



Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

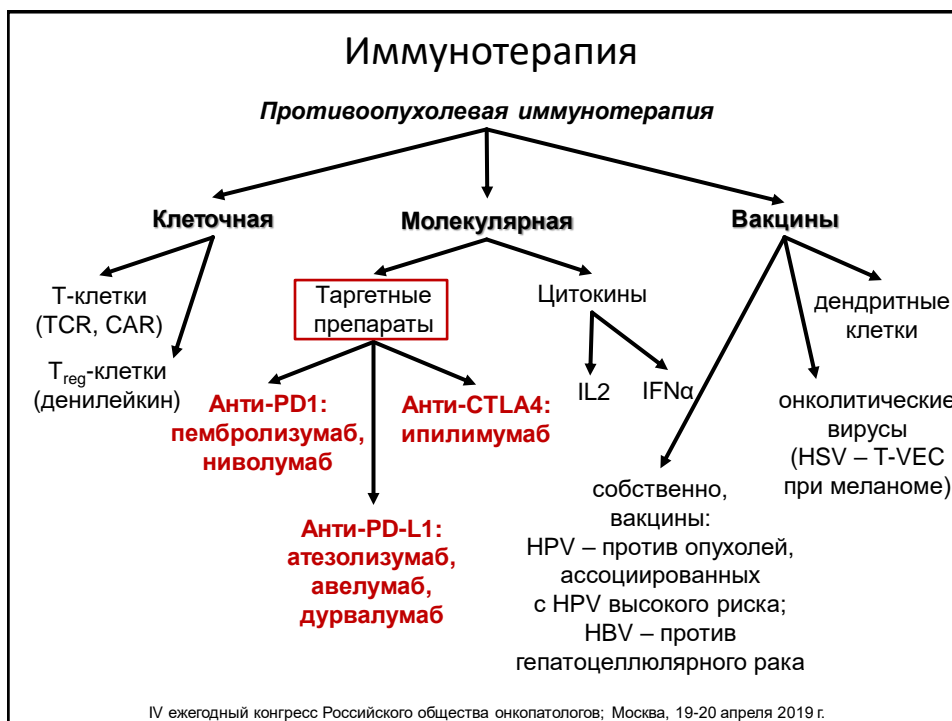


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) Институт молекулярной медицины

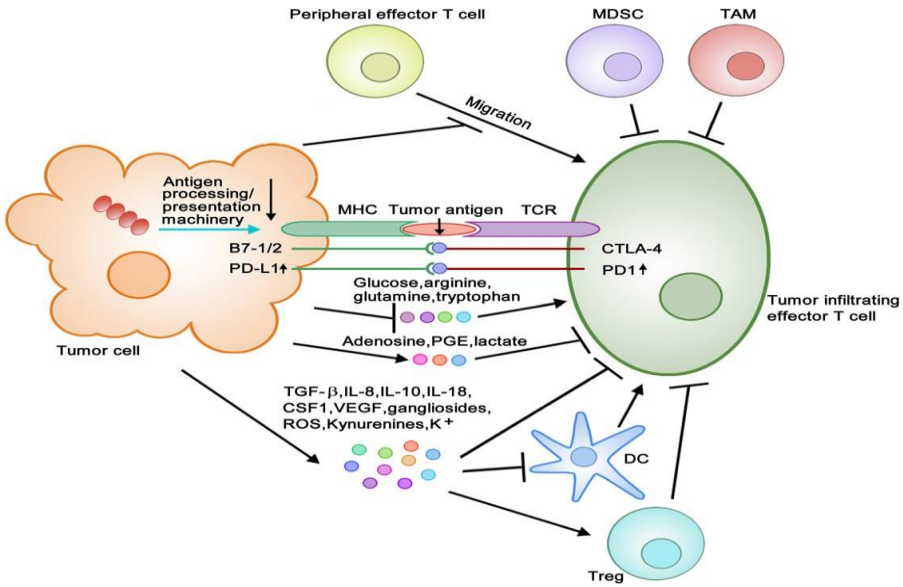
## МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ И МУТАЦИОННАЯ НАГРУЗКА ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

к.м.н., доц. Михайленко Д.С.

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.



