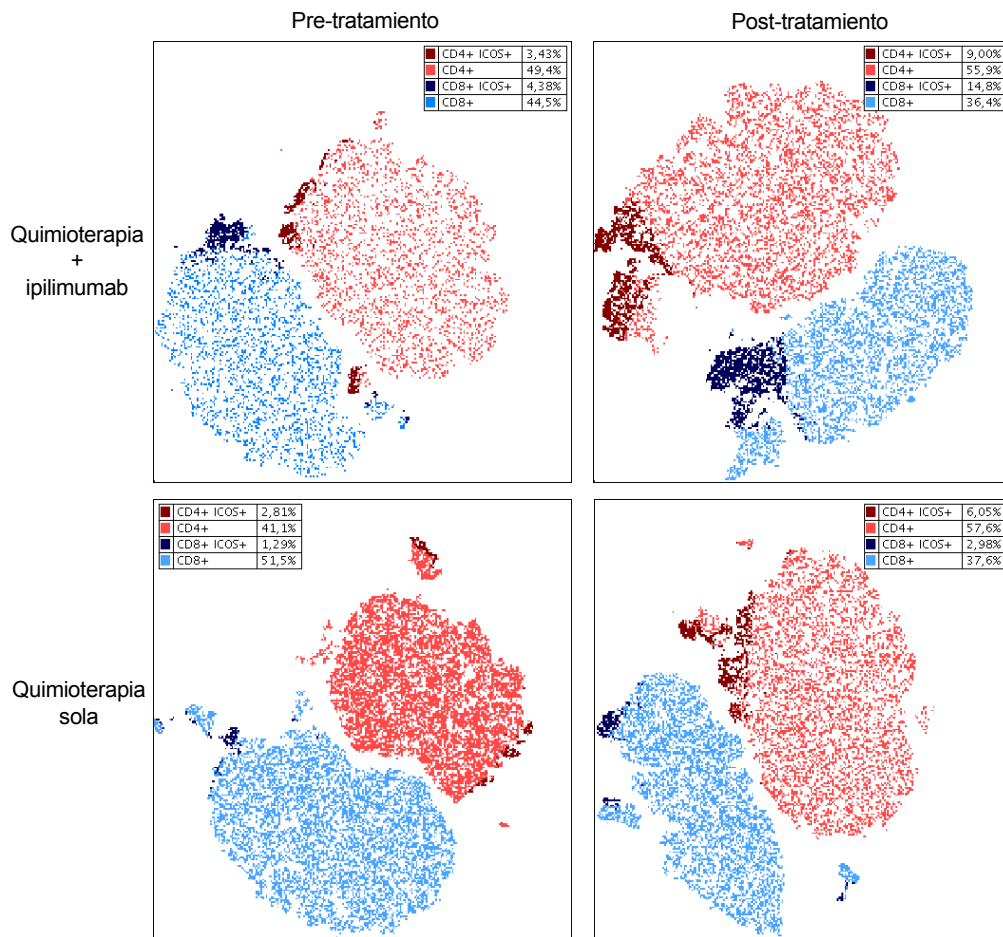


Figura 4.3. Distribución de CD4 y CD8 ICOS+ pre-tratamiento y post-tratamiento, para cada cohorte. Se observa un mayor aumento en la expresión de ICOS en los pacientes tratados con quimioterapia + ipilimumab.

Para evaluar cómo modificaba el tratamiento la expresión del receptor, calculamos el porcentaje de variación de la expresión de ICOS entre la muestra pre y post-tratamiento para cada paciente. Utilizando estos valores, mediante el paquete de R ‘survminer’ identificamos el valor que mejor segregaba dos poblaciones teniendo en cuenta la SG. De esta manera, observamos que aquellos pacientes tratados con ipilimumab además de quimioterapia, que sufrían un aumento proporcional en la expresión de ICOS por encima del punto de corte, tanto en CD4+ (mayor al 310%) como en CD8+ (mayor al 142%), tenían una mejor supervivencia (18.5m vs 7.8m, $p=0.012$ y 18.5m vs 6.9m, $p=0.0068$ respectivamente) (Figura 4.4). Esta asociación no se observó en los pacientes tratados con quimioterapia sola.

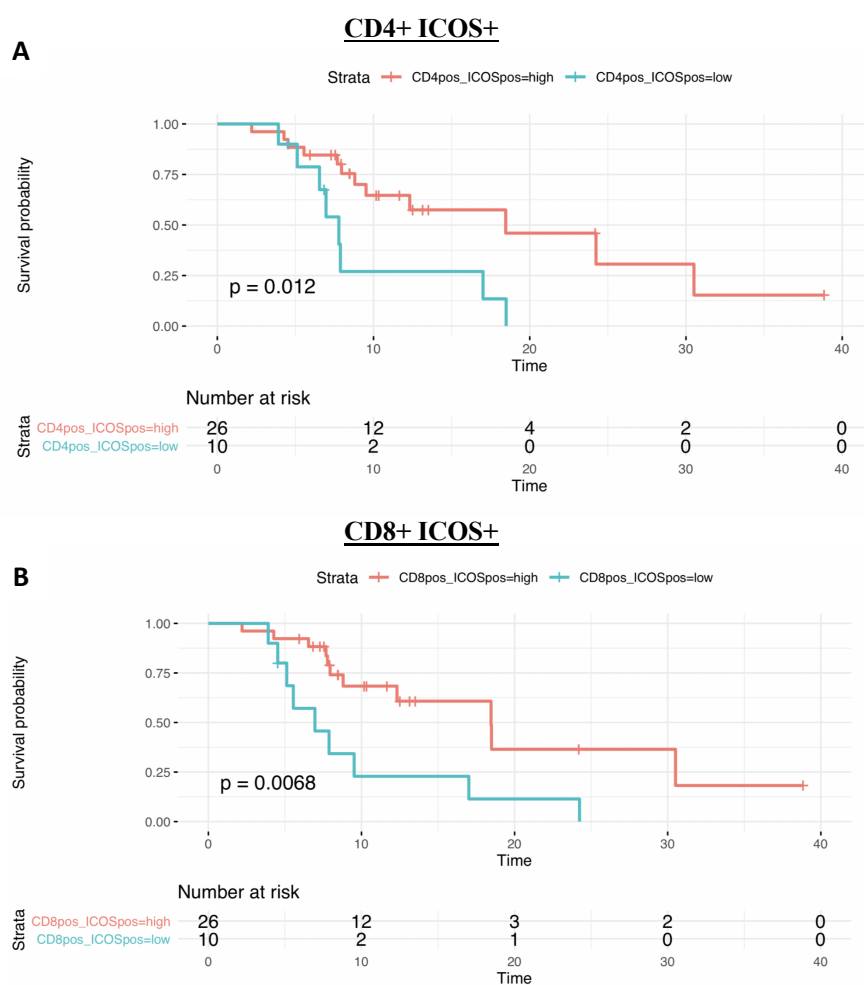


Figura 4.4. A: pacientes tratados con quimioterapia + ipilimumab con una mayor expansión de CD4+ ICOS+, presentan una mejor supervivencia. **B:** pacientes tratados con quimioterapia + ipilimumab con una mayor expansión de CD8+ ICOS+ tras el tratamiento, presentan una mejor supervivencia.

El estado madurativo de las células NK puede predecir la respuesta a ipilimumab en CPCP

Además de la caracterización de las diferentes subpoblaciones de los linfocitos T en sangre periférica, basándonos en trabajos previos del grupo^{226,227} se llevó a cabo el estudio de las células NK, entendiéndose éstas como aquellas células CD3- CD56+. Este análisis incluyó diversos marcajes de receptores para definir distintos subtipos de células NK (NKG2A, CD16, NKG2C, NKG2D) y sus estados de diferenciación (CD57).

Observamos que aquellos pacientes tratados con quimioterapia + ipilimumab que presentaban un porcentaje de CD57+ en el total de células NK por encima del 45% antes de iniciar el tratamiento, presentaban una SG de 18.5m, mientras que aquellos con un porcentaje de CD57+ por debajo del 45% presentaban una SG de 7.8m (p=0.002) (Figura 4.5). Esta asociación no se mantuvo en los pacientes tratados con quimioterapia sola, lo que indica que podría ser un marcador predictivo de beneficio de ipilimumab.

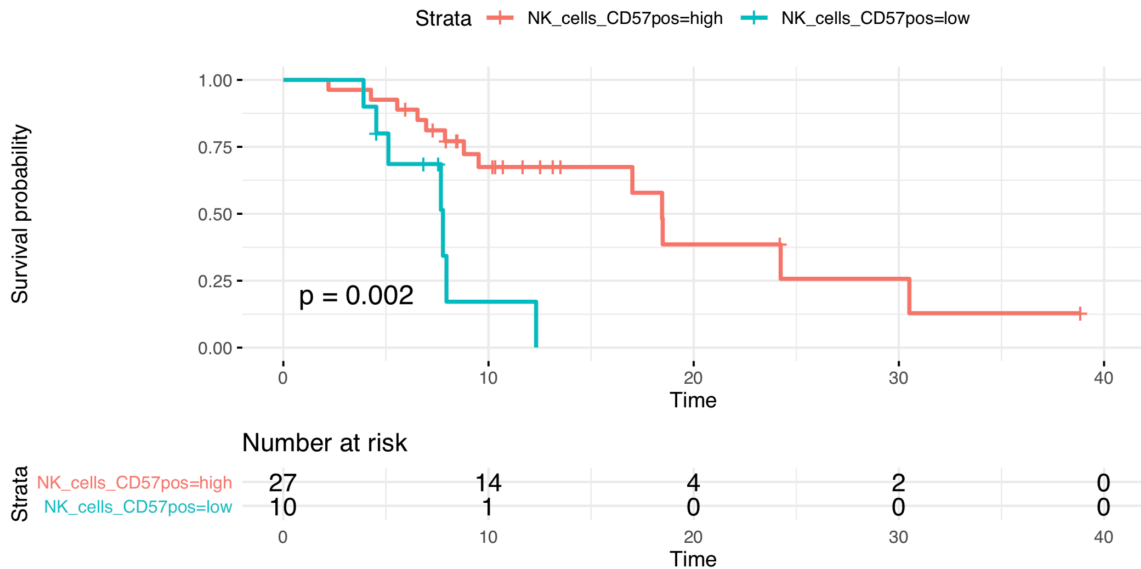


Figura 4.5. Un mayor porcentaje pre-tratamiento de células NK CD57+ se asocia con una mayor supervivencia global en pacientes tratados con quimioterapia + ipilimumab

El fenotipado de sangre periférica podría predecir toxicidad por ipilimumab en CPCP

Dada la elevada tasa de efectos adversos por ipilimumab reportada en los diferentes ensayos clínicos, investigamos si existía alguna distribución específica de subpoblaciones celulares periféricas que pudiera predecir la aparición de estos. Entre los pacientes incluidos en nuestro estudio tratados con quimioinmunoterapia, un 70% había sufrido al menos un efecto adverso grado 3; el desarrollo de efectos adversos se asoció a una baja expresión de PD-1+ en los linfocitos CD8+ antes de empezar el tratamiento ($p = 0.012$) (Figura 4.6).

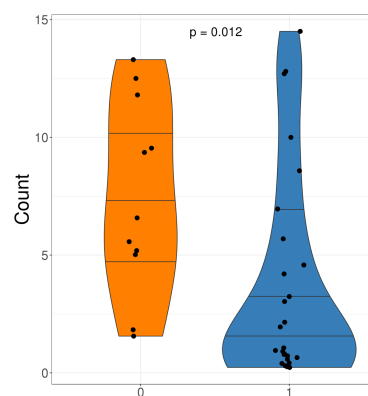


Figura 4.6. Porcentaje de expresión de PD-1 en los linfocitos CD8+ en pacientes que no sufrieron ningún efecto adverso grado 3 secundario a ipilimumab (izquierda) vs aquellos que sufrieron al menos un efecto adverso grado 3 (derecha).

El 62% de los pacientes padecieron efectos adversos intestinales en forma de colitis. Aquellos con un porcentaje de linfocitos CD4+ superior antes de iniciar el tratamiento fueron más propensos a desarrollar colitis de cualquier grado ($p = 0.0089$) (Figura 4.7).

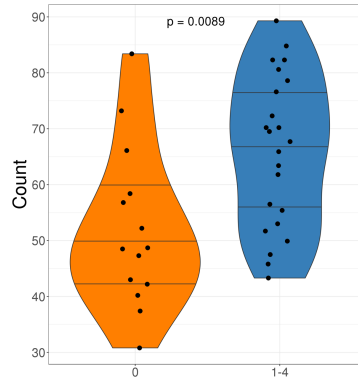


Figura 4.7. Porcentaje de linfocitos CD4+ en pacientes que no sufrieron colitis de ningún tipo secundaria a ipilimumab (izquierda) vs aquellos que sufrieron al menos un episodio de colitis de cualquier grado (derecha).

La co-expresión de CD137+ en los linfocitos CD4+ se asoció con la aparición de colitis más severa (grado 3 y 4) ($p = 0.016$) (Figura 4.8).

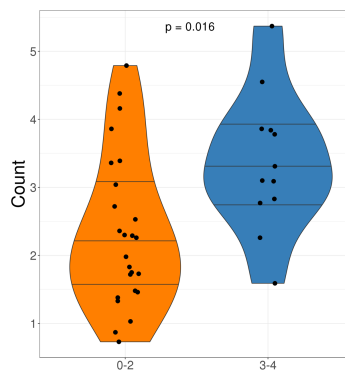


Figura 4.8. Porcentaje de expresión de CD137 en los linfocitos CD4+ en pacientes que no sufrieron colitis o sufrieron algún episodio de colitis leve (hasta grado 2) (izquierda) vs aquellos que sufrieron colitis grave (grado 3 o 4) (derecha).

