



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES DEL NÚMERO DE COPIAS SOMÁTICAS
COMO BIOMARCADOR EN TEJIDO Y BIOPSIA LÍQUIDA Y SU CORRELACIÓN
CON LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE PROGRESIÓN A INHIBIDORES DE
PUNTO DE CONTROL INMUNOLÓGICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE
PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO.**

Tesis para optar al grado doctoral

Presentada por

Nuria Pardo Aranda

Directores:

Enriqueta Felip Font

Tutores:

Jordi Giralt Lopez de Sagredo

Barcelona, 2022

“El éxito es la habilidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo” Winston
Churchill

A mi abuela Mari

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Tabernero por permitirme formar parte de este gran proyecto que es VHIO.

A la Dra. Felip, por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo y realizar la tesis a la vez que ser mi directora guiándome en estos difíciles meses.

A nuestra piña de equipo; “Foxy in the sky,” “ASCO girls” que son el esqueleto para el trabajo diario y sin los que no sería posible seguir en pie.

A Ramon, Caterina y Joan, el equipo del laboratorio, que gracias ha ellos se ha podido llevar a cabo todo este trabajo, siendo el engranaje principal de este proyecto estando al pie del cañón en estos meses difíciles.

A Javier, por ser mi confidente, mi compañero de batallas, por estar en los malos y en los buenos momentos sin perder la fe en mi.

A mis padres por haber creído en mi, haberme enseñado los valores que tengo y porque gracias a ellos estoy donde estoy.

A mis hermanos, que me han acompañado en este viaje de mi vida aceptando mis decisiones, estando ahí en todo momento.

A mis hijas, que son mi motor de cada día.

A mi abuela Mari, descanse en paz, que fue mi luz todo el tiempo que estuvo a mi lado.

Al resto de mi familia por ser como son.

A mis “Gossip Girls”, que siempre creyeron en mi y están ahí para cualquier ocasión.

A mis compañeros de residencia que se convirtieron en amigos; Fredzzia, Maria, Laia...

A todos los pacientes con cáncer de pulmón, sin los que no se hubiera podido llevar a cabo este proyecto.

ABREVIATURAS

NSCLC: del inglés *non small cell lung cancer*

EGFR: del inglés *epidermal growth factor receptor*

ERBB-1: del inglés *epidermal growth factor receptor*

ALK: del inglés *anaplastic lymphoma kinase*

cMET : del inglés *mesenchymal-epithelial transition*

NTRK: del inglés *neurotrophin tyrosine receptor kinase*

HER2: del inglés *epidermal growth factor receptor 2*

RB: proteína del retinoblastoma

MAPK: del inglés *mitogen-activated protein Kinase*

JAK/STAT: del inglés *janus-associated kinase/signal transducers and activators of transcription*

PI3K: del inglés *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PI3KCA: del inglés *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*

AKT: del inglés *serine/threonine kinase*

TP53: del inglés *tumor protein p53*

PTEN: del inglés *phosphatase and tensin homolog*

FGFR1: del inglés *fibroblast growth factor receptor 1*

FGFR2: del inglés *fibroblast growth factor receptor 2*

RET: del inglés *rearranged during transfection*

NRAS: del inglés *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

KRAS: del inglés *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue*

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*

NGS: del inglés *next generation sequencing*

WGS: del inglés *whole-genome sequencing*

sWGS: del inglés *shallow whole-genome sequencing*

WES: del inglés *whole-exome sequencing*

PD-L1: del inglés *programmed death ligand 1*

PD-1: del inglés *programmed cell death 1*

PD-L2: del inglés *programmed death ligand 2*

Anti-PD-L1: del inglés *anti - programmed cell death ligand*

Anti-PD-1: del inglés *anti - programmed cell death receptor*

Anti-CTL-4: del inglés *cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
TKIs: del inglés *tyrosine kinase inhibitor*
TMB: del inglés *tumor mutational burden*
ICIs: del inglés *immuno check point inhibitors*
CNV: del inglés *copy number variation*
SNV: del inglés *single nucleotide variant*
CNA: del inglés *copy number alteration*
TILs: del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*
DNA: del inglés *deoxyribonucleic acid*
RNA: del inglés *ribonucleic acid*
mRNA: del inglés *ribonucleic acid messenger*
cfDNA: del inglés *cell free DNA*
ctDNA: del inglés *circulating tumor DNA*
ctRNA: del inglés *cell tumor RNA*
CTCs: del inglés *circulating tumor cells*
bTMB: del inglés *blood tumor mutation burden*
SCNA: del inglés *somatic copy number aberrations*
SCNAs: del inglés *somatic copy number aberration burden*
FFPE: del inglés *formalin-fixed, paraffin-embedded*
HR: del inglés *hazard ratio*
CEA: del inglés *carcinoembryonic antigen*
ULP-WGS del inglés: *ultra-low pass whole genome sequencing*
WHO: del inglés *organización mundial de la salud*
FDA: del inglés: *Food and Drug Administration*
EMA: del inglés: *European Medicine Agency*
TTF-1: del inglés *thyroid transcription factor-1*
NOS: NSCLC no especificado de otra manera
VEGFR: del inglés *vascular endothelial growth factor receptor*
PDGFR: del inglés *Platelet-derived growth factor receptor*
FGFR: del inglés *fibroblast growth factor receptor*
ASCO: del inglés *American Society of Clinical Oncology*
ESMO: del inglés *European Society for Medical Oncology*
mut/MbP: *mutaciones por megabase*
SG: *supervivencia global*

SLP: supervivencia libre de progresión

IHC: inmunohistoquímica

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías de señalización del EGFR.

Figura 2. Representación esquemática del Pan Cancer Immune Profiling Panel.

Figura 3. La biopsia de tejido (a) y la biopsia líquida (b) pueden captar la heterogeneidad espacial y temporal.

Figura 4. Análisis en plasma del perfil mutacional a través de NGS.

Figura 5. Análisis de las muestras de la cohorte 1.

Figura 6. Análisis de las muestras de la cohorte 2.

Figura 7. Representación histológica de la cohorte de los pacientes.

Figura 8. Clustering de todos los pacientes de la cohorte basado en el perfil de SCNAs de fragmentos de 0.5Mb.

Figura 9. Curva de supervivencia de Kaplan Meier, en los 6 clusteres identificados.

Figura 10. Asociación entre SLP y SCNAs *burden* según FGA o suma de número de alteraciones.

Figura 11. Asociación entre SLP y FGA según sea clonal o subclonal.

Figura 12. Asociación entre SLP y FGA según presenten amplificación o delección.

Figura 13. Asociación entre SLP y FGA según los tres tipos de SCNAs (clasificación por tamaño de la alteración).

Figura 14. FGA de acuerdo al hábito tabáquico.

Figura 15. FGA^{a+c} según el lugar de obtención de la biopsia.

Figura 16. Análisis multivariado que muestra la asociación entre FGA^{a+c} y la SLP en pacientes tratados con inhibidores de punto de control inmunológico en SLP sin ajustar por el sitio de obtención de la biopsia.

Figura 17. Análisis multivariado que muestra la asociación entre FGA^{a+c} la SLP en pacientes tratados con inhibidores de punto de control inmunológico en función del sitio de obtención de la biopsia.

Figura 18. Asociación entre SLP y la alteración en cada segmento del genoma.

Figura 19. Agrupación jerárquica de los pacientes según la abundancia de las diferentes células inmunes.

Figura 20. Curva de supervivencia de Kaplan Meier según la SLP en base a los tres clústeres identificados.

Figura 21. Curva de supervivencia de Kaplan Meier según la cantidad de células B divididas en terciles (alto, medio y bajo).

Figura 22. Valor de p en función de la infiltración de los distintos tipos de células infiltradas.

Figura 23. Niveles de las distintas células inmunes según el lugar de obtención de la biopsia.

Figura 24. Comparación de los niveles de las células B, mastocitos, células T y células citotóxicas entre el pulmón y el sitio de metástasis.

Figura 25. Correlación entre los diferentes tipos de células inmune y FGA^{a+c} independiente del sexo.

Figura 26. Valor p obtenido de la correlación de Spearman entre los 14 tipos de células inmunes y el FGA^{a+c}.

Figura 27. Valor p obtenido de la correlación de Spearman entre las células inmunes y FGA^{a+c} cuando lo dividimos entre los hombres y las mujeres.

Figura 28. Distribución de la fracción del ctDNA de los pacientes en la muestra pretratamiento.

Figura 29. Curva de SLP de Kaplan Meier comparando pacientes con la detección y la no detección de ctDNA.

Figura 30. Curva de SLP de Kaplan Meier comparando los pacientes con alto y bajo SCNAs con alto y bajo SCNAs en muestra plasmática basal

Figura 31. Curva de SLP de Kaplan Meier para los pacientes con detección y aquellos sin detección de ctDNA en la muestra plasmática obtenida a los 80 días del tratamiento con ICIs..

Figura 32. Representación gráfica del ctDNA de las muestras.

Figura 33. Número de SCNA por tipo de tumor, dividido en amplificaciones o deleciones.

Figura 34. Representación de los diferentes tipos de población celular en 22 pacientes.

Figura 35. Diferencias del sistema inmunológico según el sexo.

Figura 36. CNA para ULP-WGS de cfDNA x 0.1. Comparación del número de ratio de copias entre ULP-WGS de cfDNA a una profundidad de >10x y WGS de la misma muestra de cfDNA.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los pacientes cohorte 1

Tabla 2. Características de los pacientes cohorte 2

ÍNDICE

RESUMEN	16
SUMMARY	18
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Cáncer de pulmón no célula pequeña (NSCLC) avanzado	19
1.1.1 Epidemiología y factores de riesgo	19
1.1.2. Genómica del NSCLC	19
1.1.3. Diagnóstico.....	22
a) Diagnóstico histológico	22
b) Diagnóstico molecular.....	23
1.1.4. Tratamiento.....	23
a) Estadios avanzados con alteraciones diana	23
b) Estadios avanzados sin alteraciones diana.....	25
1.2. Inmunoterapia en NSCLC	27
1.2.1. Mecanismos de acción de los inhibidores de puntos de control inmunológico	28
1.2.2. Biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en NSCLC.....	30
1.3. Marcadores de respuesta a la inmunoterapia en biopsia líquida en NSCLC.....	38
1.3.1. Blood tumor mutation <i>burden</i> (bTMB).....	41
1.3.2. SCNA y SCNAs <i>burden</i>	42
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	44
3. OBJETIVOS	45
3.1. Principal.....	45
3.2. Secundarios.....	45
4. MÉTODOS	46
4.1. Métodos cohorte 1	46
4.1.1. Pacientes	46
4.1.2. sWGS en tejido.....	46
4.1.3. Análisis de SCNA.....	47
4.1.4. Análisis de la asociación entre SCNA en tejido y la SLP a ICIs.....	48

4.1.5. Análisis de la infiltración linfocitaria en tejido por NanoString©	48
4.2. Métodos cohorte 2	49
4.2.1. Pacientes	49
4.2.2. Extracción de sangre y obtención de plasma.....	50
4.2.3. Análisis de sWGS de cfDNA	50
5. RESULTADOS	52
5.1. Cohorte 1: Análisis del SCNAs burden en tejido en respuesta a ICIs.....	52
5.1.1. Características de los pacientes	52
5.1.2. Análisis del SCNA en tejido y su correlación como biomarcador predictivo. Alteraciones cromosómicas.....	54
5.1.3. SCNAs burden como biomarcador de SLP a la inmunoterapia	55
5.2. Cohorte 2: Análisis del SCNAs burden en biopsia líquida y SLP a ICIs.....	71
5.2.1. Características de los pacientes	71
5.2.2. Muestras pretratamiento	73
5.2.3. Muestras durante el tratamiento	74
6. DISCUSIÓN.....	76
7. CONCLUSIONES.....	86
8. LÍNEAS FUTURAS.....	87
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

RESUMEN

Los inhibidores de punto de control inmunológico como son los anti PD-L1 (*Programmed death ligand 1*) y anti PD-1 (*Programmed cell death*) han supuesto un cambio en el tratamiento del cáncer de pulmón no célula pequeña. Sin embargo, no todos los pacientes se benefician por igual del tratamiento, lo cual ha llevado a la búsqueda incesante de marcadores que ayuden a definir una mejor respuesta a dichos fármacos. En este sentido hemos analizado la carga de alteraciones del número de copias somáticas (SCNAs *burden*) como biomarcador de supervivencia libre de progresión en pacientes tratados con inhibidores del punto de control inmunológico en dos cohortes diferentes.

La primera cohorte se compone de 109 pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña avanzado tratados con fármacos inhibidores de punto de control inmunológico analizados de manera retrospectiva. Se determinan los SCNA a través de “*Shallow whole-genome sequencing*” y la expresión de RNA a través de *NanoString*® para el análisis de la infiltración inmune en la biopsia tumoral. Inicialmente se caracteriza el SCNAs *burden* de diferentes formas, siendo la fracción del genoma alterado que engloba brazos o cromosomas, la que mejor se asocia a respuesta. Así, detectamos que niveles altos de SCNAs *burden* se asocian negativamente a supervivencia libre de progresión de inmunoterapia. Por otro lado, observamos una correlación negativa entre SCNAs *burden* e infiltración inmune, concluyendo que SCNAs *burden* podría ser un marcador de respuesta con impacto en la supervivencia libre de progresión en pacientes tratados con inmunoterapia.

La segunda cohorte se trata de un análisis prospectivo de 45 pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña avanzado tratados con inhibidores de punto de control inmunológico. Se realiza el sWGS en plasma pretratamiento, a los 80 días del inicio del tratamiento y a la progresión radiológica. A partir del análisis del sWGS obtenemos la fracción de DNA tumoral circulante (ctDNA) y el SCNAs *burden*. Observamos que la presencia de ctDNA pretratamiento y alto SCNAs *burden* pretratamiento se asocia con peor supervivencia libre de progresión a inmunoterapia y la ausencia de ctDNA a los 80 días de tratamiento se asocia con supervivencia libre de progresión más larga en pacientes tratados con inhibidores de punto de control inmunológico.

Por tanto, observamos que los datos obtenidos en el análisis de SCNAs *burden* en biopsia de tejido se correlacionan con los datos obtenidos del SCNAs *burden* en biopsia líquida: los pacientes con menor SCNAs *burden* presentan una mejor supervivencia libre de progresión a los tratamientos de inmunoterapia.

SUMMARY

Immune checkpoint inhibitors have become a major therapeutic advance in non small lung cancer advanced but not all the patients experience the same benefit. Nevertheless, not all the patients have the same benefit, being the reason for the search of new biomarkers for optimal patient selection. Here, we analyzed the somatic copy number alterations (SCNAs) burden in two cohorts. The first cohort consists of 109 patients with advanced non small cell lung cancer with tumor tissue biopsy treated with immune checkpoint inhibitors. We performed “Shallow whole-genome sequencing” to obtain the SCNAs profile and *NanoString*® to infer the immune infiltration. Initially SCNAs burden was analyzed in different ways being the fraction of the genome altered by arms or chromosomes, the one that showed the strongest association with immunotherapy. Thus, we observed that high SCNAs burden was negatively associated with response to immunotherapy. Importantly, we observed a negative correlation between SCNAs burden and tumor immune infiltration. We concluded that SCNAs burden is a good marker of response with an impact in progression free survival in patients treated with immune checkpoint inhibitors.

Our second cohort is a prospective analysis of 45 patients treated with immune checkpoint inhibitors. We performed “shallow whole-genome sequencing” on plasma samples obtained at baseline, at 80 days of treatment initiation and at progression of the disease. From shallow whole-genome sequencing we obtained the circulating tumor fraction (ctDNA) and the SCNAs burden. The baseline presence of ctDNA and high SCNAs burden was associated with worse response to immunotherapy and the absence of ctDNA after 80 days was associated with longer progression free survival.

We concluded that the analysis of SCNAs burden in tumor tissue match with the SCNAs burden in liquid biopsy: patients with low SCNAs burden presented better progression free survival.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de pulmón no célula pequeña (NSCLC) avanzado

1.1.1 Epidemiología y factores de riesgo

El tumor con mayor incidencia en Europa en 2020 fue el cáncer de mama, seguido del cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón y el cáncer de próstata. En las mujeres el de mayor incidencia fue el cáncer de mama, seguido del cáncer colorrectal, y después el cáncer de pulmón; en hombres el de mayor incidencia fue el cáncer de próstata seguido de cáncer de pulmón y luego colorrectal (1). En España, en 2020, el cáncer más prevalente en varones fue el cáncer de próstata, seguido del cáncer de vejiga, siendo el cáncer de pulmón el cuarto en prevalencia a 5 años; y en mujeres el cáncer de mama seguido del cáncer de colon, siendo el cáncer de pulmón octavo en prevalencia también a 5 años (2).

El cáncer de pulmón presenta una incidencia en aumento y su mortalidad fue la más alta a nivel mundial en 2020 (2). Al diferenciarlo por sexo, en los hombres el cáncer de pulmón fue la causa más frecuente de mortalidad por cáncer, mientras que en mujeres fueron el cáncer colorrectal y cáncer de mama seguido de cerca del cáncer de pulmón (2).

El principal factor de riesgo en el cáncer de pulmón es el consumo de tabaco, existiendo una relación directamente proporcional entre el riesgo de padecer cáncer de pulmón, el número de cigarrillos diarios y el número de años de adicción. Los fumadores pasivos también tienen un mayor riesgo relativo de desarrollar cáncer de pulmón (3–5). Otros de los posibles factores de riesgo asociados al cáncer de pulmón incluyen enfermedades previas como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la historia familiar de cáncer de pulmón, la presencia de otros tumores (6,7) y/o la exposición a agentes carcinógenos como el asbesto, arsénico o radón (8,9).

1.1.2. Genómica del NSCLC

Los compuestos carcinógenos (hidrocarburos policíclicos aromáticos) del humo del tabaco producen numerosas mutaciones siendo el cáncer de pulmón uno de los tumores con más mutaciones (4). Algunas de ellas pueden afectar a genes claves para el crecimiento y la proliferación celular como, por ejemplo, *TP53* (tumor protein p53). *TP53* es un gen supresor de tumores que regula la apoptosis y el ciclo celular. Mutaciones que afectan la función de este gen permiten la proliferación de las células anormales favoreciendo los procesos de tumorigénesis (10).

Se han identificado varias anomalías genéticas en algunos protooncogenes. Los más estudiados en el NSCLC son el *epidermal growth factor receptor* (*ERBB1*= *EGFR*), más prevalente en adenocarcinoma en nunca fumadores, y el human epidermal growth factor receptor 2 (*ERBB2*) (9).

Existen otros protooncogenes de la familia *RAS* (*rat sarcoma*): *HRAS* (*H-RAS proto-oncogene*), *NRAS* (*neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), siendo este último el más conocido (11,12). Las mutaciones en *KRAS* son las más frecuentes, encontrándose en aproximadamente el 35% de los adenocarcinomas de pulmón (11). Estas mutaciones de *KRAS* se relacionan con el tabaco, siendo las más frecuentes las transversiones G-T asociadas con hidrocarburos policíclicos y nitrosaminas.

La activación de las distintas vías de señalización como las vías de las MAP quinasas (*RAS-RAF-MAPK* ((*Mitogen-Activated Protein Kinase*)), la vía *PI3K* (*phosphoinositide 3- Kinase*) y la vía *JAK/STAT* (*Janus-associated kinase/signal transducers and activators of transcription*) inducen la regulación de la proliferación e invasión celular, la angiogénesis, y la inhibición de la apoptosis y de las metástasis (13).

Otros de los eventos moleculares descritos en el desarrollo del NSCLC son los cambios epigenéticos, la amplificación de *MET* (*mesenchymal-epithelial transition*) y la inestabilidad de microsatélites. Diferentes estudios moleculares han reportado modificaciones en las vías de señalización que contribuyen a la tumorigénesis, involucrando a las proteínas *EGFR*, *KRAS*, *cMET* y *AKT* (*Serine/threonine Kinase*) (14).

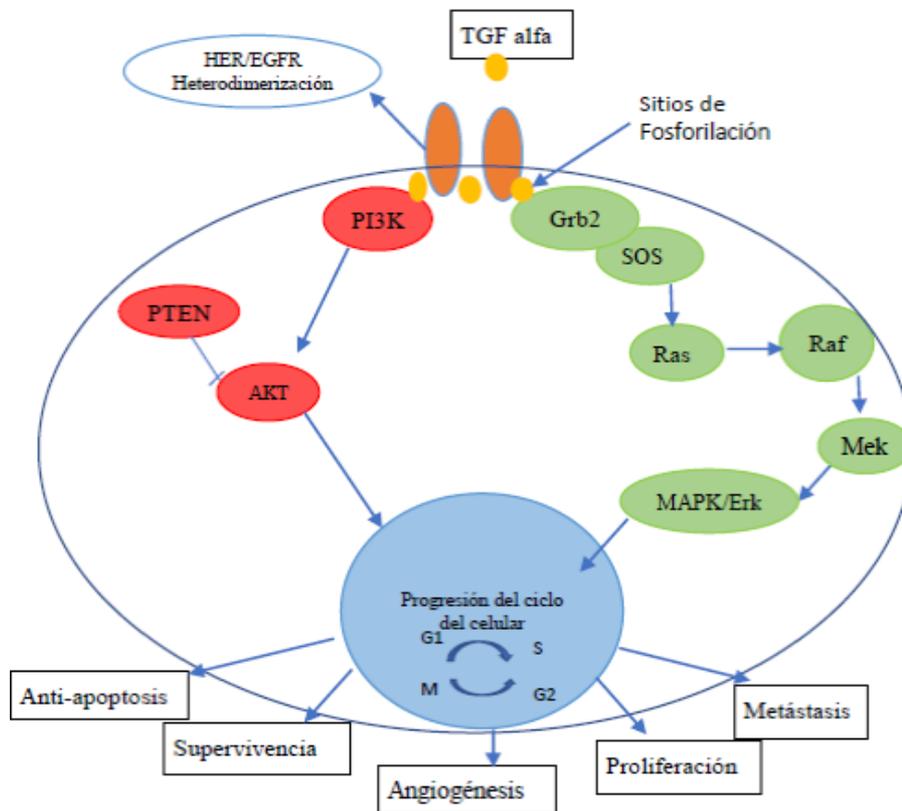


Figura 1. Vías de señalización del EGFR [Nota. Adaptado de “Genotipificación en cáncer de pulmón de células no pequeñas”. Por Campos-Parra AD. 2012. Revista gaceta mexicana oncología (13)].

En el carcinoma escamoso se han identificado algunas alteraciones moleculares que podrían tener relevancia para el tratamiento dirigido como son la amplificación de *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor*) (22% de los casos), *PI3K* (8%), mutaciones de *DDR2* (*discoidin domain receptor tyrosine kinase 2*) (1-4%) y mutaciones de *FGFR1* (10%) (15,16).

Como la mayoría de tumores sólidos, el cáncer de pulmón se caracteriza por presentar alteraciones cromosómicas, es decir, alteraciones somáticas en el número de copias (SCNA) de segmentos variables del genoma (16,17). Normalmente se suelen identificar 3 tipos de SCNA que representan distintos eventos biológicos: nivel cromosómico (aneuploidía), nivel del brazo cromosómico (a veces también recogido como aneuploidía) y nivel focal, que se define como una afectación <50% del brazo cromosómico pudiendo corresponder con una delección o una amplificación (17,18). En el cáncer de pulmón son frecuentes amplificaciones de genes como *ERBB2*, *EGFR*, *MYC*, *PI3KCA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*), *FGFR1/2*,

MET, *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) y deleciones en genes como *CDKN2A*, *RBI* (*proteína de retinoblastoma*) o *TP53* (19).

Las aneuploidías y SCNA se relacionan con el desarrollo de la tumorigénesis (20,21) y el número de mutaciones tiende a correlacionarse positivamente con los niveles de SCNA (22).

La proporción del genoma afectado por SCNA se conoce como la carga de SCNA (SCNAs burden). Se ha demostrado la existencia de una correlación entre la carga de SCNA y el grado de recurrencia y metástasis (23). Un estudio en cáncer de próstata evidenció que la carga de SCNAs puede ser considerado un marcador de recurrencia bioquímica y de metástasis (22).

1.1.3. Diagnóstico

La estadificación del cáncer de pulmón se realiza según el tamaño tumoral, la localización, la afectación ganglionar y la existencia o no de enfermedad a distancia (24). En aquellos estadios localizados con afectación ganglionar, la prueba de elección para completar el estudio es una ecobroncoscopia/broncoscopia (25). El diagnóstico patológico se realiza tras la obtención de material del tumor, preferiblemente con una biopsia de la zona más accesible y, en su defecto, por punción con aguja fina (26).

a) Diagnóstico histológico

El diagnóstico histopatológico es necesario para clasificar el tumor. Se basa en los criterios establecidos por la clasificación de la organización mundial de la salud (WHO) (26). Estos criterios establecen la terminología para clasificar el cáncer de pulmón. Gracias a la caracterización molecular de los tumores se establece una subclasificación del NSCLC pudiendo implantar tratamientos diana. Asimismo, a través de técnicas de inmunohistoquímica (IHC) se va a obtener un diagnóstico más preciso favoreciendo a la subclasificación del cáncer de pulmón. La mayoría de los tumores de NSCLC son diagnosticados en estadios irresecables avanzados. Es necesario la obtención de biopsias o muestras citológicas para definir el mejor tratamiento, pero a veces la escasa representación de la muestra puede limitar el material (27).

La IHC es la técnica de elección para poder hacer el diagnóstico en aquellos casos donde la morfología por sí sola no es suficiente para diferenciar el subtipo de NSCLC (28,29).

Los adenocarcinomas habitualmente son TTF-1 (Thyroid Nuclear Factor 1) positivo y en cambio los carcinomas escamosos son p40 positivo. Si ninguno de los dos fuera positivo

el diagnóstico se filiaría como NSCLC no especificado de otra manera, (NOS), los cuales suponen supone menos de un 10%.

b) Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular se realiza paralelamente a través de 2 vías: una vía detecta las alteraciones oncogénicas tratables y otra vía determina la expresión de PD-L1 para establecer una terapia inmunológica (30–32).

