

# A daganatok immunterápiájának prediktív markerei, a PD-L1-meghatározás gyakorlati kérdései

TÍMÁR JÓZSEF,<sup>1</sup> LADÁNYI ANDREA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, <sup>2</sup>Országos Onkológiai Intézet, Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, Budapest

A munka az NKFI 112371, 105132 sz. grantok támogatásával készült.

## Levelezési cím:

Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93. Tel.: 06-20-825-9685, e-mail: jtimar@gmail.com

## Közlésre érkezett:

2017. április 1.

## Elfogadva:

2017. május 5.

A daganatellenes immunválaszra utaló jeleket a patológia régóta regisztrálja, azonban csak kevés daganatfésülés esetében vált a lelet részévé ennek jelentése. Az immunterápiák megjelenése azonban kikényszeríti, hogy meghatározásra kerüljenek azok a prognosztikus és prediktív faktorok, amelyek segíthetnek a hatékonyabb betegszelekcióban. A számba vehető prognosztikus és prediktív markerek közül az Immunoscore (a daganatot infiltráló egyes T-sejt-populációk denzitása) és a PD-L1 fehérje expressziója a daganat- vagy infiltráló immunsejteken az a két marker, amely jelenleg a legkidolgozottabb, ezek alkalmazása azonban csak egy-egy daganatfésülésben vált a napi rutin részévé. A PD-L1-meghatározás emellett technológiai problémákat is felvetett, mivel szinte minden egyes immunterápiás gyógyszerhez más-más *in vitro* diagnosztikai eszközt fejlesztettek. Ilyen körülmények között csak a törzskönyvi leiratokban szereplő markerek és technológiák használata ajánlható a napi rutin diagnosztikában. *Magy Onkol* 61:158–166, 2017

**Kulcsszavak:** immunterápia, prediktív marker, prognosztikus marker, PD-L1

*Pathologists have detected signs of antitumor immune reactions for a long time but only in case of a few cancer types became this part of the report. The advent of immunotherapy of cancers, however, radically alters this routine and promotes the development of clinically valid prognostic and predictive immunological makers. The most advanced immunological markers are the Immunoscore (density of T-cell subpopulations), and PD-L1 protein expression on tumor or immune cells. PD-L1 testing of cancers raises new issues since almost all novel therapies developed its own in vitro diagnostics. Due to the incompatibility of these assays it is suggested to use the companion diagnostic of the given immunotherapeutic drug defined in its label.*

*Tímár J, Ladányi A. Predictive markers of immunotherapy of cancer, practical issues of PD-L1 testing. *Magy Onkol* 61:158–166, 2017*

**Keywords:** immunotherapy, predictive marker, prognostic marker, PD-L1

## BEVEZETÉS

A daganatok kezelésének új modalitása az immunterápia, mely az elmúlt években fejlődött csak ki, és ez alatt az idő alatt már sok kérdés merült fel az ilyen szerek alkalmazásával kapcsolatban, illetve a megfelelő betegszelekcióra vonatkozóan. Sok kérdés a megfelelő törzskönyvezési vizsgálatok megtervezésekor még azért nem merült fel, mert az erre vonatkozó tudományos eredmények még nem voltak ismeretesek. Sok probléma arra vezethető vissza, hogy a daganatimmunológia tapasztalatait, eredményeit nem vették figyelembe a klinikai vizsgálatok tervezésekor, vagy azok eredményeinek értékelésekor. Ennek alapján az állítható, hogy az immunonkológiai szerek klinikai alkalmazásának mai gyakorlata csak egy fejlődési folyamat első, kezdeti lépéseit jelenti, és minden bizonnyal változni fog a nem is olyan távoli jövőben, főleg azért, mert a retrospektív elemzések a felmerülő kérdések legalább egy részére választ fognak adni. Másrészt az újabb gyógyszerek klinikai vizsgálatainak tervezéséhez már fel lehet használni a korábbi tapasztalatokat.

Az immunellenőrzőpont-gátló kezelések az onkológia új és sikeres modalitásának ígéretét hordozzák. Ennek legfőbb oka az, hogy olyan daganatfélésekben is hatékonyak bizonyulnak, amelyek esetében a terápiás arzenál igen szűkös és igen kevésbé hatékony; erre legjobb példa a tüdő laphámrákja vagy a húgyhólyagrak. Ugyanakkor a fejlődés igen gyors, a törzskönyvezési folyamat is az, aminek a következménye az, hogy sok tudományos kérdés nem kerül megválaszolásra, de ami még fontosabb, hogy számos gyakorlati jelentőségű kérdés is nyitva marad. Ezen új immunterápiás eszközök alkalmazásának feltétele általában biomarker-meghatározás: a tumorsejtek és/vagy az immunsejtek PD-L1-fehérjeexpressziója. Szemben azonban a legtöbb szolid daganattal, tüdőrákok esetében legtöbbször nem áll rendelkezésre a műtéttel eltávolított daganatszövet, hanem csak kis biopszia vagy citológiai kenet, ami nemcsak a pontos differenciáldiagnosztikát, hanem a molekuláris és immundiagnosztikát is jelentősen megnehezíti. Újabban felmerült probléma az, hogy az ún. kísérő diagnosztika két formájával szembesülünk: a kiegészítő formával, amely használata nem kötelező, és a társított formával, amely alkalmazása feltétele a gyógyszer alkalmazásának. Új jelenség az is, hogy egy biomarker-meghatározás (PD-L1 fehérje expressziója) négyféle *in vitro* diagnosztikumként (IVD) érhető el, amelyek egymással nem felcserélhetők, és csak egy-egy gyógyszer alkalmazásához használhatók. Legalább ilyen zavaró az is, hogy a PD-L1-meghatározás kiértékelése az adott gyógyszerre és diagnosztikumra specifikus. Ebben a helyzetben értékelendő ezen új terápiák költséghatékonysága és közgazdasági vonatkozása: a biztosítók befogadási és finanszírozási stratégiája. Az alábbiakban kísérletet teszünk a fenti problémák kibontására és a rendelkezésre álló evidenciák alapján a kérdések megválaszolására.