5. DISCUSIÓN

El CPCP es una enfermedad sumamente agresiva y presenta un pronóstico infausto. Los avances en el tratamiento en enfermedad metastásica han sido escasos y se han caracterizado por sucesivos fracasos de los ensayos clínicos en los que se ha buscado una alternativa al tratamiento con platino en primera línea. La llegada de la inmunoterapia ha dado paso a una nueva era en el tratamiento del cáncer; esto tiene una especial relevancia en el CPCP dada la falta de tratamientos efectivos en esta enfermedad. Particularmente, ipilimumab fue el primer fármaco inmunoestimulador que se testó en CPCP, demostrando ser efectivo y obteniendo largos supervivientes. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no responden al tratamiento. Por lo tanto, la búsqueda de biomarcadores predictivos que puedan ayudar a la selección de pacientes que se puedan beneficiar del tratamiento es fundamental. En este proyecto de tesis se ha intentado abordar esta necesidad.

Dada la dificultad del acceso a muestras de tejido en CPCP, nos hemos centrado en el estudio de marcadores periféricos: además de tratarse de una técnica poco cruenta, permite la toma seriada muestras para poder estudiar no sólo los eventos inmunológicos estáticos sino ver como estos se modulan a lo largo del tiempo con el tratamiento.

El trabajo se ha centrado en tres áreas. En primer lugar, se han analizado autoanticuerpos neuronales (AAN) en suero, característicos de los SPN, que presentan una alta prevalencia en el CPCP. En segundo lugar, se ha evaluado la presencia de citoquinas séricas, tanto pro-inflamatorias como supresoras. En tercer y último lugar, se ha llevado a cabo la caracterización del fenotipo periférico de diferentes poblaciones inmunológicas.

Estudio y análisis de autoanticuerpos neuronales

En el CPCP pueden darse una serie de eventos inmunológicos asociados al tumor, que se manifiestan en forma de los llamados síndromes paraneoplásicos y se observan en la clínica como eventos adversos neurológicos¹⁰². En pacientes con síndromes paraneoplásicos neurológicos (SPN) se pueden detectar en sangre autoanticuerpos dirigidos contra antígenos neuronales que se expresan de manera aberrante en el tumor. Estos autoanticuerpos neuronales (AAN) pueden tener un papel como una herramienta diagnóstica en SPNs relacionados con CPCP¹⁰⁴. En un estudio, Titulaer y cols.¹²¹ analizaron la presencia de anticuerpos frente a múltiples miembros de la familia de Sox y otros AAN (anti-HuD entre ellos) en pacientes con CPCP con y sin diagnóstico de SPN, así como en pacientes con síndromes paraneoplásicos sin tumor. Observaron que la detección de anticuerpos anti-Sox podía tener un valor diagnóstico para discriminar síndromes paraneoplásicos asociados a CPCP de aquellos que no están asociados al tumor. Por otro lado, recientemente se ha reportado que la detección a modo de cribado de autoanticuerpos específicos asociados a antígenos tumorales podría tener un papel relevante en la detección precoz tanto de CPCNP como CPCP²²⁸.

El daño neuronal a consecuencia de la autoinmunidad provocada en los SPN en el CPCP puede tener diferentes mecanismos de acción. En el caso de los autoanticuerpos contra antígenos de superficie, son los propios anticuerpos anti-antígenos de membrana los efectores de la disfunción celular causante de la clínica neurológica^{123,229–232}. Sin embargo, se ha reportado que los AAN intracelulares no son patogénicos *per se*^{233,234}, sino que es una respuesta mediada por células T la responsable del daño neurológico^{109,235}. En este sentido, y de manera congruente con este concepto, existe una proporción de pacientes con CPCP en los que se detectan AAN en suero en ausencia de síntomas neurológicos. En 1990 Dalmau y cols.²³⁶ analizaron la presencia

de anti-HuD en el suero de 50 sujetos sanos y 69 pacientes con CPCP, de los cuales 25 tenían algún SPN asociado y el resto no. En el 16% de los pacientes con CPCP y sin SPN asociado se detectaron niveles positivos de anti-HuD. En estos pacientes el título de anticuerpo era inferior al de aquellos en los que se detectó anti-HuD en presencia de síntomas neurológicos. En un estudio similar con 196 pacientes sin SPN, también se observó una prevalencia de anti-HuD en suero del 16% en ausencia de síntomas neurológicos²³⁷. En un estudio más reciente, Gozzard y cols.¹²⁸ reportaron un 9.6% de pacientes con CPCP y sin evidencia de SPN que tenía positivización de anti-HuD en suero; sin embargo al testar otros autoanticuerpos frente a otros antígenos (Sox2, Gad65, Amphiphisina, Ri, Cv2, Ma2, Yo), más del 40% de los pacientes tenían positividad para al menos uno de ellos. En nuestro estudio ningún paciente presentaba síntomas neurológicos al diagnóstico de la enfermedad y el 9.5% de ellos tenía niveles detectables en suero de anti-HuD y el 53% de ellos tenían positividad para al menos un autoanticuerpo. Para evaluar si existían diferencias en el título de anticuerpos entre los pacientes con y sin SPN, se incluyó en el estudio como control positivo a un paciente con CPCP diagnosticado de una encefalitis límbica paraneoplásica con positividad de anti-HuD en suero. Todos los pacientes de nuestro estudio con detección de anti-HuD presentaron niveles inferiores al control positivo menos uno de ellos.

El AAN más prevalente en nuestro estudio fue anti-Sox1, observándose en un 37% de los pacientes, dato que fue consistente con otras series reportadas^{121,128}. Generalmente, tras Sox1, el autoanticuerpo más frecuente es anti-HuD. Sin embargo, en nuestra serie, el segundo anticuerpo más prevalente era el dirigido contra el antígeno Yo. Este autoanticuerpo se detecta más habitualmente al cáncer de ovario o al cáncer de mama¹¹⁵, aunque también se ha descrito asociado a cáncer de pulmón²³⁸. Por otro lado, anti-Gad65, que en general está asociado a pacientes con diabetes mellitus²³⁹, se detectó

en 5 pacientes en nuestro estudio (3 en la cohorte 1, tratados con quimioterapia; 2 en la cohorte 2, tratados con quimioinmunoterapia), y ninguno de estos pacientes tenía antecedentes de diabetes tipo 1. Al tratarse de un pequeño número de pacientes, y con poca probabilidad de positividad según la clínica reportada, podría argumentarse que se tratara de un error de la técnica de medición del anticuerpo. Sin embargo, este método se ha utilizado en estudios previos^{240,241} y ha demostrado ser eficiente como herramienta de detección como se ha hecho en nuestro proyecto. Por otro lado, el tener diferentes muestras seriadas dentro de la misma serie de pacientes, objetivándose de manera repetida la positividad frente al anticuerpo, ha servido como control interno, descartando razonablemente el error técnico.

La presencia de AAN se ha asociado al diagnóstico de CPCP en estadio limitado y como consecuencia a mejores cifras de supervivencia. En el reporte de Dalmau y cols. citado previamente²³⁶, todos los pacientes con CPCP sin SPN y con detección de anti-HuD en suero habían sido diagnosticados con enfermedad limitada, mientras que entre aquellos que eran negativos para anti-HuD, más de la mitad tenían enfermedad diseminada. Posteriormente, Verschuuren y cols.²⁴² reportaron una serie de pacientes con CPCP con un 17% de prevalencia para la detección de anti-HuD en suero; de estos, más de la mitad se habían diagnosticado con enfermedad limitada. En una serie de 200 pacientes con encefalomiелitis asociada a anti-HuD, se diagnosticó un CPCP en 111 de ellos, y de estos, el 75% se encontraba en estadio limitado¹²⁹. En una serie más reciente de 59 pacientes con CPCP donde Atakan y cols.²⁴³ analizaron la presencia de anti-Sox1, observaron que de los 17 pacientes seropositivos para Sox-2, 12 tenían enfermedad limitada. Por último, en el ensayo clínico ICE¹⁴⁹ donde se analizaron las mismas muestras de nuestra cohorte de pacientes tratados con la combinatoria con ipilimumab (pero para la detección de un panel diferente de autoanticuerpos), también se observó

una relación entre la seropositividad de autoanticuerpos y beneficio al tratamiento. Los datos de nuestro estudio fueron consistentes con todas estas series: en el 75% de los pacientes con enfermedad limitada se detectó al menos un NAA en suero, y esta asociación tuvo una tendencia hacia la significación estadística para el global de todos los NAA así como de manera individual para anti-Sox1. En estos casos, la existencia de una respuesta citotóxica de células T concomitante^{234,244,245} podría haber contribuido en parte al control del crecimiento tumoral, pero al mismo tiempo podría haber llegado a sortear la barrera inmunológica del sistema nervioso, característica por brindar una protección diferencial²⁴⁶. Además, en pacientes con CPCP que presentan SPN, los síntomas neurológicos a menudo se presentan antes de la detección del tumor^{102,247,248} sugiriendo que el sistema inmune es capaz de detectar y controlar la presencia del cáncer incluso antes del desarrollo de las metástasis.

Al analizar un panel con múltiples autoanticuerpos, se detectó la presencia en suero no solo de anticuerpos de manera individual sino también la coexistencia de diferentes reactividades. En un 28% de pacientes en nuestro estudio se detectó la presencia de más de un AAN. Estos datos son comparables con los de series reportadas previamente. En un estudio donde se analizó de manera retrospectiva el suero de 60 mil pacientes con sospecha de SPN para la detección de autoanticuerpos, en 553 (el 0.9%) se detectó algún AAN, y de estos, el 31% presentaban reactividad para más de uno¹⁰⁴. Posteriormente analizamos el impacto en la supervivencia de la detección de un solo AAN frente a la detección de más de un AAN en los pacientes con CPCP. De manera sorprendente, observamos que aquellos pacientes con detección de múltiples AAN tenían una peor SLP y SG que aquellos con una sola reactividad cuando se trataban con la combinación de quimioterapia e ipilimumab. La coexistencia de múltiples autoanticuerpos refleja una respuesta inmunológica diversificada frente a diferentes

antígenos onconeuronales expresados en los tumores, que a su vez se puede explicar por una mayor heterogeneidad tumoral: esto conllevaría a su vez una respuesta inmune subclonal de células T. En este escenario se ha reportado que se obtienen peores resultados con el tratamiento con inhibidores de punto de control en tumores con predominio de neoantígenos subclonales²⁴⁹, lo cual podría apoyar nuestros resultados. Un estudio reciente con modelos singénicos de ratón para simular diferentes estados de heterogeneidad en melanoma, corrobora este concepto y refuerza la importancia del estudio de la heterogeneidad intratumoral por su impacto en la respuesta a la inmunoterapia²⁵⁰.

Uno de los objetivos de esta parte del proyecto era analizar la presencia de una modulación diferencial en el título de los AAN en los pacientes tratados con ipilimumab además de quimioterapia. En la mayoría de los pacientes en ambas cohortes el título de AAN se vio reducido tras el inicio del tratamiento. Dado que la mayoría de los pacientes presentan una respuesta inicial al tratamiento en el CPCP, esta bajada del autoanticuerpo podría interpretarse como un reflejo de la carga tumoral. Sin embargo, la adición de ipilimumab al tratamiento no afectó estos resultados. Estos hallazgos difieren de otros resultados reportados donde se observaba un aumento de la respuesta humoral frente a antígenos tumorales en pacientes con melanoma tratados con ipilimumab¹⁷⁷. Por otro lado, nuestros datos donde se observa una reducción de AAN tras el inicio del tratamiento van a favor de otros estudios donde en pacientes con síndromes paraneoplásicos asociados a CPCP se observaba una reducción o normalización del título de anticuerpos con el tratamiento efectivo de la neoplasia de base^{251,252}. En una serie de 50 pacientes con degeneración cerebelar paraneoplásica y positivización para por lo menos un autoanticuerpo, se consiguió la resolución del síndrome neurológico en el 21% de los pacientes de los pacientes tras objetivarse que el tratamiento antitumoral

había sido efectivo²⁵³. En este estudio se evaluó la modulación del título de anticuerpos antes y después del tratamiento en 5 pacientes que presentaron del cuadro neurológico, pero no se observaron cambios; es probable que el tratamiento concomitante con inmunosupresores para el SPN pueda haber influido en la interpretación de los resultados. En otros casos con pacientes diagnosticados de SPN con seropositividad de anti-Yo, los títulos del anticuerpo se redujeron tras la extirpación quirúrgica del tumor, con resolución posterior del cuadro^{254,255}. A grandes rasgos, parece que con la retirada del antígeno, el título del autoanticuerpo desciende: el empeoramiento de un SPN tras la progresión tumoral^{243,256}, o el aumento de riesgo de recaída en pacientes con tumores con tumores de cabeza y cuello con virus del papiloma humano (VPH) positivo y con persistencia del anticuerpo en suero²⁵⁷, refuerzan esta idea.