En el adenocarcinoma de pulmón avanzado las recomendaciones establecidas por la American Society of Clinical Oncology (ASCO) y por la European Society for Medical Oncology (ESMO) son: la determinación de mutaciones en *EGFR*, la translocación de *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*), la fusión de *ROS1* (*ROS proto-oncogene 1*), la mutación *BRAF V600E* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), la mutación *KRAS*, la mutación *MET* *exón kipping 14*, la fusión *NTRK* (*neurotrophin tyrosine receptor kinase*) y la translocación de *RET* (*rearranged during transfection*) (33,34).

Para establecer un tratamiento con inmunoterapia es necesaria la determinación de la expresión de PD-L1 en la muestra tumoral en pacientes con NSCLC metastásicos y estadios localmente avanzados. Esta determinación de PD-L1 ha sido avalada en estudios fase III que demuestran la superioridad de fármacos inhibidores de punto de control inmunológico frente a quimioterapia en supervivencia global (SG) (35). La evaluación del nivel de expresión de PD-L1 en tejido tumoral puede realizarse usando diferentes anticuerpos monoclonales (Ac) desarrollados sobre plataformas automatizadas de IHC (36).

1.1.4. Tratamiento

a) Estadios avanzados con alteraciones diana

- **Mutación de EGFR**

El tratamiento estándar es un inhibidor de tirosina quinasa (TKIs) específico de mutaciones de *EGFR*. Diversos estudios han demostrado que los inhibidores de primera generación (erlotinib, gefitinib) y segunda generación (afatinib, dacomitinib) tienen un impacto superior en supervivencia libre de progresión (SLP) frente a quimioterapia (37–40). Recientemente, el osimertinib, un inhibidor de tercera generación, ha sido aprobado para el tratamiento de primera línea (41). La combinación de erlotinib y bevacizumab (antiangiogénico, anti VEGF) ha demostrado un impacto en SLP siendo otra opción de tratamiento por la European Medicines Agency (EMA) (42).

Tras tratamiento con inhibidores de 1-2ª generación, en un 50-60% de los pacientes se va a detectar la presencia de la mutación *T790M* como mecanismo de resistencia. La única medicación aprobada para los pacientes que desarrollen esta mutación es osimertinib a excepción de los pacientes que lo hayan recibido en primera línea (43,44).

La amplificación de *MET*, la amplificación de *HER2*, las alteraciones de *PI3CKA*, la mutación de *BRAF*, la mutación de *KRAS* o la transformación a célula pequeña se han descrito como otros posibles mecanismos de resistencia (45). El tratamiento aprobado en estos pacientes sería la quimioterapia con inmunoterapia (46), recomendado en las guías de ASCO y de ESMO (33,34).

- **Translocación ALK**

En pacientes con translocación de *ALK*, la aparición de fármacos diana ha supuesto un avance en el NSCLC relegando la quimioterapia a un segundo plano. Estudios fases III han demostrado la superioridad de dichos fármacos (tanto a nivel de tasas de respuesta como un impacto en SLP) frente a la quimioterapia, siendo aprobados en primera línea de tratamiento. Fármacos como crizotinib (inhibidor de 1ª generación), ceritinib (inhibidor de 2ª generación) (47,48) o alectinib, (inhibidor de 2ª generación) son fármacos de elección en primera línea de tratamiento, siendo alectinib el fármaco de primera opción por demostrar una superioridad en SLP y SG (HR 0,42 y HR 0,67 respectivamente) frente a crizotinib (49).

Brigatinib (inhibidor de 2ª generación) en el estudio ALTA 1, evidenció una superioridad a crizotinib en SLP, siendo también aprobado como tratamiento de primera línea (50). Posteriormente, el estudio Crown demostró en primera línea, la superioridad de lorlatinib (inhibidor de 3ª generación) frente a crizotinib con mejor SLP (HR0,28) (51). Este estudio significó la aprobación de lorlatinib por la FDA en primera línea en pacientes ALK translocados.

Lorlatinib es el tratamiento aprobado por la FDA y la EMA (52) a la progresión de enfermedad tras tratamiento con alectinib o ceritinib.

- **Otras alteraciones**

Crizotinib es el fármaco de elección en pacientes con translocación de *ROSI* (53).

Recientemente, un nuevo inhibidor de *ROSI*, el entrectinib, ha sido aprobado por la FDA y la EMA también en primera línea de tratamiento (54). El lorlatinib es el tratamiento de elección tras progresión tumoral al tratamiento con crizotinib (52).

La combinación de dabrafenib con trametinib, ha sido aprobada por la FDA y la EMA en pacientes con mutación de *BRAF V600*. Este es el tratamiento de elección tanto en primera línea como en pacientes pretratados (55).

Pralsetinib (56) y selpercatinib (57) han sido aprobados por la FDA y la EMA en pacientes con fusión de *RET*, previamente tratados.

Por último, larotrectinib y entrectinib son fármacos también aprobados por la FDA y la EMA, en el tratamiento de pacientes con fusiones de *NTRK*, previamente tratados (58,59).

b) Estadios avanzados sin alteraciones diana

• Primera línea

La quimioterapia establecida en NSCLC avanzado en pacientes sin alteración diana está basada en doblete de platino asociado a taxanos, vinorelbina o gemcitabina. La recomendación son cuatro ciclos en lugar de seis por toxicidad acumulada (60). En pacientes con cáncer de pulmón no escamoso, el tratamiento de elección es la combinación de platino con pemetrexed, condicionado a la histología. En pacientes con adenocarcinoma de pulmón, la adición de pemetrexed al platino supuso un mayor impacto en SG (HR 0,78) y SLP (HR:0,6) frente a otros agentes quimioterápicos como el docetaxel o la gemcitabina (61).

La adición de bevacizumab al doblete de tratamiento ha supuesto una mejoría en la SG en pacientes con cáncer de pulmón no escamoso y, por tanto, su uso es una opción a tener en cuenta en ausencia de contraindicaciones (62,63).

Tras los cuatro ciclos de doblete de quimioterapia la opción de mantenimiento con pemetrexed está recomendada (en ausencia de toxicidad y de progresión) por demostrar mayor impacto tanto en SLP como en SG (64).

El tratamiento en primera línea con ICIs en monoterapia constituye el estándar terapéutico en pacientes con NSCLC avanzado con expresión de PD-L1 \geq 50%. El estudio KEYNOTE 024 demostró una SG a favor de pembrolizumab (un anticuerpo monoclonal anti-PD-1) frente a quimioterapia con una HR de 0,6 y una SLP de 10,3 meses en el brazo de pembrolizumab con una HR de 0,5 (35). El atezolizumab (anticuerpo monoclonal anti-PD-L1) frente a quimioterapia también evidenció un mayor beneficio en SG en el estudio IMPOWER 110 con una HR de 0,5 (65). El cemiplimab (anticuerpo monoclonal anti-PD-L1), gracias al estudio EMPOWER-Lung 01, (66) también es un fármaco que demostró un beneficio en este grupo de pacientes con una HR en SLP de 0,54 y una HR de 0,57 en

en SG. En base a estos resultados, estos ICIs han sido aprobados por la FDA, pero la EMA sólo ha aprobado el pembrolizumab y atezolizumab.

Múltiples estudios fase III han avalado el esquema de quimioterapia más inmunoterapia, independientemente del nivel de expresión de PD-L1. El estudio KEYNOTE 189 que incluía pacientes con carcinoma no escamoso de pulmón, demostró que la combinación de quimioterapia (platino/pemetrexed) con pembrolizumab era superior tanto en SG como en SLP, con una HR de 0,48 y 0,56 respectivamente, al compararlo con sólo quimioterapia (67). El estudio KEYNOTE 407 tenía un diseño parecido, pero incluía únicamente pacientes con NSCLC histología escamosa, y la quimioterapia estaba basada en platinos en combinación con nab-paclitaxel (nanopartículas de albúmina) o paclitaxel más pembrolizumab vs placebo. Los datos de SG y de SLP también fueron mejores para el brazo de combinación, con una HR de 0,64 y de 0,57 respectivamente (68). En el estudio IMPOWER 150, la adición de atezolizumab a bevacizumab más quimioterapia, en pacientes con carcinoma de pulmón no escamoso, mejoró significativamente la SG (HR 0,76) y la SLP (HR 0,62), en comparación con el uso de bevacizumab más quimioterapia (69). El estudio IMPOWER 130, fue otro estudio multicéntrico con pacientes con NSCLC no escamoso, que demostró ser superior la combinación de atezolizumab con quimioterapia, tanto en términos de SG (HR 0,79) como en SLP (HR 0,64) al compararlo con quimioterapia (70). El estudio IMPOWER 131 reportó en pacientes con carcinoma de pulmón escamoso, un beneficio en SLP (HR 0,71) con la introducción del atezolizumab junto con la quimioterapia, frente a sólo quimioterapia (carboplatino + nab-paclitaxel o paclitaxel), pero no halló beneficio en la SG (71).

Finalmente, el estudio CheckMate 9LA valoró la combinación de nivolumab más ipilimumab (anti-CTLA-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) y dos ciclos de quimioterapia frente a quimioterapia en primera línea de tratamiento, independientemente de su variante histológica. Demostró que la combinación tenía un impacto en la SG para ambas histologías con HR de 0,62 y 0,69 respectivamente, y que la inmunoterapia dual junto con quimioterapia, mostraba mejor SLP con una HR de 0,68 (72). Con estos resultados, la combinación fue aprobada por la FDA y por la EMA.

La combinación dual de ipilimumab y nivolumab también ha sido aprobada por la FDA en primera línea en pacientes con NSCLC con expresión de \geq PD-L1 1% según el estudio CheckMate 227 (73). Los datos de SG fueron superiores (TMB \geq 10; HR 0,86 y TMB $<$

10; HR 0,75) frente al brazo estándar de quimioterapia, y la SLP también demostró una superioridad en el brazo experimental con una HR de 0,58.

En aquellos pacientes donde la inmunoterapia está contraindicada, el doblete de platino sería el esquema de elección (61).

- **Segunda línea**

Existen tres fármacos anti PD-1/PD-L1 (nivolumab, pembrolizumab y atezolizumab) aprobados en segunda línea en NSCLC tras el fracaso de quimioterapia en primera línea. Nivolumab y atezolizumab (74,75) se han aprobado independientemente de la expresión de PD-L1, mientras que pembrolizumab se ha aprobado en pacientes con expresión de PD-L1 $\geq 1\%$ (76). En aquellos pacientes no candidatos a inmunoterapia, el tratamiento consiste en quimioterapia basado en docetaxel o bien pemetrexed, siempre y cuando no lo hayan recibido en primera línea, ya que presenta eficacia similar pero con menor toxicidad (77–79).

Los antiangiogénicos asociados a quimioterapia han demostrado un impacto en la SG. Nintedanib es un inhibidor triple de la angioquinasa oral que bloquea simultáneamente tres receptores de factores de crecimiento: VEGFR 1-3 (*vascular endothelial growth factor receptor*), PDGFR alfa y beta (*platelet-derived growth factor receptor*) y FGFR 1-3 (*fibroblast growth factor receptor*). El estudio LUME-1 demostró que la asociación de nintedanib con docetaxel era superior en SG (HR 0,82) y en SLP (HR 9,79), frente a quimioterapia, en pacientes con adenocarcinoma de pulmón (80). Esta combinación representa una opción de tratamiento en pacientes que hayan progresado a la quimioterapia o inmunoterapia. Ramucirumab es otro antiangiogénico, que en combinación con docetaxel, demostró ser superior en SG (HR 0,86) y en SLP comparado con docetaxel en monoterapia en NSCLC; por ello, representaría también una opción de tratamiento independientemente de la histología (81).

1.2. Inmunoterapia en NSCLC

La inmunoterapia en el cáncer de pulmón ha supuesto un cambio en el paradigma del tratamiento, a la vez que un impacto en la supervivencia. Son numerosos los ICIs probados en el NSCLC avanzado y/o metastásico, entre los que se encuentran los anti PD-1, anti PD-L1 y anti CTLA-4, que han pasado a ser una parte activa del tratamiento, posicionándose también como tratamiento de consolidación tras quimioterapia y radioterapia concomitante. De esta manera, durvalumab (anticuerpo monoclonal anti-

PD-L1), se convierte en el nuevo estándar de tratamiento en el NSCLC localmente avanzado tras la quimioterapia y radioterapia torácica, por su beneficio en SLP (HR 0,56) (82) por la FDA y, en pacientes con PD-L1 \geq 1% por la EMA.

Los ICIs también han sido evaluados en pacientes quirúrgicos como tratamiento neoadyuvante, obteniendo tasas de respuestas patológicas superiores a la quimioterapia neoadyuvante, pero sin llegar a unos resultados concluyentes (83). Dada la evidencia científica del sinergismo de la quimioterapia con ICIs en el escenario metastásico, se ha realizado el estudio NADIM (84) que combina anti-PD-L1 y quimioterapia con unos resultados que han favorecido la realización de ensayos fases III (85).

La llegada de estudios en el grupo de pacientes con tratamiento adyuvante, también es continua (KEYNOTE091, BR031). Recientemente, se ha publicado el estudio IMPOWER010, que ha demostrado un beneficio a favor de atezolizumab tras quimioterapia adyuvante en SLP con HR de 0,66 en aquellos pacientes con estadio II-III y expresión de PD-L1 \geq 1% (86).

1.2.1. Mecanismos de acción de los inhibidores de puntos de control inmunológico

Los puntos de control inmunológicos son cruciales para mantener la autotolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias fisiológicas en los tejidos periféricos, con el fin de minimizar el daño tisular (87). Las células T inician el reconocimiento de antígenos por el receptor de células T (TCR) y tienen capacidad para reconocer y matar directamente las células que expresan antígenos gracias a los linfocitos T CD8 + o citotóxicos y, además, son capaces de orquestar respuestas inmunitarias gracias los linfocitos T CD4 + o *helper*. En esta línea, se han desarrollado fármacos que son capaces de actuar como agonistas de receptores coestimuladores o, como antagonistas de señales inhibitorias, que provocan la amplificación de respuesta de las células T específica de antígeno (nivolumab, atezolizumab, pembrolizumab e ipilimumab).

- **PD-1 (*Programmed Death-1*)**

PD-1 es una proteína de membrana tipo I que se expresa principalmente en tejidos periféricos, donde las células T pueden encontrar los ligandos PD-L1, también conocido como B7-H1, y PD-L2, también conocido como B7-D, que se expresan en células estromales, en células tumorales o en ambas. La función de PD-1 consiste en condiciones normales, en limitar la respuesta inflamatoria a la infección y limitar la autoinmunidad. Dentro del microambiente tumoral esto supone un mecanismo de resistencia inmunitaria.

La unión de PD-1 con sus dos ligandos activa la señal inhibitoria, previniendo así la inflamación excesiva o dañina, y mantiene la tolerancia inmune a los autoantígenos en condiciones normales (87–89).

- **PD-L1 (*Programmed Death-ligand 1*)**

PD-L1 a menudo se expresa en células tumorales y en células mieloides del microambiente tumoral que probablemente suprimen, aún más, las respuestas inmunes efectoras. El bloqueo de la vía mediante la interacción con PD-1 en las células T puede mejorar las respuestas inmunitarias antitumorales al disminuir el número y/o la actividad supresora de las células T reguladoras intratumorales (87,90,91).

- **CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)**

La proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es un receptor inhibitorio expresado principalmente por las células T. Sus ligandos CD80 y CD86 se encuentran típicamente en la superficie de las células presentadoras de antígeno y pueden unirse a CD28 o CTL-4, favoreciendo una respuesta coestimuladora o inhibitoria, respectivamente. (92). Esto ha supuesto la aprobación de un fármaco anti-CTL-4 (ipilimumab) para el tratamiento del cáncer de pulmón avanzado.

- **LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3 protein*)**

LAG-3 regula una vía de punto de control inmunológico que inhibe la actividad de las células T y que en muchos tumores se encuentra sobreexpresado. Los estudios preclínicos sugieren que la inhibición de LAG-3 permite, a los linfocitos T, recuperar su función citotóxica y potencialmente, afectar al crecimiento tumoral (88,93,94).

LAG-3 y PD-1 frecuentemente se coexpresan en los linfocitos que se infiltran en el tumor, contribuyendo al agotamiento de las células T. El relatlimab (fármaco anti-LAG-3), permite restaurar la función de las células T. Recientemente se ha demostrado que la combinación de relatlimab con nivolumab mejora la SLP en pacientes con melanoma (93). Son numerosos los fármacos anti-LAG-3 en desarrollo que se están probando en combinación con los fármacos ya aprobados (95–97).

- **TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*)**

TIGIT interactúa con el ligando CD155 expresado en las células presentadoras de antígenos (APC) o en las células tumorales, favoreciendo el desarrollo tumoral. Se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales que bloquean la actividad de TIGIT y se está estudiando en combinación con otros tratamientos para el NSCLC avanzado (98,99).

- **OX40 o antígeno CD134**

OX40 se expresa en los CD4, CD8 y otras células linfoides favoreciendo la respuesta inmunológica. El desarrollo de fármacos potenciadores de OX40 para un mejor control inmunológico en el tratamiento del cáncer, es otra de las dianas en investigación (100,101).

- **TIM3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-3*)**

TIM3 inhibe la inmunidad antitumoral, de manera que el bloqueo de TIM3 junto con PD-1 puede favorecer la regresión tumoral y mejorar las respuestas de las células T contra el cáncer (88,102).

1.2.2. Biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en NSCLC

a) Expresión de PD-L1

La evaluación del nivel de expresión de PD-L1 en tejido tumoral puede realizarse usando diferentes Ac monoclonales desarrollados sobre plataformas automatizadas de IHC. La única técnica de PD-L1 validada por los ensayos clínicos es el Ac 22C3, pero numerosos estudios han comparado otros Ac, dando validez a otras determinaciones para el análisis de PD-L1: 28-8 PD-L1 (Dako) y SP263 PD-L1 (Ventana) (36,103,104).

El estudio “BluePrint” se diseñó para armonizar los resultados proporcionando información sobre la comparabilidad clínica y analítica de los cuatro Ac monoclonales descritos (28-8 (Dako), SP263 (Ventana), SP142 (Ventana), 22C3 (Dako)). El estudio reveló que tres de los cuatro Ac monoclonales para evaluar la expresión de PD-L1, tienen una alta concordancia (22C3, 28-8 y SP63), siendo validadas para el análisis de PD-L1, mientras que el Ac SP142 tuvo menor marcación en las células tumorales (36).

b) Tumor mutational burden (TMB)

El TMB se define como el número de mutaciones somáticas no sinónimas que presenta un tumor, incluyendo sustituciones no sinónimas y pequeñas inserciones/deleciones. Normalmente se expresa respecto a una unidad del genoma, por ejemplo, mutaciones/megabase (mut/MbP), y generalmente, se asocia con una mayor inestabilidad genómica. En el NSCLC se ha descrito un alto número de mutaciones en pacientes fumadores, debido a que del tabaco se derivan sustancias altamente carcinogénicas que generan mutaciones (105).

Las mutaciones son posibles neoantígenos que pueden ser reconocidos por las células T citotóxicas (106), lo que provoca un aumento en la inmunogenicidad y mayor sensibilidad a los tratamientos con inmunoterapia (107).

La determinación del TMB se puede hacer mediante distintas técnicas de *next generation sequencing* (NGS).

a) Whole-genome sequencing (WGS): implica la secuenciación del genoma completo, identificando todas las mutaciones. Tiene un alto coste económico y además el análisis de sus datos genera un alto uso de recursos computacionales para el procesamiento y almacenamiento (108). Además, la mayoría de mutaciones se encuentran en regiones no codificantes, por lo que raramente pueden dar lugar a neoantígenos.

b) Whole-exome sequencing (WES): permite la secuenciación sólo del exoma (conjunto completo de regiones de genes del genoma humano). Supone alrededor del 2,5% del genoma, reduciendo el coste y el tiempo en comparación con WGS. A pesar de ello, sigue siendo una técnica costosa, por lo se han puesto en marcha la creación de diferentes paneles de genes (109).

La secuencia dirigida mediante el uso de paneles se centra en una selección de genes de interés, siendo más accesible en términos de tiempo y coste para la aplicación clínica (110). Sin embargo, no todos los paneles de NGS son válidos para estimar el TMB. Paneles con una cobertura genómica < 0,5 Mb, hacen que la precisión para la medición del TMB disminuya, y por tanto, se desaconseja su uso (111).

Paneles como *Foundation One*[®] *Trusight 170*, *Oncomine Tumor Mutation Load Assay*[®], *Oncomine Comprehensive Assay V3*[®] y *MSK-IMPACT*[™] se han establecido para determinar el TMB reduciendo costes y favoreciendo su cuantificación (112). En un estudio de Rizvi et al. se realizó la medición del TMB a través del panel de *MSK-IMPACT*[™], a la vez que se determinó por WES, y se estableció que ambas pruebas tenían una alta correlación (113). Los puntos de corte se establecieron alrededor de 10 mut/MpB para los paneles de *Foundation One*[®], siendo esta la única cohorte prospectiva hasta la fecha, y 7,4 mut/MpB para el panel *MSK-IMPACT*[™].

Distintos estudios han analizado la correlación entre TMB y la respuesta a inmunoterapia (114–116). En el estudio Checkmate 026, se realizó un análisis retrospectivo para ver la eficacia del tratamiento según el análisis del TMB analizado por WES. Se definió el TMB

alto ≥ 243 mutaciones, el nivel medio entre 100 y 242 mutaciones y el TMB bajo de 0 a 100 mutaciones. Pacientes con alto TMB presentaron tasas de respuesta más prolongadas y mejores SLP a nivolumab frente a quimioterapia (117).

El estudio Checkmate 227 en la parte 1 analizó la utilidad del TMB, obteniendo un resultado positivo a favor de la combinación de nivolumab/ipilimumab en aquellos pacientes con tumores con TMB alto (≥ 10 mut/MpB) con mejor SLP (HR 0,58); independientemente de la expresión de PD-L1 o de la histología. Sin embargo, los resultados para SG fueron independientes de la TMB (TM.B alta: HR 0,68, y TMB baja: HR 0,75) (73).

Recientemente, la FDA ha aprobado el uso de pembrolizumab para tumores agnósticos con TMB alto (≥ 10 mut/MpB), de acuerdo al análisis retrospectivo del estudio KEYNOTE-158 (118). El análisis del TMB se realizó a través de la plataforma de *Foundation One*[®], sin embargo esta evaluación no incluyó pacientes con NSCLC.

Nuestro grupo analizó, en una cohorte de pacientes con NSCLC avanzado, el TMB por WES y lo correlacionó con la respuesta a ICIs. Identificamos que aquellos pacientes que se beneficiaban con la inmunoterapia (SLP > 6 meses), se correlacionaban con un alto TMB ($p = 0,029$) (119). Después, estratificamos la cohorte de pacientes en tres grupos según el beneficio de ICIs en la SLP: ausencia de beneficio (SLP < 6 meses), beneficio medio (SLP entre 6-18 meses) y beneficio largo (SLP > 18 meses); y observamos que aquellos pacientes con SLP > 18 meses tenían un mayor TMB en comparación con los otros 2 grupos ($p = 0,001$ y $p = 0,003$ respectivamente).

A pesar de los resultados mencionados anteriormente, todavía sigue habiendo aspectos sin resolver del TMB en cuanto a la cuantificación e interpretación. El TMB es una variable continua y uno de los inconvenientes es el punto de corte establecido para determinar qué paciente con un TMB alto va responder a la inmunoterapia. Los puntos de corte objetivos no están establecidos, de manera que cada ensayo clínico utiliza su punto de corte específico estableciendo una mediana de TMB o dividiendo en terciles o cuartiles. Los estudios de NSCLC que emplean el WES han establecido puntos de media de 158 ó 200, y 243 como tércil superior (107,115,117). La armonización en la cuantificación de TMB sigue siendo un desafío para el futuro, siendo necesario procedimientos estándares que permitan la interoperabilidad entre diferentes paneles de genes, comparando los resultados de todos los estudios, y definir un límite universal para

poder identificar con claridad a los pacientes con más probabilidad de beneficiarse de inmunoterapia (118).

c) Otros marcadores emergentes

▸ Infiltración inmune del tumor

El microambiente tumoral (TME) lo forman diferentes tipos celulares, entre los que se incluyen las células inmunes: macrófagos, células B, células T y mastocitos (120). La creciente investigación sobre el TME indica que las células inmunes que infiltran el tumor desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y agresividad del tumor (121,122). Existe evidencia de que el microambiente del NSCLC está enriquecido por diferentes tipos de células inmunes.

La infiltración de células del sistema inmune en el tumor contribuye positiva o negativamente al crecimiento e invasión del tumor, pudiendo condicionar la evolución del paciente dependiendo de la heterogeneidad del tumor y de los niveles de linfocitos que infiltran las lesiones neoplásicas. Los TIL (*tumor-infiltrating lymphocytes*), se componen principalmente de subconjuntos de células T CD4 + y CD8 +. Las células T CD8 + son los linfocitos T citotóxicos primarios en la respuesta inmune antitumoral, aunque las células T CD4 + también han demostrado tener potencial de destrucción tumoral (123).

Se ha analizado la infiltración inmunológica de los tumores estudiando la diversidad de células (macrófagos, células dendríticas, células T...) que invaden las diferentes lesiones neoplásicas, pudiendo contribuir negativamente y positivamente al crecimiento e invasión tumoral. Así, estrategias centradas en la manipulación de la infiltración celular a través de terapias génicas, moleculares y celulares es una herramienta para ensayos clínicos ya en marcha en la práctica clínica (124). Los tumores infiltrados por histiocitos (macrófagos y células dendríticas) se asocian a peor evolución, por el contrario, una mayor infiltración de TILs en el tumor y en las metástasis, es un marcador de buen pronóstico (107). Varios estudios han demostrado en diferentes tumores, incluido el NSCLC, que a mayor infiltración de TILs (CD8 +, CD3 +, CD4 +) mayor sensibilidad a la inmunoterapia y mayor supervivencia (125,126).

Sin embargo, el impacto en la supervivencia de la infiltración inmune tumoral del NSCLC sigue sin estar clara. Estudios previos han intentado identificar el perfil de células

inmunitarias por inmunohistoquímica (127,128) demostrando que el NSCLC contiene numerosos tipos de células inmunitarias (células T, células B, macrófagos, células *natural killers* (NK) y células dendríticas), encontrando una asociación entre las diferentes células inmunitarias y la supervivencia de los pacientes (129). Sin embargo, dichos estudios tienen poca validez dado que la técnica utilizada es con un solo Ac monoclonal. Estudios posteriores han utilizado la citometría de flujo con múltiples anticuerpos para el análisis del perfil de las células inmunitarias, aportando más fiabilidad a los resultados (pero estas técnicas siguen siendo subóptimas por el número de biomarcadores evaluados simultáneamente).