## A DAGANATELLENES IMMUNVÁLASZ SAJÁTÓSÁGAI

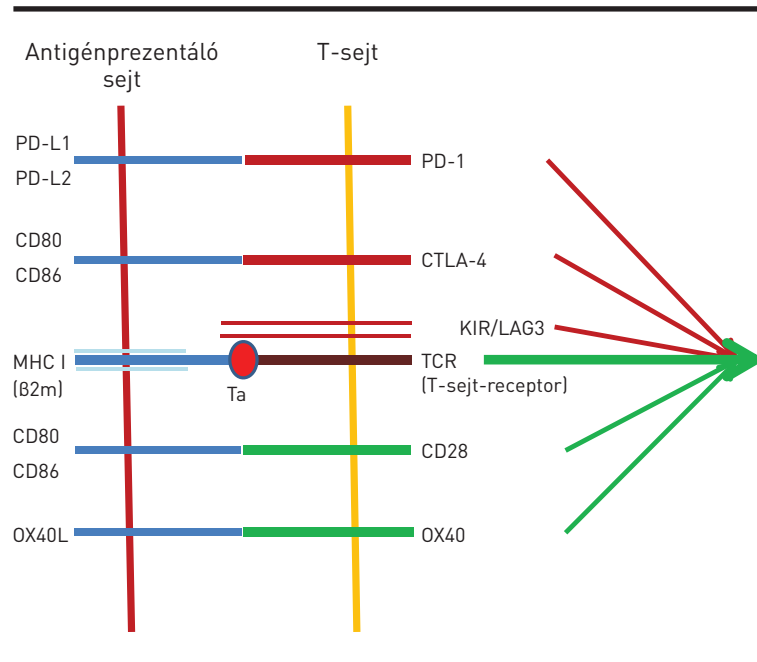
Az adaptív vagy szerzett daganatellenes immunválasznak két kara van, az antitest-közvetített (humorális) és a sejt-közvetített (celluláris) immunválasz. A celluláris immunválasz esetében az antigént MHC-kötött formában kell bemutatni az antigénprezentáló sejteknek (pl. dendritikus sejt, makrofág) a T-sejtek számára, amelyek így aktiválódnak. A daganatellenes humorális immunválasz esetében az antigénfelismerési folyamat B-sejt-aktiválódáshoz vezet, aminek következménye tumorantigén-specifikus antitestek termelődése. Míg a T-sejt-mediált daganatellenes immunválaszról alkotott képünk egyre pontosabb, a B-sejtes válasz biológiai jelentősége nem tisztázott.

Az immunrendszer a daganatsejtekkel a primer tumor, vagyis a malignusan transzformált sejtpopuláció keletkezési helyén találkozhat először. Az antigénprezentáló sejtek feldolgozzák a tumorsejtekből kijutó fehérjéket, majd a daganatban keletkező, vagy a peritumorális nyirokutakon keresztül elvándorolnak a regionális nyirokcsomókba, ahol e fehérjék egyes peptidfragmentumait MHC-molekuláikhoz kötve bemutatják a T-sejtek számára. A megfelelő antigéneket felismerő T-sejtek ennek következtében aktiválódnak és klonálisan felszaporodnak. Ezt követően a regionális nyirokcsomókból a nyirokutakon át a primer tumorba visszajuthatnak, illetve a vérkeringésbe kerülve akár a primer tumorba, akár az esetleges áttétekbe is eljuthatnak, ahol szerencsés esetben pusztíthatják a daganatsejteket, amennyiben az aktivációs mechanizmusok túlsúlyban vannak a gátló mechanizmusokkal szemben. Sajnos ez az idillikusan felvázolt folyamat gyakran nem működik vagy nem hatékony, aminek számos, az alábbiakban részletezett oka lehet [1, 2].

### Tumorantigének

A daganatokban egyes normális fehérjék mennyisége jelentősen megnőhet, így immunválaszt provokálhat. Ilyen a melanómákban a tirozináz, a melanin bioszintézisében érintett kulcsenzim, amely csak a normális melanocitákban és a melanómákban található. Az immunválaszt kiváltó fehérjék másik csoportját „cancer-testis/cancer-germline” (rák-here/rák-csíravonal) antigéneknek nevezik, amelyek a herén kívül a legtöbb felnőtt szövetben nem aktívak. Ezek a fehérjék – bár jelen vannak a hereszövetben – nem jelennek meg a sejt felszínén, mint antigének, mert a spermiumok nem expresszálják az MHC I molekulákat. Emiatt gyakorlatilag ezek az antigének tumorspecifikusak, prototípusuk a MAGE géncsalád. Továbbá specifikus tumorantigénként szerepelhet több mucinféleség, mint a CA-125 és CA-19-9, amelyek elsősorban a petefészekrákokban termelődnek, vagy a MUC1, amely emlőrákban.

A daganatok növekedéséért felelős mutáns szabályzók eltérnek normális megfelelőiktől, ezért elméletileg antigénként szerepelhetnének (pl. RAS, p53, WT1 stb.), azonban az ellenük kialakuló immunválasz igen erőtlenséggel. Ugyanakkor újabb adatok azt mutatják, hogy azon daganatokban



1. ÁBRA. Az immunellenőrző pontok szabályozásának sémája. β2m: béta-2-mikroglobulin, Ta: tumorantigén

van jobb esélye az immunterápiának, amelyekben nagyobb a mutációs ráta, mint amilyenek a dohányzás vagy UV által indukált daganatok (tüdőrák, melanóma, húgyhólyagrák, fej-nyaki laphámrák). Ebből a szempontból fontos, hogy a magas mutációs rátájú daganatokban a DNS-hibajavító rendszer vagy rendszerek károsodása meghatározó. Ilyenek a mismatch repair (MMR) rendszerek, melyek hibája ugyan a vastagbélrákban a leggyakoribb (~20%), de más szolid daganatban is előfordul 5-10%-os gyakorisággal, mint pl. az endometrium-, gyomor-, ill. petefészekrákok (3). Ezenkívül vagy emellett károsodott lehet a nukleotidexcíziós repair rendszer is, aminek jellegzetes példája a szerzett vagy örökletes BRCA-génhibával rendelkező daganatok. Végül a homológ repair rendszerek is gyakran károsodhatnak daganatokban, így a magas mutációs rátának számos, gyakran együtt jelentkező genetikai oka van. Azonban a nagyobb mutációs ráta következtében keletkező megváltozott fehérjék nem válnak automatikusan neoantigénné: egyrészt rendelkezniük kell antigén-sajátosságokkal, másrészt egyes fragmenseiknek MHC-kötő képességgel. Ennek az az eredménye, hogy a daganatokban a mutációk révén megváltozó fehérjéknek csak egy igen kis része szolgál valódi neoantigénként. A tumorantigén-prezentáció gyakori problémája az is, hogy a daganatsejteken genetikai vagy epigenetikai okokból lecsökken az MHC I, illetve az antigénfeldolgozásban szereplő molekulák (APM – antigen processing machinery) expressziója (4), ami amúgy alkalmas neoantigén esetében is megakadályozza a sejtes immunválasz kialakulását.