# Противоопухолевый иммунный ответ



Liu M. et al., 2018

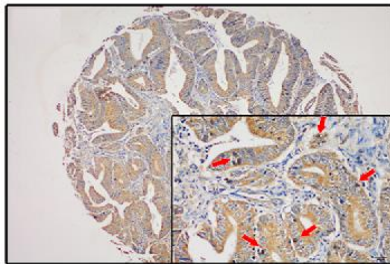
IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Экспрессия PD-L1 как прогностический признак

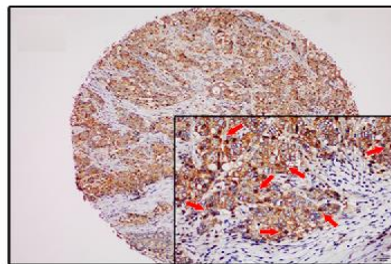
Из молекул PD1, PD-L1, PD-L2 с эффективностью анти-PD1/PD-L1 терапии достоверно ассоциирована только экспрессия PD-L1

ИГХ – наиболее распространенный метод определения экспрессии PD-L1

PD-1



PD-L1



Li Y. et al., 2016

При немелкоклеточном раке легкого:

На терапию ниволумабом ответили 36% пациентов с гиперэкспрессией PD-L1 и 0% - без экспрессии PD-L1

На терапию пембролизумабом ответили 45% пациентов с гиперэкспрессией PD-L1 и 11% - без экспрессии PD-L1

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Тесты на PD-L1, одобренные FDA

Препарат	Тип опухоли	Положительный результат теста на PD-L1
Пембролизумаб (KEYTRUDE)	Немелкоклеточный рак легкого	TPS $\geq$ 1% - экспрессия, TPS $\geq$ 50% видимых опухолевых клеток - гиперэкспрессия
	Аденокарцинома желудка	CPS $\geq$ 1%
	Рак шейки матки	CPS $\geq$ 1%
	Уротелиальная карцинома	CPS $\geq$ 10%
Ниволумаб (OPDIVO)	Немелкоклеточный рак легкого	*должно быть не менее 100 опухолевых клеток в образце
	Меланома	$\geq$ 1% опухолевых клеток имеют мембранное окрашивание
Атезолизумаб (TECENTRIQ)	Уротелиальная карцинома	$\geq$ 5% опухоль-ассоциированных иммунных клеток
	Немелкоклеточный рак легкого	$\geq$ 50% опухолевых клеток или $\geq$ 10% опухоль-ассоциированных иммунных клеток
Дурвалумаб (IMFINZI)	Уротелиальная карцинома (инвазивная или метастазирующая)	Любое из условий: <ul style="list-style-type: none"> <li><math>\geq</math>50% опухолевых клеток</li> <li>ICP<math>&gt;</math>1% и <math>\geq</math>10% опухоль-ассоциированных иммунных клеток</li> <li>ICP=1% и все опухоль-ассоциированные иммунные клетки</li> </ul>

TPS – tumor proportion score – доля опухолевых клеток с мембранным окрашиванием любой интенсивности; CPS – combined positive score – количество окрашенных клеток (опухолевых, лимфоцитов, макрофагов); ICP – immune cells present – процент опухоли, занятый опухоль-ассоциированными иммунными клетками

- Часть пациентов без гиперэкспрессии PD-L1 тоже отвечают на таргетную иммунотерапию
- Экспрессия PD-L1 временно индуцируется цитокинами и может отражать статус пациента или проводимую терапию, а не особенности опухоли
- В небольшой мере могут отличаться результаты на разных тест-системах (Ventana SP263/Dako 28-8/Merck 22C3 – конкордантность 96%) (Zhang M. et al., 2018)



**Экспрессия PD-L1 как единственный маркер чувствительности к иммунотерапии – недостаточно!**

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## В чем идея генетического тестирования при иммунотерапии?

Чем больше в опухоли образуется видоизмененных белков – опухолевых неоантигенов – тем в большей мере она представляет собой мишень для иммунной системы



Опухолевые неоантигены образуются вследствие точковых мутаций в кодирующих их генах, либо при перестройках с образованием химер