La localización exacta de los grupos celulares donde se sintetizan los AAN es desconocida. En pacientes con timoma, por ejemplo, el cuadro de miastenia paraneoplásica desaparece tras la timectomía quirúrgica²⁵⁸; asimismo, se han observado casos de neuropatía óptica asociados a la presencia de AAN anti-Cv2 que mejoran tras la extirpación quirúrgica del CPCP²⁴⁸. Esto sugiere que la producción del anticuerpo se lleva a cabo en el microambiente tumoral; de hecho, se han identificado clústeres de linfocitos B y estructuras linfáticas terciarias como constituyentes de la masa tumoral en diversos tipos de cáncer²⁵⁹⁻²⁶². Por lo contrario, la persistencia del cuadro neurológico así como la positividad de los títulos de AAN en algunos casos incluso tras una respuesta completa al tratamiento (como ha sucedido en el control positivo en nuestro estudio) sugiere que el nicho productor de autoanticuerpos pueda estar localizado de manera extratumoral. En consonancia con esta idea, en un estudio que evaluaba mediante inmunohistoquímica la presencia de células B y T en piezas quirúrgicas de CPCP, se observó la presencia de escasas células B y se demostró la ausencia de estas

en el 40% de los casos²⁶³; sin embargo este estudio se centraba en CPCP en estadio localizado y los hallazgos podrían variar en enfermedad metastásica. En última instancia, no se puede descartar que sea la quimioterapia la responsable de eliminar las células productoras de AAN. En relación con este concepto en el que la retirada del antígeno se asocia con una disminución con la concentración de anticuerpo en suero, en nuestro estudio observamos una tendencia hacia una SG mas prolongada en aquellos pacientes donde el título del AAN descendió progresivamente tras el tratamiento con la quimioterapia, independientemente de si se había añadido ipilimumab.

En un análisis de subgrupos se observó que aquellos pacientes tratados con quimioterapia que sufrían un incremento en el título de AAN tras el inicio del tratamiento, alcanzaban una SLP superior. Estos resultados proponen un escenario inmunológico diferente. Una posible explicación es que el agente citotóxico haya provocado una mayor exposición antigénica, llevando a una estimulación de la respuesta inmune con una activación de células T superior y una mayor producción de autoanticuerpos. En una publicación del grupo de Wolchok en pacientes con melanoma tratados con ipilimumab¹⁸⁸, la presencia o la aparición de anticuerpos y células T frente al antígeno tumoral NY-ESO1 identificó un subgrupo de pacientes que respondían bien al tratamiento con ipilimumab. Estos hallazgos son generadores de hipótesis: son necesarios estudios para evaluar el vínculo entre las respuestas inmunes celulares y humorales en pacientes con cáncer tras el uso tanto de quimioterapia como inmunoterapia.

En esta parte del proyecto pudimos confirmar el papel pronóstico de los autoanticuerpos en CPCP, probablemente con relación a un control inmune precoz de la enfermedad en estadios limitados. Por otro lado, hemos observado que el tratamiento con ipilimumab no modula de manera diferencial la secreción de AAN. La participación de estos

anticuerpos en la respuesta inmune antitumoral como efectores protagonistas o como una simple imagen del reflejo de la respuesta celular como consecuencia del tratamiento es incierta y requiere mas investigación al respecto.

Estudio y análisis de citoquinas

Las citoquinas son mensajeros moleculares solubles que tienen un papel crucial en la señalización de la respuesta inmune²⁶⁴. Existen diferentes tipos de citoquinas, con diferentes roles: mientras que las citoquinas Th1 (IL-2, IFN γ y TNF α) desencadenan una respuesta inmune celular, las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) desvían la respuesta de células T hacia un fenotipo supresor^{265,266}. En el cáncer, el equilibrio entre las citoquinas Th1 y Th2 se encuentra alterado, favoreciendo un ambiente inmunosupresor²⁶⁷⁻²⁶⁹.

En general en la literatura se han reportado cifras basales mas elevadas de citoquinas en suero o plasma en pacientes con diferentes tipos de cáncer al compararlos con voluntarios sanos²⁷⁰⁻²⁷⁸. Sin embargo, en nuestro estudio todas las citoquinas evaluadas menos IL-6, presentaban un valor basal sérico más bajo en comparación a los sujetos libres de enfermedad. En un estudio se analizó la concentración de citoquinas (IL-6, TNF α e IL-1 β) en suero y en el lavado bronco-alveolar de 26 pacientes con tumores torácicos, de los cuales 3 habían sido diagnosticados con CPCP²⁷⁹. Los pacientes con CPCP presentaban niveles de citoquinas basales inferiores a aquellos pacientes con otros tipos de histologías y a pacientes con patología pulmonar benigna. Previamente, en un estudio funcional con sangre total de 58 pacientes con CPCP se observó una secreción de citoquinas reducida tras estimulación in vitro²⁸⁰. Estos datos podrían apoyar en parte nuestros hallazgos. Respecto a la IL-6, hay mas información disponible: de manera consistente con nuestras observaciones, en un estudio con 72 pacientes con

CPCP ser reportó que tanto en enfermedad limitada como en enfermedad diseminada, se detectaban niveles elevados de IL-6 circulante²⁸¹.

La modulación del nivel de citoquinas en pacientes con CPCP tratados con ipilimumab, no había sido reportado previamente. En nuestro estudio observamos que en la cohorte de pacientes tratados con ipilimumab + quimioterapia, la concentración sérica de todas las citoquinas evaluadas se incrementó tras iniciarse el tratamiento, siendo capaz de contrarrestar el efecto de la quimioterapia que a su vez redujo los niveles de citoquinas en la cohorte de pacientes tratados solo con quimioterapia. Existen datos donde se ha observado que las células tumorales pueden secretar citoquinas al estroma y al torrente circulatorio^{269,282}, cosa que también ocurre concretamente en el CPCP. Es por esto que tras la respuesta al tratamiento se podría observar una reducción en los niveles de la mayoría de estas. Sin embargo, estas células podrían no ser las únicas productoras de citoquinas dado que en las muestras basales antes del tratamiento los niveles ya eran más bajos que en los controles con los voluntarios sanos, a excepción de IL-6. Existen componentes del sistema inmunológico que también son fuentes de citoquinas^{269,283}, y estos a su vez pueden verse afectados por la quimioterapia, contribuyendo también al descenso de su concentración en sangre periférica. Un hallazgo interesante de nuestro estudio es que en los pacientes tratados con quimioterapia sola se observó una estabilización o elevación en los niveles las citoquinas Th2 y TNF α . Esto sugiere que el compartimento predominante que contribuye a la secreción de estas citoquinas pueda no haberse afectado por la quimioterapia, por ejemplo, macrófagos de tipo M2 en el microambiente tumoral^{284,285}. Lamentablemente, al no tener muestras pareadas de tumor, no se pudo evaluar este fenómeno directamente. Previamente, se ha observado que ipilimumab puede incrementar la secreción de diversas citoquinas desde de

linfocitos circulantes *in vitro*²⁸⁶, lo cual concuerda con el mecanismo propuesto de liberación de citoquinas desde células T activadas.

Para investigar si el nivel basal de las citoquinas podría tener un papel pronóstico en CPCP, analizamos las muestras pretratamiento en ambas cohortes de pacientes y observamos que niveles elevados de IL-8 se asociaban a una peor SG. Este hallazgo fue similar en pacientes tratados tanto con quimioterapia sola como con la combinación con ipilimumab. Nuestros hallazgos son consistentes con resultados previos similares^{287,288} y demuestran que el nivel de la concentración de IL-8 podría tener un rol como reflejo de la carga tumoral dado que se ha objetivado un claro descenso tras el tratamiento con quimioterapia²⁸⁸. En nuestro estudio, curiosamente la IL-8 se vio afectada mínimamente con la adición de ipilimumab al tratamiento. La IL-8, identificada inicialmente como un factor quimiotáctico de neutrófilos²⁸⁹, puede ser secretada por las células tumorales o por células del estroma tumoral en diversos tipos de tumores^{290,291}. Anticuerpos anti-IL-8 han demostrado actividad *in vitro* e *in vivo*²⁹². Recientemente un ensayo clínico fase I²⁹³ demostró que el anticuerpo monoclonal anti-IL-8 ‘HuMax-IL8’ (BMS-986253) es seguro y tolerable en tumores sólidos. Actualmente existen otros ensayos clínicos en reclutamiento activo con esta molécula en combinación con anti-PD-1 (NCT03689699, NCT03400332).

El hecho de tener muestras de dos cohortes de pacientes similares pero que habían recibido tratamientos diferentes, nos permitió comparar los efectos diferenciales, en términos de supervivencia, de manera que pueda reflejar el efecto de la adición de ipilimumab al tratamiento estándar del CPCP. De esta manera, evaluamos el papel de las citoquinas como posibles marcadores predictivos de respuesta a la quimioinmunoterapia. Las asociaciones de citoquinas con supervivencia que eran significativas en la cohorte de pacientes tratados con la adición de ipilimumab, y que se

replicaban en la cohorte tratada con quimioterapia sola fueron consideradas como predictivas del efecto directo del ipilimumab. En este contexto, la IL-2 se comportó como un predictor de beneficio frente a ipilimumab al identificar que pacientes con niveles basales elevados presentaban una SG más prolongada cuando se trataban con la combinatoria, mientras que no presentaban este beneficio al tratarse con quimioterapia sola. La IL-2 es una citoquina que promueve la proliferación de células T, contribuye a la iniciación y mantenimiento de la respuesta inmune²⁹⁴, y estimula la proliferación y actividad de células Natural Killers (NK)²⁹⁵. La regulación de la activación de los linfocitos T a través de la unión de CTLA-4 con B7 puede afectar la secreción de IL-2²⁹⁶, y por lo tanto la acción directa de ipilimumab al bloquear esta unión podría aumentar la liberación de IL-2, estimulando la respuesta inmune; esto podría explicar los mejores resultados obtenidos en este contexto. La IL-2 se ha utilizado clásicamente en el tratamiento de tumores sólidos, obteniendo respuesta duraderas en una minoría de pacientes con melanoma y cáncer renal²⁹⁷. En CPCP, en un ensayo clínico fase II con pacientes con enfermedad diseminada refractaria a platino, el 17% de ellos obtuvo una respuesta completa con IL-2 a altas dosis²⁹⁸. Sin embargo, la toxicidad y falta de beneficio en otros estudios hicieron que se pierda el interés en esta molécula como tratamiento del CPCP²⁹⁹. De modo contrario, la IL-6 y el TNF α actuaron como predictores de resistencia a ipilimumab: niveles elevados de ambas citoquinas en pacientes tratados con quimioinmunoterapia se asociaron a una peor SG, hecho que no sucedió con los pacientes tratados con quimioterapia sola. Estos datos son similares a otras observaciones en CPCP^{281,300} y en otros tipos de tumores sólidos. Los niveles de IL-6 se han asociado con progresión tumoral en CPCNP³⁰¹⁻³⁰⁴ y a falta de beneficio tras tratamiento con ipilimumab en melanoma^{305,306}. Inhibidores de IL-6 han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la capacidad de detener la proliferación celular a través de la

vía de señalización STAT3 en CPCP²⁹⁹ y en cáncer de mama²⁹⁹, y han sido efectivos para revertir la resistencia a la quimioterapia en cáncer gástrico³⁰⁷. TNF α , por otro lado, ha demostrado tener actividad pro-tumoral en cáncer y su secreción desde macrófagos se ha asociado a resistencia frente a inhibidores de MAP-quinasas en melanoma³⁰⁸. Las concentraciones elevadas de TNF α podrían ser el reflejo de un microambiente tumoral inmunosupresor, lo que explicaría la resistencia observada al tratamiento con ipilimumab. Estos conceptos parecen congruentes con el mecanismo de acción de las moléculas implicadas, pero sin embargo requieren validación.

Por último, evaluamos si la modulación de los niveles de citoquinas a lo largo del tratamiento podría servir para predecir la respuesta al tratamiento; esto fue posible gracias a la disponibilidad de muestras seriadas. En la cohorte de pacientes tratados con quimioterapia sola, los valores medios de IL-4 no se modificaron a lo largo del tratamiento. Sin embargo, en el subgrupo de pacientes donde se observó una elevación en la concentración de IL-4 tras el tratamiento, se observó una peor SG. Hemos hipotetizado que este hallazgo podría explicarse por una probable polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2, efecto característico de IL-4³⁰⁹. Por otro lado, en la cohorte de pacientes tratado con la adición de ipilimumab a la quimioterapia, los valores medios de IL-4 se elevaron de manera considerable tras el tratamiento. Sorprendentemente, aquellos pacientes que experimentaron ese cambio en la IL-4 presentaron una SG mas prolongada. En un estudio con ratones con actividad inmunogénica restringida, se observó un ascenso de IL-4 tras tratamiento combinado con un anti-CTLA4 y un agonista de OX40^{310,311}. Con esta combinatoria mejoraba la tasa de supervivencia, pero el efecto desaparecía con el tratamiento en monoterapia; al bloquear la IL-4 la SG de los ratones aumentaba considerablemente, recalcando el efecto deletéreo de esta citoquina. De todas maneras, la evidencia del papel pro y

antitumoral de la IL-4 es contradictoria y su función parece depender de sus niveles y su asociación con otros moduladores inmunológicos³¹². A nivel global, estos hallazgos son novedosos y abren las puertas para investigación prospectiva en el campo.

En esta parte del proyecto hemos podido observar el impacto diferencial que tiene ipilimumab en la secreción de citoquinas en el CPCP, y como su concentración basal y su modulación con el tratamiento son herramientas útiles como biomarcadores de beneficio de ipilimumab.

Fenotipado de las poblaciones linfocitarias periféricas

La caracterización del fenotipo de los linfocitos circulantes de manera seriada es de gran interés ya que podría reflejar los cambios en las poblaciones inmunes que indirectamente podrían traducir cambios en el microambiente tumoral. Este hecho es especialmente relevante en el CPCP, donde la disponibilidad de tejido para el estudio de la respuesta inmune en el tumor es muy limitada. Tener la disponibilidad de muestras seriadas, nos permitió evaluar los cambios a lo largo del tratamiento.