#### A daganatellenes immunválasz elégtelenségének okai

Amennyiben a daganatsejtek olyan citokineket termelnek, amelyek az immunválasz sejtjeit, elsősorban az effektor vagy az antigénprezentáló sejteket gátolják, akkor hatékony tumorellenes immunválasz nem alakul ki. A daganatsejtek, illetve a környező gazdaszervezeti sejtek által termelt növekedési faktorok, citokinek egy része a csontvelői sejtpopulációkat is képes mozgósítani, melyek között az ún. mieloid eredetű szuppresszor sejteknek nagy a jelentősége. Ezek felszaporodását a VEGF-A-, IL-6-, SCF-, TGF-β-termelés segítheti elő. További lehetséges ok az immunválaszt fékező/leállító regulátor T-sejtek felszaporodása. A daganatos hipoxia kétféle módon is gátolja a T-sejtek működését: a VEGF-A termelődése kedvezőtlen a T-sejt-funkciók számára, de hipoxiában adozin is termelődik a daganatsejtekben, amely specifikus sejtmeleg a T-limfociták számára.

A tumorsejtek nemcsak gátolhatják a kialakuló immunválaszt, hanem rezisztensek is lehetnek az immuneffektorok citotoxikus hatásaival szemben. Ennek oka az, hogy nem érzékenyek olyan proteázok iránt, amelyeket ezek a sejtek a sejtpusztítás során használnak (1).

#### Az immunellenőrző pontok szabályozási problémái daganatokban

A celluláris immunválasz alapja a T-sejtek aktiválódása. A folyamat kulcslépése a TCR (T-sejt-receptor)-CD3 komplex aktivációja, ami az antigénprezentáló sejt MHC molekuláihoz kapcsolt antigénpeptid TCR általi megkötésével indul.

Amennyiben a folyamat nem lenne szigorúan szabályozva, az maradandó T-sejt-aktiválódást és szövetpusztulást eredményezne, ahogy bizonyos autoimmun betegségekből láthatjuk. A TCR-CD3 receptort negatívan szabályozzák a szintén MHC-függő T-sejt-receptorok, a LAG3 és a KIR. Emellett azonban az antigénprezentáló sejtek felszínén nagyszámú ligandum található, amelyek a T-sejtes válasz pozitív vagy negatív befolyásolására képesek. Ezek közül a legismertebb a B7-család két tagja, a B7-1/CD80 és B7-2/CD86, melyeknek a T-sejt-felszíni aktiváló receptora a CD28, míg gátló receptora a CTLA-4 (1. ábra). A gátlási folyamat jelentőségét mutatja, hogy mennyire redundáns a gátló ligandumok köre: a B7-család további tagjai közül pl. a B7-H1 (PD-L1/CD274) és B7-DC (PD-L2/CD273), melyek receptora a PD-1/CD279, valamint a HVEM (receptora a BTLA), a GAL9 (receptora a TIM3), ill. az adenzin (receptora az A2aR). Ugyanakkor a kostimuláló rendszerek is erősek, mint amilyen a CD137L (receptora a CD137), az OX40L/CD252 (receptora az OX40/CD134), a CD70 (receptora a CD27), valamint a T-sejteken kifejeződő CD40L (CD154), melynek receptora a CD40 a dendritikus sejteken. Bár ez a szabályozó rendszer igen sokarcú, de egyes elemei mégis kitüntetetten fontosak a daganat elleni immunválaszban, mint a CTLA-4, amely a fő T-sejt-kostimulátorok gátlója, vagy a PD-1, amelynek liganduma, a PD-L1 a daganatsejteken gyakran kifejeződik (5).

### Tumorinfiltráló sejtek (TIS)

A daganatimmunológia és a patológia évtizedek óta észleli és dokumentálja a daganatokat kísérő, azokat infiltráló gazdaszervezeti sejteket, amelyeket sokáig egyszerűen limfoid, leginkább T-sejteknek gondolt. A specifikus markerek alkalmazása és ezek révén a daganatokat infiltráló sejtek pontos feltérképezése mára a legtöbb szolid daganat esetében megtörtént, és kiderült, hogy ezek között T- és B-limfociták (azok alpopulációi), különféle makrofágok, más antigénprezentáló sejtek is vannak. E sejtek jelenlétének, illetve denzitásának gyakran van prognosztikus jelentősége, mivel ennek révén megjósolható a betegség későbbi kimenetele. Több daganat esetében pusztán a limfoid infiltráció mértéke is prognosztikus értékű információ (melanóma vagy emlőrák). A szolid daganatok TIS-denitása igen széles spektrumot mutat a gátló (gyulladásos) mikrokörnyezettől a „hideg”, TIS-t alig vagy egyáltalán nem tartalmazó mikrokörnyezetig. Az újgenerációs szekvenálás felhasználásával pontos mutációs frekvenciával jellemzett daganatok mikrokörnyezetének elemzése kimutatta, hogy a magas mutációs gyakoriságú daganatokban általában erősebb a TIS-denitáció és a gyulladásos mikrokörnyezet. Ugyanakkor szoros korreláció nem mutatható ki, az egyes betegek konkrét daganataiban a fenti alapszabály gyakran nem érvényesül, aminek számos oka lehet.

A TIS egyes daganatokban történő pontos jellemzése és klinikai jelentőségének elemzése alapján prognosztikus, ill. prediktív erejű markerek alakíthatók ki. Egy nagy, sok tumorfélésegre kiterjedő összefoglaló tanulmány szerint a citotoxikus és Th1 T-limfociták, a B-sejtek és a dendritikus

sejtek denitálásának a legtöbb tumortípus esetén pozitív prognosztikus értéke van, míg a regulátor T-sejtek, makrofágok és NK-sejtek jelentősége daganattípusonként erősen változó (6). A TIS vizsgálata többéves nemzetközi együttműködési program keretében zajlik, és egyes daganatokban már a gyakorlatban is hasznosítható eredményekhez vezetett, elsősorban az elsőként vizsgált vastagbélrákok esetében. Az így kialakított ún. Immunoscore (IS) kétféle T-sejt-altípus (pl. CD3+ és CD8+) elemzésén alapul, melyek denitását a tumor centrumában és annak invazív határán kell meghatározni, és ebből lehet egy 5 fokozatú értékelési rendszert (IS0–IS4) felépíteni. Az értékelés objektívítására a digitális patológiai technológiák is bevetésre kerültek (7).