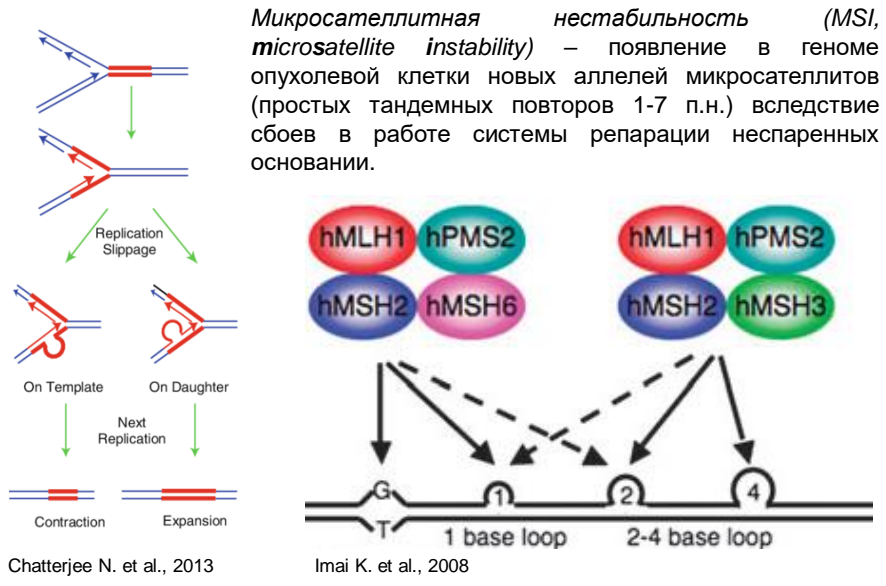
Значит, чем больше мутационная нагрузка в расчете на геном опухолевой клетки, тем, как ожидается, более эффективны будут препараты, активирующие противоопухолевый иммунитет



Вопрос остается как будто бы за малым – разработать адекватную методику оценки мутационной нагрузки для использования в клинике.....

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Механизм микросателлитной нестабильности



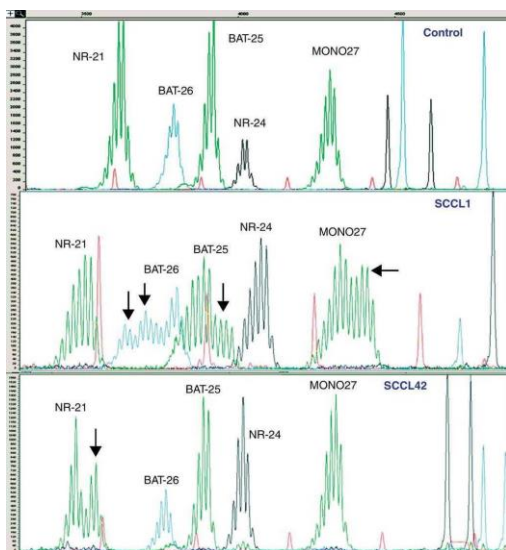
IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Метод определения MSI



IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Анализ микросателлитной нестабильности



Martinez J.G. et al., 2012

Boland C.R. et al., 1998: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer:

**BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250**

**Результат:**

**MSS – ни по одному нет MSI**

**MSI-L – один с MSI**

**MSI-H – два и более с MSI**

Сейчас чаще используют панель из мононуклеотидных повторов:

**BAT25, BAT26, NR21, NR24, Mono27**

Murphy K.M. et al., 2006. Comparison of the Microsatellite Instability Analysis System and the Bethesda Panel for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancers.

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## С какой целью проводят тест на MSI?

- MSI-H подтверждает синдром Линча при подозрении на него у пациентов с колоректальным раком**
- MSI-H ассоциирован с лучшей выживаемостью у пациентов на II стадии колоректального рака, отсутствием необходимости проведения у них адъювантной терапии 5-фторурацилом (если нет потери экспрессии SMAD4 и других маркеров-модификаторов)
- MSI-H ассоциирован с чувствительностью к анти-PD-1 иммунотерапии пембролизумабом (MSI-H response rate 50% vs 0% у MSS), ниволумабом, ниволумабом + ипилимумабом**
- MSI-H ассоциирована с мутациями *B2M* (в этом случае нарушается функция HLA-I, презентация антигенов, накапливаются Т-клетки PD-1+). При этом увеличивается выживаемость на ранних стадиях, но может возникать резистентность к ингибиторам PD-1 при иммунотерапии на поздних стадиях (меланома).

Анализ MSI может быть также проведен с помощью ИГХ (*MLH1, MSH2, MSH6, PMS2*), конкордантность с генетическим тестом 92% (Battaglin F. et al., 2018)