Se puede profundizar en qué tipos celulares existen en el tumor a partir de datos de expresión como *RNA sequencing* o el *NanoString*® .

El *NanoString*® es una hibridación en sondas ancladas a una superficie con los fragmentos del RNA del tumor que se unen entre sí para tener la misma secuencia, capturando y contando transcritos de RNA mensajero (RNAm) individualmente. El uso de plataformas que miden directamente niveles de expresión de mRNA sin reacciones enzimáticas, permite una sensibilidad mayor de las pruebas junto con una alta capacidad de lectura digital (130). Un ejemplo es el *nCounter*® *Pan Cancer Immune Profiling Panel* (figura 2). Consiste en un panel de expresión génica que incluye 770 genes para medir la presencia de transcritos relacionados con la respuesta celular inmunitaria. Mide características para el desarrollo de perfiles de expresión génica y así poder tener una aplicación clínica en el contexto de la inmunoterapia (131). El análisis se realiza mediante un *Counter Analysis System* (un sistema autorizado por la FDA) pudiendo medir la expresión génica a partir de una cantidad baja de RNAm (25 a 300 ng) (130) .

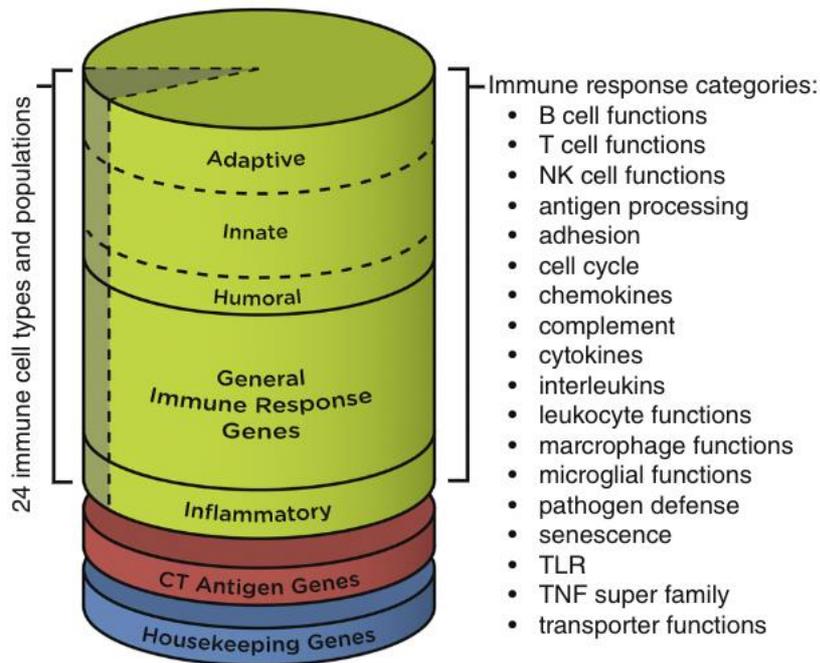


Figura 2. Representación esquemática del Pan Cancer Immune Profiling Panel. Nota. [Adaptado de “Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs.”. Por Geiss GK .2008. Nat Biotechnol. (130)]-

Nuestro grupo publicó un estudio multicéntrico donde se analizaba el perfil inmunológico en pacientes con varios tipos de tumores que habían recibido anti-PD-1. Se analizó el mRNA del tumor a través del panel nCounter® *PanCancer Immune Profiling Panel*. Se identificaron 23 genes o firmas inmunes que estaban relacionados con la respuesta a inmunoterapia y con la SLP. Además, se analizó la variabilidad intra biopsia e inter biopsia del PD-L1, PD-1, CD8 + y CD4 + y la relación de los TILs con la expresión de PD-L1. La expresión de PD-1, junto con 12 firmas que contenían CD4 +, CD8 + y/o células NK, y la activación de interferón se asociaron significativamente con la no progresión de la enfermedad y con la SLP. Estas asociaciones fueron independientes del momento de la muestra, del fármaco utilizado o del tipo de cáncer. Así, los resultados fueron consistentes con la hipótesis de que la identificación de una respuesta inmune adaptativa preexistente puede predecir la respuesta clínica (131,132).

▸ SCNA y SCNAs *burden*

Históricamente, las ganancias o pérdidas completas de los cromosomas se ha denominado aneuploidía, mientras que las ganancias o pérdidas de brazos cromosómicos serían una forma variable de aneuploidía segmentaria (133). Recientemente se ha adoptado el

término de aneuploidía tanto a los CNA que afectan a los brazos completos de los cromosomas o a los cromosomas completos (133,134); el término CNA para describir las ganancias o pérdidas de sub-brazos mayores de 10 kilobase; y el término indels para describir toda las demás CNA (134). Como el CNA surge de una célula somática pasan a llamarse SCNA (164). Se ha estudiado qué niveles de SCNA pueden tener un papel en la tumorigénesis. Dos de las vías principales de actuación del cáncer son la proliferación celular y la evasión inmunológica. Es ahí donde los niveles de SCNA han demostrado tener impacto (24).

Davoli et al. demostraron, por un lado, que el número de mutaciones tiende a correlacionarse positivamente con el nivel de SCNA a excepción del cáncer colorrectal y endometrio, y por otro lado, que los genes drives (mutaciones en genes supresores de tumores u oncogenes implicados en la reparación del DNA) se correlacionaron positivamente con los niveles de SCNA (135,136).

Los tumores con altos niveles de aneuploidías tienen un microambiente con reducción del sistema inmune citotóxico (menores niveles de CD8 y NK) y proinflamatorio (136). El mismo estudio, demostró en un análisis retrospectivo en pacientes con melanoma tratados con ICIs anti-CTLA-4, que niveles altos de SCNA se asociaba a peor respuesta, sugiriendo que la aneuploidía podía ser un biomarcador predictivo de respuesta a dicho tratamiento (136).

Recientemente, nuestro grupo ha relacionado el SCNAs burden como marcador de respuesta a inmunoterapia en una pequeña cohorte de pacientes con NSCLC (137). El SCNAs burden se definió como la suma de todos los tamaños de las regiones genómicas afectadas por SCNA. Los niveles altos de SCNAs burden se asociaron a peor respuesta a inmunoterapia y se correlacionaron negativamente con la presencia de células inmunes (células B, Cel T reguladoras, o CD8 y células NK). Igualmente, establecimos que un TMB alto se asociaba con un beneficio clínico a inmunoterapia. Los resultados hay que interpretarlos con cautela dado que el estudio tiene una cohorte con un número limitado de pacientes. Dado los resultados previos, que apuntaban al impacto que podía tener el análisis del SCNAs burden profundizamos en el tema aumentando la cohorte de pacientes para poder dar robustez a los datos previos.

▸ [Relaciones entre biomarcadores: PD-L1/TMB/SCNAs burden](#)

Los biomarcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia validados clínicamente son el PD-L1, la inestabilidad de microsatélites y TMB, dependiendo del tumor. La expresión de PD-L1 es el único validado en el NSCLC. Su expresión alta predice mejor respuesta (66,113), y sin embargo un subgrupo de pacientes no se beneficia de la inmunoterapia a pesar de tener alta expresión de PD-L1. Como se ha comentado previamente, la expresión de PD-L1 tiene algunas limitaciones como su variabilidad en el análisis dependiendo del Ac o la heterogeneidad intratumoral, por lo que es prioritario la búsqueda de nuevos marcadores o la combinación de varios para redefinir mejor aquellos pacientes con respuestas a inmunoterapia.

Rizvi et al. publicaron en 2018 resultados de pacientes con NSCLC avanzado tratados con anti-PD-1/PD-L1 o con combinación con anti-CTLA-4 y no encontraron correlación entre los dos marcadores: PD-L1 y TMB. Ambos marcadores por si solos eran variables independientes que se asociaban con beneficio de la inmunoterapia (113). Así, el TMB podría tener un significado similar a la expresión de PD-L1, pero la combinación de ambas variables podría ser más útil para identificar con precisión a los pacientes con más probabilidades de beneficiarse de la inmunoterapia.

Hellman et al. también encontraron en un análisis de la expresión de TMB y PD-L1 en pacientes con NSCLC que recibieron terapia combinada anti -PD-1 y anti-CTLA-4 que estos marcadores podían no estar relacionados (138).

El estudio Checkmate 568, un estudio fase II en primera línea que combinaba ipilimumab más nivolumab, quiso evaluar la asociación de la eficacia con PDL1 y TMB (*Foundation One*[®]) siendo el punto de corte ≥ 10 mut/MbP(139). Se vio que independientemente de la expresión de PD-L1, la tasa de respuesta era más alta en pacientes con TMB ≥ 10 mut/MbP versus TMB <10 mut/MbP. La SLP fue más larga en pacientes con TMB ≥ 10 mut/MbP versus TMB < 10 mut/MbP. Así la mejor respuesta y una mayor SLP se asoció a mayor TMB en ambos subgrupos de expresión de PD-L1; $\geq 1\%$ y $<1\%$ estando ambos marcadores asociados a respuesta, pero sin que se observara una correlación significativa entre los dos biomarcadores.

Posteriormente se publicó un estudio donde se analizaba si existía una asociación entre el PD-L1 y TMB en varios tumores en más de 9000 muestras, estableciendo el punto de corte también en ≥ 10 mut/MbP para TMB alto (140). Una vez más, se observó que la relación entre estos dos biomarcadores no fue consistente entre los tipos de tumores; débil

pero positiva en algunos tumores como el melanoma, páncreas y NSCLC, fuertemente positiva para endometrio y gástrico; pero negativa para la mayoría de los otros tumores.

En nuestro estudio también relacionamos el SCNAs *burden* como marcador de respuesta a inmunoterapia estableciendo que alto SCNAs *burden* es indicativo de ausencia de respuesta y que alto TMB se asociaba con beneficio a inmunoterapia (119). Aún así esta cohorte es relativamente pequeña y el valor del SCNAs *burden* no se definió claramente.

Por otro lado, el desarrollo de perfiles de expresión génica en tumores ha permitido identificar firmas de expresión génica pronóstica (132,141). Nosotros observamos que pacientes que presentaban un beneficio a ICIs tenían altos niveles de infiltración inmune (de células B, células CD8, NK y células T) (119).

Son numerosos los biomarcadores emergentes para una mejor caracterización de los pacientes respondedores a inmunoterapia. La clave es combinar diferentes marcadores para poder caracterizar mejor a los pacientes y poder establecer patrones de beneficio a la inmunoterapia.

1.3. Marcadores de respuesta a la inmunoterapia en biopsia líquida en NSCLC

La biopsia líquida hace referencia a cualquier material derivado del tumor que circula en sangre o cualquier otro fluido corporal. Esto incluye el análisis de células tumorales circulantes (CTCs), exosomas, RNA tumoral circulante (ctRNA), cell free DNA (cfDNA) y proteínas (21,124). Las CTCs y el estudio de DNA del tumor circulante (ctDNA), que forma parte del cfDNA, son los sustratos más estudiados en cáncer de pulmón.

El tejido tumoral fijado en parafina sigue siendo el estándar para el análisis molecular del cáncer de pulmón. En más de un 60% de los casos, el diagnóstico se realiza en estadios avanzados y a pesar de que el diagnóstico citológico tenga escasa representación tumoral, puede ser suficiente para el análisis molecular del tumor (142).

A diferencia de una muestra de tejido que sólo ofrece una instantánea del tumor en un momento y lugar determinado, la biopsia líquida tiene el potencial de captar la heterogeneidad espacial y temporal del tumor (143) (figura 3). Además, determina el paisaje molecular de un tumor (teniendo en cuenta los diferentes clones presentes dentro de todos los sitios de metástasis) y puede seguir su evolución subclonal a través de

extracciones seriadas de sangre (144). Se ha establecido como un elemento diagnóstico más, siendo recomendado su uso para pacientes con NSCLC avanzado (145).

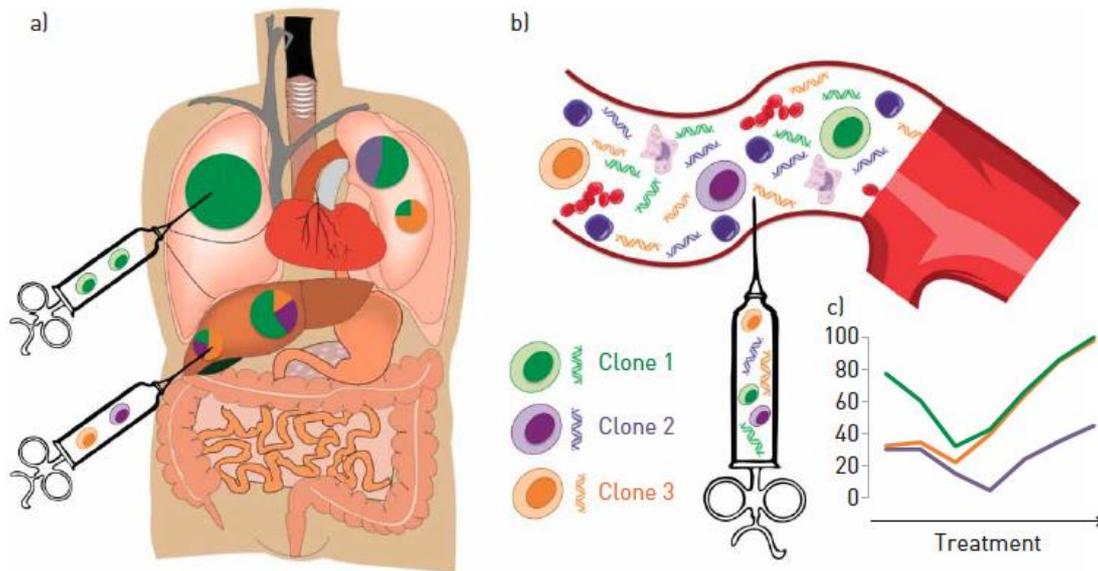


Figura 3. La biopsia de tejido (a) y la biopsia líquida (b) pueden captar la heterogeneidad espacial y temporal. [Nota. Adaptado de “*Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages*”. Por Guibert N.2020. Eur Respir Rev.(143)

El cfDNA procedente de células normales se encuentra en el plasma a niveles muy bajos, pudiendo elevarse en situaciones de estrés, ejercicio, inflamación o cirugía (146). Se ha observado que pacientes con cáncer presentan niveles más altos de cfDNA que personas sin cáncer (147). La detección de cfDNA derivado de tumores también es conocido como DNA tumoral. El DNA tumoral se define por la presencia de mutaciones o alteraciones en el número de copias. El porcentaje de ctDNA en el cfDNA en pacientes con cáncer puede variar desde un 0% hasta más del 90% (148) dependiendo de la carga tumoral y la capacidad del tumor de liberar ctDNA (149). Un estudio comparativo del cfDNA en plasma o suero mostró que las muestras de plasma tendían a tener una cantidad mayor de porcentaje tumoral que las de suero (150).

Diferentes estudios han demostrado que la concentración de cfDNA está aumentada en pacientes con NSCLC y los niveles altos se correlacionan con peor pronóstico (151,152).

La mayoría de los datos publicados de biopsia líquida en NSCLC hacen referencia al análisis de *EGFR*. En pacientes con mutación de *EGFR* se puede predecir una resistencia precoz o una ausencia de respuesta al tratamiento (153), de manera que la desaparición de la mutación de sensibilidad, asociada a respuesta radiológica, es un indicador de buen pronóstico. Tras un periodo de respuesta, si volviera a detectarse la mutación de sensibilidad, probablemente estaríamos ante una recaída “molecular”, lo cual podría ser un marcador predictivo de recaída radiológica (145).

A pesar de que los niveles de ctDNA varían mucho entre los pacientes, a nivel individual también hay variaciones a lo largo del tiempo. La vida media de cfDNA en circulación (aproximadamente una hora) puede ser una ventaja a la hora de poder medir en tiempo real la respuesta al tratamiento, justo lo contrario que ocurre con los marcadores convencionales en suero como el antígeno carcínogeno embrionario (CEA) o el CA 125 (antígeno de cáncer 125), que tienen una vida media que va desde días a semanas (154–156).

Diferentes estudios sugieren que los niveles de ctDNA aumentan transitoriamente después del inicio del tratamiento debido a que la muerte celular provoca un aumento de la liberación de cfDNA, y una o dos semanas después disminuyen significativamente si hay respuesta al tratamiento. El aumento del ctDNA puede predecir la progresión tumoral semanas antes de que se pueda objetivar una progresión radiológica, pudiendo establecerse como un marcador de respuesta a la inmunoterapia (157,158).

Estudios en melanoma han demostrado que la ausencia de niveles de ctDNA pretratamiento o su desaparición en las doce primeras semanas de tratamiento con inmunoterapia (en monoterapia o en combinación), predice una mejor respuesta asociado a un impacto en la SLP (159,160). En NSCLC los niveles de ctDNA también tienen un papel relevante. En un estudio publicado en 2019 se analizaron muestras de plasma pretratamiento y al mes del tratamiento en NSCLC avanzado y se concluyó que el descenso de la fracción alélica en los 2 primeros meses de tratamiento se relacionaba de manera inversamente proporcional con la supervivencia (14 meses de SLP en aquellos que pacientes que disminuía, con una $p < 0,0001$)(160). En otro estudio, también en pacientes con NSCLC avanzado tratados con nivolumab, se estableció una correlación radiológica y clínica con la detección de ctDNA en los primeros dos meses, teniendo un impacto en la supervivencia en aquellos pacientes donde no se observaba un aumento del $ctDNA > 9\%$ (161). Además, se ha visto una correlación entre la respuesta de ctDNA y la

respuesta radiológica, de manera que una reducción del nivel de ctDNA es un marcador precoz de eficacia terapéutica y predice una supervivencia prolongada en pacientes con NSCLC tratados con inmunoterapia (157).

Una de las ventajas del ctDNA es la posibilidad de estudiar la dinámica tumoral y poder detectar mecanismos de resistencia anticipándonos a la progresión radiológica del paciente. La resistencia adquirida se caracteriza habitualmente por el crecimiento clonal de múltiples subclones resistentes en un paciente que pueden coexistir en la misma lesión o en distintas metástasis (162,163) (figura 4).

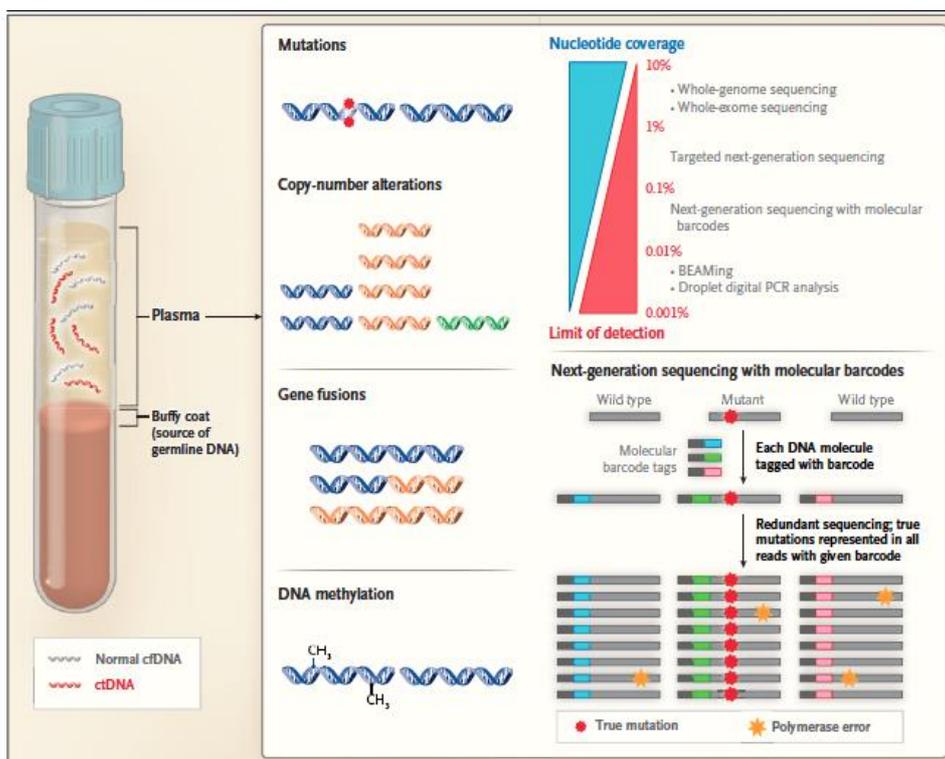


Figura 4. Análisis en plasma del perfil mutacional a través de NGS [Nota. Adaptado de “Application of cell free DNA analysis to cancer treatment”. Por Corcoran RB.2018. N Eng J Med(163)].

1.3.1. Blood tumor mutation burden (bTMB)

El bTMB es otro marcador en investigación analizado en plasma. Gandara et al. demostraron la posibilidad de usar cfDNA para determinar el bTMB, sugiriendo que el bTMB identifica a pacientes que obtienen mejoras clínicamente significativas en la SLP tras tratamiento con atezolizumab. Con este resultado se estableció bTMB como un

posible biomarcador de beneficio clínico en pacientes con NSCLC tratados con anti-PD-L1 (164).

Posteriormente, en el estudio MYSTIC se realizó un análisis exploratorio donde se utilizó el ensayo GuardantOMNI para cuantificar la bTMB y para determinar si se asociaba con beneficio a inmunoterapia (165). Se correlacionó $bTMB \geq 20$ mut/MbP con mejor SG en pacientes que recibían la combinación de durvalumab con tremelimumab con un HR de 0,49 al compararlo con quimioterapia. En cambio, para aquellos pacientes con un bTMB < 20 mut/MbP el tratamiento con inmunoterapia no supuso ningún beneficio en la SG (HR 1,16).

Por último, los resultados del estudio BFAST no consiguieron demostrar el papel del bTMB (*Foundation One*[®]) (166). En la cohorte C se aleatorizó recibir tratamiento de quimioterapia convencional *versus* atezolizumab. Todos los pacientes debían presentar un bTMB ≥ 10 mut/MbP y se separaron en dos grupos: pacientes con bTMB medio (entre 10-15 MbP) y pacientes con bTMB alto (≥ 16 MbP). El estudio demostró que aquellos pacientes con alto bTMB ≥ 16 mut/MbP no obtenían mejores SLP al tratar con atezolizumab. Sí que fue superior el valor numérico en la SG y la SLP, pero no de manera estadísticamente significativa (HR 0,87 y HR,77, respectivamente). Por ello, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales que ayuden a definir mejor los puntos de corte de TMB.

1.3.2. SCNA y SCNAs *burden*

A partir de cfDNA también se puede obtener el perfil global de SCNAs mediante una secuenciación del genoma completo a baja profundidad conocido como sWGS. Es una tecnología que permite identificar aberraciones cromosómicas de manera precisa a un coste asequible a partir de la secuenciación del genoma completo a una baja profundidad (0.1x) (153). Diferentes grupos han demostrado que es factible detectar SCNA con un 0.1x WGS de cfDNA y que existe una correlación al compararlo con los resultados obtenidos por WES (167).

También se ha estudiado la inestabilidad del número de cromosomas (a menudo se expresa como grandes ganancias y pérdidas somáticas en el tumor cfDNA) a partir del perfil global de SCNA como una manera de poder cuantificar la respuesta al tratamiento a través del cfDNA mediante NGS (168). En este estudio se incluyeron pacientes con distintos tipos de tumores que iban a recibir tratamiento con ICIs o ICIs en combinación

con otra quimioterapia, un tratamiento diana o radioterapia y se monitorizaron los cambios observados en la inestabilidad del número de copias alteradas durante los primeros ciclos comparados con los marcadores tumorales. El objetivo fue definir la eficacia del tratamiento por criterios radiológicos RECIST 1.1 e irRECIST, así como analizar la eficacia de la monitorización de la inestabilidad del número de copias alteradas y determinar su equivalencia con los marcadores tumorales en plasma. El estudio demostró que en 51 de 56 pacientes existía una elevada inestabilidad del número cromosómico (más alta en pacientes con cáncer de pulmón) que se correlacionaba con una alta carga tumoral. Además, la variación de la inestabilidad del número de cromosomas producía una predicción correcta de la progresión en los pacientes y la inestabilidad del número cromosómico permitía diferenciar los casos de pseudoprogresión o de progresión (168).

A pesar de todo, el papel del SCNAs *burden* a partir de cfDNA como biomarcador de respuesta relacionado con la SLP a inmunoterapia en NSCLC avanzado no se ha estudiado en profundidad y sigue siendo objetivo de investigación.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La carga de las alteraciones del número de copias somáticas (SCNAs *burden*) es un biomarcador de beneficio clínico en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado tratados con inhibidores de punto de control inmunológico.

3. OBJETIVOS

3.1. Principal

- Evaluar el potencial del SCNAs *burden* determinado en tejido por *Shallow Whole Genome Sequencing (sWGS)* como biomarcador predictivo de beneficio clínico al tratamiento con inhibidores de punto de control inmunológico en pacientes cáncer de pulmón no microcítico avanzado.

3.2. Secundarios

- Establecer la asociación entre el SCNAs *burden* e infiltración tumoral inmune en biopsia de tejido.
- Determinar el valor del SCNAs *burden* por sWGS en biopsia líquida como biomarcador de inhibidores de punto de control inmunológico.

4. MÉTODOS

Se incluyeron pacientes con NSCLC avanzado tratados con inmunoterapia en el hospital de Valle de Hebrón (VH) – Vall de Hebron Institute of Oncology (VHIO). Los pacientes firmaron un consentimiento informado para la conformidad del análisis de sus muestras previamente aprobado por el comité de Ética del hospital (PR(AG)308/2016). Las metodologías del estudio estaban diseñadas de acuerdo a la declaración de Helsinki.

Dividimos nuestro estudio en 2 cohortes:

4.1. Métodos cohorte 1

4.1.1. Pacientes

La cohorte 1 está formada por las muestras tumorales de pacientes que fueron tratados con inmunoterapia entre enero 2013 y enero 2020 (figura 5). Se recogen retrospectivamente muestras de 109 pacientes y se realiza sWGS en 46 muestras, *NanoString*[®] en 20 muestras y a 43 muestras se les realizó tanto sWGS como *NanoString*[®]. En total se realizaron 89 sWGS y 63 *NanoString*[®].