Al evaluar asociaciones entre las diferentes poblaciones linfocitarias y las características clínicas de los pacientes observamos que la proporción de células T CD4⁺ Foxp3⁺ antes de iniciar el tratamiento, se asociaba al estado funcional de los pacientes. Concretamente observamos que aquellos pacientes con un mejor estado funcional (PS por sus siglas en inglés, ‘performance status’) al diagnóstico de la enfermedad, tenían una menor proporción basal de Tregs. Las asociaciones de este tipo en la literatura son escasas; en un estudio donde buscaban marcadores predictivos de respuesta en el infiltrado tumoral de linfomas, Kim y cols.³¹³ reportaron que niveles bajos de Tregs en ganglios linfáticos afectados, se asociaban a un peor PS en pacientes con linfoma.

Las variaciones de las diferentes subpoblaciones linfocitarias circulantes tras tratamiento con ipilimumab no han sido reportadas en CPCP. En nuestro estudio observamos que ipilimumab provocó un incremento en el porcentaje de la mayoría de los subtipos de linfocitos estudiados y no así la quimioterapia sola. Entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+, observamos que en la mayoría de ellas (PD-1, ICOS y CD137) aumentaba la subpoblación que expresaba Ki67 tras el tratamiento con ipilimumab. Este no fue el caso de los linfocitos CD8+ que expresaban ICOS+, donde se observó una bajada de aquellos que co-expresaban ICOS y Ki67. Por último, observamos que en los pacientes tratados con ipilimumab, tras el tratamiento se producía una expansión de los linfocitos T CD4 Foxp3+. Kwek y cols.³¹⁴ reportaron un incremento en los niveles de los linfocitos CD4 efectores y reguladores, y de los linfocitos CD8 y CD4+ con expresión de PD-1 en pacientes con cáncer de próstata tratados con ipilimumab.

ICOS (del inglés, inducible co-stimulator) es un receptor específico de las células T activadas, y se encuentra estructuralmente relacionado con el receptor de activación CD28 y CTLA-4^{168,315}. Su papel en la respuesta inmunitaria ha sido motivo de controversia ya que se han reportado hallazgos contradictorios. Existen datos que señalan que la expresión de ICOS en los linfocitos podría conferirles un fenotipo supresor de la respuesta inmune. Se ha observado que en ratones deficientes para la expresión de ICOS, la secreción de la citoquina tipo Th2 IL-10 estaba deprimida³¹⁶. La IL-10 liberada por células T reguladoras produce una supresión de las células T efectoras³¹⁷. Al mismo tiempo, se ha reportado que como resultado de la interacción de ICOS con su ligando en células dendríticas, se produce la diferenciación de células T CD4+ en estadios precoces de maduración hacia células T reguladoras productoras de IL-10³¹⁸. Sin embargo, estudios posteriores pusieron en entredicho el papel

inmunosupresor de ICOS, al asociarlo con procesos autoinmunes³¹⁹ y con la supervivencia y expansión de células T efectoras³²⁰. El rol que juega ICOS en cáncer es incierto, y su papel en CPCP no ha sido examinado en profundidad. En nuestro estudio observamos que la adición de ipilimumab al tratamiento aumentó el porcentaje de expresión de ICOS en linfocitos tanto CD4+ como CD8+. Al tener una cohorte de pacientes tratados sólo con quimioterapia pudimos observar que este efecto no se replicaba en estos pacientes, indicando que el efecto observado es atribuible a ipilimumab. Al correlacionar estos hallazgos con los datos de supervivencia, observamos que un aumento en la expresión de ICOS tanto en células CD4+ como CD8+ tras el tratamiento con ipilimumab, se asociaba a un aumento en la SG de manera significativa. Liakou y cols. reportaron un marcado aumento de la expresión de ICOS en células CD4+ en pacientes con cáncer de vejiga tras tratarse con ipilimumab¹⁷⁰. En este estudio, al tener la disponibilidad de biopsias pareadas, pudieron objetivar los mismos cambios en la expresión de ICOS en tejido. Estos hallazgos evidencian que uno de los efectos del tratamiento con ipilimumab en CPCP es un incremento del porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan ICOS, y que este incremento tiene un impacto positivo en la supervivencia. Son necesarios estudios mecanísticos y análisis de muestras de tejido pareadas para determinar la relevancia biológica de ICOS en este escenario.

Las células natural killer (NK) forman parte de la inmunidad innata³²¹ y son capaces de reconocer células tumorales y provocar su destrucción a través de una muerte citotóxica celular mediada por anticuerpos³²², o mediante el reclutamiento de citoquinas pro-inflamatorias³²³. CD57 es un receptor de membrana que se encuentra prácticamente ausente en las células NK del recién nacido³²⁴ y que aumenta progresivamente con la edad³²⁵, lo que apunta a que se trata de un marcador de diferenciación de células NK. En nuestro estudio observamos que aquellos pacientes con un porcentaje elevado de

células NK CD57+ antes de empezar el tratamiento, tenían una mejor SG cuando se trataban con ipilimumab + quimioterapia. En un metaanálisis se evaluó el papel pronóstico de linfocitos CD57+ (tanto células T CD8+ como células NK) infiltrantes de tumor. Observaron que la infiltración por linfocitos CD57+ se asociaba de manera significativa a una mejor SG en varios tipos de cáncer, entre ellos el CPCNP³²⁶. De manera contraria, en un estudio reciente se observó que un elevado número de células NK CD57+ circulantes se relacionaba con resistencia al tratamiento (trastuzumab neoadyuvante) en pacientes con cáncer de mama HER2+²²⁶. El tratamiento con ipilimumab en nuestro estudio no alteró de manera significativa el porcentaje de las células NK CD57+ a lo largo del tratamiento.

Por último, analizamos si existía alguna asociación entre las características del fenotipo celular periférico previo al tratamiento con ipilimumab y la toxicidad frente a este. Observamos que un porcentaje bajo de células T CD8+ expresando PD-1 se asociaba con tener al menos un tipo de toxicidad grado 3 durante el curso de tratamiento con ipilimumab. Además, un recuento elevado de CD4+ se asociaba con el desarrollo de colitis de cualquier grado, y dentro de estos, un porcentaje elevado de células positivas para el receptor de co-activación CD137 se asociaba con una colitis más severa. No se han reportado muchos datos respecto a la relación entre marcadores periféricos y toxicidad por ipilimumab. Khoja y cols.³²⁷ analizaron el recuento de los subtipos leucocitarios en sangre en pacientes con melanoma metastásico tratados con ipilimumab, pero no encontraron ninguna asociación con toxicidad. En un trabajo presentado en 2017 en el congreso americano de oncología, Schindler y cols.³²⁸ evaluaron 156 pacientes en el mismo escenario y observaron que el aumento del número de eosinófilos a lo largo del tratamiento estaba significativamente asociado a la aparición de cualquier tipo de efecto adverso. Nuestros hallazgos relativos al desarrollo

de colitis de alto grado en pacientes con un porcentaje elevado de CD4⁺ CD137⁺ en sangre, son congruentes con el rol de CD137 reportado en las colitis inmunomediadas, donde la interacción del receptor con su ligando contribuye a la persistencia de la inflamación en la mucosa intestinal³²⁹. En un modelo de ratón con colitis mediada por transferencia de células T CD4⁺, se observó que el patrón de citoquinas generadas cuando los linfocitos T CD4⁺ provenían de ratones deficientes para CD137 incluía citoquinas Th2 inmunoreguladoras, mientras que tenía un predominio de citoquinas proinflamatorias Th1 cuando estos eran transferidos desde ratones con presencia de CD137³³⁰. En nuestro estudio, al valorar la modulación de las subpoblaciones celulares periféricas tras el tratamiento con ipilimumab, la mayoría de los pacientes no sufrieron una elevación de la proporción de los linfocitos CD4⁺ CD137⁺, sino que el marcador, en promedio, se mantuvo estable.

En resumen, hemos observado que el estudio de las subpoblaciones linfocitarias periféricas podría ser de utilidad para predecir tanto la respuesta como la toxicidad frente a ipilimumab en CPCP, aunque son necesarios estudios funcionales y cohortes más extensas de pacientes para la validación de los resultados. En la siguiente fase del proyecto se llevarán a cabo análisis del resto de subpoblaciones linfocitarias estudiadas y se asociarán los resultados con los datos previos de la concentración de autoanticuerpos y citoquinas, para obtener una imagen adicional de los eventos inmunológicos en el CPCP tratado con quimioterapia con o sin ipilimumab.

6. CONCLUSIONES

1. Los AAN se pueden detectar en más de la mitad de los pacientes con CPCP, incluso en ausencia de síntomas neurológicos. El tratamiento con ipilimumab combinado con quimioterapia no induce cambios diferenciales en los títulos de AAN a lo largo del tratamiento. La variación del título de AAN en suero a lo largo del tratamiento actúa como un reflejo de la carga tumoral en CPCP.
2. La presencia de AAN se asocia a un mejor pronóstico en CPCP. La presencia de múltiples reactividades frente a AAN podría estar relacionada con una peor respuesta al tratamiento con quimioinmunoterapia.
3. En el CPCP existen unos niveles basales bajos de citoquinas Th1, Th2 y pro-inflamatorias en comparación a sujetos sanos. La adición de ipilimumab al tratamiento con quimioterapia en CPCP produce un impacto en los niveles de citoquinas séricas provocando un incremento global de estas, que no se observa con la quimioterapia sola.
4. Niveles basales elevados de IL-2 predicen sensibilidad a ipilimumab, mientras que niveles elevados de IL-6 y TNF α son biomarcadores predictivos de resistencia.
5. La adición de ipilimumab al tratamiento con quimioterapia en CPCP induce la expansión de distintas subpoblaciones linfocitarias periféricas.

6. Tanto una expansión de los linfocitos CD4/CD8 ICOS+ como un porcentaje elevado de células NK CD57+ antes de iniciar el tratamiento, se asocian a una mejor supervivencia en pacientes con CPCP tratados con quimioinmunoterapia.

7. La determinación del fenotipo linfocitario periférico en pacientes con CPCP tratados con ipilimumab puede ayudar a predecir toxicidad inmunomediada, especialmente frente a la aparición de colitis severas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* [Internet]. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018;68(6):394–424.
3. Barnard WG. The nature of the “oat-celled sarcoma” of the mediastinum. *J Pathol Bacteriol*. 1926;29(3):241–4.
4. JG A. Oat-cell carcinoma of the bronchus. *J Pathol Bacteriol*. 1959;Oct;78:513.
5. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: Analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*. 2006;24(28):4539–44.
6. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ CK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
7. A KS. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer*. 2000;31(2–3):139–48.
8. Ou SHI, Ziogas A, Zell JA. Prognostic factors for survival in extensive stage small cell lung cancer (ED-SCLC): The importance of smoking history, socioeconomic and marital statuses, and ethnicity. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009;4(1):37–43.
9. Varghese AM, Zakowski MF, Yu HA, Won HH, Riely GJ, Krug LM, et al. Small-Cell Lung Cancers in Patients Who Never Smoked Cigarettes. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2014;9(6):892–6.
10. Sun J-M, Choi Y-L, Ji JH, Ahn JS, Kim K-M, Han J, et al. Small-cell lung cancer detection in never-smokers: clinical characteristics and multigene mutation profiling using targeted next-generation sequencing. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2015 Jan;26(1):161–6.
11. Liu X, Jiang T, Li W, Li X, Zhao C, Shi J, et al. Characterization of never-smoking and its association with clinical outcomes in Chinese patients with small-cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2018;115(November 2017):109–15.
12. Travis W.D., Brambilla E., Muller-Hermelink H.K. HCC (Eds. . World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon; 2004.
13. Karachaliou N, Pilotto S, Lazzari C, Bria E, de Marinis F, Rosell R. Cellular and molecular biology of small cell lung cancer: an overview. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2016;5(1):2–15.
14. Mollaoglu G, Guthrie MR, Böhm S, Brägelmann J, Can I, Ballieu PM, et al. MYC Drives Progression of Small Cell Lung Cancer to a Variant Neuroendocrine Subtype with Vulnerability to Aurora Kinase Inhibition. *Cancer Cell* [Internet]. 2017 Feb 13;31(2):270–85.
15. Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, He M, Augustyn A, Osborne JK, et al. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Aug 2;16(5):1259–72.
16. Nicholson AG, Chansky K, Crowley J, Beyruti R, Kubota K, Turrisi A, et al. The international association for the study of lung cancer lung cancer staging project: Proposals for the revision of the clinical and pathologic staging of small cell lung cancer