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Ограничения теста MSI

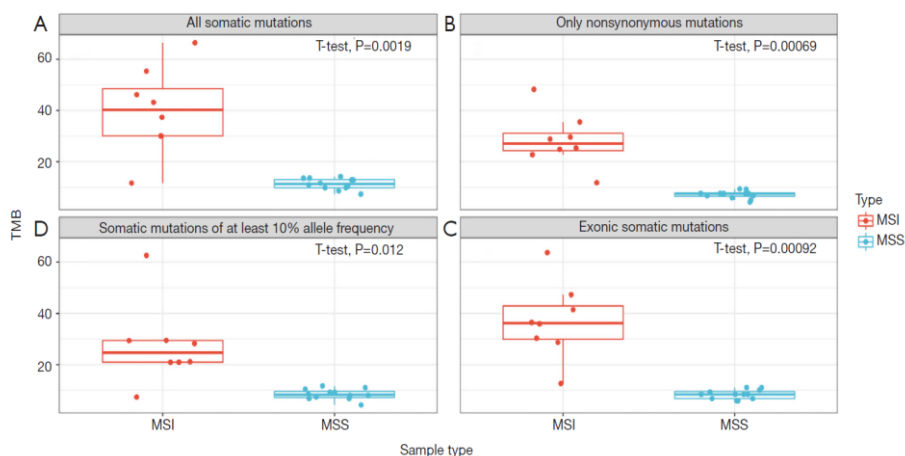
TABLE 1. Frequency and Clinico-pathologic Features of Cancers With Microsatellite Instability High (MSI-H)

Tumor Type	Frequency (%)	Tumor Type	Frequency (%)
Thyroid carcinoma	63	Esophageal adenocarcinoma	7
Skin (sebaceous tumors)	35-60	Pancreatic adenocarcinoma	2-17
Endometrial carcinoma	26-33	Hepatocellular carcinoma	2-16
Colorectal carcinoma	15-20	Soft-tissue sarcoma	2-5
Ampullary carcinoma	10	Head and neck squamous cell carcinoma	2-3
Ovarian carcinoma	10	Renal cell carcinoma	2
Gastric carcinoma	8-22	Skin (melanoma)	1-11
Cervical cancer	8	Prostate carcinoma	1-2
		Bladder cancer	1

**83%** опухолей с MSI-H имеют высокую мутационную нагрузку, но только **16%** опухолей с высокой мутационной нагрузкой классифицируют как MSI-H (Chang L. et al., 2017)

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Ассоциация MSI с мутационной нагрузкой



Chaudhary R. et al. 2018.

**MSI-H коррелирует с мутационной нагрузкой при KPP независимо от вариантов расчета**

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Определение мутационной нагрузки с помощью NGS

Выделение ДНК

↓

Фрагментация ДНК, баркодирование, лигирование с адаптерами

↓

Клональная амплификация библиотеки

↓

Секвенирование

↓

Биоинформатический анализ данных

- *Разные технологии NGS с различной эффективностью выявляют те или иные типы мутаций*
- *В разных экспериментах мутационная нагрузка определяется на экзом, геномную панель, геном; причем расчет может зависеть от качества прочтений*



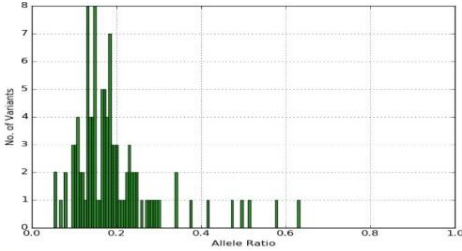
**Нужен консенсус в методике определения мутационной нагрузки**

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

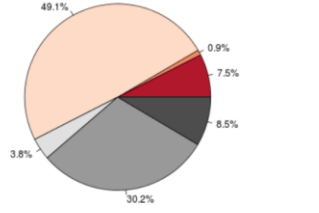
## Панель [OncoPrint™ Tumor Mutation Load], ThermoFisherScientific

Mutational load (tumor mutational burden – TMB) – количество несинонимичных соматических вариантов (миссенс-, нонсенс-, индели) в расчете на 1 м.п.н. кодирующей последовательности, секвенированной с удовлетворительным покрытием. Панель содержит 409 генов.

Pre-calibration mutation load = (nonsynonymous somatic mutations x 10<sup>6</sup>) / total exonic bases with sufficient coverage  
 If pre-calibration mutation load ≥ 25, then mutation load = (pre-calibration mutation load – 25) x calibration slope + 25  
 If pre-calibration mutation load < 25, then no calibration is required, mutation load = pre-calibration mutation load



Total Somatic Variants: 108  
 Nonsynonymous: 89; Synonymous: 16  
 Number of Somatic Variants Present in COSMIC: 15



**Figure 4** Substitution type of Somatic Mutations

C>T	49.1%	T>G	8.5%
C>G	7.5%	T>C	8.8%
C>A	0.9%	T>A	3.2%

A pie chart dividing somatic mutations into 6 base substitution classes (that is, C>A, C>G, C>T, T>A, T>C, T>G) based on their substitution type.