Se analiza el SCNA y se calcula el SCNAs *burden*; se analiza la asociación entre el SCNAs *burden* y el beneficio a inmunoterapia; la infiltración tumoral en RNA por *NanoString*[®] asociado SLP; y se analiza la correlación entre la infiltración inmune y el SCNAs *burden*. El cálculo del SLP se realiza desde la fecha de inicio del tratamiento de ICIs hasta que el tratamiento finaliza debido a progresión de la enfermedad o por exitus del paciente. Cuando el tratamiento termina por otras razones (toxicidad, protocolo...) el paciente es censurado en el momento del fin del tratamiento de inmunoterapia.

4.1.2. sWGS en tejido

Para la secuenciación por sWGS se utilizó DNA tumoral extraído de muestras fijadas en formalina e incluidas FFPE. La extracción de DNA se hizo a partir de entre 5 y 10 cortes de 5 micras utilizando el sistema de extracción automatizado del Kit Maxwell RSC DNA FFPE. Además, se extrajo DNA genómico de sangre periférica para usarlo como referencia utilizando el DNeasy blood & tissue kit (Qiagen).

La construcción de librerías para secuenciación se hizo utilizando el KAPA hyper kit (Roche). Las librerías fueron secuenciadas en el Centro Nacional de Análisis Genómico en una plataforma NovaSeq 6000 para obtener lecturas pareadas de 150 pares de bases hasta alcanzar una profundidad media de 6X.

Las lecturas de secuenciación se alinearon con el genoma de referencia GRCh38 utilizando el algoritmo mem del software BWA 0.7.17. Los duplicados se marcaron con la herramienta mark Duplicates de Picard 2.21.2.

El sWGS (conocido también como LpWGS) se realizó en el DNA de la muestra de FFPE (Maxwell 16 FFPEPlus LEVDNA Purification Kit, Promega, Madison, WI, USA).

4.1.3. Análisis de SCNA

Los archivos BAM se transformaron en WIG usando redcounter y HMMcopy con el parámetro `--window` establecido en 500.000 y el `quality` establecido en 20. A continuación se usó ichor CNA(153) para llamar a SCNA, con los siguientes parámetros `--ploidy: 2,3, --normal: 0.5,0.6,0.7,0.8,0.9, --maxCN: 5, --include HOMD: False, --chrTrain: 1:22, --estimateNormal: True, --estimatePloidy: True, --estimateScPrevalence: True, --scStates: 1,3, --txnE: 0.9999, --txnStrength: 10000, --maxFra cCNA Subclone: 1, --chrs: 1:22, --chrTrain: 1:22`. Ichor CNA es un sistema que utiliza conceptos de algoritmos existentes (156,157) diseñados para cobertura de datos WGS / WES para predecir simultáneamente regiones de CNA y estimar la fracción de tumor en sWGS. De manera que el flujo de trabajo consistía en tres pasos: 1° computación de cobertura de la lectura, 2° normalización de datos y 3° predicción y estimación de CNA de la fracción tumoral (153). Se utilizó como referencia un panel personalizado construido a partir de muestras de sangre.

La pureza de las muestras fue examinada por un patólogo y solo aquellas con más del 20% de tumor fueron secuenciadas. El porcentaje de tumor de las muestras fue también estimado a través de IchorCNA y aquellas inferiores a un 10% fueron descartadas.

Se aplicó un filtro de amplitud de $\pm 0,1$ a los SCNA identificados. Así, consideramos amplificadas aquellas regiones identificadas por ichorCNA y cuya amplitud era superior a 0,1, y consideramos deleciones aquellas regiones denominadas suprimidas por ichorCNA y cuya amplitud era inferior a $-0,1$.

SCNA fue clasificado como clonal o subclonal basándose en el estatus de cada alteración reportado por IchorCNA.

SCNA se dividió en: cromosoma brazo si afectaba a más del 50% del brazo simple del cromosoma, en focal cuando implicaba una región menor del 50%, y se confirmaba alteración cromosómica FGA^{a+c} si afectaba a ambos brazos y como mínimo al 50% del total del cromosoma.

La carga de SCNAs o *burden* SCNAs se definió como el número de eventos o fracciones del genoma alterados (FGA) en cada categoría específica del SCNA.

El número de eventos se contabilizó como el número de amplificaciones y deleciones en la muestra. La FGA se contabilizó como la suma del tamaño de todas las alteraciones encontrada en la región focal del cromosoma, en el brazo del cromosoma o en la totalidad del cromosoma.

4.1.4. Análisis de la asociación entre SCNA en tejido y la SLP a ICIs

El status de SCNA según IchorCNA se realizó con un filtro de amplitud de +/- 0.1 para cada segmento de 500Kb y en cada uno de ellos la muestra se dividió en 3 categorías según dónde estaba la amplificación, la deleción o si no había alteración.

Utilizando pruebas de rango logarítmico, se evaluó el efecto de tener alteraciones en un segmento comparando individualmente la SLP de las muestras inalteradas con muestras con amplificaciones y muestras con deleciones. Finalmente se aplicó la corrección de la prueba múltiple FDR Benjamini-Hochberg.

Asimismo, con la intención de estudiar la asociación entre las alteraciones de cada uno de estos 500kb y la carga de SCNAs de los pacientes, se comparó la FGA^{a+c} de los pacientes que no tenían alteraciones en un segmento con aquellos que presentaban amplificaciones o deleciones utilizando Kruskal–Wallis H-tests.

Los modelos Cox univariantes y multivariantes se crearon utilizando la biblioteca de Python (169) con el parámetro de tamaño de paso establecido en 0.5. Las variables categóricas se transformaron en variables ficticias y las variables numéricas se estandarizaron.

El status de SCNA se obtuvo por cada segmento de 500kb. Se realizó una matriz anotando los segmentos ordenados en las filas, los pacientes en las columnas y el estado del SCNA en las celdas. A los segmentos con deleción se les asignó un 1, los segmentos inalterados un 2 y los segmentos amplificados un 3. A continuación los pacientes se agruparon de manera jerárquica según Hierarchy linkage function from the la biblioteca Python (169).

4.1.5. Análisis de la infiltración linfocitaria en tejido por NanoString©

Se realizó una tinción del tejido con hematoxilina-eosina para confirmar la presencia de células tumorales invasoras y determinar el área del tumor.

Para la purificación del RNA se utilizaron entre 1 y 5 portaobjetos de FFPE de 10 micras para cada muestra de Roche High Pure FFPE RNA Kit de aislamiento. Para evitar la contaminación de la muestra se realizó macrodissección de la muestra cuando fue necesario.

El análisis de las muestras se llevó a cabo por *NanoString*[®] utilizando la plataforma de nCounter[®] *PanCancer Immune Profiling Panel*, siendo necesarios 50 ng de RNA. El análisis se realizó en base a *Gene Expression Data Analysis Guidelines* (170). Como medidas de calidad se utilizaron el valor medio de los genes constitutivos y el valor medio positivo. Valores medios de los genes constitutivos por encima de 10 o por debajo de 0,1 y valores medios positivos mayores de 3 o inferiores a 0,3 se descartaron. El número de genes constitutivos por debajo del límite de detección se utilizó como filtro adicional para determinar la calidad de la muestra, de manera que aquellas muestras que tuvieron más de 2 genes constitutivos por debajo del valor negativo fueron descartadas.

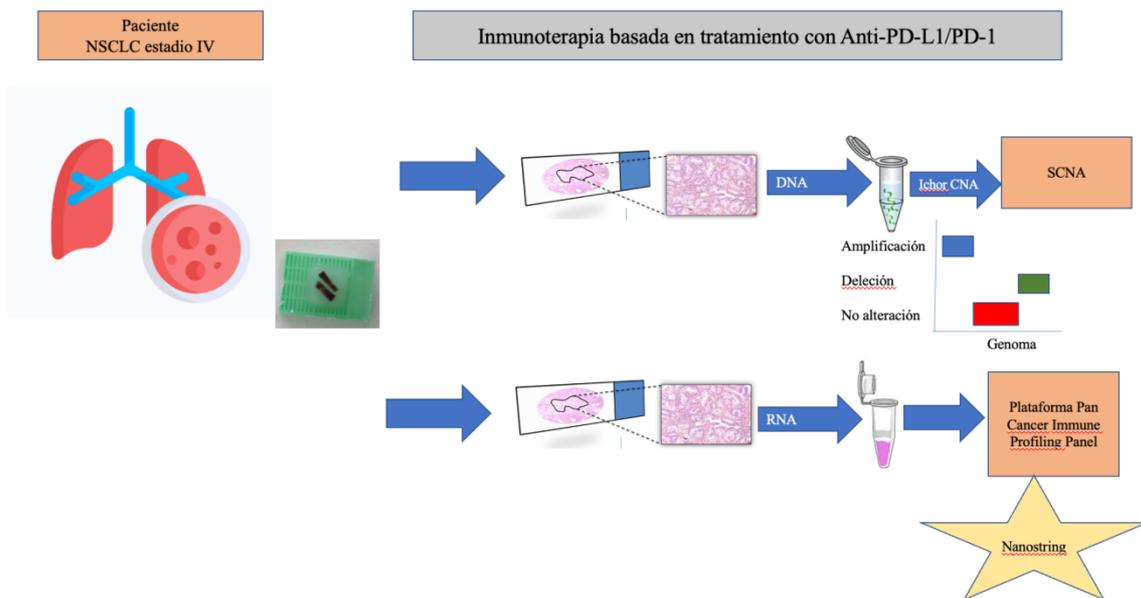


Figura 5. Análisis de las muestras de la cohorte 1.

4.2. Métodos cohorte 2

4.2.1. Pacientes

La cohorte 2 incluye las muestras de plasma de pacientes que se trataron con inmunoterapia en primera o segunda línea desde el año 2016 al 2019. Para ello, se extrajo sangre a todos los pacientes antes del inicio del tratamiento y después de cada ciclo de

tratamiento (2-3 semanas) hasta que se decidía no dar más tratamiento, bien por progresión o por pérdida de beneficio clínico. Se estableció el análisis en la muestra basal, a los 80 días y en el fin de tratamiento. Se incluyeron 80 pacientes, pero se descartaron 36 (2 por no ser NSCLC, 12 pacientes no tenían muestra recogida al inicio del tratamiento y 22 pacientes se perdieron durante el seguimiento), quedando un total de 45 pacientes con NSCLC avanzado tratados con inmunoterapia. Se analiza el ctDNA y el SCNAs *burden* y su relación con la SLP.

4.2.2. Extracción de sangre y obtención de plasma

Los pacientes que iban a iniciar tratamiento con ICIs, eran identificados como potenciales candidatos a la inclusión en el proyecto. En consultas externas de oncología, se les explicaba el proyecto, y tras su aceptación, se firmaba el consentimiento informado establecido. A continuación, se programaba el inicio del tratamiento previa extracción de sangre. Posteriormente se repetía la extracción después de cada ciclo de tratamiento (2-3 semanas).

Se extrajeron 20 mL de sangre utilizando tubos EDTA. Para la obtención de plasma se realizaron dos centrifugaciones de 20 minutos a 4°C, la primera a 200 g y la segunda a 400 g. El plasma se conservó a -80°C hasta el momento de la extracción del cfDNA.

4.2.3. Análisis de sWGS de cfDNA

Las muestras de plasma se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 16000 g. El cfDNA se extrajo de 2 mL de sobrenadante de plasma utilizando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (QIAGEN) y se utilizaron al menos 4 ng de cfDNA para la preparación de bibliotecas de códigos de barras utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ADN NEBNext® Ultra™ (New England Biolabs). Las bibliotecas se secuenciaron en una plataforma HiSeq2500 para generar lecturas de un solo extremo (50 pb) con un objetivo de cobertura de objetivo media de 0,3x.

La extracción del DNA de la sangre se hizo a través de DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN). La fracción de ctDNA se obtuvo a través de ichorDNA (171) (figura 6).

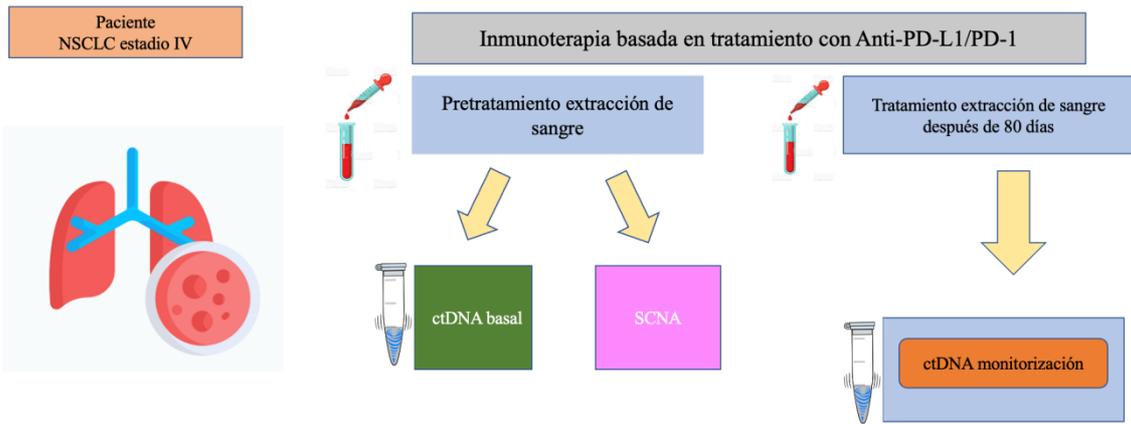


Figura 6. Análisis de las muestras de la cohorte 2.

5. RESULTADOS

5.1. Cohorte 1: Análisis del SCNAs burden en tejido en respuesta a ICIs

5.1.1. Características de los pacientes

De los 109 pacientes diagnosticados de NSCLC avanzado tratados con inmunoterapia, 78 eran adenocarcinomas, 21 escamosos, 6 neuroendocrinos de célula grande y 4 NOS (figura 7).

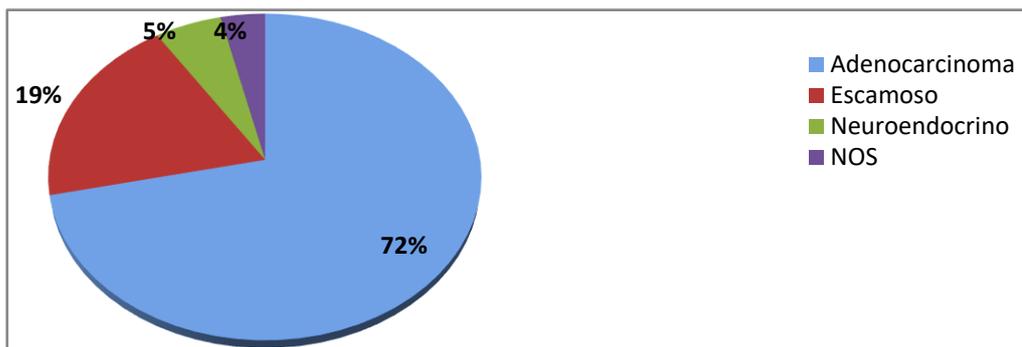


Figura 7. Representación histológica de la cohorte de los pacientes.

La mediana de SLP al tratamiento con ICIs en nuestra cohorte fue de 4,6 meses (0 - 73,5).

Características		N (%)
Edad (media +/- DE)		59 +/- 10
Sexo	Hombre/Mujer	71/38 (65/35)
Hábito tabáquico	Ex/fumador	96 (88)
	Nunca fumador	13 (12)
Localización de metástasis	Cerebral	27 (25)
	Óseas	29 (27)
	Hepáticas	31 (28)
	Otras	22 (20)
	localizaciones	
Tratamiento	IO	93 (85)
	IO + QT	11 (10)
	IO + TKI	5 (5)
Línea de tratamiento		IO 29 (72)
	Primera	40 (37) IO + QT 9 (23) IO + TKI 2 (5)
	Segunda	50 (46) IO 48 (96) IO + QT 2 (4)
	Tercera	10 (9) IO 10 (100)
	Cuarta	6 (5) IO 3 (50) IO + QT 3 (50)
	Quinta	2 (2) IO 2 (100)
	Sexta	1 (1) IO 1 (100)

Tabla 1. Características de los pacientes cohorte 1. ICIs: inhibidores de punto de control inmunológico. ICIs + QT: inhibidores de punto de control inmunológico + quimioterapia. ICIs + TKI: inhibidores de punto de control inmunológico + inhibidor de tirosin kinasa

5.1.2. Análisis del SCNA en tejido y su correlación como biomarcador predictivo. Alteraciones cromosómicas.

Los pacientes de la cohorte tenían una media del 44,9% de su genoma afectado por SCNA, correspondiendo un 24,3% a amplificaciones y un 20,7% a deleciones. El genoma se dividió en segmentos de 0,5 Mb obteniendo un total de 4826 segmentos y se agruparon las muestras según la alteración del número de copias realizando un clustering jerarquizado. Se diferenciaron 6 clústeres diferentes según los distintos niveles de alteraciones (figura 8). Además, se seleccionaron las características clínicas más relevantes de los pacientes (sexo, hábito tabáquico, localización de la obtención de la biopsia e histología) para ver si existía alguna correlación con los diferentes clústeres (figura 8).

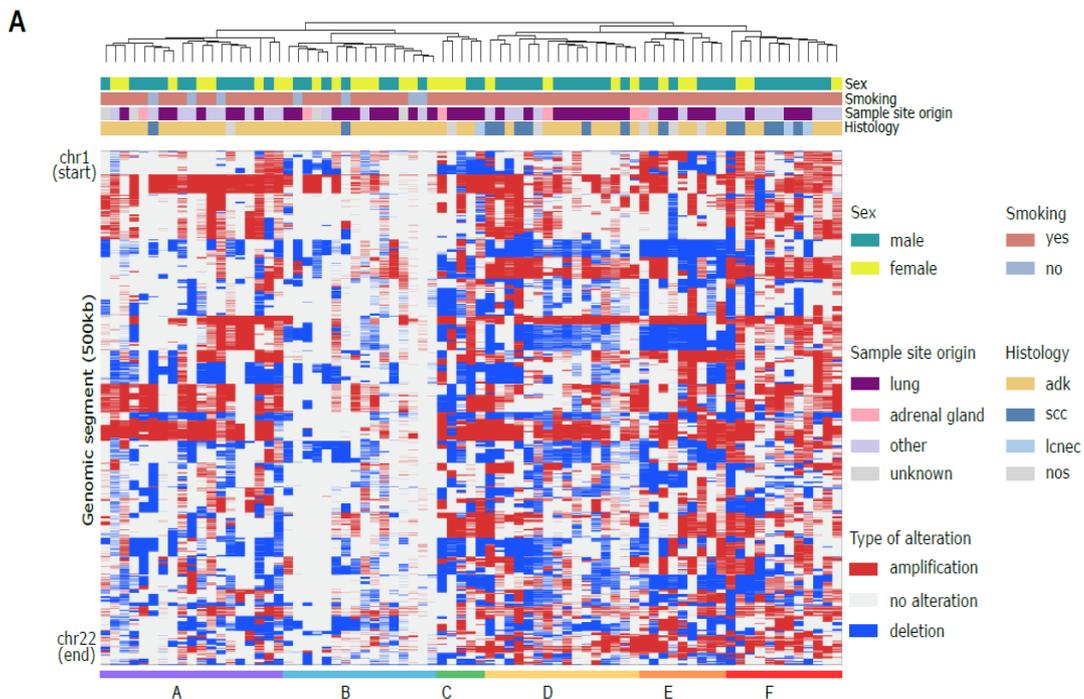


Figura 8. El clustering de todos los pacientes de la cohorte basado en el perfil de SCNAs de fragmentos de 0,5 Mb.

En el cluster B se detectó el menor número de alteraciones con una mediana de segmentos alterados de SCNA de 528,5, en el cluster A se detectó una mediana de 995,5, en el cluster D una mediana de 1204,5, en el cluster F 1247, en el cluster E 1436 y en el cluster C la mediana de segmentos alterados fue la más alta con una mediana de 1593.

Posteriormente se analizó la SLP entre los 6 clusters a través de una curva de Kaplan Meier y se encontraron diferencias significativas entre algunos clusteres, siendo el cluster F el de mayor SLP (cluster A vs B, cluster A vs E, cluster B vs E y cluster E vs F, *log-rank test*, $p = 0,004, 0,047, 2 \cdot 10^{-5}$, y $0,020$, respectivamente) (figura 9). Los pacientes en cluster B tenían una SLP de 406 días de mediana, mientras que el cluster A o E tenían medias de SLP inferiores; 126 y 49 días respectivamente (figura 9).

Estos resultados sugieren que el SCNAs *burden* tiene un impacto en la SLP en los pacientes con NSCLC tratados con inmunoterapia.

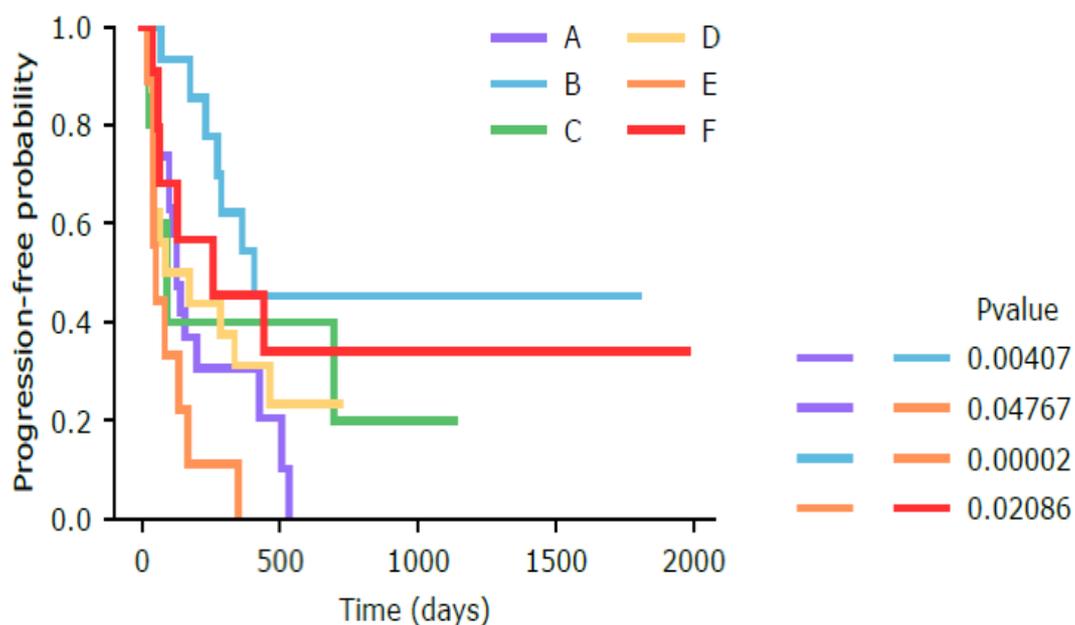


Figura 9. Curva de supervivencia de Kaplan Meier, en los 6 clusteres identificados.

5.1.3. SCNAs *burden* como biomarcador de SLP a la inmunoterapia

Basándonos en las diferencias de SLP entre los diferentes clusteres quisimos profundizar y definir mejor el SCNAs *burden* como marcador de beneficio a inmunoterapia. Para ello se determinó cuál era la mejor manera de asociar el SCNAs *burden* con el beneficio a ICIs y se identificó el SCNAs *burden* como la suma del número de alteraciones o bien como la FGA. En el análisis de la regresión de Cox se observó que al definir el SCNAs *burden* como el número de alteraciones no se asociaba significativamente a SLP ($p = 0,052$), en cambio, sí se definió el SCNAs *burden* como FGA, se detectó una fuerte asociación entre ambos ($p = 0,008$) (figura 10).

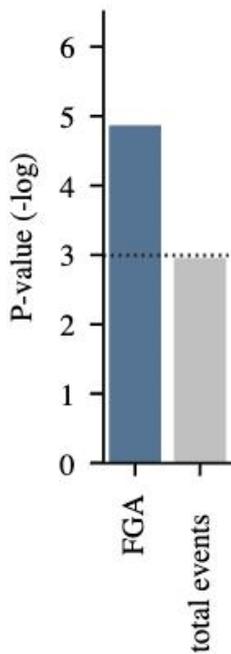


Figura 10. Asociación entre SLP y SCNAs *burden* según FGA o suma de número de alteraciones.

A partir de ahí identificamos el SCNAs *burden* como FGA y analizamos si características particulares como la clonalidad podían influir en el FGA.

Analizamos las diferencias entre eventos clonales y subclonales utilizando el método IchorCNA. Mediante la regresión de Cox se observó que, independiente de la clonalidad, el FGA de todas las alteraciones se asociaba con un impacto en la SLP ($p = 0,008$), siendo además el mejor predictor (Cross-validated c-index: 0,64); y si se diferenciaba por evento clonal también se asociaba a beneficio a inmunoterapia ($p = 0,017$) (Cross-validated c-index: 0,63) (figura 11). Los eventos subclonales no fueron informativos de SLP a inmunoterapia ($p = 0,201$).

Analizamos también si la carga de la amplificación o de la delección podía influir en la SLP, tal y como se había demostrado previamente en melanoma (136). Evidenciamos que el FGA de todas las alteraciones (SCNAs *burden*) se asociaba a mejor SLP ($p = 0,008$) que la carga de las amplificaciones ($p = 0,015$) o de las delecciones ($p = 0,043$) por separado (figura 12).

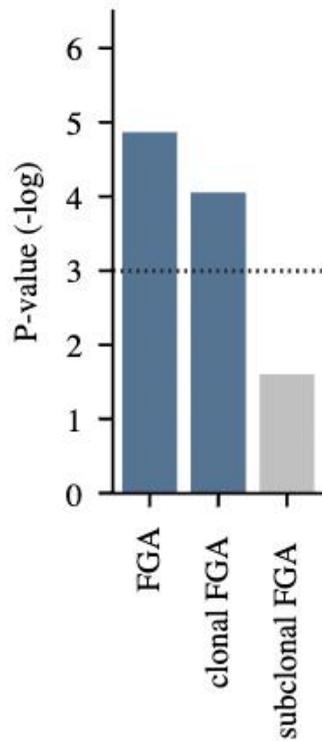


Figura 11. Asociación entre SLP y FGA según sea clonal o subclonal.