- in the forthcoming eighth edition of the tnm classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(3):300–11.
17. M S, T F, S K, Y H, M I, M K, et al. Prognostic significance of the 8th edition of the TNM classification for patients with extensive disease small cell lung cancer. *Cancer Manag Res [Internet]*. 2018;10:6039–47.
 18. Farago AF, Keane FK. Current standards for clinical management of small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7(1):69–79.
 19. Socinski MA, Smit EF, Lorigan P, Konduri K, Reck M, Szczesna A, et al. Phase III study of pemetrexed plus carboplatin compared with etoposide plus carboplatin in chemotherapy-naïve patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(28):4787–92.
 20. Evans WK, Shepherd FA, Feld R, Osoba D, Dang P, Deboer G. VP-16 and cisplatin as first-line therapy for small-cell lung cancer. *J Clin Oncol [Internet]*. 1985 Nov;3(11):1471–7.
 21. Pujol J-L, Carestia, Daurès J-P. Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *Br J Cancer*. 2002;83(1):8–15.
 22. Hanna N, Bunn PA, Langer C, Einhorn L, Guthrie T, Beck T, et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer. *J Clin Oncol [Internet]*. 2006 May 1;24(13):2038–43.
 23. Argiris A, Murren JR. Staging and clinical prognostic factors for small-cell lung cancer. *Cancer J [Internet]*. 7(5):437–47.
 24. M Z. Keynote address on biostatistics and data retrieval. *Cancer Chemother Rep* 3. 1973;Mar;4(2):3.
 25. Livingston RB, McCracken JD, Trauth CJ, Chen T. Isolated pleural effusion in small cell lung carcinoma: Favorable prognosis. A review of the Southwest Oncology Group experience. *Chest [Internet]*. 1982;81(2):208–11.
 26. Haddadin S, Perry MC. History of small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer [Internet]*. 2011;12(2):87–93.
 27. Tendler S, Grozman V, Lewensohn R, Tsakonas G, Viktorsson K, De Petris L. Validation of the 8th TNM classification for small-cell lung cancer in a retrospective material from Sweden. *Lung Cancer [Internet]*. 2018;120:75–81.
 28. Wolf M, Holle R, Hans K, Drings P, Havemann K. Analysis of prognostic factors in 766 patients with small cell lung cancer (SCLC): The role of sex as a predictor for survival. *Br J Cancer [Internet]*. 1991 Dec;63(6):986–92.
 29. Sculier J-P, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P, International Staging Committee and Participating Institutions. The Impact of Additional Prognostic Factors on Survival and their Relationship with the Anatomical Extent of Disease Expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the Proposals for the 7th Edition. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2008 May;3(5):457–66.
 30. Rawson N, Peto J. An overview of prognostic factors in small cell lung cancer. *Br J Cancer [Internet]*. 1990 Apr;61(4):597–604.
 31. Cerny T, Anderson H, Bramwell V, Thatcher N, Blair V. Pretreatment prognostic factors and scoring system in 407 small-cell lung cancer patients. *Int J Cancer [Internet]*. 1987 Feb 15;39(2):146–9.
 32. Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, Livingston RB. Determinants of improved outcome

- in small-cell lung cancer: an analysis of the 2,580-patient Southwest Oncology Group data base. *J Clin Oncol* [Internet]. 1990 Sep;8(9):1563–74.
33. Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH. Long-term survival in small-cell lung cancer: posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years--an analysis of 1,714 consecutive patients. *J Clin Oncol* [Internet]. 1995 May;13(5):1215–20.
 34. Souhami RL, Bradbury I, Geddes DM, Spiro SG, Harper PG, Tobias JS. Prognostic significance of laboratory parameters measured at diagnosis in small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* [Internet]. 1985 Jun;45(6):2878–82.
 35. Foster NR, Mandrekar SJ, Schild SE, Nelson GD, Rowland KM, Deming RL, et al. Prognostic factors differ by tumor stage for small cell lung cancer. *Cancer* [Internet]. 2009 Jun 15;115(12):2721–31.
 36. Evans WK, Shepherd FA, Feld R, Osoba D, Dang P, Deboer G. VP-16 and cisplatin as first-line therapy for small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1985 Nov;3(11):1471–7.
 37. Pujol J-L, Carestia L, Daurès J-P. Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *Br J Cancer* [Internet]. 2000 Jul;83(1):8–15.
 38. Skarlos D V., Samantas E, Kosmidis P, Fountzilias G, Angelidou M, Palamidas P, et al. Randomized comparison of etoposide-cisplatin vs. etoposide-carboplatin and irradiation in small-cell lung cancer. *Ann Oncol* [Internet]. 1994 Sep;5(7):601–7.
 39. Okamoto H, Watanabe K, Kunikane H, Yokoyama A, Kudoh S, Asakawa T, et al. Randomised phase III trial of carboplatin plus etoposide vs split doses of cisplatin plus etoposide in elderly or poor-risk patients with extensive disease small-cell lung cancer: JCOG 9702. *Br J Cancer* [Internet]. 2007 Jul 19;97(2):162–9.
 40. Hatfield LA, Huskamp HA, Lamont EB. Survival and Toxicity After Cisplatin Plus Etoposide Versus Carboplatin Plus Etoposide for Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer in Elderly Patients. *J Oncol Pract*. 2016;12(7):666–73.
 41. Rossi A, Di Maio M, Chiodini P, Rudd RM, Okamoto H, Skarlos DV, et al. Carboplatin- or Cisplatin-Based Chemotherapy in First-Line Treatment of Small-Cell Lung Cancer: The COCIS Meta-Analysis of Individual Patient Data. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 May 10;30(14):1692–8.
 42. Warde P, Payne D. Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis. *J Clin Oncol* [Internet]. 1992 Jun;10(6):890–5.
 43. Pignon J-P, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, et al. A Meta-Analysis of Thoracic Radiotherapy for Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 1992 Dec 3;327(23):1618–24.
 44. Schneider BJ. Management of recurrent small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2008 Mar;6(3):323–31.
 45. Owonikoko TK, Behera M, Chen Z, Bhimani C, Curran WJ, Khuri FR, et al. A systematic analysis of efficacy of second-line chemotherapy in sensitive and refractory small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2012 May;7(5):866–72.
 46. O'Brien MER, Ciuleanu T-E, Tsekov H, Shparyk Y, Čučević B, Juhasz G, et al. Phase III Trial Comparing Supportive Care Alone With Supportive Care With Oral Topotecan in Patients With Relapsed Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 Dec 1;24(34):5441–7.

47. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2018;379(23):NEJMoa1809064.
48. Ready NE, Pang HH, Gu L, Otterson GA, Thomas SP, Miller AA, et al. Chemotherapy With or Without Maintenance Sunitinib for Untreated Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study—CALGB 30504 (Alliance). *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 May 20;33(15):1660–5.
49. Arnold AM, Seymour L, Smylie M, Ding K, Ung Y, Findlay B, et al. Phase II study of vandetanib or placebo in small-cell lung cancer patients after complete or partial response to induction chemotherapy with or without radiation therapy: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.20. *J Clin Oncol*. 2007;25(27):4278–84.
50. Pelayo Alvarez M, Gallego Rubio Ó, Bonfill Cosp X, Agra Varela Y. Chemotherapy versus best supportive care for extensive small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(4).
51. Kokron O, Micksche M, Titscher R, Wrba H. Ifosfamid versus Ifosfamid + CCNU in der Behandlung des inoperablen kleinzelligen Bronchuskarzinoms. *Oncol Res Treat* [Internet]. 1982 Apr;5(2):56–9.
52. Kokron O, Titscher R, Micksche M, Cerni C, Wrba H. [Clinical experiences with Holoxan in small cell carcinoma of the bronchus (author's transl)]. *Osterr Z Onkol* [Internet]. 1977 Nov 15;4(5–6):103–6.
53. Faivre-Finn C, Snee M, Ashcroft L, Appel W, Barlesi F, Bhatnagar A, et al. Concurrent once-daily versus twice-daily chemoradiotherapy in patients with limited-stage small-cell lung cancer (CONVERT): an open-label, phase 3, randomised, superiority trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017 Aug;18(8):1116–25.
54. Nicholson LB. The immune system. *Essays Biochem* [Internet]. 2016;60(3):275–301.
55. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):235–71.
56. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Sep 14;343(11):782–6.
57. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Sep 7;343(10):702–9.
58. Parham P, Ohta T. Population Biology of Antigen Presentation by MHC Class I Molecules. *Science* (80-) [Internet]. 1996 Apr 5;272(5258):67–74.
59. Horn L, Reck M, Spigel DR. The Future of Immunotherapy in the Treatment of Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* [Internet]. 2016;21(8):910–21.
60. Steer HJ, Lake RA, Nowak AK, Robinson BWS. Harnessing the immune response to treat cancer. *Oncogene* [Internet]. 2010;29(48):6301–13.
61. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* [Internet]. 2013 Dec 20;342(6165):1432–3.
62. Hoos A, Ibrahim R, Korman A, Abdallah K, Berman D, Shahabi V, et al. Development of ipilimumab: Contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin Oncol* [Internet]. 2010;37(5):533–46.
63. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012;12(4):252–64.
64. Acuto O, Michel F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 Dec;3(12):939–51.

65. Hathcock K, Laszlo G, Dickler H, Bradshaw J, Linsley P, Hodes R. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* (80-) [Internet]. 1993 Nov 5;262(5135):905–7.
66. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* [Internet]. 1994 Dec;1(9):793–801.
67. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* [Internet]. 2009 May;229(1):12–26.
68. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Apr 3;4(4):330–6.
69. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* (80-) [Internet]. 2003 Feb 14;299(5609):1057–61.
70. Walker LSK, Sansom DM. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(2):63–70.
71. Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1767–75.
72. Comin-Anduix B, Escuin-Ordinas H, Ibarondo FJ. Tremelimumab: Research and clinical development. *Onco Targets Ther*. 2016;9:1767–76.
73. 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* [Internet]. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
74. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* [Internet]. 1992 Nov;11(11):3887–95.
75. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubat T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* [Internet]. 1996 May;8(5):765–72.
76. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* [Internet]. 2001 Mar;2(3):261–8.
77. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* [Internet]. 2000 Oct 2;192(7):1027–34.
78. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* [Internet]. 2009 Dec 21;206(13):3015–29.
79. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* [Internet]. 2012 Jun 4;209(6):1201–17.
80. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jan 22;372(4):320–30.
81. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity

- and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2015 Mar;16(3):257–65.
82. 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* [Internet]. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
 83. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJM, et al. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Jun;15(7):700–12.
 84. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jun 25;372(26):2521–32.
 85. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* [Internet]. 1996 Jun 1;183(6):2533–40.
 86. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. Longo DL, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 3;375(18):1767–78.
 87. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* [Internet]. 2002 Aug 24;8(8):793–800.
 88. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Sep 24;373(13):1270–1.
 89. Friedman CF, Proverbs-Singh TA, Postow MA. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016 Oct 1;2(10):1346.
 90. Khoja L, Day D, Wei-Wu Chen T, Siu LL, Hansen AR. Tumour- and class-specific patterns of immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Ann Oncol* [Internet]. 2017 Oct 1;28(10):2377–85.
 91. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade. *N Engl J Med*. 2018;378(2):158–68.
 92. Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO, Brogdon C, Dadu R, et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2017 Dec 21;5(1):95.
 93. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of Immune-Related Adverse Events and Kinetics of Response With Ipilimumab. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Jul 20;30(21):2691–7.
 94. Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC, Schindler K, Lacouture ME, et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol* [Internet]. 2015 Sep 14;26(12):mdv383.
 95. Weber JS, Yang JC, Atkins MB, Disis ML. Toxicities of Immunotherapy for the Practitioner. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Jun 20;33(18):2092–9.
 96. Cuzzubbo S, Javeri F, Tissier M, Roumi A, Barlog C, Doridam J, et al. Neurological adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: Review of the literature. *Eur J Cancer* [Internet]. 2017 Mar;73:1–8.

97. Michot JM, Bigenwald C, Champiat S, Collins M, Carbonnel F, Postel-Vinay S, et al. Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *Eur J Cancer* [Internet]. 2016 Feb;54:139–48.
98. Pavan A, Attili I, Pasello G, Guarneri V, Conte PF, Bonanno L. Immunotherapy in small-cell lung cancer: from molecular promises to clinical challenges. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1–13.
99. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes and the nervous system. *N Engl J Med*. 2003;3(4):287–8.
100. Maddison P, Newsom-Davis J, Mills K, Souhami R. Favourable prognosis in Lambert-Eaton myasthenic syndrome and small-cell lung carcinoma. *Lancet*. 1999;353:117–8.
101. Wang W, Hodgkinson P, McLaren F, Mackean MJ, Williams L, Howie SEM, et al. Histologic assessment of tumor-associated CD45+ cell numbers is an independent predictor of prognosis in small cell lung cancer. *Chest* [Internet]. 2013;143(1):146–51.
102. Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol* [Internet]. 2006 Jun;33(3):270–98.
103. Gozzard P, Maddison P. Republished: Which antibody and which cancer in which paraneoplastic syndromes? *Postgrad Med J* [Internet]. 2011 Jan 1;87(1023):60–70.
104. Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol*. 2004;56(5):715–9.
105. Benatar M, Blaes F, Johnston I, Wilson K, Vincent A, Beeson D, et al. Presynaptic neuronal antigens expressed by a small cell lung carcinoma cell line. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2001 Feb 1;113(1):153–62.
106. Sagar SM. Neurologic complications of cancer By Jerome B. Posner, MD Philadelphia, FA Davis, 1995 482 pp, illustrated, \$99.00. *Ann Neurol* [Internet]. 1996 Feb;39(2):279–279.
107. Höftberger R, Rosenfeld MR, Dalmau J. Update on neurological paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(6):489–95.
108. Lancaster E, Dalmau J. Neuronal autoantigens-pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2012;8(7):380–90.
109. Zhang L, Qian W, Chen Q, Yin L, Li B, Wang H. Imbalance in circulating T lymphocyte subsets contributes to Hu antibody-associated paraneoplastic neurological syndromes. *Cell Immunol* [Internet]. 2014 Aug;290(2):245–50.
110. Pignolet BS, Gebauer CM, Liblau RS. Immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes associated with anti-Hu antibodies. *Oncoimmunology* [Internet]. 2013 Dec 27;2(12):e27384.
111. Planagumà J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* [Internet]. 2015 Jan;138(1):94–109.
112. Petit-Pedrol M, Armangue T, Peng X, Bataller L, Cellucci T, Davis R, et al. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* [Internet]. 2014 Mar;13(3):276–86.
113. Lucchinetti CF, Kimmel DW, Lennon VA. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for type 1 antineuronal nuclear autoantibodies. *Neurology* [Internet]. 1998 Mar;50(3):652–7.
114. Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Ann Neurol*