OncoPrint™ Tumor Mutation Load Assay  
 USER GUIDE, ThermoFisherScientific

Но пока нет РУ.....((

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

### Преимущества и недостатки молекулярных предикторов ответа на таргетную иммунотерапию

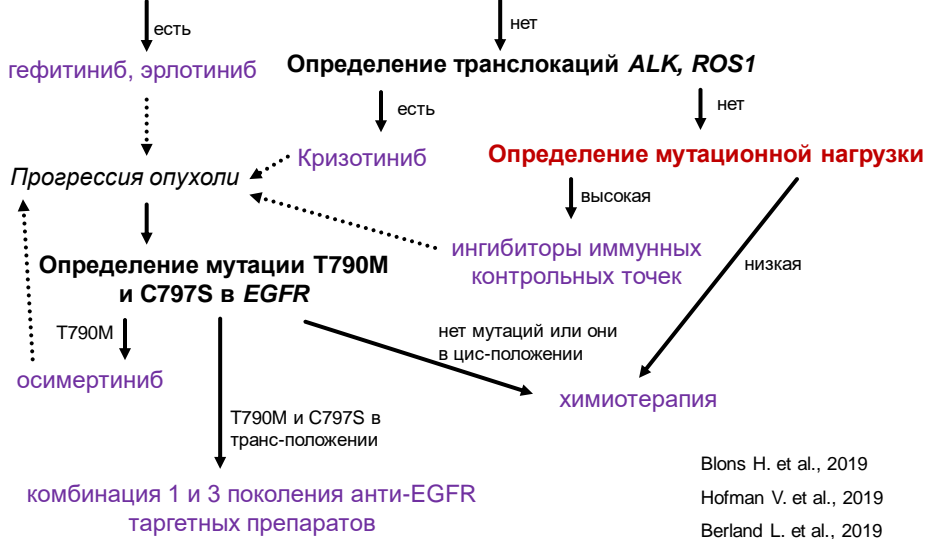
	Advantages	Disadvantages
<b>PD-L1 Immunohistochemistry</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Most well-characterized biomarker to date</li> <li>Rapid turn around time from biopsy</li> <li>IHC assays are standardized specific to each therapy</li> <li>Relatively inexpensive</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Discordant results across studies</li> <li>Poor negative predictive value: responses seen in PD-L1 negative tumors</li> <li>Multiple antibodies in use to detect PD-L1</li> <li>Unclear if composite score or tumor cell score is more reflective of the tumor microenvironment</li> <li>Biomarker is dynamic over time and does not reflect PD-1/PD-L1 interactions in tumor draining lymph nodes</li> <li>Does not assess status of the immune microenvironment</li> </ul>
<b>TCGA Subtyping</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Evidence of increased immunotherapy response in luminal cluster II subtypes with atezolizumab</li> <li>Basal cluster I subtype demonstrated increased ORR with nivolumab therapy</li> <li>Distinct classifications based on tumor gene signatures (i.e. few patients with gene signatures between groups)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Multiple gene cluster assays used, difficult to standardize</li> <li>TCGA subtyping in patients treated with immunotherapy is limited to small numbers in each cohort (&lt;60 patients in IMVigor study)</li> <li>May require deep sequencing to appropriately identify the TCGA subtype</li> <li>Responses are achieved in all 4 TCGA clusters, suggesting a low negative predictive value</li> <li>Does not assess status of the immune microenvironment</li> </ul>
<b>Tumor Mutational Burden</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Clear examples of durable responses (&gt; 6 months) in patients with high mutation burden</li> <li>Correlation demonstrated in subgroup analyses between tumor mutation burden and overall response rates with atezolizumab and pembrolizumab</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Difficult to standardize between sequencing assays</li> <li>Relative weight of SNPs and translocations not yet elucidated</li> <li>Relationship between tumor mutation burden and neoantigen burden is still undefined</li> <li>Depth of sequencing required to predict responders vs nonresponders undetermined</li> <li>Evolution of tumor over time may change the relative mutation burden</li> <li>Does not assess status of the immune microenvironment</li> </ul>
<b>Immune Cell Gene Expression Profiling</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Higher reproducibility relative to PD-L1 IHC to predict immunotherapy responses</li> <li>Only biomarker assessing immune cell status rather than tumor characteristics</li> <li>Correlated with response to therapy in subgroup analyses of nivolumab and pembrolizumab trials</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>No standardized commercially available gene panel as of yet. Multiple gene panels currently available (T-cell panel, combined T-cell tumor cell panel, IFN-γ specific)</li> <li>Insufficient negative predictive value: responders seen in all groups</li> <li>Cost</li> </ul>