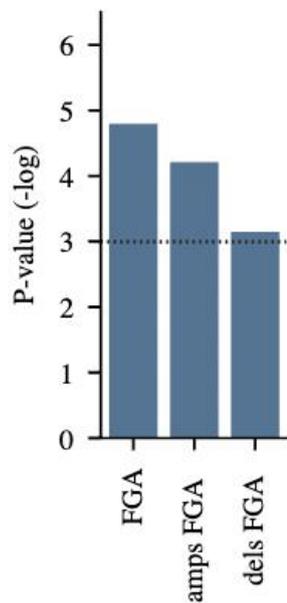


Figura 12. Asociación entre SLP y FGA según presenten amplificación o delección.

Más adelante valoramos si según los tres tipos de SCNA, clasificado por tamaño de la alteración: alteraciones focales del cromosoma (FGA^f), alteraciones del brazo del cromosoma (FGA^a) y alteraciones del cromosoma entero (FGA^c), se podía definir una

mejor SLP. A través de un análisis de regresión de Cox univariado demostramos que aquellas alteraciones en el FGA^a o alteraciones en FGA^c o la suma de ambas se asociaban a beneficio a inmunoterapia, a diferencia de las alteraciones FGA^f que no suponía ninguna ventaja en SLP ($p > 0,05$) (figura 13).

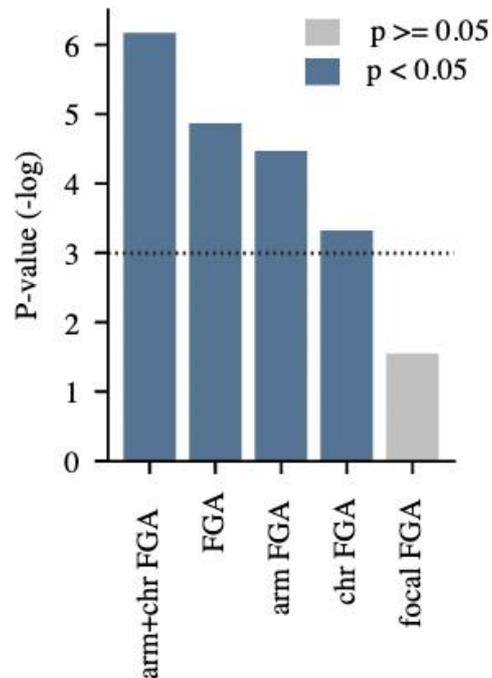


Figura 13. Asociación entre SLP y FGA según los tres tipos de SCNAs (clasificación por tamaño de la alteración).

La asociación de FGA^a + FGA^c demostró tener el mayor impacto en la SLP relacionada con la inmunoterapia ($p = 0,002$) y la mayoría de estas características mostraron un mayor valor predictivo (índice c validado de forma cruzada de FGA^a + FGA^c = 0,65 y FGA^a = 0,66). Con estos resultados se decidió utilizar la suma de FGA brazo + cromosoma (FGA^{a+c}) como manera de medir el SCNAs *burden*.

Analizamos si las distintas características clínicopatológicas de los pacientes (sexo, hábito tabáquico histología, edad, sitio de la biopsia y los días transcurridos entre la obtención de la muestra y el inicio de la inmunoterapia) podían tener un impacto en el FGA^{a+c}. El hábito tabáquico resultó ser una característica diferenciadora en el FGA^{a+c}, de manera que había un mayor *burden* en pacientes fumadores que en los pacientes nunca fumadores ($p = 0,049$) (figura 14).

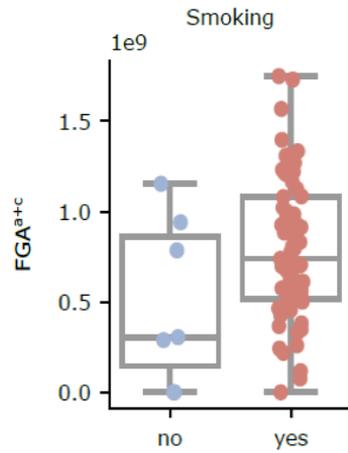


Figura 14. FGA^{a+c} de acuerdo al hábito tabáquico.

Al analizar si el SCNAs *burden* podía tener relación con el lugar de la toma de biopsia demostramos que el SCNAs *burden* era mayor cuando la biopsia se obtenía de la metástasis en lugar del tumor primario ($p = 0,026$) (figura 15). Al examinar el lugar de la metástasis, observamos que en todos los sitios había una tendencia a tener un mayor SCNAs *burden* a excepción de la pleura que no se encontraron diferencias significativas, y fue claramente significativo cuando la biopsia se obtenía del ganglio linfático ($p= 0,016$) o del hígado ($p= 0,025$). El resto de características clinicopatológicas no se asociaron con la FGA^{a+c}.

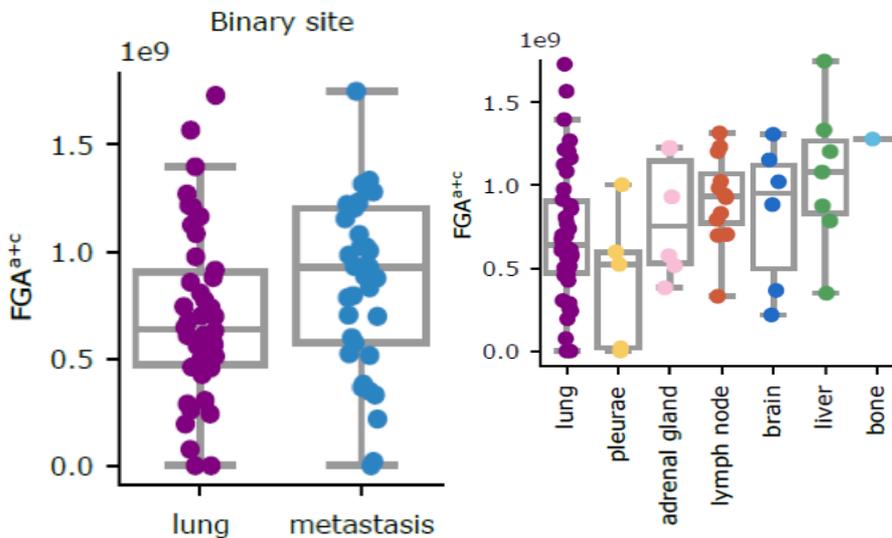


Figura 15. FGA^{a+c} según el lugar de obtención de la biopsia.

Analizamos si la asociación entre FGA^{a+c} y beneficio a inmunoterapia podía estar condicionada por las características clinicopatológicas. Para ello dividimos nuestra

cohorte en varios subgrupos con un mínimo de 15 pacientes, en función de cada una de las características mencionadas. Observamos que la correlación entre el SCNAs *burden* e inmunoterapia era significativa cuando se tenía en cuenta a pacientes fumadores ($p = 3,10^{-4}$), pacientes con adenocarcinoma ($p = 0,007$), se diferenciaban por sexo (mujeres, $p = 0,005$; hombres, $p = 0,045$), cuando se analizaba el lugar de la toma de biopsia (primario, $p = 0,020$ vs metástasis, $p = 0,010$), o cuando los pacientes eran tratados solo con inmunoterapia en monoterapia ($p = 1,8 \cdot 10^{-4}$) (figura 16).

Cabe destacar que la asociación entre FGA^{a+c} y la SLP era más evidente en mujeres que en hombres a pesar de que el número de mujeres era menor (29 vs 48), siendo el valor predictivo más alto en mujeres que en hombres (Cross-validated c-index = 0,74 y 0,60, respectivamente).

Hicimos un modelo de riesgos proporcionales de Cox multivariado ajustado por las características clínicopatológicas a excepción del sitio de la biopsia y confirmamos la asociación entre FGA^{a+c} y la SLP ($p = 1,3 \cdot 10^{-6}$; HR 2,51) (Figura 16). Al ajustar por el sitio de biopsia la significación ($p = 5,4 \cdot 10^{-10}$; un HR 3,19) aumentó sustancialmente (Figura 17).

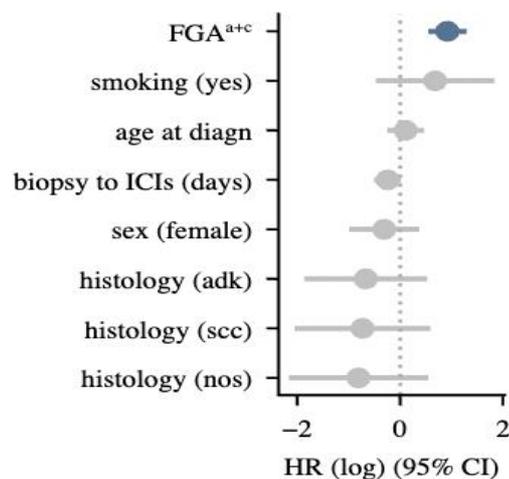


Figura 16. Análisis multivariado que muestra la asociación entre FGA^{a+c} y la SLP en pacientes tratados con inhibidores de punto de control inmunológico en SLP sin ajustar por el sitio de obtención de la biopsia.

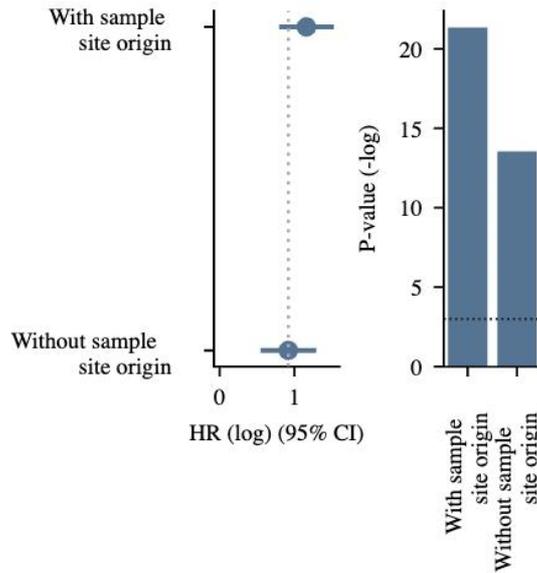


Figura 17. Análisis multivariado que muestra la asociación entre FGA^{a+c} la SLP en pacientes tratados inhibidores de punto de control inmunológico en función del sitio de obtención de la biopsia.

Una vez identificadas las diferencias en la SLP entre la carga de SCNAs de los diferentes clústeres (Figura 8), determinamos las alteraciones concretas que pudieran justificar estas diferencias. Buscamos segmentos en el genoma que justificaran estas diferencias y pudieran relacionarse con un impacto en SLP a inmunoterapia. A pesar de que determinadas deleciones y las amplificaciones se asociaron significativamente a SLP, hubo una fuerte correlación entre la mayoría de las alteraciones y una alta FGA^{a+c} (Figura 18). A pesar de ello, también encontramos alteraciones que se correlacionaban con la respuesta a inmunoterapia, pero no con alto FGA^{a+c}.

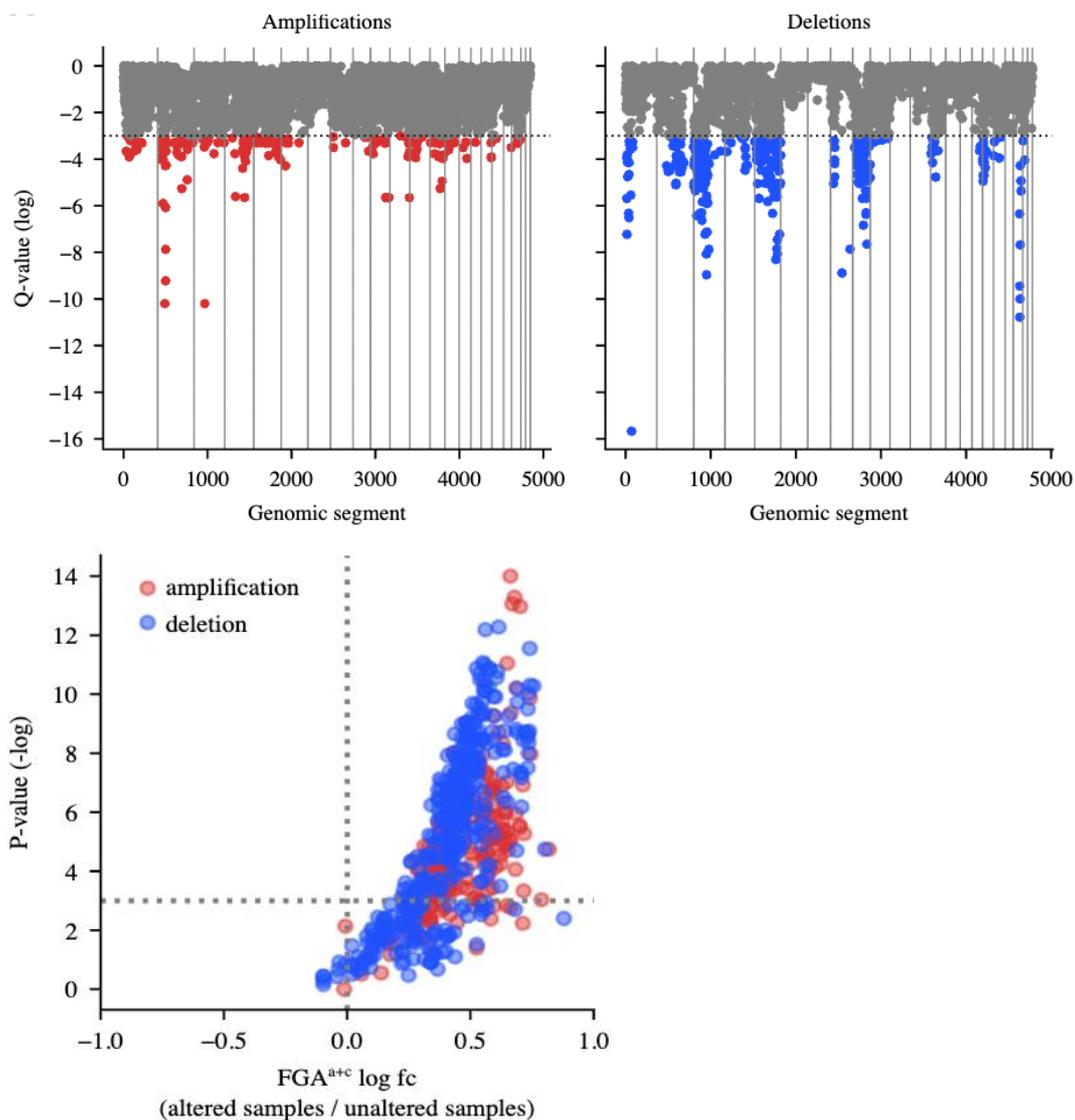


Figura 18. Asociación entre SLP y la alteración en cada segmento del genoma.

a) Características de la infiltración inmune e impacto en la SLP con inmunoterapia.

La infiltración tumoral del sistema inmune se ha asociado con SLP a inmunoterapia (118,161,162). Así, analizamos las características de la infiltración tumoral y que impacto tenía en la SLP el tratamiento con inmunoterapia. Estudiamos 63 muestras a través de un panel génico, en el cual se analizaron más de 700 transcritos relacionados con el sistema inmunológico. Determinamos la abundancia de los diferentes tipos de células inmunes (14 tipos diferentes) en las muestras y los agrupamos de manera jerárquica en un *clustering* (figura 19). Basándonos en la agrupación de las células inmunes se

identificaron tres clústeres con distintos niveles de infiltración inmune y se compararon entre sí para analizar la SLP según el método de Kaplan Meier. La mediana del cluster A (el de mayor infiltrado linfocitario) tenía una mediana de SLP de 215 días, el cluster C una mediana de SLP de 230 días y el cluster B (el de menor infiltrado linfocitario) tenía una SLP de 98 días. Entre los 3 grupos no se observaron diferencias significativas (figura 20).

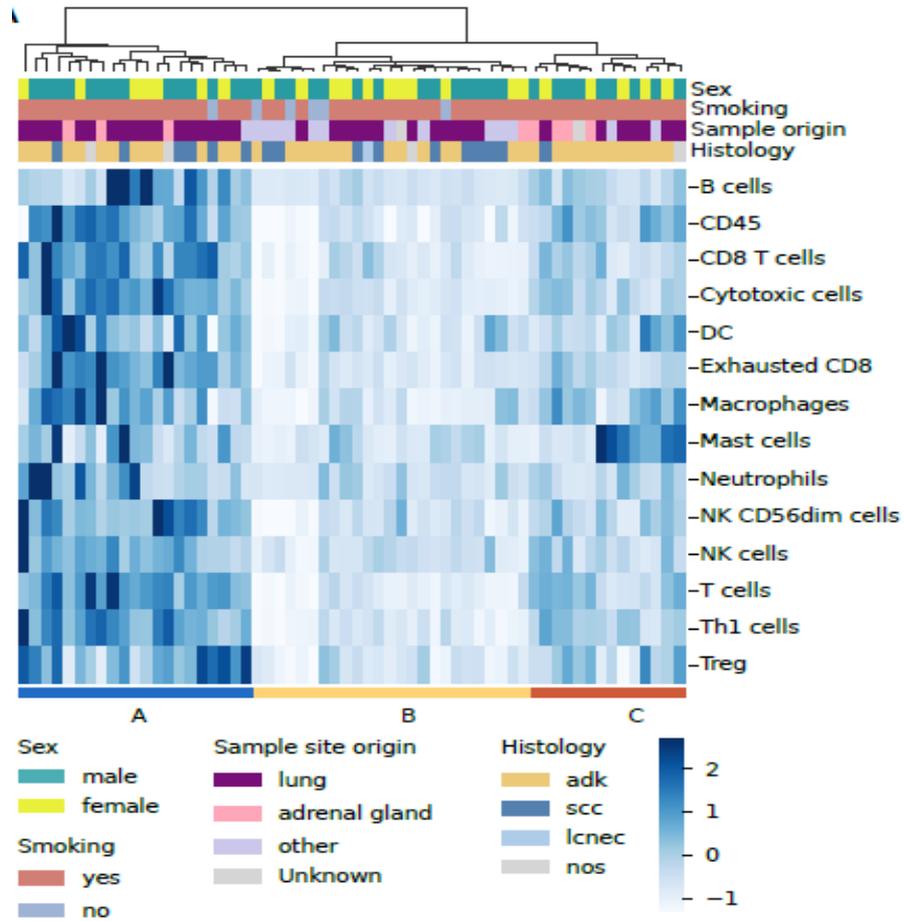


Figura 19. Agrupación jerárquica de los pacientes según la abundancia de las diferentes células inmunes.

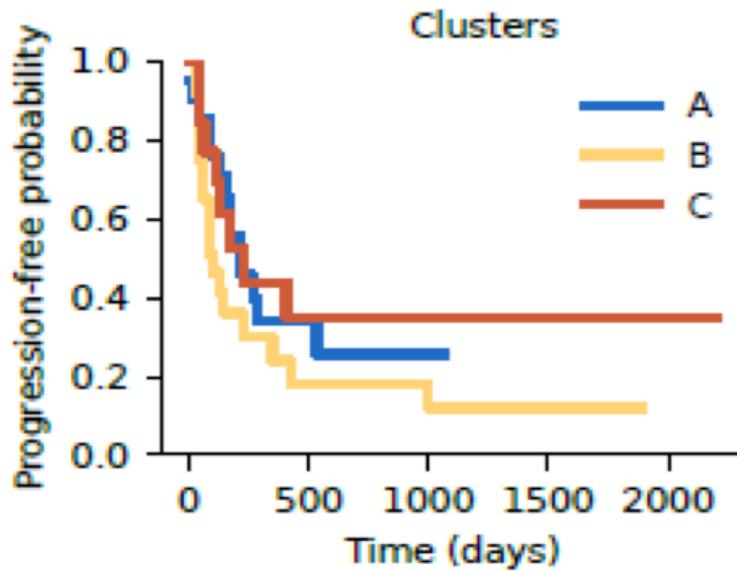


Figura 20. Curva de supervivencia de Kaplan Meier según la SLP en base a los tres clústeres identificados.

Examinamos el impacto que tenían los 14 tipos de células inmune (células B, células CD45, células T CD8, células citotóxicas, células dendríticas, células CD8 exhaustas, macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células NK CD56, células NK, células T, células T helper, y células T reguladora) sobre la SLP. Se estratificaron los pacientes en terciles según la infiltración inmune de cada una de las células inmunes y analizamos su SLP. Así observamos que sólo la presencia de células B alcanzaba una significación estadística cuando se hacía una comparativa entre altos y bajos terciles, de manera que pacientes con mayores niveles de células B presentaban SLP más largas (*log rank test*, $p = 0,043$) (figuras 21, 22).

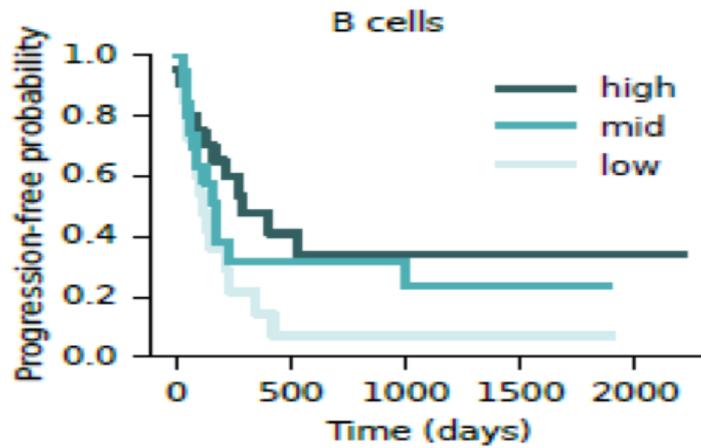


Figura 21. Curva de supervivencia de Kaplan Meier según la cantidad de células B divididas en terciles (alto, medio y bajo).

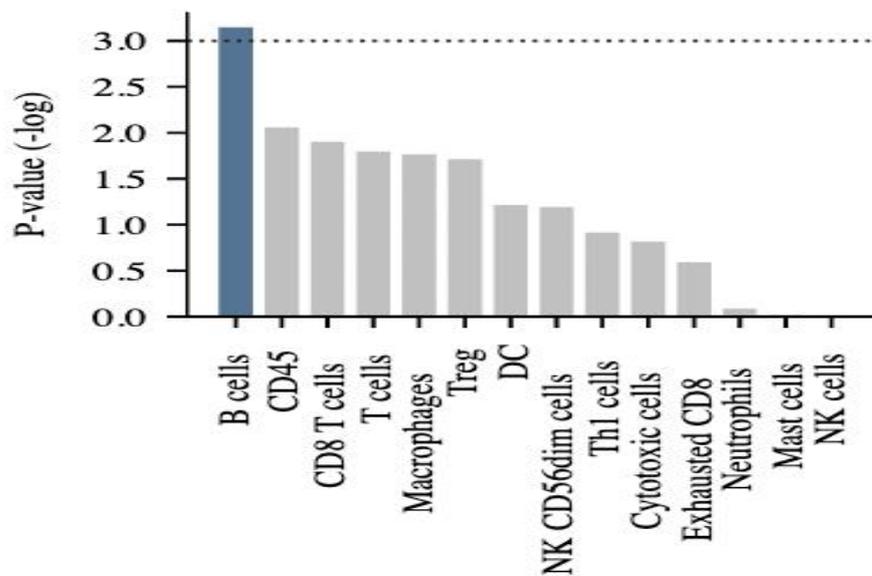
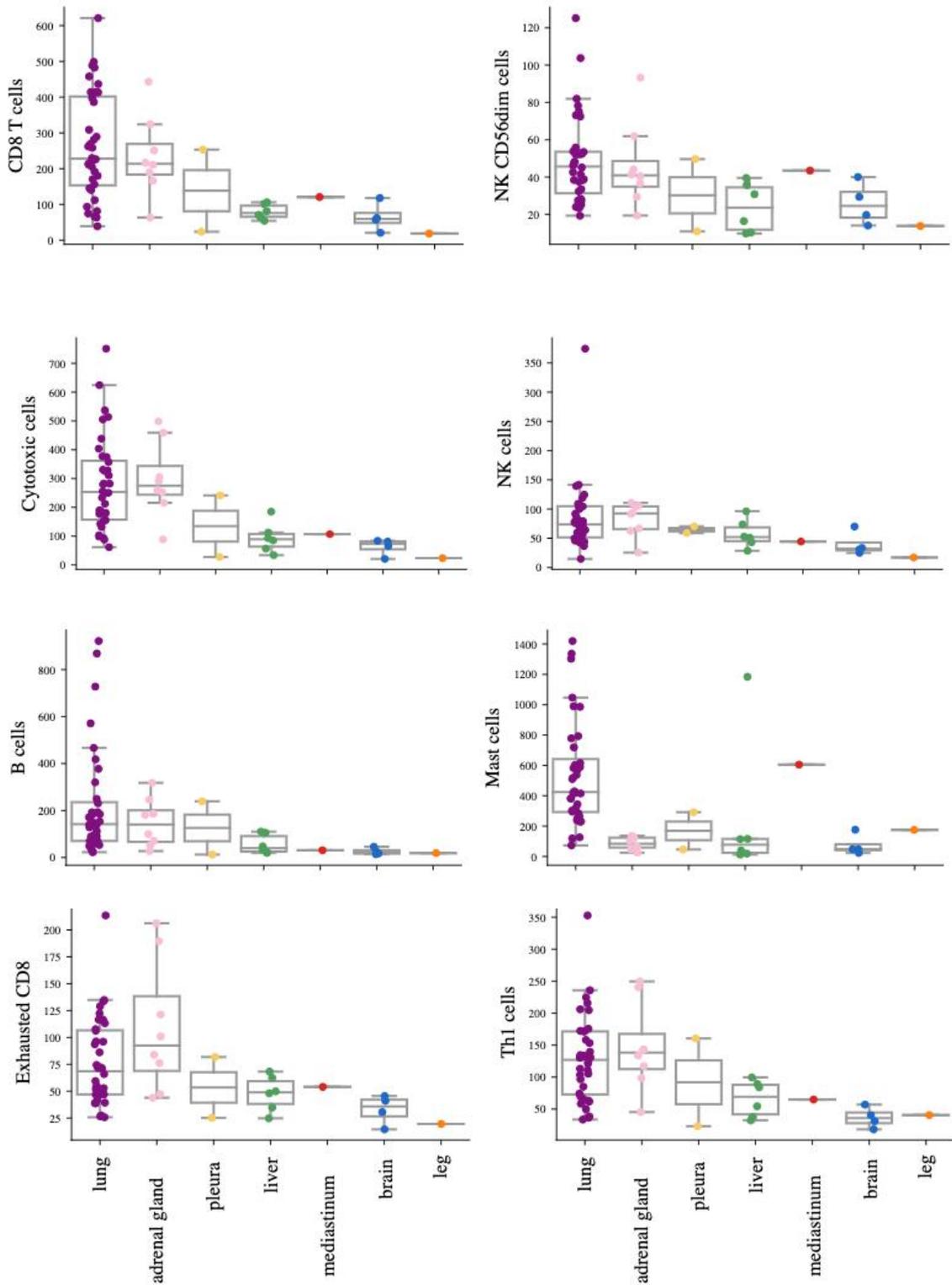


Figura 22. Valor de p en función de la infiltración de los distintos tipos de células infiltradas.