- [Internet]. 2001 Feb;49(2):146–54.
115. Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* [Internet]. 1992 Oct;42(10):1931–7.
 116. Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA. Anti-neuronal nuclear autoantibody type 2: Paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol* [Internet]. 2003 May;53(5):580–7.
 117. Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, Sanchez-Valle R, Saiz A, Dalmau J, et al. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology* [Internet]. 2003 Jan 28;60(2):230–4.
 118. Dalmau J, Graus F, Villarejo A, Posner JB, Blumenthal D, Thiessen B, et al. Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. *Brain* [Internet]. 2004 Jun 16;127(8):1831–44.
 119. Pittock SJ, Lucchinetti CF, Parisi JE, Benarroch EE, Mokri B, Stephan CL, et al. Amphiphysin autoimmunity: Paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol* [Internet]. 2005 Jul;58(1):96–107.
 120. Ariño H, Höftberger R, Gresa-Arribas N, Martínez-Hernández E, Armangue T, Kruer MC, et al. Paraneoplastic neurological syndromes and glutamic acid decarboxylase antibodies. *JAMA Neurol*. 2015;72(8):874–81.
 121. Titulaer MJ, Klooster R, Potman M, Sabater L, Graus F, Hegeman IM, et al. SOX antibodies in small-cell lung cancer and Lambert-Eaton myasthenic syndrome: frequency and relation with survival. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Sep 10;27(26):4260–7.
 122. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* [Internet]. 2008 Dec;7(12):1091–8.
 123. Tan KM, Lennon VA, Klein CJ, Boeve BF, Pittock SJ. Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity. *Neurology* [Internet]. 2008 May 13;70(20):1883–90.
 124. Vernino S, Lennon VA. Autoantibody Profiles and Neurological Correlations of Thymoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2004 Nov 1;10(21):7270–5.
 125. Payne M, Bradbury P, Lang B, Vincent A, Han C, Newsom-Davis J, et al. Prospective Study into the Incidence of Lambert Eaton Myasthenic Syndrome in Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2010 Jan;5(1):34–8.
 126. Wirtz PW, Lang B, Graus F, van den Maagdenberg AMJM, Saiz A, de Koning Gans PA, et al. P/Q-type calcium channel antibodies, Lambert–Eaton myasthenic syndrome and survival in small cell lung cancer. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2005 Jul;164(1–2):161–5.
 127. Elrington GM, Murray NM, Spiro SG, Newsom-Davis J. Neurological paraneoplastic syndromes in patients with small cell lung cancer. A prospective survey of 150 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1991 Sep;54(9):764–7.
 128. Gozzard P, Woodhall M, Chapman C, Nibber A, Waters P, Vincent A, et al. Paraneoplastic neurologic disorders in small cell lung carcinoma: A prospective study. *Neurology* [Internet]. 2015 Jul 21;85(3):235–9.
 129. Graus F, Keime-Guibert F, Reñe R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, et al. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* [Internet]. 2001 Jun;124(Pt 6):1138–48.
 130. Giometto B. Paraneoplastic Neurologic Syndrome in the PNS Euronetwork Database. *Arch Neurol*. 2010;67(3):330.

131. Lubin JH, Alavanja MCR, Caporaso N, Brown LM, Brownson RC, Field RW, et al. Cigarette smoking and cancer risk: Modeling total exposure and intensity. *Am J Epidemiol*. 2007;166(4):479–89.
132. DeMarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res Mutat Res* [Internet]. 2004 Nov;567(2–3):447–74.
133. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* [Internet]. 2002 Oct 15;21(48):7435–51.
134. Hecht SS. Progress and Challenges in Selected Areas of Tobacco Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2008 Jan;21(1):160–71.
135. Pleasance ED, Stephens PJ, O’Meara S, McBride DJ, Meynert A, Jones D, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*. 2010;463(7278):184–90.
136. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A V., et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415–21.
137. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretia L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47–53.
138. M.D. Galsky¹, A. Saci², P.M. Szabo², A. Azrilevich³, C. Horak², A. Lambert⁴, A. Siefker-Radtke⁵, A. Necchi⁶ PS. Impact of Tumor Mutation Burden on Nivolumab Efficacy in Second-Line Urothelial Carcinoma Patients: Exploratory Analysis of the Phase II CheckMate 275. In: *Annals of Oncology* [Internet]. 2017.
139. Retz M, Bedke J, Herrmann E, Grimm M-O, Zimmermann U, Müller L, et al. 845O Phase III randomized, sequential, open-label study to evaluate the efficacy and safety of sorafenib-pazopanib versus pazopanib-sorafenib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma (SWITCH-II). *Ann Oncol* [Internet]. 2017 Sep 1;28(suppl_5).
140. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Dec 4;371(23):2189–99.
141. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar A V, Necchi A, 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* [Internet]. 2016 May 7;387(10031):1909–20.
142. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* [Internet]. 2015 Apr 3;348(6230):124–8.
143. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (80-) [Internet]. 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
144. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jun 22;376(25):2415–26.
145. Antonia SJ, López-Martin JA, Bendell J, Ott PA, Taylor M, Eder JP, et al. Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):883–95.
146. Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, Calvo E, Ascierto PA, Atmaca A, et al. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination with Ipilimumab in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2018;1–9.

147. Reck M, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi. F, Chacko R, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: Results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Ann Oncol.* 2013;24(1):75–83.
148. Reck M, Luft A, Szczesna A, Havel L, Kim SW, Akerley W, et al. Phase III randomized trial of ipilimumab plus etoposide and platinum versus placebo plus etoposide and platinum in extensive-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(31):3740–8.
149. Arriola E, Wheeler M, Galea I, Cross N, Maishman T, Hamid D, et al. Outcome and Biomarker Analysis from a Multicenter Phase 2 Study of Ipilimumab in Combination with Carboplatin and Etoposide as First-Line Therapy for Extensive-Stage SCLC. *J Thorac Oncol.* 2016 Sep;11(9):1511–21.
150. Hellmann MD, Ott PA, Zugazagoitia J, Ready NE, Hann CL, De Braud FG, et al. Nivolumab (nivo) ± ipilimumab (ipi) in advanced small-cell lung cancer (SCLC): First report of a randomized expansion cohort from CheckMate 032. *J Clin Oncol [Internet].* 2017 May 20;35(15_suppl):8503–8503.
151. M. Reck, D. Vicente, T. Ciuleanu, S. Gettinger, S. Peters, L. Horn, C. Audigier-Valette, N. Pardo, O. Juan-Vidal, Y. Cheng, H. Zhang, M. Shi, J. Wolf, S.J. Antonia, K. Nakagawa, G. Selvaggi, C. Baudelet, H. Chang DRS. Efficacy and safety of nivolumab (nivo) monotherapy versus chemotherapy (chemo) in recurrent small cell lung cancer (SCLC): Results from CheckMate 331. In: *Annals of Oncology (2018) 29 (suppl_10): x39-x43* 101093/annonc/mdy511.
152. T.K. Owonikoko¹, H.R. Kim², R. Govindan³, N. Ready⁴, M. Reck⁵, S. Peters⁶, S.R. Dakhil⁷, A. Navarro⁸, J. Rodriguez-Cid⁹, M. Schenker¹⁰, J.S. Lee¹¹, V. Gutierrez¹², I. Percent¹³, D. Morgensztern¹⁴, J. Fairchild¹⁵, C. Baudelet¹⁵ KP. Nivolumab (nivo) plus ipilimumab (ipi), nivo, or placebo (pbo) as maintenance therapy in patients (pts) with extensive disease small cell lung cancer. In: *Annals of Oncology (2019) 30 (suppl_2): ii77-ii80* 101093/annonc/mdz094.
153. Patrick Alexander Ott, Maria Elena Elez Fernandez, Sandrine Huret, Dong-Wan Kim, Rebecca Anne Moss, Tammy Winser, Sammy Yuan, Jonathan D. Cheng, Bilal Piperdi JMM. Pembrolizumab (MK-3475) in patients (pts) with extensive-stage small cell lung cancer (SCLC): Preliminary safety and efficacy results from KEYNOTE-028. In: *J Clin Oncol 33, 2015 (suppl; abstr 7502).*
154. Hyun Cheol Chung, Jose A. Lopez-Martin, Stephen Chuan-Hao Kao, Wilson H. Miller, Willeke Ros, Bo Gao, Aurelien Marabelle, Maya Gottfried, Alona Zer, Jean-Pierre Delord, Nicolas Penel, Shadia Ibrahim Jalal, Lei Xu, Susan Zeigenfuss, Scott K. Pruitt SAP-P. Phase 2 study of pembrolizumab in advanced small-cell lung cancer (SCLC): KEYNOTE-158. In: *Journal of Clinical Oncology 36, no 15_suppl (May 20 2018) 8506-8506.*
155. YuJung Kim, Bhumsuk Keam, Chan-Young Ock, Sanghoon Song, Miso Kim, Se Hyun Kim, Ki Hwan Kim, Jin-Soo Kim, Tae Min Kim, Dong-Wan Kim, Jong Seok Lee, Dae Seog Heo YuJung Kim, Bhumsuk Keam, Chan-Young Ock, Sanghoon Song, Miso Kim, Se Hyun Kim, Ki Hwan Kim, Ji DSH. A phase II study of pembrolizumab and paclitaxel in refractory extensive disease small cell lung cancer. In: *J Clin Oncol 36, 2018 (suppl; abstr 8575).*
156. Gadgeel SM, Pennell NA, Fidler MJ, Halmos B, Bonomi P, Stevenson J, et al. Phase II Study of Maintenance Pembrolizumab in Patients with Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer (SCLC). *J Thorac Oncol [Internet].* 2018;13(9):1393–9.
157. FDA approves pembrolizumab for metastatic small cell lung cancer. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pembrolizumab-metastatic-small-cell-lung-cancer> [Internet].

158. Pujol JL, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Uwer L, Hureauux J, et al. A Randomized Non-Comparative Phase II Study of Anti-Programmed Cell Death-Ligand 1 Atezolizumab or Chemotherapy as Second-Line Therapy in Patients With Small Cell Lung Cancer: Results From the IFCT-1603 Trial. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2019;14(5):903–13.
159. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, Reinmuth N, Hotta K, Trukhin D, et al. Durvalumab plus platinum–etoposide versus platinum–etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2019 Oct;6736(19).
160. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet*. :155–64.
161. Delyon J, Mateus C, Lefeuvre D, Lanoy E, Zitvogel L, Chaput N, et al. Experience in daily practice with ipilimumab for the treatment of patients with metastatic melanoma: an early increase in lymphocyte and eosinophil counts is associated with improved survival. *Ann Oncol* [Internet]. 2013 Jun;24(6):1697–703.
162. Kelderman S, Heemskerk B, van Tinteren H, van den Brom RRH, Hospers GAP, van den Eertwegh AJM, et al. Lactate dehydrogenase as a selection criterion for ipilimumab treatment in metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2014 May;63(5):449–58.
163. Di Giacomo AM, Calabrò L, Danielli R, Fonsatti E, Bertocci E, Pesce I, et al. Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who responded to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access programme. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2013 Jun;62(6):1021–8.
164. Valpione S, Martinoli C, Fava P, Mocellin S, Campana LG, Quaglino P, et al. Personalised medicine: Development and external validation of a prognostic model for metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer* [Internet]. 2015 Sep;51(14):2086–94.
165. Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, Del Vecchio M, Maio M, Antonini Cappellini GC, et al. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol* [Internet]. 2016 Apr;27(4):732–8.
166. Katja Schindler, Kaan Harmankaya, Michael Andrew Postow, Sophie Frantal, Danielle Bello, Charlotte Eielson Ariyan, Olivier Alain Michielin, Christoph Hoeller, Hubert Pehamberger JDW. Pretreatment levels of absolute and relative eosinophil count to improve overall survival (OS) in patients with metastatic melanoma under treatment with ipilimumab, an anti CTLA-4 antibody. In: ASCO. 2017.
167. Weide B, Martens A, Hassel JC, Berking C, Postow MA, Bisschop K, et al. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2016 Nov 15;22(22):5487–96.
168. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* [Internet]. 1999 Jan 21;397(6716):263–6.
169. Chen H, Liakou CI, Kamat A, Pettaway C, Ward JF, Ng D, et al. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4⁺ ICOS^{hi} T cell frequency and IFN- γ levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *PLoS One*. 2009;106(8).
170. Liakou CI, Kamat A, Tang DN, Chen H, Sun J, Troncoso P, 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* [Internet]. 2008 Sep

- 30;105(39):14987–92.
171. Vonderheide RH, Lorusso PM, Khalil M, Gartner EM, Khaira D, Soulieres D, 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):3485–94.
 172. Carthon BC, Wolchok JD, Yuan J, Kamat A, Tang DSN, Sun J, et al. Preoperative CTLA-4 Blockade : Tolerability and Immune Monitoring in the Setting of a Presurgical Clinical Trial. :2861–71.
 173. Weide B, Di Giacomo AM, Fonsatti E, Zitvogel L. Immunologic Correlates in the Course of Treatment With Immunomodulating Antibodies. *Semin Oncol* [Internet]. 2015;42(3):448–58.
 174. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, et al. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med.* 2014;6(238):1–9.
 175. Attia P, Phan GQ, Maker A V., Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, et al. Autoimmunity Correlates With Tumor Regression in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Sep 1;23(25):6043–53.
 176. Maker A V., Phan GQ, Attia P, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, et al. Tumor Regression and Autoimmunity in Patients Treated With Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4 Blockade and Interleukin 2: A Phase I/II Study. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2005 Dec 21;12(12):1005–16.
 177. Weber JS, Hamid O, Chasalow SD, Wu DY, Parker SM, Galbraith S, et al. Ipilimumab Increases Activated T Cells and Enhances Humoral Immunity in Patients With Advanced Melanoma. *J Immunother* [Internet]. 2012 Jan;35(1):89–97.
 178. Simeone E, Gentilcore G, Giannarelli D, Grimaldi AM, Caracò C, Curvietto M, et al. Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. 2014;675–83.
 179. Tarhini AA, Edington H, Butterfield LH, Lin Y, Shuai Y, Tawbi H, et al. Immune Monitoring of the Circulation and the Tumor Microenvironment in Patients with Regionally Advanced Melanoma Receiving Neoadjuvant Ipilimumab. 2014;9(2).
 180. Romano E, Kusio-kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. 2015;1–6.
 181. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009 Mar;9(3):162–74.
 182. Pico de Coaña Y, Poschke I, Gentilcore G, Mao Y, Nyström M, Hansson J, et al. Ipilimumab treatment results in an early decrease in the frequency of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells as well as their Arginase1 production. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2013 Sep;1(3):158–62.
 183. Martens A, Wistuba-hamprecht K, Foppen MG, Yuan J, Postow MA, Wong P, et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. 2016;22(12):2908–18.
 184. Kitano S, Postow MA, Ziegler CGK, Kuk D, Panageas KS, Cortez C, et al. Computational Algorithm-Driven Evaluation of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Frequency for Prediction of Clinical Outcomes. 2014;4(August):812–22.
 185. Postow MA, Manuel M, Wong P, Yuan J, Dong Z, Liu C, et al. Peripheral T cell