Aggen D.H., Drake C.G. Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: a moving target. J Immun Ther Cancer (2017) 5:94

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

### Алгоритм генетического тестирования при немелкоклеточном раке легкого

#### Определение активирующих мутаций в 18-21 экзонах EGFR



Blons H. et al., 2019  
Hofman V. et al., 2019  
Berland L. et al., 2019



## Пороговые уровни мутационной нагрузки при немелкоклеточном раке легкого

Немелкоклеточный рак легкого имеет одну из самых высоких мутационных нагрузок – в среднем, 7.2 mut/Mb, причем 12% случаев – более 20 mut/Mb

### ChekMate-026 III фаза, ниволумаб, немелкоклеточный рак легкого, экзом:

до 100 mut/Mb – низкая, 100-242 mut/Mb – средняя, 243 и более mut/Mb – высокая

### Набор F1CDx, атезолизумаб, немелкоклеточный рак легкого, 324 гена:

пороговый уровень 16 mut/Mb

### POPLAR II фаза, атезолизумаб, немелкоклеточный рак легкого, для ctDNA:

пороговый уровень 14 mut/Mb

Другие наборы для оценки мутационной нагрузки в ctDNA: 394 и 62 гена –

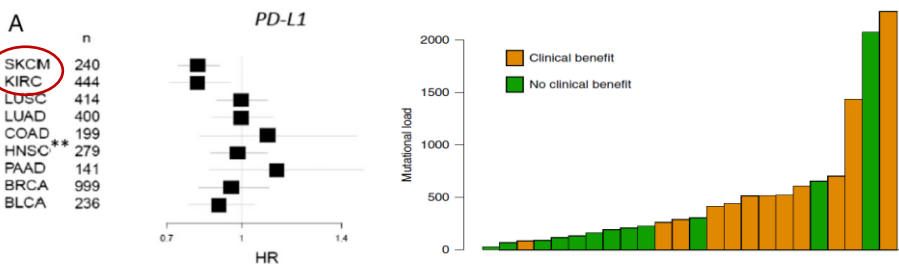
результаты совпали лишь у 17% пациентов (...желательно не менее 300 генов

**Результат зависит от количества исследуемых локусов, вида биоматериала (tissue DNA vs ctDNA), дизайна исследования, но сейчас ряд исследователей считают высокой нагрузкой более 10 mut/Mb, низкой – менее 5 mut/Mb**

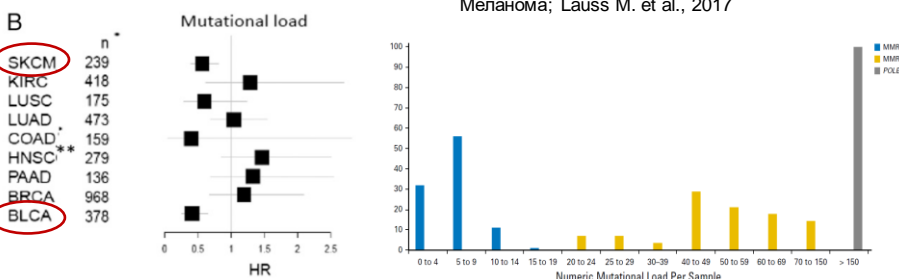
Berland L. et al., 2019

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Мутационная нагрузка в меланоме и колоректальном раке



Меланома; Lauss M. et al., 2017



Danilova L. et al., 2016

Колоректальный рак; Stadler Z.K. et al., 2016

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.

## Заключение

1. Пембролизумаб рекомендован FDA пациентам с MSI-H независимо от типа опухоли
2. Ниволумаб рекомендован пациентам с немелкоклеточным раком легкого с мутационной нагрузкой больше 10 мутаций на 1 м.п.н.
3. Для большинства исследованных типов опухолей пороговый уровень мутационной нагрузки при планировании иммунотерапии составляет 10-20 несинонимичных мутаций на 1 м.п.н.
4. При определении мутационной нагрузки желательно секвенировать если не экзом, то генные панели, которые включают целевые кодирующие части не менее 300 генов; фильтровать ошибки, которые случаются в FFPE-образцах из-за фиксации.

IV ежегодный конгресс Российского общества онкопатологов; Москва, 19-20 апреля 2019 г.