### A VASTAG- ÉS VÉGBÉLRÁK PROGNOSZTIKUS ÉS PREDIKTÍV MARKEREI

A fentebb már említett Immunoscore (IS) prognosztikus erejét a nem metasztatikus daganatok (NOM0) recidiváló képességének előrejelzésére tesztelték nagy beteganyagban. Míg az IS4 betegcsoportban az 5 éves relapszusarány csak 4,8% volt, az IS0–IS1 csoportban ez 72%-nak bizonyult, és az 5 éves túlélés a magas IS esetében 86,2%, míg az alacsony IS esetében 27,5% volt (7). Az Immunoscore a TNM-klasszifikáció prognosztikus erejével vetekedő erősségű független prognosztikus tényezőnek bizonyult vastag- és végbélrákban (7). Ebből a szempontból különösen fontos, hogy a mikroszatellita-instabil (MSI) rákok szignifikánsan magasabb IS-értékekkel jellemezhetők, mint a mikroszatellita-stabil (MSS) daganatok (3). A PD-1/PD-L1 rendszer expressziójának elemzése azt mutatta, hogy vastagbélrákokban a daganatsejteken e molekulák nem fejeződnek ki, csak a TIS-eken (8, 9). Gyakorlatilag valamennyi eddig végzett elemzés arra jutott, hogy az MSI daganatok TIS-ein magasabb a PD-1 és PD-L1 kifejeződése, mint az MSS daganatok esetében. Érdekes megfigyelés volt az is, hogy az áttétes lokoregionális nyirokcsomókban is hasonló volt a helyzet.

### MALIGNUS MELANÓMA

Génexpressziós elemzések kimutatták, hogy a primer melanómáknak négyféle geno/fenotípusuk van: normális melanocitához hasonlító, immunfenotípusú, pigmentált, és egy proliferatív fenotípusú, melyek közül az immunfenotípusú a jó, míg a proliferatív fenotípusú a rossz prognózisú alcsoporthoz tartozik (10). Az immunfenotípusú alcsoportban kimutatható az immuninfiltrátumot alkotó sejteket jellemző gének expressziója. Az immunogenicitás elvesztésének genetikai alapjai között az egyik legfontosabb melanóma esetében is az MHC I-expresszió elvesztése, aminek oka lehet kromoszomális károsodás, génmetilációs zavar, vagy a béta-2-mikroglobulin gén mutációja (10, 11). Bár melanómában még nem rendelkezünk nemzetközileg elfogadott IS-szerű markerrel, megfelelő mennyiségű adat áll már rendelkezésre arra nézve, hogy a TIS szempontjából mely elemeket lehetne felhasználni. Hazai eredményeket is figye-

lembe véve megállapítható, hogy az aktivált T-, a B- és az érett dendritikus sejtek magas peritumorális denzitásának pozitív prognosztikus értéke van. Ezzel szemben a magas leukocitás és/vagy plazmocitoid dendritikus sejtes infiltráció kedvezőtlen prognosztikus értékű [12, 13].

Az újfajta ellenőrzőpont-gátló immunterápiák (anti-CTLA-4, anti-PD-1/PD-L1) alkalmazásának szempontjából felmerült, hogy a melanóma egyes molekuláris alcsoportjainak van-e prediktív szerepe. Az immunterápiás vizsgálatok utólagos elemzése arra derítettek fényt, hogy az NRAS-mutáns melanómás betegek érzékenyebbek az immunterápiákra, mint a BRAF-mutáns vagy kettős vad típusú tumorral rendelkezők [10]. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy az NRAS-mutáns melanómákban a daganatok PD-L1-fehérjeexpressziója emelkedett. A melanóma emelkedett PD-L1-expressziójának másik oka lehet a PD-L1 gén amplifikációja vagy az IFN-szabályozott gének fokozott expressziója (IDO és CXCL9) [10]. Újabb retrospektív elemzések azt mutatták, hogy minél több a T-sejt-klónok száma, annál valószínűbb a kedvező anti-PD-1 terápiás válasz [14]. Ezzel szemben minél nagyobb volt a gének kópiaszámvesztési mértéke, annál rosszabb volt az anti-PD-1 terápia hatékonysága.

Miután az anti-CTLA-4 terápia melanómában került bevezetésre elsőként, így egyre gyűlnek a tapasztalatok az esetleges prediktív markerek vonatkozásában. Igazolódt, hogy a magasabb mutációs rátájú, ill. nagyobb mennyiségű neoantigénnel rendelkező melanómák érzékenyebbek általában ezzel a terápiatípussal szemben [10, 14, 15]. Ugyanakkor a nagymértékű kópiaszámvesztés az anti-CTLA-4 terápia hatástalanságával kapcsolódott [14]. A kedvező anti-CTLA-4 terápiás válasz szempontjából a T-sejtek citolitikus molekulái, valamint a CTLA-4 és a PD-L2 gének emelkedett expressziójának volt prediktív ereje [15]. Ezek mellett a tumor területén meghatározott, immunaktivással összefüggésbe hozható génexpressziós mintázat és egyes immunsejttípusok megnövekedett mennyisége is korrelált a CTLA-4-gátló terápia hatékonyságával [13, 16, 17]. A szisztémás tényezők közül többek között a magas abszolút limfocitaszám, a PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-sejtek magas, illetve a mieloid-eredetű szuppresszor sejtek alacsony aránya bírt prediktív erővel [16–19]. A MART-1/MelanA melanómaantigénben keletkező mutációk is az immunterápiás érzékenység fokozódásához vezethetnek. Az UV-indukált mutációk révén olyan antigénepitópok jöhetnek létre, amelyek a CMV korai génjeihez hasonlatosak, a FAMC3 gén mutációja olyan új fehérjét eredményezhet, amely a hepatitis D-vírus p27 fehérjéhez lesz hasonló, míg a CSMD1 gén mutációja a Burkholderia pseudomallei baktérium gén termékéhez hasonló fehérjét eredményez, mely növelheti az anti-CTLA-4 terápia hatékonyságát [10, 11].