- receptor diversity is associated with clinical outcomes following ipilimumab treatment in metastatic melanoma. ??? [Internet]. 2015;3–7.
186. Das R, Verma R, Sznol M, Boddupalli S, Gettinger SN, Kluger H, et al. Combination Therapy with Anti – CTLA-4 and Anti – PD-1 Leads to Distinct Immunologic Changes In Vivo. 2016;
 187. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Güre AO, Ritter G, Jäger E, et al. NY-ESO-1: Review of an Immunogenic Tumor Antigen. *Adv Cancer Res.* 2006;95(06):1–30.
 188. Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, Rasalan TS, Ritter E, Gallardo HF, et al. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Oct 4;108(40):16723–8.
 189. Waldmann H, Cobbold S. Regulatory T Cells: Context Matters. *Immunity* [Internet]. 2009;30(5):613–5.
 190. Hannani D, Vétizou M, Enot D, Rusakiewicz S, Chaput N, Klatzmann D, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25. *Cell Res* [Internet]. 2015 Feb 13;25(2):208–24.
 191. Pine SR, Mechanic LE, Enewold L, Chaturvedi AK, Katki HA, Zheng YL, et al. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, c-reactive protein, and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(14):1112–22.
 192. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1988–95.
 193. Koguchi Y, Hoen HM, Bambina SA, Rynning MD, Fuerstenberg RK, Curti BD, et al. Serum Immunoregulatory Proteins as Predictors of Overall Survival of Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Cancer Res* [Internet]. 2015 Dec 1;75(23):5084–92.
 194. Wilgenhof S, Four S Du, Vandenbroucke F, Everaert H, Salmon I, Liénard D, et al. Single-center experience with ipilimumab in an expanded access program for patients with pretreated advanced melanoma. *J Immunother.* 2013;36(3):215–22.
 195. Shrotriya S, Walsh D, Bennani-Baiti N, Thomas S, Lorton C. C-Reactive Protein Is an Important Biomarker for Prognosis Tumor Recurrence and Treatment Response in Adult Solid Tumors: A Systematic Review. Zhang L, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 30;10(12):e0143080.
 196. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Lyberis P, Bruna MC, Macrì L, et al. Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Neoplasms. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2009;87(2):365–72.
 197. Eriksen AC, Sørensen FB, Lindebjerg J, Hager H, dePont Christensen R, Kjær-Frifeldt S, et al. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating lymphocytes in Stage II Colon Cancer. A Nationwide Population-Based Study. *Transl Oncol* [Internet]. 2018;11(4):979–87.
 198. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. 2011;(90404):1–16.
 199. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* [Internet]. 2014;515(7528):568–71.

200. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014;2189–99.
201. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* (80-) [Internet]. 2015 Oct 9;350(6257):207–11.
202. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non – small cell lung cancer. 2016;348(6230):124–9.
203. Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, Kuo FC, Shivdasani P, Frieden A, et al. Frameshift events predict anti–PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight* [Internet]. 2018 Feb 22;3(4).
204. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti–PD-1 Antibody in Cancer. *New. 2012;339–54.*
205. 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.
206. Miao L, Lu Y, Xu Y, Zhang G, Huang Z, Gong L, et al. PD-L1 and c-MET expression and survival in patients with small cell lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Aug 15;8(33):53978–88.
207. Takada K, Toyokawa G, Okamoto T, Akamine T, Takamori S, Katsura M, et al. An Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Small Cell Lung Cancer Using Different Antibodies and Criteria. *Anticancer Res* [Internet]. 2016 Jul;36(7):3409–12.
208. Yu H, Batenchuk C, Badzio A, Boyle TA, Czapiewski P, Chan DC, et al. PD-L1 Expression by Two Complementary Diagnostic Assays and mRNA In Situ Hybridization in Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017 Jan;12(1):110–20.
209. Yasuda Y, Ozasa H, Kim YH. PD-L1 Expression in Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2018;13(3):e40–1.
210. Kulangara K, Hanks DA, Waldroup S, Peltz L, Shah S, Roach C, et al. Development of the combined positive score (CPS) for the evaluation of PD-L1 in solid tumors with the immunohistochemistry assay PD-L1 IHC 22C3 pharmDx. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 May 20;35(15_suppl):e14589–e14589.
211. Jacquilot N, Roberti MP, Enot DP, Rusakiewicz S, Ternès N, Jegou S, et al. Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. *Nat Commun.* 2017;8(1).
212. Sugimoto H, Oda SI, Otsuki T, Hino T, Yoshida T, Shiro Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2611–6.
213. Mbongue J, Nicholas D, Torrez T, Kim N-S, Firek A, Langridge W. The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines* [Internet]. 2015 Sep 10;3(3):703–29.
214. Ji R-R, 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* [Internet]. 2012 Jul 7;61(7):1019–31.
215. Buder-Bakhaya K, Hassel JC. Biomarkers for clinical benefit of immune checkpoint inhibitor treatment-A review from the melanoma perspective and beyond. *Front*

- Immunol. 2018;9(JUN).
216. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* [Internet]. 2015 Nov 27;350(6264):1079–84.
 217. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol* [Internet]. 2017 Jun 1;28(6):1368–79.
 218. Attia P, Phan GQ, Maker A V., Robinson MR, Quezado MM, Yang JC, et al. Autoimmunity Correlates With Tumor Regression in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005 Sep 1;23(25):6043–53.
 219. Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the Brake on the Immune System: Ipilimumab in Melanoma and Other Tumors. *Cancer Biother Radiopharm* [Internet]. 2010 Dec;25(6):601–13.
 220. Downey SG, Klapper JA, Smith FO, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, et al. Prognostic Factors Related to Clinical Response in Patients with Metastatic Melanoma Treated by CTL-Associated Antigen-4 Blockade. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Nov 15;13(22):6681–8.
 221. Weber J. Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2009 May 6;58(5):823–30.
 222. Ascierto PA, Simeone E, Sileni V, Pigozzo J, Maio M, Altomonte M, et al. Clinical experience with ipilimumab 3 mg/kg: real-world efficacy and safety data from an expanded access programme cohort. *J Transl Med* [Internet]. 2014 May 7;12(1):116.
 223. Callahan MK, Yang A, Tandon S, Xu Y, Subudhi SK, Roman RA, et al. Evaluation of serum IL-17 levels during ipilimumab therapy: Correlation with colitis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 May 20;29(15_suppl):2505–2505.
 224. Shahabi V, Berman D, Chasalow SD, Wang L, Tsuchihashi Z, Hu B, et al. Gene expression profiling of whole blood in ipilimumab-treated patients for identification of potential biomarkers of immune-related gastrointestinal adverse events. *J Transl Med* [Internet]. 2013 Mar 22;11(1):75.
 225. Travis WD. Pathology and Diagnosis of Neuroendocrine Tumors: Lung Neuroendocrine. *Thorac Surg Clin*. 2014;24(3):257–66.
 226. Muntasell A, Servitja S, Cabo M, Bermejo B, Pérez-Buira S, Rojo F, et al. High Numbers of Circulating CD57 + NK Cells Associate with Resistance to HER2-Specific Therapeutic Antibodies in HER2 + Primary Breast Cancer . *Cancer Immunol Res*. 2019;7(8):1280–92.
 227. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, Berraondo P, López-Díaz de Cerio A, Cabo M, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2017 Apr;45:73–81.
 228. Du Q, Yu R, Wang H, Yan D, Yuan Q, Ma Y, et al. Significance of tumor-associated autoantibodies in the early diagnosis of lung cancer. *Clin Respir J* [Internet]. 2018 Jun;12(6):2020–8.
 229. Fukunaga H, Engel AG, Lang B, Newsom-Davis J, Vincent A. Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with IgG from man to mouse depletes the presynaptic membrane active zones. *Pnas*. 1983;80(24):7636–40.
 230. Tomimitsu H, Arimura K, Nagado T, Watanabe O, Otsuka R, Kurono A, et al. Mechanism of action of voltage-gated K⁺ channel antibodies in acquired neuromyotonia. *Ann Neurol* [Internet]. 2004 Sep;56(3):440–4.

231. Nagado T, Arimura K, Sonoda Y, Kurono A, Horikiri Y, Kameyama A, et al. Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyperexcitability. *Brain* [Internet]. 1999 Nov;122(11):2057–66.
232. Sinha S, Newsom-Davis J, Mills K, Byrne N, Lang B, Vincent A. Autoimmune aetiology for acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). *Lancet* (London, England) [Internet]. 1991 Jul 13;338(8759):75–7.
233. Kai W. Wucherpfennig. Autoimmunity in the Central Nervous System: Mechanisms of Antigen Presentation and Recognition. Vol. 72, *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994. p. 293–306.
234. Albert ML, Darnell JC, Bender a, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med*. 1998;4(11):1321–4.
235. Pignolet BS, Gebauer CM, Liblau RS. Immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes associated with anti-Hu antibodies: A beneficial antitumor immune response going awry. *Oncoimmunology* [Internet]. 2013;2(12):e27384.
236. Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* [Internet]. 1990 May;27(5):544–52.
237. Graus F, Dalmau J, Reñé R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, et al. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol*. 1997;15(8):2866–72.
238. Hasadsri L, Lee J, Wang BH, Yekkirala L, Wang M. Anti-yo associated paraneoplastic cerebellar degeneration in a man with large cell cancer of the lung. *Case Rep Neurol Med* [Internet]. 2013;2013:725936.
239. Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem*. 2011;57(2):168–75.
240. Gozzard P, Chapman C, Vincent A, Lang B, Maddison P. Novel Humoral Prognostic Markers in Small- Cell Lung Carcinoma : A Prospective Study. 2015;430:1–14.
241. Berger B, Bischler P, Dersch R, Hottenrott T, Rauer S, Stich O. “Non-classical” paraneoplastic neurological syndromes associated with well-characterized antineuronal antibodies as compared to “classical” syndromes - More frequent than expected. *J Neurol Sci* [Internet]. 2015;352(1–2):58–61.
242. Verschuuren JJ, Perquin M, ten Velde G, De Baets M, Vriesman PB, Twijnstra A. Anti-Hu antibody titre and brain metastases before and after treatment for small cell lung cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 1999 Sep;67(3):353–7.
243. Atakan S, Bayiz H, Sak S, Poyraz A, Vural B, Yildirim AS, et al. Autologous anti-SOX2 antibody responses reflect intensity but not frequency of antigen expression in small cell lung cancer. *BMC Clin Pathol*. 2014;14(1):24.
244. Tanaka M, Maruyama Y, Sugie M, Motizuki H, Kamakura K, Tanaka K. Cytotoxic T cell activity against peptides of Hu protein in anti-Hu syndrome. *J Neurol Sci*. 2002;201(1–2):9–12.
245. Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, Whalen RG, Posner JB, Dalmau J. DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice. *Clin Cancer Res*. 1998;4(11):2819–24.
246. DeLuca I, Blachère NE, Santomasso B, Darnell RB. Tolerance to the neuron-specific paraneoplastic HuD antigen. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jun 3;4(6):e5739.
247. Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 1997

- Oct;9(5):723–9.
248. Nakajima M, Uchibori A, Ogawa Y, Miyazaki T, Ichikawa Y, Kaneko K, et al. CV2/CRMP5-antibody-related Paraneoplastic Optic Neuropathy Associated with Small-cell Lung Cancer. *Intern Med* [Internet]. 2018 Jun 1;57(11):1645–9.
 249. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science* [Internet]. 2016 Mar 25;351(6280):1463–9.
 250. Wolf Y, Bartok O, Patkar S, Eli GB, Cohen S, Litchfield K, et al. UVB-Induced Tumor Heterogeneity Diminishes Immune Response in Melanoma. *Cell*. 2019;1–17.
 251. Morita M, Fukuhara T, Takahashi H, Maemondo M. Small cell lung cancer and progressive retinopathy. *BMJ Case Rep*. 2014;2014:2–5.
 252. Hiasa Y, Kunishige M, Mitsui T, Kondo S, Kuriwaka R, Shigekiyo S, et al. Complicated paraneoplastic neurological syndromes: A report of two patients with small cell or non-small cell lung cancer. *Clin Neurol Neurosurg*. 2003;106(1):47–9.
 253. Shams'ili S, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, Hooijkaas H, van der Holt B, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* [Internet]. 2003 Jun;126(Pt 6):1409–18.
 254. Greenlee JE, Dalmau J, Lyons T, Clawson S, Smith RH, Pirch HR. Association of anti-Yo (type I) antibody with paraneoplastic cerebellar degeneration in the setting of transitional cell carcinoma of the bladder: detection of Yo antigen in tumor tissue and fall in antibody titers following tumor removal. *Ann Neurol* [Internet]. 1999 Jun;45(6):805–9.
 255. Selby KJ, Warner J, Klempner S, Konstantinopoulos PA, Hecht JL. Anti-Yo antibody associated with occult fallopian tube carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2011 Nov;30(6):536–8.
 256. Nagashima T, Mizutani Y, Kawahara H, Maguchi S, Terayama Y, Shinohara T, et al. Anti-Hu paraneoplastic syndrome presenting with brainstem-cerebellar symptoms and Lambert–Eaton myasthenic syndrome. *Neuropathology*. 2003;23(April):230–8.
 257. Hanna GJ, Sridharan V, Margalit DN, La Follette SK, Chau NG., Rabinowits G, et al. Salivary and serum HPV antibody levels before and after definitive treatment in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark* [Internet]. 2017;19(2):129–36.
 258. Romi F. Thymoma in Myasthenia Gravis: From Diagnosis to Treatment. *Autoimmune Dis* [Internet]. 2011;2011:1–5.
 259. Wood O, Woo J, Seumois G, Savelyeva N, McCann KJ, Singh D, et al. Gene expression analysis of TIL rich HPV-driven head and neck tumors reveals a distinct B-cell signature when compared to HPV independent tumors. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Aug 30;7(35):56781–97.
 260. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* [Internet]. 2010 Feb 25;29(8):1093–102.
 261. Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Cremer I, Fisson S, Damotte D, et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2011;344(May 2010):1–24.
 262. Poschke I, Faryna M, Bergmann F, Flossdorf M, Lauenstein C, Hermes J, et al. Identification of a tumor-reactive T-cell repertoire in the immune infiltrate of patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016;5(12):e1240859.