Al igual que se había visto que el FGA^{a+c} era diferente según la zona de obtención de la biopsia, analizamos si podía ocurrir lo mismo cuando se analizaba la infiltración inmune.

Miramos los 14 tipos de células inmunes entre los diferentes sitios de biopsia (figuras23).



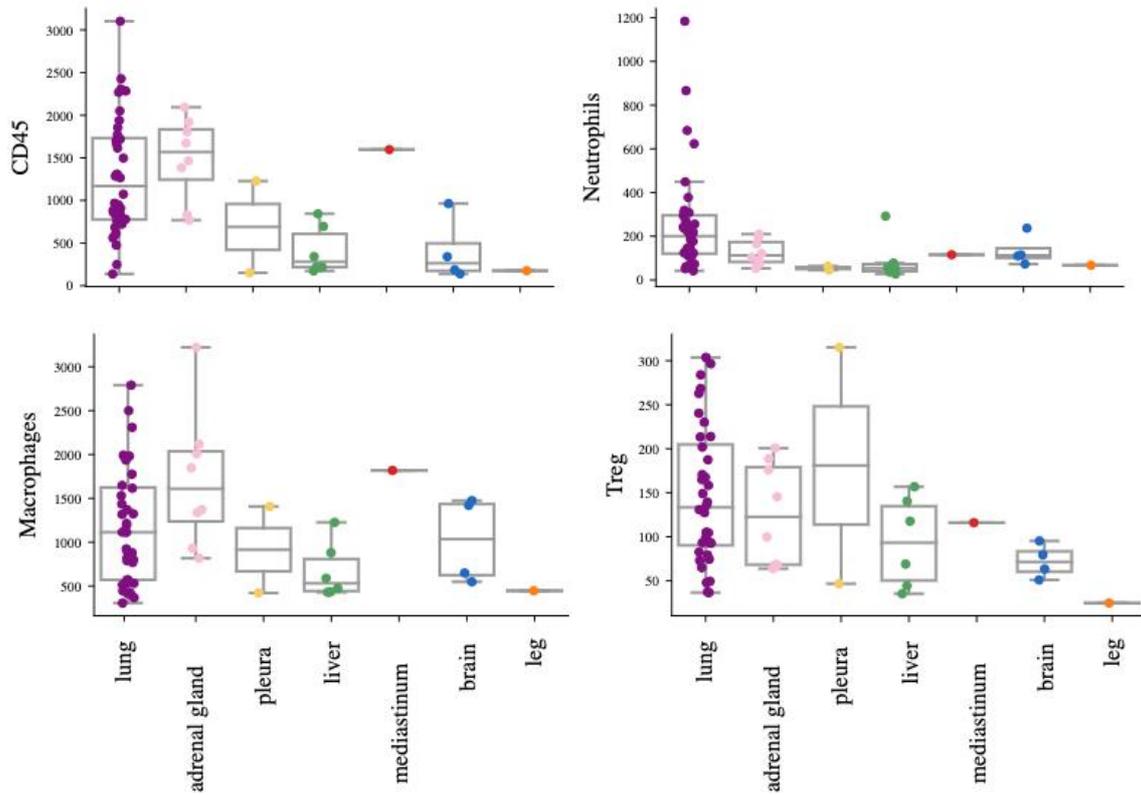


Figura 23. Niveles de las distintas células inmunes según el lugar de obtención de la biopsia.

Cuando la biopsia se obtenía del tumor primario pulmonar se evidenciaba niveles más altos para la mayoría de las diferentes células inmunológicas analizadas: células B ($p = 7,10^{-4}$), células T ($p = 0,004$), células citotóxicas ($p = 0,001$) y mastocitos ($p = 3,2 \cdot 10^{-7}$) (figura 24).

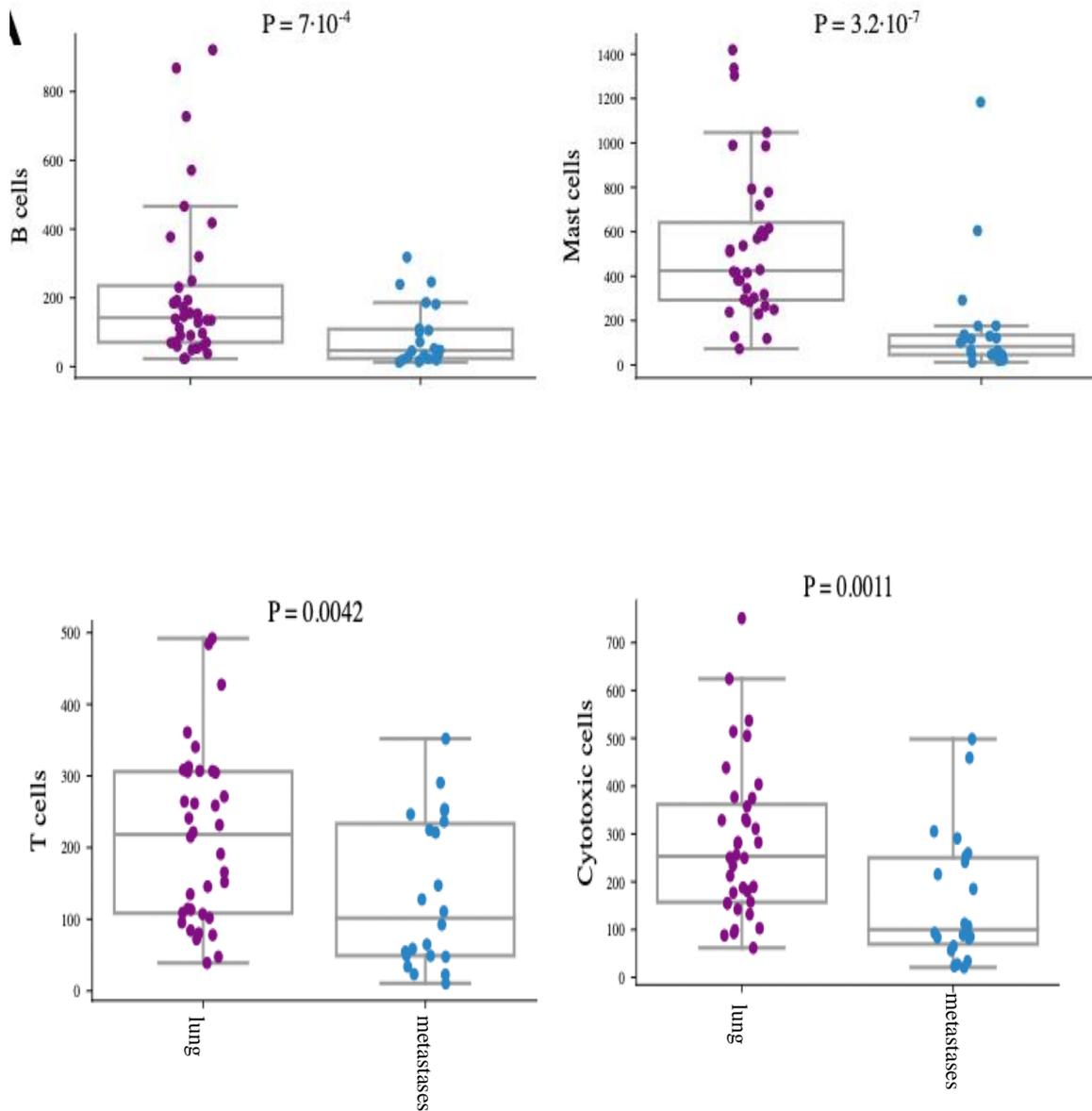


Figura 24. Comparación de los niveles de las células B, mastocitos, células T y células citotóxicas entre el pulmón y el sitio de metástasis.

Sin embargo, observamos algunas diferencias si se analizaban los sitios de metástasis: en el caso de la metástasis suprarrenal presentaba un porcentaje elevado de infiltración inmune (células B, células T, células citotóxicas) similar al tumor primario, en cambio, las metástasis en cerebro e hígado apenas tenían infiltración de células inmunes.

b) Correlación entre la infiltración inmune y FGA a+c

En 37 muestras analizamos su transcriptoma y también obtuvimos su panel de sWGS. Así pudimos establecer las posibles interacciones y corroborar la asociación negativa que existe entre la infiltración inmune y FGA^{a+c}, de manera que a mayor SCNAs *burden* menor infiltración de células inmunes (figuras 25,26).

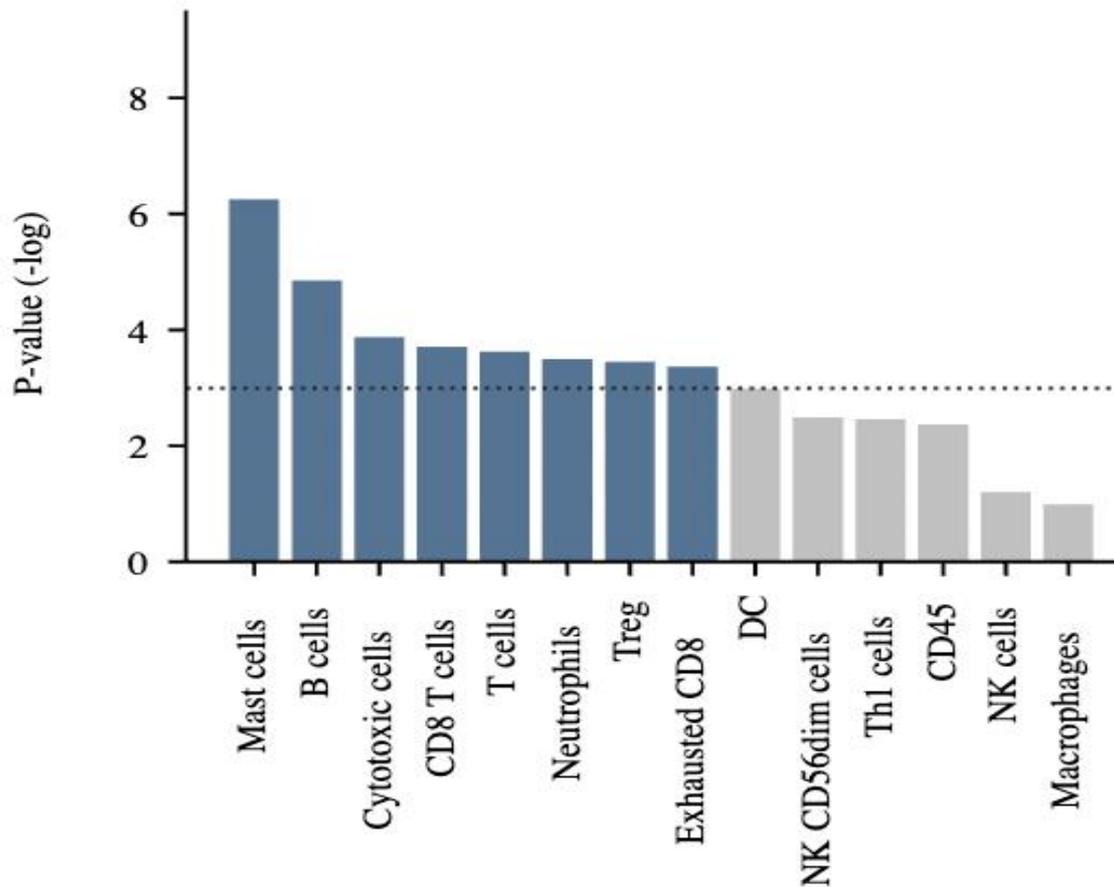


Figura 25. Correlación entre los diferentes tipos de células inmune y FGA^{a+c} independiente del sexo.

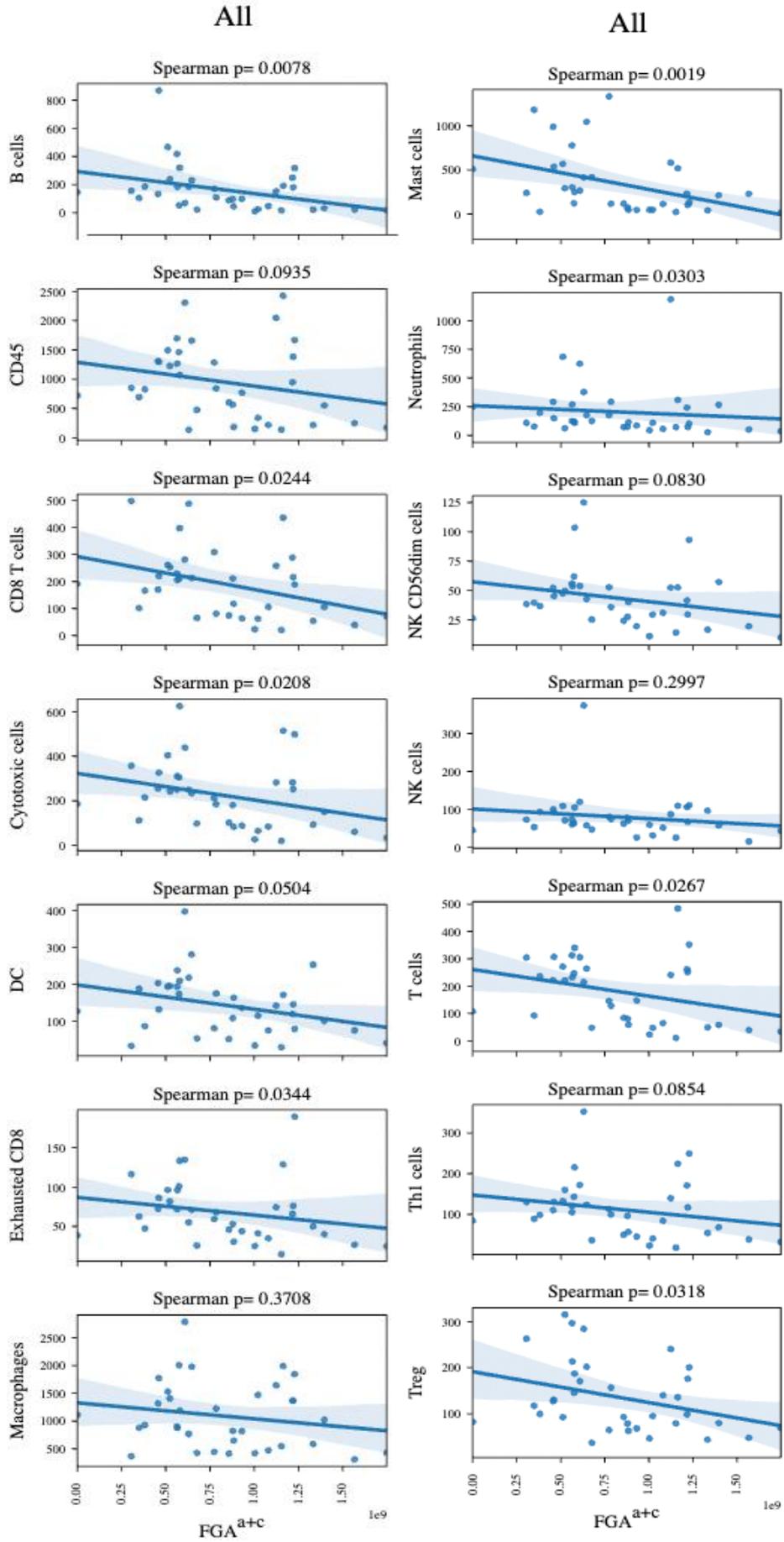


Figura 26. Valor p obtenido de la correlación de Spearman entre los 14 tipos de células inmunes y el FGA^{a+c}.

Analizamos si la correlación negativa que había entre la carga de SCNAs y la infiltración inmune era diferente si se analizaba por sexos (figura 27), observando que, a diferencia de los hombres, en las mujeres sí que existía esta correlación entre el SCNAs *burden* y la infiltración inmune.

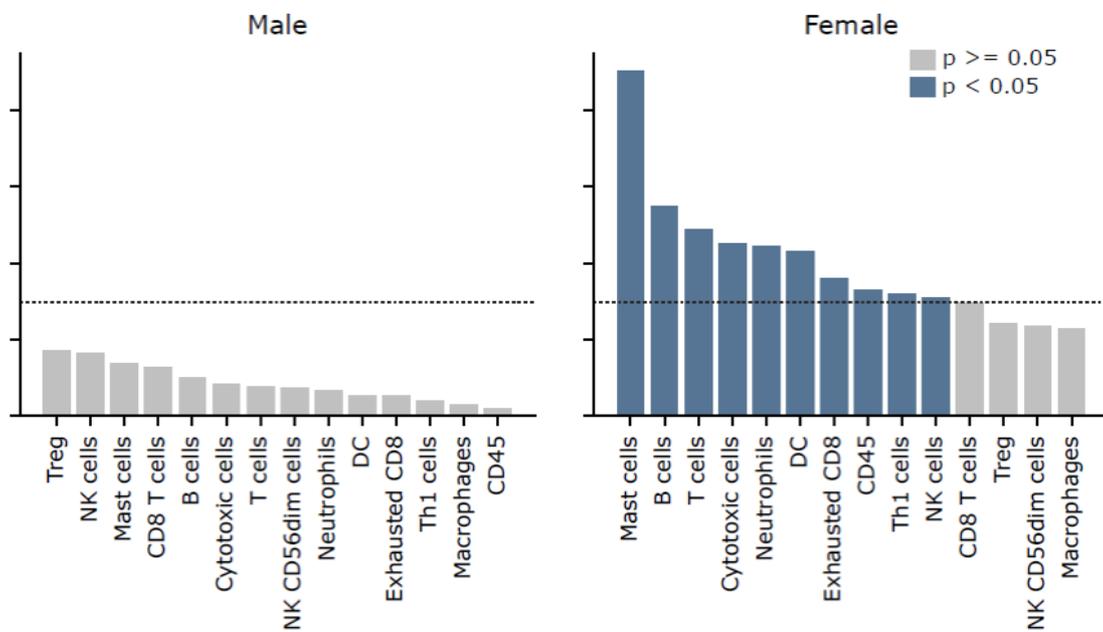


Figura 27. Valor p obtenido de la correlación de Spearman entre las células inmunes y FGA^{a+c} cuando lo dividimos entre los hombres y las mujeres.

5.2. Cohorte 2: Análisis del SCNAs burden en biopsia líquida y SLP a ICIs

5.2.1. Características de los pacientes

Las características de los pacientes incluidos se describen la tabla 2.

Características		N (%)	
Edad (media+/-DE)		68+/-9	
Sexo	Hombre/Mujer	31/14 (69/31)	
Hábito tabáquico	Fumador	14 (31)	
	Exfumador	29 (64)	
	Nunca fumador	2 (5)	
Histología	Adenocarcinoma	33 (73)	
	Escamoso	9 (20)	
	NOS	2 (5)	
	Neuroendocrino de célula grande	1 (2)	
Número de metástasis	Único órgano	22 (48)	
	2 órganos	14 (31)	
	3 órganos afectados	3 (7)	
	4 órganos afectados	3 (7)	
	5 órganos afectados	3 (7)	
	Localización de metástasis	Cerebral	4 (6)
Óseas		14 (19)	
Hepáticas		6 (8)	
Pulmonares		14 (19)	
Ganglios no mediastínicos		7 (10)	
Pleura		12 (17)	
Suprarrenales		11 (15)	
Coroidea		1 (1)	
Peritoneal		1 (1)	
Cardiaca		3 (4)	
Línea de tratamiento	Primera	23 (51)	Monoterapia 8 (35) Combo 15 (65)
	Segunda	22 (49)	Monoterapia 15 (68) Combo 7 (32)

Tabla 2. Características de los pacientes cohorte 2

5.2.2. Muestras pretratamiento

Se analizó inicialmente la fracción de ctDNA circulante mediante ichorDNA de los 45 pacientes. En 18 pacientes no se objetivó ctDNA y en 26 pacientes sí que se pudo detectar fracción de ctDNA (figura 28).

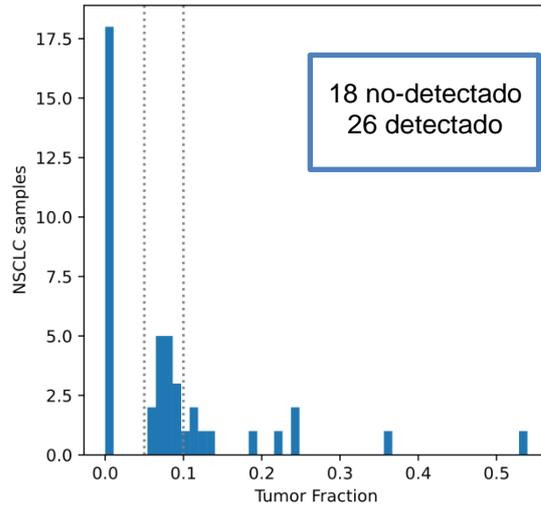


Figura 28. Distribución de la fracción del ctDNA de los pacientes en la muestra pretratamiento.

Comparamos ambos grupos de pacientes y se observó que aquellos pacientes en los cuales no se objetivó ctDNA de manera basal presentaban mayor SLP que aquellos pacientes en los cuales sí se detectó ctDNA (363 días vs 126 días) de manera estadísticamente significativa ($p = 0,031$) (figura 29).

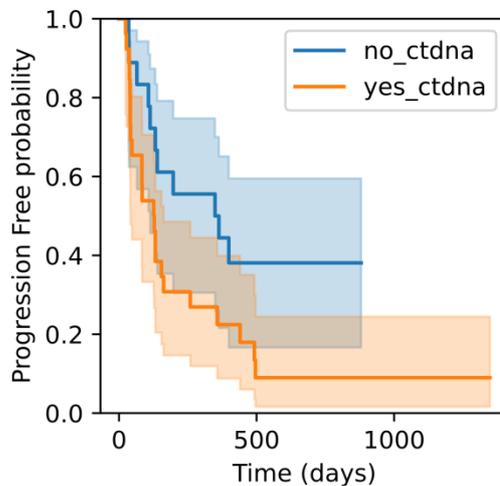


Figura 29. Curva de SLP de Kaplan Meier comparando pacientes con la detección y la no detección de ctDNA pre-tratamiento en plasma.

De los 26 pacientes en los que se detectó ctDNA se establecieron dos grupos diferentes: los pacientes con alta carga de SCNAs y los pacientes con baja carga SCNAs. La mediana de SLP en pacientes con alta carga SCNAs fue de 41 días a diferencia de aquellos con baja carga de SCNAs que obtuvieron una SLP de 121 días (figura 30).

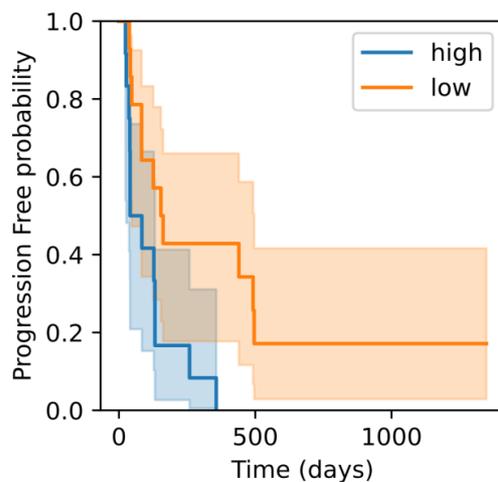


Figura 30. Curva de SLP de Kaplan Meier comparando los pacientes con alto y bajo SCNAs con alto y bajo SCNAs en muestra plasmática basal.

5.2.3. Muestras durante el tratamiento

De estos 26 pacientes con ctDNA, sólo a 14 pacientes se les pudo realizar nuevamente un sWGS en la muestra plasmática obtenida a los 80 días. El resto de pacientes no se pudieron evaluar porque abandonaron el tratamiento por progresión de la enfermedad. A los 80 días, en 8 pacientes no se detectó ctDNA y 6 pacientes mantuvieron ctDNA en sangre. Al calcular la SLP de ambos grupos se observó que aquellos pacientes que no expresaban ctDNA tuvieron una mayor SLP que aquellos que sí liberaban ctDNA (492 días vs 132 días), de manera estadísticamente significativa ($p = 0,009$) (figura 31,32).

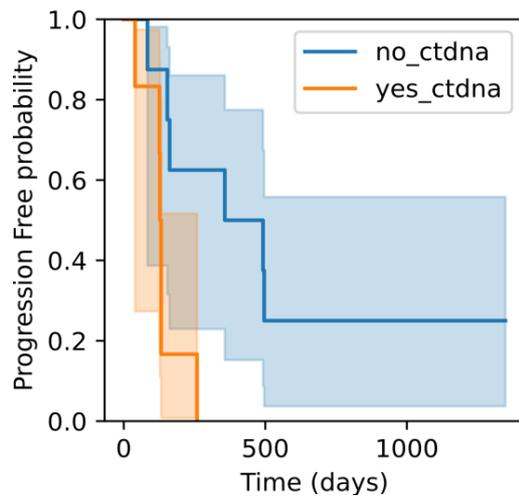


Figura 31. Curva de SLP de Kaplan Meier para los pacientes con detección y aquellos sin detección de ctDNA en la muestra plasmática obtenida a los 80 días del tratamiento con ICIs.