## TÜDŐRÁK

Az immunonkológia egyik nagy sikere a nem kissejtes tüdőrákok terápiájának megváltoztatása, amit a PD-1-gátló antitestes terápiák sikere okozott. Ezek közül kiemelkedik

az anti-PD-1 terápia (pembrolizumab és nivolumab) laphámrákban és adenokarcinómában mutatott aktivitása [20]. A fázisvizsgálatok megkezdésétől fogva nagy figyelem övezte a biomarker alkalmazásának kérdését [21]. A tüdőrákok és azok három nagy szövettani és molekuláris alcsoportjának immunológiai jellemzése eddig nem volt a kutatások középpontjában. Szemben a melanómával vagy az emlőrákkal, a limfocitás infiltrátum jelentősége nem ismert. Hasonlóképpen a daganatok TIS-einek jellemzése is inkomplett, nem rendelkezünk Immunoscore-ral vagy prognosztikus immunológiai markerrel. Ezért is érdemel figyelmet az a frissen megjelent hazai közlemény, amely az adenokarcinóma agyi áttéteiben a mononukleáris sejtes gyűrű jelenlétének kedvező prognosztikus szerepét mutatta ki [22]. Ebben a vizsgálatban a TIS-ek PD-1- és PD-L1-proteinexpressziója is prognosztikusnak bizonyult (az alacsony expresszió kedvezőbb volt). Ebből a szempontból (is) kell értékelni az új immunterápiák megjelenését és bevonulását a klinikai gyakorlatba. Az anti-PD-1 terápiák fázisvizsgálataiban a nem immunológiai potenciális markerek közül a dohányzást, a KRAS-mutációs státuszt és a mutációs terhelést elemezték. Mindkét gyógyszer esetében (nivolumab, pembrolizumab) az immunterápia hatásosabb volt a dohányos betegekben és a KRAS-mutáns molekuláris alcsoportban [23]. A pembrolizumab fázis II-es vizsgálata során elemezték a daganatok mutációs terhelését, és kimutatták, hogy a tartós klinikai választ mutató betegekben sokkal magasabb a genetikai állomány károsodása az ilyen választ nem mutató betegekhez képest. Ezenkívül az ún. dohányzási génhibatípusok száma is szignifikánsan magasabb volt a tartós választ mutató betegekben [23]. Az anti-PD-1/anti-PD-L1 antitest-terápiák fázisvizsgálatainak nagy részében prediktív markerként a PD-L1-expressziót elemezték, döntően a daganatsejteken, de az anti-PD-L1 terápia esetében a TIS-eken is. A daganatsejtek PD-L1-expressziójánál alkalmazott küszöbérték meglehetősen széles skálán mozgott az 1%-tól 50%-ig. Laphámrákban a nivolumab esetében a tumorsejtek PD-L1-expressziója nem bizonyult prediktívnek. Adenokarcinómában ezzel szemben mind a nivolumab, mind a pembrolizumab esetében a PD-L1 kifejeződése prediktív volt, nivolumab esetén alacsony, 1-5-10%-os határértékeket használva, pembrolizumabnál 50%-os küszöböt [24, 25]. Ebből a szempontból érdekes az MPD3280A anti-PD-L1 antitest, amely esetében a daganatsejtek PD-L1-expressziója mellett a TIS-ekét is értékelték, itt is 50%-os határértékkel, és az erős PD-L1-expresszió minden esetben szignifikánsan magasabb válaszadási aránnyal járt [24, 25].

A jelenlegi viszonyok között a tüdőrák patológiai és molekuláris diagnosztikájának összehangolása nagy kihívás, különösen a biopsziás minták esetében. A PD-L1-meghatározás citológiai minták esetében nem lehetséges validált immunhisztokémiai (IHC) teszt hiányában. Másrészt a biopsziákból a differenciáldiagnosztikai feladatok elvégzése után a szükséges molekuláris tesztek (EGFR, KRAS, ALK) adenokarcinóma esetében kötelezően el kell végezni (lap-

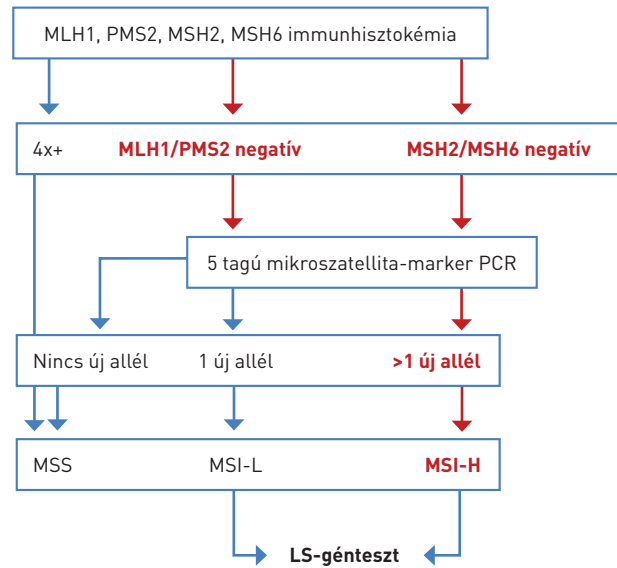


hámrák esetén ilyen kötelezettség értelemszerűen nincs]. A PD-L1 IHC-teszt vagy tesztek elvégzése ezek után kerülhet sorra, amikor gyakran már nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiségű sejt az értékeléshez. Ennek figyelembevételével célszerű volna a párhuzamos tüdőbiopsziák és citológiai minták optimális felhasználásának koordinálása: a citológiai minták használhatók a mutációs profil meghatározására, míg a biopsziás minták megmaradnak a PD-L1 meghatározására.

**A MIKROSZATELLITA-INSTABILITÁS MINT AZ IMMUNELLENŐRZŐPONT-GÁTLÓ KEZELÉSEK ÁLTALÁNOS PREDIKTÍV MARKERE**

Ahogy azt a fentiekben több helyen is ismertettük, az MSI daganatok, főleg a vastagbélrák, de nem csak az, a daganatellenes immunválasz kiváltása szempontjából kivételes helyzetben vannak, mivel ezekben a nagyszámú neoantigén expressziójának esélye sokszorosa az MSS daganatokhoz képest. A PD-1-gátló pembrolizumabbal különféle szolid daganatokon folytatott fázis II-es vizsgálatok azt igazolták, hogy ennek az immunterápiás eszköznek a klinikai hatékonyságát alapvetően befolyásolja a kezelt daganat mikroszatellita-státusza [26, 27]. Miután e daganatok között több olyan is van, amelyek esetében előrehaladott állapotban a kezelési opciók nagyon szűkek, a pembrolizumab indikációs körének bővítése az FDA elé kerül előterjesztésre. A döntés azonban más szempontból is történelmi jelentőségűnek ígérkezik. A célzott terápiák alkalmazása esetében már általánosan elfogadott elvvé vált, hogy az adott gyógyszerpushoz a célpont genetikai hibájának meghatározására alkalmas kísérő molekuláris diagnosztikát kell elvégezni. Ugyanakkor az egyes célzott terápiás gyógyszereket mindig egy-egy megfelelő szolid daganaton lefolytatott fázisvizsgálatok eredményei alapján törzskönyvezték. A pembrolizumab alkalmazási körének kibővítése az MSI státuszú szolid daganatokra azt jelentené, hogy a korábbi szövettani altípusra alapozott törzskönyvezéssel szemben megszülethet az első molekuláris profilra alapozott gyógyszer-törzskönyvezés [27]. Természetesen a helyzet eltérő a molekulárisan célzott terápiákhoz képest, talán nem is véletlen, hogy éppen az immunterápiák esetében állt elő ilyen helyzet. A pembrolizumab alkalmazásának MSI-státuszhoz kötése, akár csak vastagbélrákok esetében is, a molekuláris diagnosztika újabb fejezetének megszületését jelenti.