263. Eerola AK, Soini Y, Pääkkö P. A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2000 May;6(5):1875–81.
264. Lee S, Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2011;3(4):3856–93.
265. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76(2):241–51.
266. Huang M, Wang J, Lee P, Stiantila S, Mao JT, Meissner H, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Lung Cancer*. 1996;14(1):154.
267. Hong CC, Yao S, McCann SE, Dolnick RY, Wallace PK, Gong Z, et al. Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):477–88.
268. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1, and Type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(4):532–62.
269. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):218–28.
270. Islas-vazquez L, Prado-garcia H, Aguilar-cazares D, Meneses-flores M, Galicia-velasco M, Romero-garcia S, et al. Treg Cells is Increased and Overexpresses LAP TGF-Beta in Lung Adenocarcinoma Patients. 2015;2015.
271. Song X-Y, Zhou S-J, Xiao N, Li Y-S, Zhen D-Z, Su C-Y, et al. Research on the relationship between serum levels of inflammatory cytokines and non-small cell lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2013;14(8):4765–8.
272. Pan YW, Zhou ZG, Wang M, Dong JQ, Du KP, Li S, et al. Combination of IL-6, IL-10, and MCP-1 with traditional serum tumor markers in lung cancer diagnosis and prognosis. *Genet Mol Res* [Internet]. 2016;15(4):2–10.
273. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, Marrangoni AM, Velikokhatnaya L, Winans MT, et al. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Apr 15;13(8):2422–8.
274. Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, Suemitsu R, Yoshino I, Sugio K. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery*. 2002;131(1):S236–41.
275. Pusztai L, Mendoza TR, Reuben JM, Martinez MM, Willey JS, Lara J, et al. Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy. *Cytokine* [Internet]. 2004 Feb 7;25(3):94–102.
276. Dimberg J, Ström K, Löfgren S, Zar N, Lindh M, Matussek A. DNA promoter methylation status and protein expression of interleukin-8 in human colorectal adenocarcinomas. *Int J Colorectal Dis* [Internet]. 2012 Jun 24;27(6):709–14.
277. Mroczko B, Groblewska M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Kedra B, Konopko M, Szmitekowski M. The diagnostic value of G-CSF measurement in the sera of colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2006 Sep;371(1–2):143–7.
278. Johdi NA, Mazlan L, Sagap I, Jamal R. Profiling of cytokines, chemokines and other soluble proteins as a potential biomarker in colorectal cancer and polyps. *Cytokine* [Internet]. 2017 Nov;99:35–42.
279. Matanić D, Beg-Zec Z, Stojanović D, Matakorić N, Flego V, Milevoj-Ribić F. Cytokines in patients with lung cancer. *Scand J Immunol*. 2003;57(2):173–8.
280. Fischer JR, Schindel M, Stein N, Lahm H, Gallati H, Krammer PH, et al. Selective

- suppression of cytokine secretion in patients with small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1995 Nov;6(9):921–6.
281. Wójcik E, Jakubowicz J, Skotnicki P, Sas-Korczyńska B, Kulpa JK. IL-6 and VEGF in small cell lung cancer patients. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1773–8.
282. Rincon M. Interleukin-6: From an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol [Internet]*. 2012;33(11):571–7.
283. Wehner R, Bitterlich A, Meyer N, Kloß A, Schäkel K, Bachmann M, et al. Impact of chemotherapeutic agents on the immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc⁺ (slan) dendritic cells. *Int J Cancer*. 2013;132(6):1351–9.
284. Kitajima M, Ziegler SF. Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity. *J Immunol*. 2013;191(10):4903–7.
285. Dijkgraaf EM, Heusinkveld M, Tummers B, Vogelpoel LTC, Goedemans R, Jha V, et al. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting m2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2013;73(8):2480–92.
286. Yano H, Thakur A, Tomaszewski EN, Choi M, Deol A, Lum LG. Ipilimumab augments antitumor activity of bispecific antibody-armed T cells. *J Transl Med*. 2014;12(1):1–11.
287. Young RJ, Tin AW, Brown NJ, Jitlal M, Lee SM, Woll PJ. Analysis of circulating angiogenic biomarkers from patients in two phase III trials in lung cancer of chemotherapy alone or chemotherapy and thalidomide. *Br J Cancer*. 2012;106(6):1153–9.
288. Young RJ, Tin AW, Brown NJ, Jitlal M, Lee SM, Woll PJ. Analysis of circulating angiogenic biomarkers from patients in two phase III trials in lung cancer of chemotherapy alone or chemotherapy and thalidomide. *Br J Cancer*. 2012;106(6):1153–9.
289. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 1987 Dec;149(2):755–61.
290. Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2008 Nov 1;14(21):6735–41.
291. Zarogoulidis P, Katsikogianni F, Tsiouda T, Sakkas A, Katsikogiannis N, Zarogoulidis K. Interleukin-8 and Interleukin-17 for Cancer. *Cancer Invest [Internet]*. 2014 May 28;32(5):197–205.
292. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang X-D, et al. Fully Humanized Neutralizing Antibodies to Interleukin-8 (ABX-IL8) Inhibit Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis of Human Melanoma. *Am J Pathol [Internet]*. 2002 Jul;161(1):125–34.
293. Bilusic M, Heery CR, Collins JM, Donahue RN, Palena C, Madan RA, et al. Phase I trial of HuMax-IL8 (BMS-986253), an anti-IL-8 monoclonal antibody, in patients with metastatic or unresectable solid tumors. *J Immunother cancer [Internet]*. 2019 Sep 5;7(1):240.
294. Dembic Z. Cytokines of the Immune System. *Cytokines Immune Syst*. 2015;143–239.
295. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*. 1981;291(5813):335–8.
296. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*. 1996;183(6):2533–40.
297. Rosenberg SA. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J Immunol*

- [Internet]. 2014 Jun 15;192(12):5451–8.
298. Clamon G, Herndon J, Perry MC, Ozer H, Kreisman H, Maher T, et al. Interleukin-2 Activity in Patients With Extensive Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Trial of Cancer and Leukemia Group B. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1993 Feb 17;85(4):316–20.
 299. Clamon G, Herndon J, Akerley W, Green M. Subcutaneous interleukin-2 as initial therapy for patients with extensive small cell lung cancer: a phase II trial of Cancer and Leukemia Group B. *Lung Cancer* [Internet]. 1998 Jan;19(1):25–9.
 300. Ding X, Zhang J, Liu D, Xu W, Lu D, Zhang L-P, et al. Serum expression level of IL-6 at the diagnosis time contributes to the long-term prognosis of SCLC patients. *J Cancer* [Internet]. 2018;9(5):792–6.
 301. Chang CH, Hsiao CF, Yeh YM, Chang GC, Tsai YH, Chen YM, et al. Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *Int J Cancer*. 2013;132(9):1977–85.
 302. Kita H, Shiraishi Y, Watanabe K, Suda K, Ohtsuka K, Koshiishi Y, et al. Does postoperative serum interleukin-6 influence early recurrence after curative pulmonary resection of lung cancer? *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;17(5):454–60.
 303. Ryan BM, Pine SR, Chaturvedi AK, Caporaso N, Harris CC. A Combined Prognostic Serum Interleukin-8 and Interleukin-6 Classifier for Stage I Lung Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2014;9(10):1494–503.
 304. Silva EM, Mariano VS, Aguiar Pastrez PR, Pinto MC, Castro AG, Syrjanen KJ, et al. High systemic IL-6 is associated with worse prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2017;12(7):1–12.
 305. Damuzzo V, Solito S, Pinton L, Carrozzo E, Valpione S, Pigozzo J, et al. Clinical implication of tumor-associated and immunological parameters in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1249559.
 306. Bjoern J, Juul Nitschke N, Zeeberg Iversen T, Schmidt H, Fode K, Svane IM. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):e1100788.
 307. Ham I-H, Oh HJ, Jin H, Bae CA, Jeon S-M, Choi KS, et al. Targeting interleukin-6 as a strategy to overcome stroma-induced resistance to chemotherapy in gastric cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 Dec 30;18(1):68.
 308. Martínez-Reza I, Díaz L, García-Becerra R. Preclinical and clinical aspects of TNF- α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):1–8.
 309. Rahal OM, Wolfe AR, Mandal PK, Larson R, Tin S, Jimenez C, et al. Blocking Interleukin (IL)4- and IL13-Mediated Phosphorylation of STAT6 (Tyr641) Decreases M2 Polarization of Macrophages and Protects Against Macrophage-Mediated Radioresistance of Inflammatory Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2018 Mar 15;100(4):1034–43.
 310. Linch SN, Redmond WL. Combined OX40 ligation plus CTLA-4 blockade: More than the sum of its parts. *Oncoimmunology*. 2014;3(3):11–3.
 311. Redmond WL, Linch SN, Kasiewicz MJ. Combined Targeting of Costimulatory (OX40) and Coinhibitory (CTLA-4) Pathways Elicits Potent Effector T Cells Capable of Driving Robust Antitumor Immunity. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2):142–53.
 312. Li Z, Chen L, Qin Z. Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell Mol Immunol*. 2009;6(6):415–22.
 313. Kim WY, Jeon YK, Kim TM, Kim JE, Kim YA, Lee SH, et al. Increased quantity of

- tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1688–96.
314. Kwek SS, Lewis J, Zhang L, Weinberg V, Greaney SK, Harzstark AL, et al. Preexisting Levels of CD4 T Cells Expressing PD-1 Are Related to Overall Survival in Prostate Cancer Patients Treated with Ipilimumab. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(9):1008–16.
 315. Dong C, Juedes AE, Temann U-A, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* [Internet]. 2001 Jan 4;409(6816):97–101.
 316. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* [Internet]. 1999 Dec 16;402(6763):827–32.
 317. Kohyama M, Sugahara D, Sugiyama S, Yagita H, Okumura K, Hozumi N. Inducible costimulator-dependent IL-10 production by regulatory T cells specific for self-antigen. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Mar 23;101(12):4192–7.
 318. Ito T, Yang M, Wang Y-H, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Jan 22;204(1):105–15.
 319. Di Yu D, Tan AH-M, Hu X, Athanasopoulos V, Simpson N, Silva DG, et al. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature* [Internet]. 2007 Nov 8;450(7167):299–303.
 320. Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam K-P, Coyle AJ, et al. ICOS Controls the Pool Size of Effector-Memory and Regulatory T Cells. *J Immunol* [Internet]. 2008 Jan 15;180(2):774–82.
 321. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Jan 7;331(6013):44–9.
 322. Malmberg K-J, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren H-G. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol* [Internet]. 2017 Jun;31:20–9.
 323. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* [Internet]. 2010 Mar 18;115(11):2167–76.
 324. Abo T, Miller CA, Balch CM. Characterization of human granular lymphocyte subpopulations expressing HNK-1 (Leu-7) and Leu-11 antigens in the blood and lymphoid tissues from fetuses, neonates and adults. *Eur J Immunol* [Internet]. 1984 Jul;14(7):616–23.
 325. Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, et al. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* [Internet]. 2010 Apr 29;9(4):527–35.
 326. Hu G, Wang S. Prognostic role of tumor-infiltrating CD57-positive lymphocytes in solid tumors: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(8):8111–9.
 327. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med* [Internet]. 2018 Sep;7(9):4509–16.
 328. Schindler K, Harmankaya K, Kuk D, Mangana J, Michielin O, Hoeller C, et al. Correlation of absolute and relative eosinophil counts with immune-related adverse events in melanoma patients treated with ipilimumab. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 May 20;32(15_suppl):9096–9096.

329. Maerten P, Geboes K, Hertogh G De, Shen C, Cadot P, Bullens DM., et al. Functional expression of 4-1BB (CD137) in the inflammatory tissue in Crohn's disease. *Clin Immunol* [Internet]. 2004 Sep;112(3):239–46.
330. Maerten P, Kwon BS, Shen C, De Hertogh G, Cadot P, Bullens DMA, et al. Involvement of 4-1BB (CD137)-4-1BB ligand interaction in the modulation of CD4+ T cell-mediated inflammatory colitis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2006 Feb;143(2):228–36.