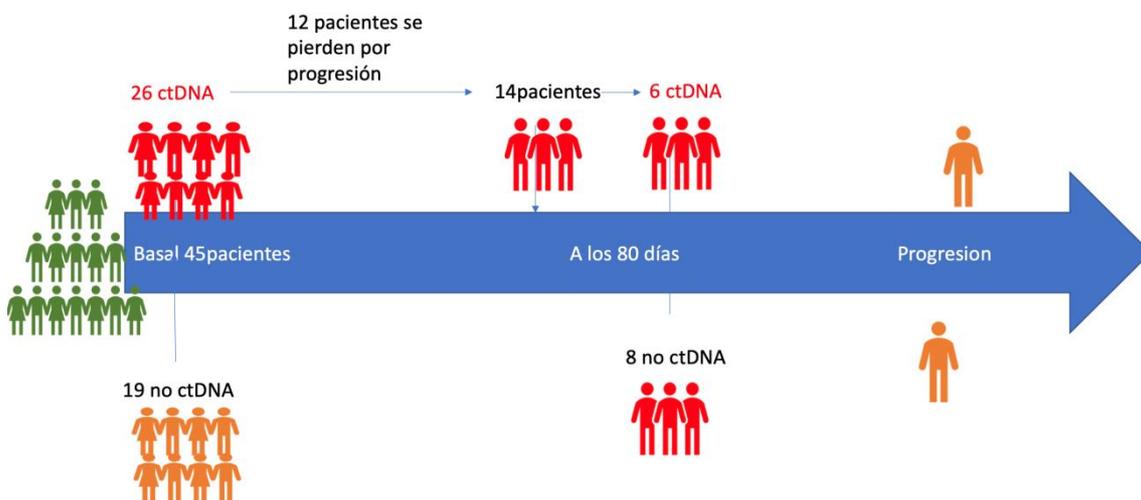


Figura 32. Representación gráfica del ctDNA de las muestras.

6. DISCUSIÓN

Los tratamientos en el NSCLC han avanzado considerablemente gracias a la aparición de la inmunoterapia. Sin embargo, no todos los pacientes se benefician por igual, siendo necesaria la búsqueda de marcadores que puedan definir mejor quiénes se van a favorecer de cada tratamiento. SCNA es un marcador poco estudiado, y aunque estudios previos han demostrado su importancia en la tumorigénesis, aún no queda claro su impacto en la supervivencia (172). La aneuploidía es un proceso seleccionado positivamente durante la transformación oncogénica proporcionando a las células precancerosas la capacidad de evolucionar a células cancerosas. La inestabilidad cromosómica, el proceso que da lugar a la aneuploidía, puede promover la tumorigénesis al aumentar la heterogeneidad genética y promover la evolución del tumor. Sin embargo, la aneuploidía no es un promotor universal de la tumorigénesis pero sí que se puede definir como un evento oncogénico específico del tipo de cáncer pudiendo tener una relevancia clínica como marcador pronóstico y como posible diana terapéutica (134).

Se han identificado SCNA en miles de muestras tumorales de todos los tipos tumorales desde que se dispone del *Cancer Genome atlas* (TCGA). Recientemente el consorcio *Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes* (PCAWG) amplió el número de datos de cáncer al secuenciar el genoma completo de más de 2000 tumores. Los SCNA entre los distintos tumores son diferentes, si bien es cierto que existe una gran heterogeneidad de SCNA para cada tipo de tumor (figura 33) (134).

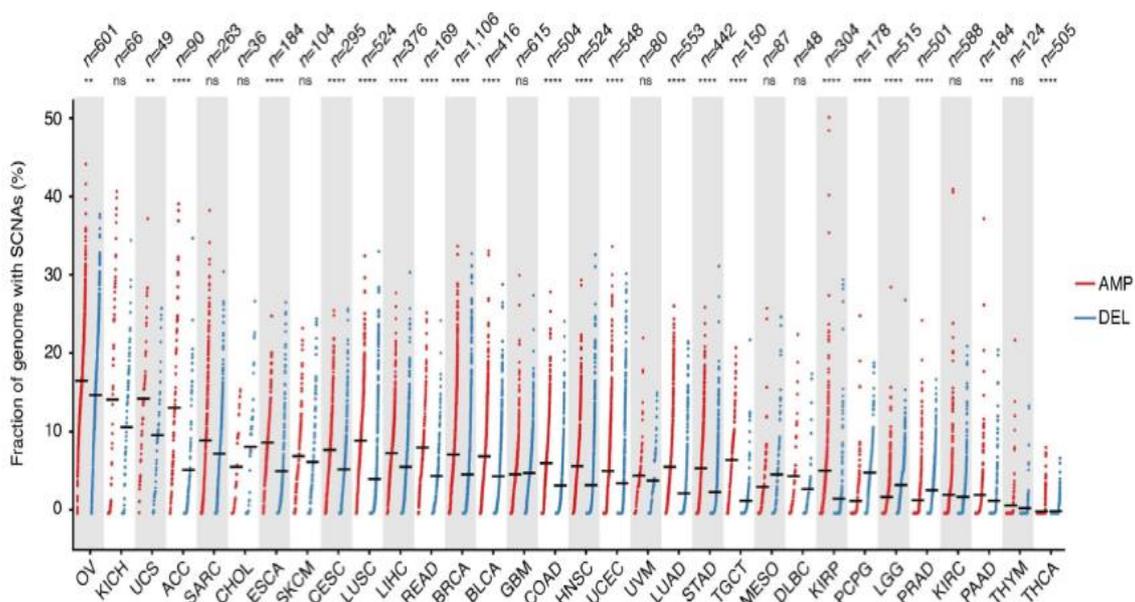


Figura 33. Número de SCNA por tipo de tumor, dividido en amplificaciones o deleciones. [Nota Adaptado “Somatic Copy Number Alterations in Human Cancers: An Analysis of Publicly Available Data from the Cancer Genome Atlas” Harbers L. 2021. Front Oncol (134)].

En melanoma niveles altos de aneuploidía se han asociado con peor pronóstico (173). Davoli et al. estudiaron el impacto que tenía la aneuploidía en la tumorigénesis, no solo en melanoma si no en hasta 12 tipos de tumores diferentes incluyendo más de 5000 muestras del TCGA (136). Establecieron también tres tipos de SCNA: SCNA que afectan todo el cromosoma, SCNA que afectan sólo un brazo y SCNA focal (menos del 50% de un brazo), pues consideraban que tienen un distinto origen biológico. Al contrario que lo previamente descrito (174), donde se observó que los niveles de SCNA son más abundantes en tumores con baja carga mutacional encontrando una correlación positiva entre los niveles de SCNA y el número total de mutaciones en 8 de los 12 tumores analizados, confirmando que el número de mutaciones tiende a correlacionarse positivamente con el nivel de SCNA. Hallaron asociación entre los tumores con mutaciones oncogénicas de la vía de RAS y un menor SCNA, y que pacientes con altos niveles de SCNA, sobre todo focal, mostraron un mayor número de marcadores de proliferación celular y una reducción de los marcadores de infiltrados de células inmunes citotóxicas. Además, encontraron que niveles elevados de SCNA se correlacionaban con peor supervivencia y si se combinaban SCNA y carga mutacional del tumor se observaba una mejor supervivencia tras inmunoterapia (136).

Rohw et al. también describieron una tendencia de una mayor carga de pérdida del número de copias en aquellos pacientes que no respondieron a tratamiento con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 (175). Analizaron el SCNAs *burden* previo al tratamiento con inmunoterapia y a la progresión y vieron que había una tendencia de mayor *burden* en aquellos pacientes no respondedores a los anti-CTLA-4. Posteriormente analizaron el *burden* de los pacientes que a la progresión recibían un anti-PD-1 y obtuvieron un mayor *burden* clínicamente significativo en aquellos pacientes que sí respondían a ICIs (175).

En esta misma línea nosotros analizamos (como previamente hemos enseñado) el SCNAs *burden* gracias a la técnica de sWGS, así como su impacto en la SLP a inmunoterapia. El FGA se asoció a mayor SLP a inmunoterapia que el número de alteraciones. A su vez, analizamos el FGA en base al tamaño y dividimos el FGA en tres tipos: SCNA

cromosoma, SCNA brazo o SCNA focal, igual que Davoli et al. y vimos que la combinación de FGA^{a+c} era la que presentaba una asociación más significativa de respuesta a inmunoterapia, a pesar de que cada una por sí sola (FGA^a/ FGA^c) también tenían un impacto en la respuesta a inmunoterapia (136).

Anteriormente, Rizvi et al. estudiaron el impacto que tenía el TMB analizado por dos paneles diferentes de NGS: WES y MSK-IMPACT™, así como el beneficio asociado a la inmunoterapia(113). Pacientes con un beneficio clínico a la inmunoterapia y/o con respuestas parciales, se asociaban a mayor TMB. Además, relacionando FGA (calculado a partir de paneles de NGS) se observó una relación inversamente proporcional: a FGA más baja los pacientes presentaban mayor beneficio clínico a la inmunoterapia y a más alta FGA menor beneficio clínico. A pesar de esta relación inversa, TMB y FGA se asociaron de manera positiva entre sí y en cambio TMB y PD-L1 eran variables independientes, ambas asociadas con beneficio a la inmunoterapia (113). Esta relación nosotros también la objetivamos en nuestro análisis (a mayor *burden* peor respuesta a inmunoterapia), y que previamente ya habíamos observado cuando analizamos nuestra cohorte de largos respondedores a la inmunoterapia obteniendo un menor SCNA (137). También pudimos identificar qué pacientes con mayor SLP presentaban alto TMB y bajo SCNAs. Concluimos así que la combinación de ambos (TMB y SCNAs) se asociaban con SLP a inmunoterapia, corroborando los datos previamente publicados (113).

Al analizar la relación que podía existir entre el FGA y las características clínico patológicas de los pacientes, observamos que muestras obtenidas en localizaciones metastásicas, principalmente en el ganglio y en el hígado, presentaba mayor FGA que el tumor primario, lo cual coincide con lo descrito en la literatura sobre la heterogeneidad tumoral observada entre el primario y sus metástasis (176). En el cáncer de próstata al secuenciar el tumor original y sus diferentes sitios de metástasis se observó que las metástasis tenían más subclonas parecidas entre ellas. Lo mismo ocurría cuando se comparaban las metástasis de un mismo órgano que eran más parecidas entre sí con respecto a las metástasis de otros órganos. El cáncer de páncreas también ha demostrado ser una enfermedad muy heterogénea demostrando cambios en el ciclo celular en el proceso inicial y una mayor inestabilidad genómica a la hora de su diseminación metastásica (177).

En el cáncer de pulmón se ha descrito esta heterogeneidad al analizar la expresión de PD-L1 en el tumor primario y en los ganglios (178), no existiendo siempre una correlación,

sobre todo cuando el tumor no era adenocarcinoma. En el cáncer de mama (179) también se han observado discrepancias en el PD-L1 siendo más alto en la mama y heterogéneo en cuanto a la localización de las metástasis. En pulmón, tejidos blandos y en los ganglios tenían una positividad más alta en consonancia con el tumor primario y en cambio el hígado, el hueso y la piel tenían porcentajes más bajos de PD-L1. En tumores renales y en melanoma también se han descrito discrepancias en la expresión de PD-L1 (180,181). Existe una tendencia a asociar el hábito tabáquico a la respuesta a la inmunoterapia. Son numerosos los estudios que estratifican a los pacientes por su antecedente tabáquico (35,99,182). Hay publicada una revisión en la cual se han seleccionado nueve artículos de cáncer de pulmón tratados con inmunoterapia y se ha asociado una alta expresión de PD-L1 en pacientes fumadores o exfumadores con un impacto mayor en las tasas de respuesta y con mayor SLP y SG (183). Este efecto probablemente se justifica debido al alto TMB de estos pacientes. Seis de estos estudios correlacionaron una mayor tasa de respuesta entre los pacientes con hábito tabáquico, si bien es cierto que las tasas de respuestas varían en los diferentes estudios, probablemente por el porcentaje de pacientes fumadores. Sólo un único estudio comparó pacientes fumadores y exfumadores y documentó que el pembrolizumab podía ser más efectivo en aquellos pacientes que habían dejado de fumar que en aquellos pacientes que seguían fumando (35). Nosotros vimos como aquellos pacientes fumadores tenían una mayor FGA^{a+c} a diferencia de los nunca fumadores.

La importancia del SCNAs *burden* como marcador de respuesta a la inmunoterapia se ha atribuido a la correlación negativa que existe con la infiltración de células inmunes (184) lo cual explicaría la ausencia de beneficio a la inmunoterapia. Con esta premisa quisimos analizar en nuestra cohorte de pacientes si la infiltración inmune podría establecerse como marcador de SLP a la inmunoterapia y observamos que a menor infiltración peor respuesta a inmunoterapia, pero cercanos al límite de significancia. Si bien es cierto que cuando profundizamos en las diferentes células inmunológicas, obtuvimos que los altos niveles de células B se asocian a mayor SLP. Budczies et al. estudiaron 43 pacientes con adenocarcinoma de pulmón tratados con inmunoterapia y a través del RNA analizaron la expresión de más 700 genes inmuno relacionados y seleccionaron 14 células inmunes para definir la firma de expresión génica de los pacientes (185). Así, una mayor cantidad de células B, CD45 y un total de TILS (CD8 + T contribuían en un 30%) se asoció a una mayor SLP tras tratamiento con inmunoterapia. Además, observaron que el análisis de

células B y CD45 podría predecir mejor SLP a la inmunoterapia, al igual que en una cohorte anteriormente publicada (186).

Previamente también demostramos en una cohorte más pequeña (137) la correlación entre el tratamiento de ICIs y el impacto de la infiltración inmunológica tumoral a través de un panel de *NanoString*[®]. Pacientes con mayor cantidad de células B, CD8 +, NK o T reguladoras se beneficiaban más de la inmunoterapia, pero se correlacionaban negativamente con el *burden* SCNAs (figura 34).

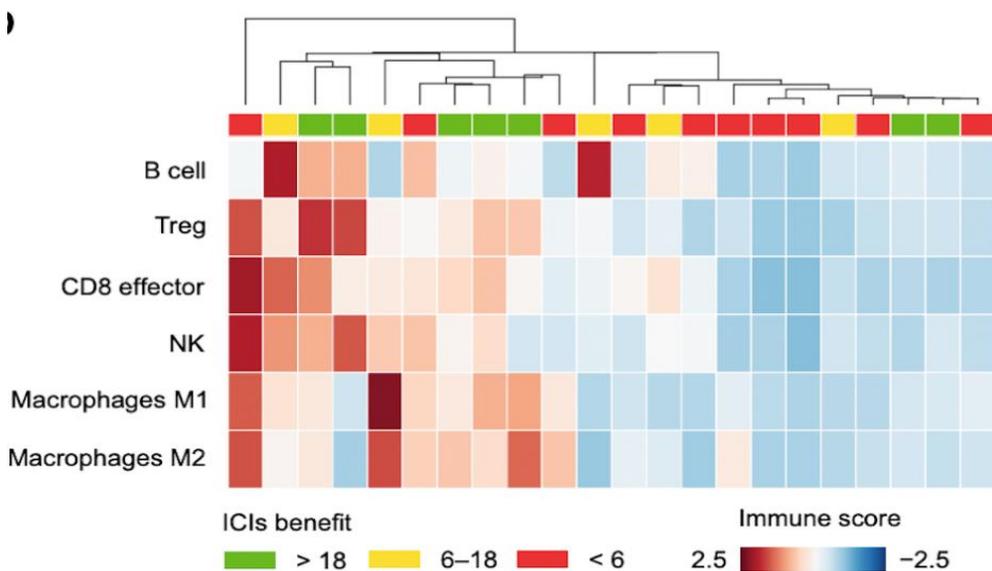


Figura 34. Representación de los diferentes tipos de población celular en 22 pacientes. [Nota. Adaptado de “Molecular profiling of long-term responders to immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer”. Frigola J.2021. Mol Oncol. (137)]

Por otro lado, correlacionamos la infiltración inmune con las características clínicopatológicas de los pacientes. La obtención del lugar de la biopsia fue determinante: las metástasis presentaban una menor infiltración inmune del tumor primario, a excepción de la metástasis suprarrenal. Aunque debido al tamaño muestral el análisis no puede ser concluyente, sí que está en consonancia con lo publicado en la literatura (187). Esta heterogeneidad se ha descrito previamente entre las metástasis cerebrales y el tumor primario de pulmón, observando que las lesiones cerebrales tenían una menor de Th1 o

CD8 + y que los TILs era menores; concluyendo, por tanto, que las metástasis cerebrales tenían una mayor inmunosupresión asociados al tumor y su bloqueo podría ser una buena estrategia terapéutica (188).

Al hacer el análisis por sexos, obtuvimos que la correlación entre el SCNA *burden* y la infiltración inmune era mayor en mujeres que en hombres. Existen señales intracelulares y extracelulares que regulan tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa (189). La respuesta adaptativa en las mujeres se caracteriza por haber un mayor número de células T CD4 +, con mayor proporción de CD4 +/CD8 + más Th2 y mayor capacidad citotóxica de los linfocitos. Por el contrario, los hombres tienen mayor número de células T CD8 +, Th1 y menor número de células B (figura 35).

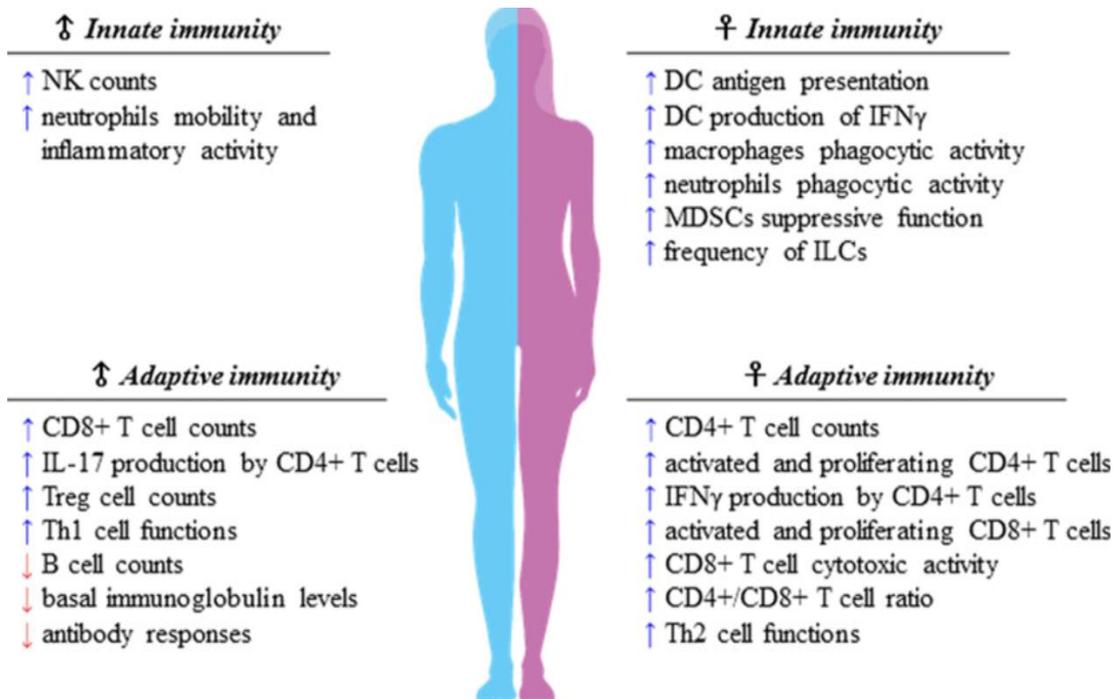


Figura 35. Diferencias del sistema inmunológico según el sexo. [Nota Adaptado de “Sexual Dimorphism of Immune Responses: A new perspective in cancer immunotherapy”. Capone I.2018. Front Immunol (189)]-

Por último, quisimos ver si existía una relación entre SCNAs e infiltración inmune e intentar y definir mejor qué pacientes se benefician de la inmunoterapia. Observamos que determinados niveles de infiltración de algunas células inmunes se correlacionaron negativamente con SCNAs pudiendo ser indicativo de una mayor inestabilidad

cromosómica, conclusión a la que también llega Rizvi et al.: la aneuploidía se correlaciona negativamente con la presencia de células inmunes citotóxicas asociado a una peor supervivencia (97).

La dificultad que implica la obtención de una biopsia y sus riesgos hacen que la biopsia líquida sea una buena alternativa para el análisis del tumor. El cáncer de pulmón es de los primeros tumores donde la biopsia líquida ha sido validada y aprobada para la determinación de *EGFR*. Estudios pivotaes como el POPLAR o el OAK (190,191) han analizado de manera retrospectiva en biopsia líquida el TMB asociándolo a respuesta a inmunoterapia.

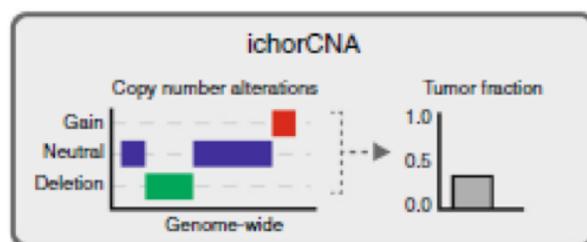
Asimismo, la necesidad de definir mejor aquellos pacientes que van a beneficiarse de los ICIs ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos enfoques, como el análisis de ctDNA antes y después del tratamiento. Varias publicaciones recientes han demostrado cómo se produce un cambio en el ctDNA entre las cuatro y las ocho primeras semanas de tratamiento con inmunoterapia en NSCLC (157,158,192). Todos estos estudios tienen un punto de corte de ctDNA diferente y en un momento determinado distinto, quedando sin resolver cuál es el mejor enfoque del análisis del ctDNA.

Hellman et al. analizaron el ctDNA basal y vieron que aquellos pacientes con niveles indetectables de ctDNA durante el tratamiento, permanecían sin progresión radiológica (193). Goldberg et al también quisieron cuantificar los cambios de ctDNA para predecir una respuesta precoz al tratamiento con inmunoterapia (194). Analizaron a las cuatro semanas de tratamiento, tras el primer ciclo, y se definió “la respuesta molecular de ctDNA” como una caída en el nivel de ctDNA menor del 50% del valor inicial de forma que enseguida vieron grandes cambios en el análisis de ctDNA comparado con el basal: el ctDNA cayó en el 59% de los pacientes que obtuvieron beneficio clínico y no disminuyó en aquellos pacientes en ausencia de beneficio. Es el mismo planteamiento que hicimos nosotros. De manera prospectiva, analizamos el ctDNA basal de nuestros pacientes previo a la inmunoterapia y también obtuvimos los mismos resultados: la ausencia de ctDNA predice una respuesta a la inmunoterapia, lo cual podría justificar usar la determinación basal de ctDNA como posible marcador predictivo de respuesta. Posteriormente, también analizamos la detección de ctDNA a los 80 días de tratamiento realizando sWGS para la detección de ctDNA y así poder establecer el SCNAs *burden*, observando que la SLP era mejor en aquellos pacientes con baja carga de SCNAs.

Hellman et al. también analizaron el ctDNA de pacientes tratados con inmunoterapia de NSCLC con supervivencia mayor de 12 meses (193). Se identificaron 31 pacientes y se analizó el plasma a más de dos años del inicio del tratamiento de ICIs. Sólo en nueve pacientes se pudo analizar el basal y todos ellos tenían ctDNA previo al tratamiento. En el momento del análisis de supervivencia en 27 pacientes no se detectó ctDNA, de los cuales 25 pacientes (93%) se mantenían libres de progresión, pero en los 4 pacientes que habían progresado se detectó ctDNA.

Consideramos que el análisis del ctDNA puede ser una técnica útil para medir enfermedad mínima residual y poder predecir la progresión adelantándose a la progresión radiológica. La homogeneización de las técnicas de ctDNA puede facilitar la personalización del tratamiento con inmunoterapia y avanzarse en aquellos pacientes con alto riesgo de progresión.

El sWGS es una alternativa a las técnicas convencionales de WGS o WES, pero a menor profundidad de secuenciación. Adalsteinsson et al. correlacionaron las técnicas de WES en tejido y en sangre con los datos obtenidos del análisis realizado por ULP-WGS en cfDNA en 520 pacientes metastásicos de cáncer de próstata y de mama (171). Demostraron que la fracción tumoral estimada a través de ULP-WGS de cfDNA concordaba con el WGS de la biopsia tumoral. Posteriormente realizaron WES de cfDNA de los mismos pacientes y los correlacionaron con el WES de las biopsias detectando las mismas alteraciones SCNA. Al comparar ULP-WGS y WES encontraron que existía una alta correlación cuando medían la fracción tumoral (ctDNA) y alta predicción del SCNA. Además, nosotros implementamos la misma herramienta que ellos, ichorCNA, que utiliza algoritmos existentes diseñados para la cobertura de datos de WGS, predice simultáneamente regiones de CNA y estima la fracción de tumor por la técnica *ultra low pass whole genome sequencing* (ULP-WGS) (figura 36).



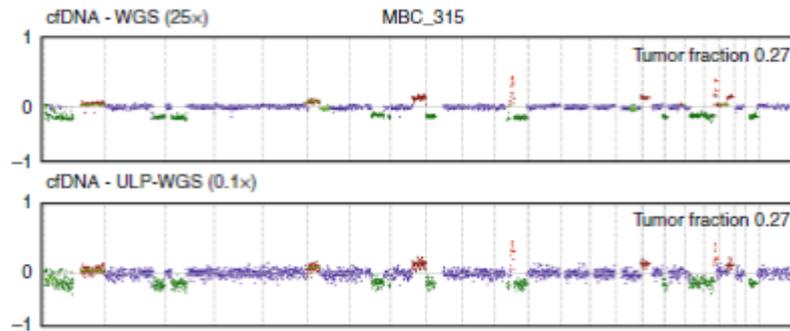


Figura 36. CNA para ULP-WGS de cfDNA x 0.1. Comparación del número de ratios de copias entre ULP-WGS de cfDNA a una profundidad de >10x y WGS de la misma muestra de cfDNA. [Nota: Adaptado de “*Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors*”. Adalsteinsson VA.2017. Nat Commun ((171))]

Un artículo publicado recientemente también utiliza la misma técnica de secuenciación en muestras de cáncer de pulmón. Es una prueba de concepto para demostrar la validez de la técnica sWGS (0,1-0,5 x) para el análisis de SCNAs en diferentes histologías de cáncer de pulmón comparándolo con muestras tisulares. Demuestra que existe una buena correlación entre el número de copias halladas en el tejido parafinado y las encontradas en la biopsia líquida (195).