A mikroszatellita-státusz meghatározása jelenleg a vastagbélrákos betegek Lynch-szindrómás alcsoportjának diagnosztikájához szükséges. Az MSI-státusz vizsgálata prediktív indikációban ennek a diagnosztikus eljárásnak a sokkal kiterjedtebb alkalmazását fogja kikényszeríteni. Az MSI-státusz meghatározásának kidolgozott, nemzetközileg elfogadott diagnosztikus algoritmus van [28]. Első lépésben a daganatokban immunhisztokémai eljárással meg kell határozni a négy MMR-gén (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) fehérjeszintű magi expresszióját. Amennyiben valamely gén károsodott, az MLH1/PMS2 vagy az MSH2/MSH6 fehérjék kiesését tapasztaljuk. Ezekben az esetekben a következő lépés öt ún.



**2. ÁBRA.** A mikroszatellita-instabilitás patológiai diagnosztikájának sémája. MSS: mikroszatellita-stabil, MSI-L: alacsony szintű mikroszatellita-instabilitás, MSI-H: mikroszatellita-instabilitás (kifejezett), LS: Lynch-szindróma

mikroszatellita-marker [2 mononukleotid és 3 dinukleotid] PCR-módszerrel történő vizsgálata. Amennyiben mind az öt marker szabályos reakciót mutat, a daganat mikroszatellita-stabilnak tekintendő. Amennyiben az öt marker közül egy ad kóros reakciót, a daganat alacsony szintű mikroszatellita-instabilitást mutat. Az immunterápia szempontjából e daganatok azonos csoportba kerülnek a mikroszatellita-stabil daganatokkal [kezelésre nem alkalmasak]. Ugyanakkor a betegeket tovább kell vizsgálni MMR-génmutáció szempontjából a Lynch-szindróma kizárása céljából, azonban ehhez normális sejtjeit is elemezni kell. Amennyiben az öt mikroszatellita-marker közül legalább kettő kóros reakciót ad, a daganat mikroszatellita-instabilnak tekintendő, amely alkalmas az immunterápiára. Természetesen az ilyen betegeket is tovább kell vizsgálni MMR-génmutáció szempontjából az örökletes rákhajlam igazolása céljából [2. ábra].

**A PD-L1-PROTEINEXPRESSZIÓ MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZERTANA**

Már a fentiekből is kiviláglik, hogy az immunellenőrzőpont-gátló terápiák prediktív markereinek meghatározása és mindennapi gyakorlata új feladatot jelent a molekuláris diagnosztikában. Ahogy azt látni lehetett, az egyes gyógyszerek esetében a használt PD-L1 marker vonatkozásában eltérő értékelési módszertannal és határértékekkel találkozunk. Azonban a helyzet ennél sokkal bonyolultabb [1. táblázat]. A patológiai/molekuláris diagnosztikában precedens nélküli, hogy ugyanazon gyógyszer-csoportban (PD-1/PD-L1

**1. TÁBLÁZAT.** *In vitro* diagnosztikumok a PD-L1-proteinexpresszió immunhisztokémiai meghatározására

Gyógyszer	PD-L1 antigén	Anti-PD-L1 antitest	Antitesttípus	Automata előhívó rendszer	Értékelés	IVD státusz
Nivolumab (BMS)	ECD	28-8	nyúl monoklonális	Dako	tumorsejt TPS	kiegészítő diagnosztikum
Nivolumab (BMS)	ECD	SP263	nyúl monoklonális	Ventana	tumorsejt TPS	kiegészítő diagnosztikum
Pembrolizumab (MSD)	ECD	22C3	egér monoklonális	Dako	tumorsejt TPS	társított diagnosztikum
Pembrolizumab (MSD)	ECD	SP263	nyúl monoklonális	Ventana	tumorsejt TPS	kiegészítő diagnosztikum
Atezolizumab (Roche)	ICD	SP142	nyúl monoklonális	Ventana	tumorsejt TPS, immunsejt	kiegészítő diagnosztikum
Durvalumab (AstraZeneca)	ECD	SP263	nyúl monoklonális	Ventana	tumorsejt TPS	kiegészítő diagnosztikum

ECD: extracelluláris domén, ICD: intracelluláris domén, IVD: *in vitro* diagnosztikum, TPS: membránpozitivitás 1–3+ erősség %-ban megadva

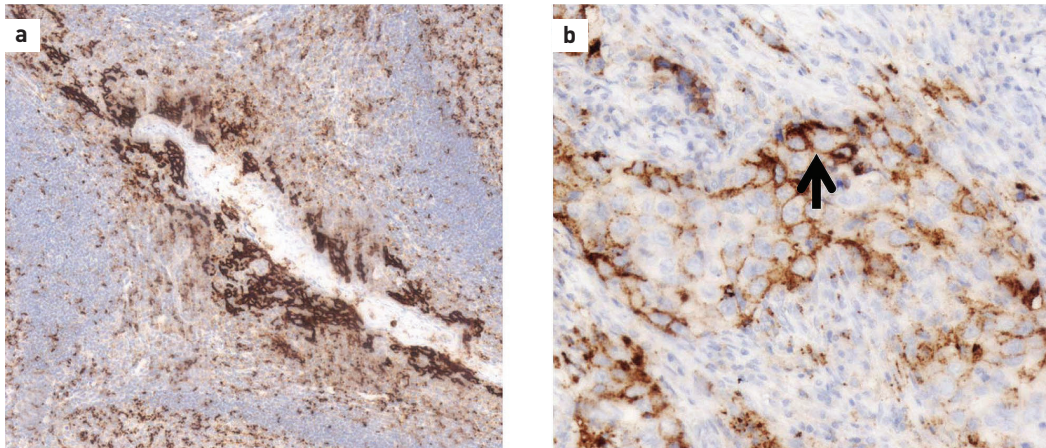
gátlók) négy *in vitro* diagnosztikum álljon rendelkezésre ugyanazon tesztre (PD-L1 fehérje expressziója), amelyeket négyféle gyógyszerhez kapcsoltnak fejlesztettek és tesztelnek. A négy IVD tesztet két gyártó fejlesztette immunfestő automatikus rendszerére. A teszt egyik kulcsa az az elsődleges antitest, amely a PD-L1 transzmembrán fehérjét felismeri: az SP142 az intracelluláris szakaszt ismeri fel, míg a többi az ún. külső extracelluláris részt, ami abból a szempontból lehet fontos, hogy csak ez a külső epitóp vehet részt a PD-1-hez való kapcsolódásban. Ennek az lehet a jelentősége, hogy a daganatsejtekben a PD-L1 kifejeződése nem feltétlenül jelenti azt, hogy a fehérje a sejtfelületen is megjelenik. A négy primer savó közül a 22C3 egérben termelt, míg a többi nyúl monoklonális antitest. Az előhívórendszereknek is nagy jelentőségük van: miután a daganatsejteken és még a TIS-eken is sokszor alacsony a fehérje expressziós szintje,

speciális erősítő eljárással kell a primer savót kimutatni a metszetben. Ahogy azt a fentiekben is bemutattuk, a daganatokban a PD-L1-expresszióknak különféle határértékeit használták, ezért nagyon fontos a reakció ún. dinamikus skálájának konzekvens használata. Hasonló feladat volt korábban a HER2 fehérje expressziójának meghatározása is, azonban az emlőrákban lehetőség van a teszt egy független módszerrel történő ellenőrzésére a kérdéses esetekben a génkópiaszám meghatározásával, míg a PD-L1 esetében csak a megfelelő dinamikus kontrollok használata segít, ami része a validált esszének (2. táblázat, 3.a ábra). Eltérés az egyes diagnosztikumok között az is, hogy bár valamennyi ún. *in vitro* diagnosztikum státuszú, de az egyes gyógyszerek szempontjából kísérő diagnosztikumként eltérnek egymástól, mert csak a Dako 22C3 rendszernek van ún. társított diagnosztikum státusza (a törzskönyvi leiratban meghatározva,

**2. TÁBLÁZAT.** PD-L1 fehérjét kimutató *in vitro* diagnosztikumok értékelési sajátosságai

	28-8/Dako	22C3/Dako	SP142/Ventana	SP263/Ventana
Kontroll normális szövet	tonzilla	tonzilla	tonzilla	placenta, tonzilla
Házi pozitív kontroll tumor	fej-nyaki laphámrák	bármely korábbi pozitív daganat	?	?
Kalibráló sejtvonalak	erős (L2987) közepes (ES-2) gyenge (HCC-70) negatív (Colo205)	70% erős (NCI-H226) negatív (MCF7)	–	erős (MDA-MB231) közepes (HCT116) negatív (MCF7)
Értékelési sajátosságok	TPS>1% TPS>5% TPS>10%	TPS<1% TPS 1–49% TPS 50–100%	TC3= TC>50% IC3= IC>10% TC2/IC2= TC vagy IC>5% TC1/IC1= TC vagy IC>1%	TPS<1% TPS>25% TPS>50%

TPS: membránpozitivitás 1–3+ erősség %-ban megadva, TC: tumorsejt, IC: 1–3+ mononukleáris sejt által elfoglalt stro-mális terület %-os aránya



**3. ÁBRA.** PD-L1 fehérje immunhisztokémiai kimutatása a Dako 22C3 rendszerrel. a) Pozitív kontroll: tonszilla. A felszíni hámsejtek és a follikuláris immunsejtek egy része erős membránreakciót mutat. 10× nagyítás. b) Tüdő-adenokarcinóma nyirokcsomóáttéte. A daganatsejtek 60%-a erős vagy közepesen erős membránreakciót mutat. 20× nagyítás

2. táblázat, 3.b ábra), míg a Dako 28-8 és a Ventana SP142 és SP263 ún. kiegészítő diagnosztikumként szerepelnek, ami azt jelenti, hogy használatuk a gyógyszer alkalmazása előtt nem kötelező.

Fontos az is, hogy az értékelési protokollok is eltérőek az egyes IVD-PD-L1 tesztek esetében. Az SP142/Ventana teszt esetében a daganatsejtek mellett az infiltráló mononukleáris sejteket is értékelni kell, míg a másik három teszt esetében csak a daganatsejtek pozitívításának meghatározása szerepel. Az egyes tesztek esetében nem egyszerűen a pozitív/negatív esetek meghatározása a feladat, hanem a pozitívítás mértéke is fontos. Ehhez azonban arra van szükség, hogy megfelelő ismert intenzitású kontrollokat használjunk, amelyekkel a daganatsejtek pozitívításának pontos aránya kalibrálható. A daganatsejtek esetében az 1-3+ pozitívítási mértéket mutató tumorsejtek arányát kell meghatározni, amihez minimálisan 100 daganatsejtet kell értékelni. Kis biopsziás mintákban ennek a sejtmennyiségnek a jelenléte esetenként nem teszi lehetővé a korrekt tesztelést. Az SP142/Ventana PD-L1-teszt esetében a kiértékelés része az infiltráló sejtek pozitívításának meghatározása is, azonban ez esetben a pozitív sejtek által elfoglalt terület %-os arányát kell megadni, ami szokatlan feladat a patológus számára.

Az a helyzet, hogy egy adott diagnosztikus tesztet több gyártó is forgalmaz, és ezek valamennyien *in vitro* diagnosztikumok, nem különlegesség, több, a daganatdiagnosztikában vagy a molekuláris patológiai diagnosztikában szükséges teszt esetében is ez a helyzet. Az újdonság azonban az, hogy a PD-L1-meghatározás esetében az egyes tesztek egy-egy adott gyógyszerhez kapcsoltnak kerülnek forgalmazásra. Felmerült a kérdés, hogy e tesztek mennyiben hasonlíthatók össze, illetve hogy az ezekkel kapott eredmények mennyiben feleltethetők meg egymásnak. A kérdés a tüdőrák-diagnosztikára koncentrált, de a későbbiekben várhatóan más daganatokban is fel fog merülni. Az NIH (National Institutes