En nuestro estudio conseguimos, tal y como se describe en la literatura, destacar el papel del SCNAs con la técnica de sWGS, si bien es cierto que hubiera tenido más robustez si se pudieran comparar los datos con las técnicas convencionales WES o WGS.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que las biopsias se tomaron del primario o de la metástasis pudiendo ser la biopsia *per se* un factor de confusión a la hora de utilizar el SCNAs *burden* como biomarcador.

A pesar de que todos los pacientes han sido tratados con inmunoterapia, hay pacientes tratados con combinaciones de inmunoterapia o con combinaciones de quimioterapia más inmunoterapia resultando una cohorte más heterogénea.

Otra posible limitación es la falta de correlación con el PD-L1, lo cual podría haber sido un valor añadido a la hora de poder definir mejor impacto en la SLP a inmunoterapia.

Si nos fijamos en el estudio realizado en biopsia líquida el análisis a los 80 días hace que se pierdan pacientes y no podamos ver qué ocurre con los hiperprogresores seleccionando aquellos pacientes con mejor pronóstico por tener *per se* mayor supervivencia.

7. CONCLUSIONES

- El SCNAs *burden* analizado en muestras de tumor por sWGS se asoció con SLP a ICIs; a mayor SCNAs *burden* menor SLP..
- Existe una correlación negativa entre el SCNAs *burden* y la infiltración de las células inmunes en el tumor, siendo ésta más evidente en las mujeres.
- Se observa una heterogeneidad tumoral, tanto a nivel del SCNAs *burden* como de infiltración inmune tumoral al tener en cuenta la localización de la biopsia (primario o metástasis).
- En la biopsia líquida el uso de sWGS para el análisis del ctDNA y SCNAs *burden* pretratamiento puede ayudar a definir beneficio de SLP a ICIs.

8. LÍNEAS FUTURAS

1. Estudiar la correlación entre los tres biomarcadores SCNAs *burden*, TMB y PD-L1 y relación con la SLP a ICIs en biopsias pretratamiento como marcador predictivo de respuesta a inmunoterapia.
2. Biopsias pareadas al diagnóstico, a la primera evaluación y a la progresión para análisis de SCNAs *burden* en tejido y su correlación con la infiltración inmune a través de paneles de *NanoString*®.
3. Correlación de los niveles de ctDNA analizados por sWGS durante el tratamiento con ICIs y su correlación con respuesta radiológica tras la primera evaluación e impacto en SLP.
4. Correlación de niveles de SCNAs *burden* pretratamiento analizado por sWGS entre la biopsia líquida y la biopsia tumoral en aquellos pacientes que reciben tratamiento en primera línea con quimioterapia más inmunoterapia.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dyba T, Randi G, Bray F, Martos C, Giusti F, Nicholson N, et al. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur J Cancer* 2021;157:308–47.
2. Las cifras del cáncer en España 2021 [Internet]. 2021. Available from: https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espnaha_2021.pdf
3. Wald NJ, Nanchahal K, Thompson SG, Cuckle HS. Does breathing other people's tobacco smoke cause lung cancer? *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Nov;293(6556):1217–22.
4. Timofeeva MN, Hung RJ, Rafnar T, Christiani DC, Field JK, Bickeböller H, et al. Influence of common genetic variation on lung cancer risk: Meta-analysis of 14 900 cases and 29 485 controls. *Hum Mol Genet* 2012;21(22):4980–95.
5. McKay JD, Hung RJ, Han Y, Zong X, Carreras-Torres R, Christiani DC, et al. Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. *Nat Genet* 2017;49(7):1126–32.
6. Fraumeni JF. Respiratory carcinogenesis: an epidemiologic appraisal. *J Natl Cancer Inst*. 1975 Nov;55(5):1039–46.
7. Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P, Chorost S, Tucci C, et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *Am J Heal Promot*. 1992 Sep;6(6):465.
8. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, et al. Tobacco and cancer: Recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(2):99–106.
9. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 1993 Apr;20(2):105–27.
10. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 2009;9(10):749–58.
11. Johnson L, Mercer K, Greenbaum D, Bronson RT, Crowley D, Tuveson DA, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice. *Nature* 2001;410(6832):1111–6.
12. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJLM, et al. K-

- ras Oncogene Activation as a Prognostic Marker in Adenocarcinoma of the Lung . *N Engl J Med* 1990 Aug;323(9):561–5.
13. Campos-Parra AD, Cruz-Rico G, Arrieta O. Genotipificación en cáncer de pulmón de células no pequeñas. *GAMO* 2012;11(1):35–44.
 14. Sos ML, Fischer S, Ullrich R, Peifer M, Heuckmann JM, Koker M, et al. Identifying genotype-dependent efficacy of single and combined PI3K- and MAPK-pathway inhibition in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(43):18351–6.
 15. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010 Dec;2(62):62ra93.
 16. Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: Chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(7):478–87.
 17. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899–905.
 18. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration | *Nature Genetics* 2013;45(10):1134-1140
 19. Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte R V., Schwartz S, et al. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 2002;297(5583):1003–7.
 20. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. Vol. 24, *Trends in Biochemical Sciences* 1999;9(12):M57-60
 21. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997;386(6625):623–7.
 22. Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, Carver BS, Chang MT, Xiao Y, et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(30):11139–44.
 23. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanell A, Drier Y, et al. Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. *Cell* 2013;153(3):666–77.
 24. Silvestri GA, Gonzalez A V., Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. Vol. 143, *Chest*. 2013.

25. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143(5 SUPPL):e142S--e165S.
26. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015;10(9):1243–60.
27. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017;28:iv1–21.
28. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2019;14(3):377–407.
29. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6(2):244–85.
30. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: Pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014 Sep;25(9):1681–90.
31. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Patho. *J Thorac Oncol* 2013;8(7):823–59.
32. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the . *J Thorac Oncol* 2018;13(3):323–58.
33. Hanna NH, Robinson AG, Temin S, Baker S, Brahmer JR, Ellis PM, et al. Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO and

- OH (CCO) Joint Guideline Update. *J Clin Oncol* 2021;39(9):1040–91.
34. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018;29:iv192–237.
 35. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823–33.
 36. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 2017;12(2):208–22.
 37. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): An open-label, randomised phase 3 trial. Vol. 15, *The Lancet Oncology* 2014 p. 213–22.
 38. Mok TSK, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361:947-57.
 39. Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12(8):735–42.
 40. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(3):239–46.
 41. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer . *N Engl J Med* 2018;378(2):113–25.
 42. Rosell R, Dafni U, Felip E, Curioni-Fontecedro A, Gautschi O, Peters S, et al. Erlotinib and bevacizumab in patients with advanced non-small-cell lung cancer and activating EGFR mutations (BELIEF): an international, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Respir Med* 2017;5(5):435–44.

43. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer . *N Engl J Med* 2017;376(7):629–40.
44. Cross DAE, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, et al. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov* 2014;4(9):1046–61.
45. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013;19(8):2240–7.
46. Reck M, Mok TSK, Nishio M, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, et al. Atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in non-small-cell lung cancer (IMpower150): key subgroup analyses of patients with EGFR mutations or baseline liver metastases in a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 2019;7(5):387–401.
47. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, Wu YL, Paz-Ares L, Wolf J, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2017;389(10072):917–29.
48. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2014;371(23):2167–77.
49. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer [Internet]. Vol. 377, *New Engl J Med* 2017;377:829–38.
50. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, Yang JC, Han J-Y, Hochmair MJ, et al. Brigatinib versus Crizotinib in Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) Inhibitor-Naive Advanced ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Final Results of the Phase 3 ALTA-1L Trial. *J Thorac Oncol* 2021;16:2091-2118.
51. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, Felip E, Goto Y, Liu G, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020;383(21):2018–29.
52. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, Besse B, Navarro A, Postel-Vinay S, et al. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *Lancet Oncol*

- 2017;18(12):1590–9.
53. Shaw AT, Riely GJ, Bang YJ, Kim DW, Camidge DR, Solomon BJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): updated results, including overall survival, from PROFILE 1001. *Ann Oncol* 2019 ;30(7):1121–6.
 54. Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, Barlesi F, Krebs MG, Shaw AT, et al. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol* 2020;21(2):261–70.
 55. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(10):1307–16.
 56. Gainor JF, Curigliano G, Kim D-W, Lee DH, Besse B, Baik CS, et al. Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol* 2021;22(7):959–69.
 57. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020;383(9):813–24.
 58. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* 2018;378(8):731–9.
 59. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol* 2020;21(2):271–82.
 60. NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4617–25.
 61. Scagliotti GV, Parikh P, Von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(21):3543–51.
 62. Soria JC, Mauguen A, Reck M, Sandler AB, Saijo N, Johnson DH, et al.

- Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. Vol. 24, *Annals of Oncology* 2013. p. 20–30.
63. Besse B, Le Moulec S, Mazières J, Senellart H, Barlesi F, Chouaid C, et al. Bevacizumab in patients with nonsquamous non-small cell lung cancer and asymptomatic, untreated brain metastases (BRAIN): A nonrandomized, phase II study. *Clin Cancer Res* 2015;21(8):1896–903.
 64. Paz-Ares L, de Marinis F, Dediu M, Thomas M, Pujol J-L, Bidoli P, et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, random. *Lancet Oncol* 2012;13(3):247–55.
 65. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* 2020;383(14):1328–39.
 66. Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Özgüroğlu M, Gogishvili M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet* 2021;397(10274):592–604.
 67. Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, et al. Updated analysis from KEYNOTE-189: Pembrolizumab or placebo plus pemetrexed and platinum for previously untreated metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2020;38(14):1505–17.
 68. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018;379(21):2040–51.
 69. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* 2018;378(24):2288–301.
 70. West H, McCleod M, Hussein M, Morabito A, Rittmeyer A, Conter HJ, et al. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre,

- randomised, open-label, phase 3 tr. *Lancet Oncol* 2019;20(7):924–37.
71. Jotte RM, Cappuzzo F, Vynnychenko I, Stroyakovskiy D, Rodriguez Abreu D, Hussein MA, et al. IMpower131: Primary PFS and safety analysis of a randomized phase III study of atezolizumab + carboplatin + paclitaxel or nab-paclitaxel vs carboplatin + nab-paclitaxel as 1L therapy in advanced squamous NSCLC. Vol. 36, *Journal of Clinical Oncology* 2018. p. LBA9000–LBA9000.
 72. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021;22(2):198–211.
 73. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2019;381(21):2020–31.
 74. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, Holgado E, Ready N, Steins M, et al. Nivolumab versus docetaxel in previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer: Two-year outcomes from two randomized, open-label, phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol* 2017;35(35):3924–33.
 75. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial [Internet]. Vol. 389, *The Lancet* 2017 p. 255–65.
 76. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387(10027):1540–50.
 77. Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, Mattson K, Gralla R, O'Rourke M, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum- based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18(10):2095–103.
 78. Fossella F V., DeVore R, Kerr RN, Crawford J, Natale RR, Dunphy F, et al. Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. *J Clin Oncol* 2000;18(12):2354–62.
 79. Hanna N, Shepherd FA, Fossella F V., Pereira JR, Demarinis F, Von Pawel J, et

- al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22(9):1589–97.
80. Reck M, Kaiser R, Mellemegaard A, Douillard JY, Orlov S, Krzakowski M, et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): A phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014;15(2):143–55. t
 81. Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O, Prabhaskar K, Syrigos KN, Goksel T, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): A multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2014;384(9944):665–73.
 82. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017;377(20):1919–29.
 83. Bai R, Li L, Chen X, Chen N, Song W, Cui J. Neoadjuvant and Adjuvant Immunotherapy: Opening New Horizons for Patients With Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 2020;10:575472.
 84. Provencio M, Nadal E, Insa A, García-Campelo MR, Casal-Rubio J, Dómine M, et al. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020;21(11):1413–22.
 85. Benitez JC, Remon J, Besse B. Current Panorama and Challenges for Neoadjuvant Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2020;26(19):5068–77.
 86. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csőszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021;398(10308):1344–57.
 87. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64.
 88. Collins A V., Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002 ;17(2):201–10.
 89. Chemnitz JM, Parry R V., Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2

- Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J Immunol* 2004;173(2):945–54.
90. Couzin-Frankel J. Cancer immunotherapy. *Science* 2013;342(6165):1432–3.
 91. 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. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443–54.
 92. Xu J, editor. *Regulation of Cancer Immune Checkpoints*. Singapore: Springer Singapore; 2020. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1248:295-324).
 93. Hamid O, Wang D, Kim TM, Kim S-W, Lakhani NJ, Johnson ML, et al. Clinical activity of fianlimab (REGN3767), a human anti-LAG-3 monoclonal antibody, combined with cemiplimab (anti-PD-1) in patients (pts) with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2021;39(15_suppl):9515–9515.
 94. Wang M, Du Q, Jin J, Wei Y, Lu Y, Li Q. LAG3 and its emerging role in cancer immunotherapy. *Clin Transl Med*. 2021;11(3).
 95. Arolt C, Meyer M, Ruesseler V, Nachtsheim L, Wuerdemann N, Dreyer T, et al. Lymphocyte activation gene 3 (LAG3) protein expression on tumor-infiltrating lymphocytes in aggressive and TP53-mutated salivary gland carcinomas [Internet]. Vol. 69, *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2020 . p. 1363–73.
 96. Lutzky J, Feun LG, Magallanes N, Kwon D, Harbour JW. NCT04552223: A phase II study of nivolumab plus BMS-986016 (relatlimab) in patients with metastatic uveal melanoma (UM) (CA224-094). *J Clin Oncol* 2021;39(15_suppl):TPS9590–TPS9590.
 97. Gebauer F, Krämer M, Bruns C, Schlößer HA, Thelen M, Lohneis P, et al. Lymphocyte activation gene-3 (LAG3) mRNA and protein expression on tumour infiltrating lymphocytes (TILs) in oesophageal adenocarcinoma. Vol. 146, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2020. p. 2319–27.
 98. Harjunpää H, Guillerey C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin Exp Immunol*. 2020;200(2):108–19.
 99. Horvath L, Pircher A. ASCO 2020 non-small lung cancer (NSCLC) personal highlights. *Memo - Mag Eur Med Oncol* 2021;14(1):66–9.
 100. Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev* 2009;229(1):173–91.

101. Cebada J, Perez-Santos M, Bandala C, Lara-Padilla E, Herrera-Camacho I, Rosas-Murrieta NH, et al. OX40 agonists for cancer treatment: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2021;31(1):81–90.
102. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol* 2020;20(3):173–85.
103. Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, et al. A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2017;3(8):1051–8.
104. Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, Barker C, Scott M, Scorer P, et al. Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cut-Offs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2017;15;23(14):3585-3591.
105. Leichsenring J, Horak P, Kreuzfeldt S, Heining C, Christopoulos P, Volckmar A-L, et al. Variant classification in precision oncology. *Int J Cancer* 2019;145(11):2996–3010.
106. Chae YK, Davis AA, Agte S, Pan A, Simon NI, Iams WT, et al. Clinical Implications of Circulating Tumor DNA Tumor Mutational Burden (ctDNA TMB) in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* 2019;24(6):820–8.
107. 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. *Science* 2015;348(6230):124–8.
108. Vilimas T. Measuring Tumor Mutational Burden Using Whole-Exome Sequencing. In 2020. p. 63–91.
109. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011;12(11):745–55.
110. Serrati S, de Summa S, Pilato B, Petriella D, Lacalamita R, Tommasi S, et al. Next-generation sequencing: Advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther* 2016;9:7355–65.
111. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 2017;9(1):34.
112. Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, Mazzarella L. Tumor mutational burden

- quantification from targeted gene panels: Major advancements and challenges. *J Immunother Cancer* 2019;7(1):183.
113. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D, et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol* 2018;36(7):633–41.
 114. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med* 2017;377(25):2500–1.
 115. 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* 2018;33(5):853-861.e4.
 116. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med* 2018;378(22):2093–104.
 117. 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* 2017;376(25):2415–26.
 118. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord J-P, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* 2020;38(1):1–10.
 119. Frigola J, Navarro A, Carbonell C, Callejo A, Iranzo P, Cedrés S, et al. Molecular profiling of long-term responders to immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Oncol* 2021;15(4):887–900.
 120. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19(11):1423–37.
 121. Bense RD, Sotiriou C, Piccart-Gebhart MJ, Haanen JBAG, van Vugt MATM, de Vries EGE, et al. Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2017 Jan 13;109(1):djw192.
 122. Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med*

- 2011;236(5):567–79.
123. Topalian SL. Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol* 1989;142(10):3714–25.
 124. Talmadge JE. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: Mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol* 2011;21(2):131–8.
 125. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S, et al. Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34(11):1223–30.
 126. Zeng DQ, Yu YF, Ou QY, Li XY, Zhong RZ, Xie CM, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7(12):13765–81.
 127. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, Kennedy MM, King G, Cockburn JS, et al. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2000;27(1):27–35.
 128. Banat G-A, Tretyn A, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Weigert A, Olesch C, et al. Immune and Inflammatory Cell Composition of Human Lung Cancer Stroma. Zissel G, editor. *PLoS One* 2015;10(9):e0139073.
 129. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, McLaughlin J, Velcheti V, Syrigos KN, et al. Objective Measurement and Clinical Significance of TILs in Non-Small Cell Lung Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2015;107(3).
 130. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008;26(3):317–25.
 131. Cesano A. nCounter® PanCancer Immune Profiling Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA). *J Immunother Cancer* 2015;3(1):42.
 132. Prat A, Navarro A, Paré L, Reguart N, Galván P, Pascual T, et al. Immune-related gene expression profiling after PD-1 blockade in non-small cell lung carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma, and melanoma. *Cancer Res.* 2017;77(13):3540–50.
 133. Harbers L, Agostini F, Nicos M, Poddighe D, Bienko M, Crosetto N. Somatic Copy Number Alterations in Human Cancers: An Analysis of Publicly Available Data From The Cancer Genome Atlas. *Front Oncol* 2021;11:2877.
 134. Ben-David U, Amon A. Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet* 2020;21(1):44–62.

135. Carter SL, Eklund AC, Kohane IS, Harris LN, Szallasi Z. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nat Genet* 2006;38(9):1043–8.
136. Davoli T, Uno H, Wooten EC, Elledge SJ. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science* 2017;355(6322):eaaf8399.
137. Frigola J, Navarro A, Carbonell C, Callejo A, Iranzo P, Cedrés S, et al. Molecular profiling of long-term responders to immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Oncol* 2021;15(4):887–900.
138. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, Creelan BC, Sanchez-Vega F, Ahuja A, et al. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* 2018;33(5):843-852.e4.
139. Ready N, Hellmann MD, Awad MM, Otterson GA, Gutierrez M, Gainor JF, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *J Clin Oncol* 2019;37(12):992–1000.
140. Yarchoan M, Albacker LA, Hopkins AC, Montesion M, Murugesan K, Vithayathil TT, et al. PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers. *JCI Insight* 2019;4(6).
141. Weiss GR, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Zhao Y, Liu H, Slingluff CL, et al. Molecular Insights on the Peripheral and Intratumoral Effects of Systemic High-Dose rIL-2 (Aldesleukin) Administration for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(23):7440–50.
142. Eberhardt WEE, De Ruyscher D, Weder W, Le Péchoux C, De Leyn P, Hoffmann H, et al. 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: Locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2015;26(8):1573–88.
143. Guibert N, Pradines A, Mazieres J, Favre G. Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. *Eur Respir Rev* 2020;29(155).
144. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48.
145. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti G V., Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *J Thorac Oncol* 2018;13(9):1248–68.

146. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008;14(9):985–90.
147. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res* 1977;37(3):646–50.
148. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014;32(6):579–86.
149. Soave A, Chun FKH, Hillebrand T, Rink M, Weisbach L, Steinbach B, et al. Copy number variations of circulating, cell-free DNA in urothelial carcinoma of the bladder patients treated with radical cystectomy: A prospective study. *Oncotarget* 2017;8(34):56398–407.
150. Wang Z, Duan J, Cai S, Han M, Dong H, Zhao J, et al. Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients With Non–Small Cell Lung Cancer With Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. *JAMA Oncol* 2019;5(5):696.
151. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22(20):4157–64.
152. Tissot C, Toffart AC, Villar S, Souquet PJ, Merle P, Moro-Sibilot D, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J* 2015;46(6):1773–80.
153. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Gramastro M, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *J Thorac Oncol* 2015;10(10):1437–43.
154. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med* 2013;368(13):1199–209.
155. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Monitoring clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of metastatic colorectal cancer patients. *Nat Med* 2015 ;21(7):795–801.
156. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):537–40.
157. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early

- assessment of lung cancer immunotherapy response via circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res*. 2018;24(8):1872–80.
158. Raja R, Kuziora M, Brohawn PZ, Higgs BW, Gupta A, Dennis PA, et al. Early reduction in ctDNA predicts survival in patients with lung and bladder cancer treated with durvalumab. *Clin Cancer Res* 2018;24(24):6212–22.
 159. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: A proof-of-concept study. Vol. 28, *Annals of Oncology*. 2017. p. 1996–2001.
 160. Lee JH, Long G V., Boyd S, Lo S, Menzies AM, Tembe V, et al. Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017;28(5):1130–6.
 161. Giroux Leprieur E, Herbretau G, Dumenil C, Julie C, Giraud V, Labrune S, et al. Circulating tumor DNA evaluated by Next-Generation Sequencing is predictive of tumor response and prolonged clinical benefit with nivolumab in advanced non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2018;7(5):e1424675.
 162. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib (AZD9291) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2016;34(28):3375–82.
 163. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med* 2018;379(18):1754-1765.
 164. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med* 2018;24(9):1441–8.
 165. Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn MJ, et al. Durvalumab with or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: The MYSTIC Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2020;6(5):661–74.
 166. Rafal Dziadziuszko. Atezolizumab (atezo) vs platinum-based chemo in blood-based tumour mutational burden-positive (bTMB+) patients (pts) with first-line (1L) advanced/metastatic (m)NSCLC: Results of the Blood First Assay Screening Trial (BFAST) phase III cohort C. *Ann Oncol* 32 S949-S1039 101016/annonc/annonc729. 2021.
 167. Heitzer E, Ulz P, Belic J, Gutschli S, Quehenberger F, Fischereder K, et al. Tumor-

- associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med* 2013;5(4):30.
168. Weiss GJ, Beck J, Braun DP, Bornemann-Kolatzki K, Barilla H, Cubello R, et al. Tumor cell-free DNA copy number instability predicts therapeutic response to immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2017;23(17):5074–81.
 169. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., Haberland M., Reddy T., Cournapeau D. et al. SciPy 1.2.1: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nature Methods* 2020;17(3):261-272.
 170. Gene Expression Data Analysis Guidelines. https://www.nanostring.com/wp-content/uploads/2020/12/Gene_Expression_Data_Analysis_Guidelines.pdf
 171. Adalsteinsson VA, Ha G, Freeman SS, Choudhury AD, Stover DG, Parsons HA, et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat Commun* 2017;8(1):1324.
 172. Fang X, Zhang P. Aneuploidy and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2011;22(6):595–601.
 173. 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* 2015;350(6257):207–11.
 174. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet* 2013;45(10):1127–33.
 175. Roh W, Chen PL, Reuben A, Spencer CN, Prieto PA, Miller JP, et al. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci Transl Med* 2017;9(379):eaah3560.
 176. Gudem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 2015;520(7547):353–7.
 177. Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010;467(7319):1109–13.
 178. Xu H, Chen X, Lin D, Zhang J, Li C, Zhang D, et al. Conformance assessment of PD-L1 expression between primary tumour and nodal metastases in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther* 2019;12:11541–7.
 179. Rozenblit M, Huang R, Danziger N, Hegde P, Alexander B, Ramkissoon S, et al.

- Comparison of PD-L1 protein expression between primary tumors and metastatic lesions in triple negative breast cancers. *J Immunother Cancer* 2020;8(2):e001558.
180. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28(3):245–53.
181. Callea M, Albiges L, Gupta M, Cheng S-C, Genega EM, Fay AP, et al. Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2015;3(10):1158–64.
182. Leighl NB, Hellmann MD, Hui R, Carcereny E, Felip E, Ahn M-J, et al. Pembrolizumab in patients with advanced non-small-cell lung cancer ({KEYNOTE}-001): 3-year results from an open-label, phase 1 study. *Lancet Respir Med* 2019;7(4):347–57.
183. Norum J, Nieder C. Tobacco smoking and cessation and PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of the literature. *ESMO Open* 2018;3(6):e000406.
184. Ganesan A-P, Johansson M, Ruffell B, Beltran A, Lau J, Jablons DM, et al. Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells Inhibit Endogenous Cytotoxic T Cell Responses to Lung Adenocarcinoma. *J Immunol* 2013;191(4):2009–17.
185. Budczies J, Kirchner M, Kluck K, Kazdal D, Glade J, Allgäuer M, et al. A gene expression signature associated with B cells predicts benefit from immune checkpoint blockade in lung adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 2021 J;10(1).
186. Germain C, Gnjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(7):832–44.
187. Brastianos PK, Carter SL, Santagata S, Cahill DP, Taylor-Weiner A, Jones RT, et al. Genomic characterization of brain metastases reveals branched evolution and potential therapeutic targets. *Cancer Discov* 2015;5(11):1164–77.
188. Kudo Y, Haymaker C, Zhang J, Reuben A, Duose DY, Fujimoto J, et al. Suppressed immune microenvironment and repertoire in brain metastases from patients with resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2019;30(9):1521–30.
189. Capone I, Marchetti P, Ascierto PA, Malorni W, Gabriele L. Sexual Dimorphism

- Of Immune Responses: A new perspective in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2018;9:552.
190. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2017;389(10066):255–65.
 191. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): A multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387(10030):1837–46.
 192. Anagnostou V, Forde PM, White JR, Niknafs N, Hruban C, Naidoo J, et al. Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2019;79(6):1214–25.
 193. Hellmann MD, Nabet BY, Rizvi H, Chaudhuri AA, Wells DK, Dunphy MPS, et al. Circulating Tumor DNA Analysis to Assess Risk of Progression after Long-term Response to PD-(L)1 Blockade in NSCLC. *Clin Cancer Res* 2020;26(12):2849–58.
 194. Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, Decker RH, Teysir J, Carriero NJ, et al. Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res* 2018;24(8):1872–80.
 195. Raman L, Van Der Linden M, Van Der Eecken K, Vermaelen K, Demedts I, Surmont V, et al. Shallow whole-genome sequencing of plasma cell-free DNA accurately differentiates small from non-small cell lung carcinoma. *Genome Med.* 2020;12(1):35.