of Health) is észlette ezt a problémát, és az ún. Blueprint program [29] keretében kezdte meg a kérdés elemzését, elsőként a négy PD-L1-teszt összehasonlító értékelésével 40 nem kissejtes tüdőrák formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintáján. A daganatsejtek pozitívítási arányának (tumor cell, TC) meghatározása esetében a négy tesztből három egymással összehasonlítható eredményt produkált, míg az SP142/Ventana teszt konzekvensen aluljelölte a daganatsejteket. Meglepetésre a tumort infiltráló mononukleáris sejtek pozitívításának (immune cell, IC) meghatározásában a négy teszt nagyobb individuális eltéréseket mutatott (a négy teszt gyakorlatilag nem volt összehasonlítható, ami minden bizonnyal a felhasznált primer antitestek sajátosságaira vezethető vissza). A négy teszt esetében az adott esszére jellemző pozitív/negatív határértéket használva kiértékeltek az ún. prediktív képességet (a daganatok PD-L1-pozitívítását), a 22C3 és a 28-8 esetében 1%-os, az SP263-nál 25%-os TC-pozitívítási határértékkel, míg az SP142 esetében TC1/IC1 határértékkel számolva. A különböző tesztek 87–95%-ban adtak azonos PD-L1-eredményt, míg az SP142 teszt csak 63–66%-ban. A molekuláris diagnosztikában a tesztek 95% feletti pontosságot várnak el. Az elemzés alapján a négy teszt nem helyettesíthető egymással, és ami feltűnő, hogy az SP142 teszt elfogadhatatlanul alacsonyabb érzékenységgű a másik háromhoz hasonlítva [29]. Az elemzés másik konklúziója az volt, hogy amellet, hogy a tesztek nem lehet egymással helyettesíteni, a kiértékelési módokat sem szabad felcserélni. Az IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) ajánlása szerint a vizsgálat legfontosabb tanulsága az, hogy a tüdőrákok PD-L1-diagnosztikájában az adott alkalmazandó anti-PD-1/PD-L1 terápiatípusra specifikus tesztet kell alkalmazni. A program következő fázisában a PD-L1-tesztek prediktív erejét kívánják vizsgálni az egyes anti-PD-1/PD-L1 terápiák hatékonyságával összefüggésben [29].



### Hazai konzekvenciák

A PD-L1-meghatározás fentebb összefoglalt sajátosságai és a daganatok PD-L1-protein-expressziójának klinikai jelentősége alapján az ajánlható, hogy a diagnosztikus célú tesztek esetében az „*in vitro* diagnosztikum” minősítésű kiteket használják a centrumok, lehetőség szerint immunfestő automata használatával. Amennyiben többféle gyógyszer alkalmazása is szóba jön egy adott daganatos indikációban, célszerűnek látszik az adott gyógyszerekhez tartozó kiegészítő/társított diagnosztikumokkal végezni a vizsgálatot és a kiértékeléseket. A PD-L1-leletnek tartalmaznia kell a használt IVD-teszt pontos összetételét,

a gyári és helyi pozitív és negatív kontrollok használatát, valamint a PD-L1-expresszió mértékét a daganatsejteken és/vagy az infiltráló mononukleáris sejteken. Az MSI-meghatározás ma még nem része a daganatok rutin patológiai diagnosztikájának, azonban ez a közeljövőben meg fog változni. A kérdés az, hogy csak a vastagbélrákok diagnosztikája, vagy valamennyi daganaté fog változni az immunellenőrzőpont-gátló terápiák indikációváltozása miatt. A diagnosztikus centrumoknak és a biztosítónak is alkalmazkodnia kell majd ahhoz az új helyzethez, hogy nagy gyakoriságú daganatokban újabb prediktív molekuláris patológiai eljárást kell alkalmazni.

### IRODALOM

- Kopper L, Tímár J, Becságh P, Nagy Zs. Daganatimmunológia. In: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 4. Szerk. Kopper L, Tímár J, Becságh P, Nagy Zs., Semmelweis Kiadó, Budapest 2015, pp. 64–71
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 35:S185–198, 2015
- Naboush A, Roman CA, Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. *J Investig Med* 65:754–758, 2017
- Concha-Benavente F, Srivastava R, Ferrone S, Ferris RL. Immunological and clinical significance of HLA class I antigen processing machinery component defects in malignant cells. *Oral Oncol* 58:52–58, 2016
- Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The where, the when and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. *Clin Cancer Res* 22:1865–1874, 2016
- Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, et al. Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology* 1:1323–1343, 2012
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232:199–209, 2014
- Lal N, Beggs AD, Willcox BE, Middleton GW. Immunogenomic stratification of colorectal cancer: Implications for development of targeted immunotherapy. *Oncoimmunology* 4:e976052, 2015
- Toh JW, de Souza P, Lim SH, et al. The potential value of immunotherapy in colorectal cancers: review of the evidence for programmed death-1 inhibitor therapy. *Clin Colorectal Cancer* 15: 285–291, 2016
- Tímár J, Vízkeleti L, Doma V, et al. Genetic progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 35: 93–107, 2016
- Tímár J. A melanomaprogresszió immungenetikája: klinikai onkológiai tanulságok. *Magy Belorv Arch* 69:250–254, 2016
- Ladányi A. A tumort infiltráló immunsejtek prognosztikai értéke melanómában. *Magy Onkol* 57:85–95, 2013
- Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 28:490–500, 2015
- Roh W, Chen PL, Reuben A, 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* 9:379–390, 2017
- Van Allen EM, Miao D, Schilling B, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science* 350:207–211, 2015
- Ladányi A. Immunológiai biomarkerek a rákellenes kezelés hatásának megjósolásában. *Magy Onkol* 60:4–10, 2016
- Balatonai T, Mohos A, Sebestyén T, et al. Tumor-infiltrating immune cells as potential predictive markers of response to treatment and survival in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *J Transl Med* 15(Suppl 1):8, 2017
- Damuzzo V, Solito S, Pinton L, et al. Clinical implication of tumor-associated and immunological parameters in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology* 5:e1249559, 2016
- Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Guekes-Foppen M, et al. Baseline peripheral blood biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Clin Cancer Res* 22:2908–2918, 2016
- Borcuk AC, Allen TC. PD-L1 and lung cancer: the era of precision-ish medicine? *Arch Pathol Lab Med* 140:351–354, 2016
- Teixidó C, Karachaliou N, González-Cao M, et al. Assays for predicting and monitoring responses to lung cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med* 12:87–95, 2015
- Téglási V, Reiniger L, Fábrián K, et al. Evaluating the significance of density, localization, and PD-1/PD-L1 immunopositivity of mononuclear cells in the clinical course of lung adenocarcinoma patients with brain metastasis. *Neuro Oncol* doi: 10.1093/neuonc/ [Epub ahead of print], 2017
- Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348:124–128, 2015
- Grigg C, Rizvi NA. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction? *J Immunother Cancer* 4:48, 2016
- Kerr KM, Nicolson MC. Non-small cell lung cancer, PD-L1, and the pathologist. *Arch Pathol Lab Med* 140:249–254, 2016
- Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 372:2509–2520, 2015
- Garber K. Oncologists await historic first: a pan-tumor predictive marker, for immunotherapy. *Nat Biotechnol* 35:297–298, 2017
- Chen W, Swanson BJ, Frankel WD. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologist. *Diagn Pathol* 12:e24, 2017
- Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, 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* 12:208–222, 2017