

A programozott sejthalál fehérje 1 (PD-1) – programozott sejthalál ligandum 1 (PD-L1) gátlás prediktív diagnosztikája

LOTZ GÁBOR¹, SMUK GÁBOR², KOCSMÁR ÉVA¹, KOCSMÁR ILDIKÓ¹, TÍMÁR JÓZSEF¹

¹Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, Budapest, ²Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ, Patológiai Intézet, Pécs

A dolgozat elkészültéhez a következő pályázati források járultak hozzá:

Semmelweis Egyetem Start-up grant (LG), Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválósági Programja (ÚNKP-18-3-I-SE-44; KÉ).

Levelezési cím:

Dr. Lotz Gábor, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet,
1091 Budapest, Üllői út 93.

E-mail: lotz.gabor@med.semmelweis-univ.hu.

Mobil: +36-20-825-9665. Tel./fax: +36-1-215-6921

Közlésre érkezett:

2019. augusztus 26.

Elfogadva:

2019. augusztus 30.

Az elmúlt évek forradalmi változásokat hoztak a daganatok kezelésében, mivel egy új modalitás, az immunterápia a mindennapi gyakorlat részévé vált. Az ún. ellenőrző-pont-gátlók kifejlesztését, majd bevezetését követte a kísérő diagnosztikumok kialakítása is, és az alkalmazás egyre inkább a PD-L1-meghatározáshoz kötődik. Ugyanakkor szinte minden egyes immunterápiás gyógyszerhez egyedi kísérő diagnosztikum került kifejlesztésre, és hogy a kérdés még bonyolultabb legyen, szinte minden egyes diagnosztikum esetében más-más kiértékelési protokollt vezettek be és törzskönyveztek, amelyek eltérő módon veszik figyelembe a daganatsejtek, illetve a környező immunsejtek PD-L1-expresszióját. Ezek fényében a napi PD-L1-diagnosztikában szigorúan követni kell az alkalmazandó gyógyszerekhez kialakított technológiai és kiértékelési protokollokat, mert az ettől való eltérés befolyásolhatja az immunterápia hatékonyságát. *Magy Onkol* 63:183-191, 2019

Kulcsszavak: PD-1, PD-L1, biomarker, prediktív diagnosztika

In the past years, immunotherapy emerged as a novel modality of clinical oncology. The development and introduction of immune checkpoint inhibitors required the development of companion diagnostics, the PD-L1 protein immunohistochemical tests. Unfortunately, almost all checkpoint inhibitors were exclusively validated by a specific PD-L1 in vitro diagnostic test with its own evaluation protocol. These tests have different diagnostic sensitivity for PD-L1 protein and the evaluation protocols differ in many respects, as cancer and immune cell positivities are considered variously in the immunotherapy-specific evaluation schemes. Accordingly, in the routine PD-L1 diagnostics, it is crucial to follow the individual therapy-specific technical and evaluation protocols since these are not interchangeable and non-adherence may affect therapeutic efficacy.

*Lotz G, Smuk G, Kocsmár É, Kocsmár I, Tímár J. Predictive diagnostics of the programmed cell death receptor 1 (PD-1) – programmed cell death ligand 1 (PD-L1) inhibitory therapies. *Magy Onkol* 63:183-191, 2019*

Keywords: PD-1, PD-L1, biomarker, predictive diagnostics

BEVEZETÉS

A tumorelles immunválasz modulálása a daganatok kezelésének ígéretes lehetőségéből az onkológia terápiás tárházának bevett eszközévé vált az utóbbi években. Ugyanakkor jelenleg is tanúi vagyunk annak a szerves fejlődésnek, amely során az immunonkológia keresi azokat a prediktív markereket, melyek még pontosabban képesek a kezelés eredményességének előjelzésére. Ahogy ezek folyamatosan bővülő köre kerül törzskönyvezésre újabb és újabb daganatfajták esetében, úgy a kapcsolódó prediktív diagnosztika feladatai is növekednek. Ennek fő eszköze a PD-1/PD-L1 (programozott sejthalál fehérje 1/programozott sejthalál ligandum 1) gátlók esetén jelenleg a daganatsejtek és/vagy immunsejtek PD-L1-expressziójának immunhisztokémiai (IHC) kimutatása, amelynek elméleti és gyakorlati kérdéseit kívánjuk a jelen közleményben tárgyalni.

A DAGANATELLENES IMMUNVÁLASZ

A daganatellenes immunválasz legfontosabb sejtjes elemei a CD4-, ill. CD8-pozitív T-sejtek, valamint B-limfociták, továbbá a különféle antigénprezentáló sejtek, mint a makrofágok és dendritikus sejtek. Az antigénprezentáló sejtek felveszik a tumorsejtekből származó fehérjéket, majd a nyirokcsomókba vándorolva bemutatják ezek egyes peptidrészeit az MHC- (fő hisztokompatibilitási komplex) molekuláikhoz kötve a T-sejteknek. Ezt a folyamatot a két sejttípus felszínén számos receptor és ligandum szabályozza, melyek egy része serkentő, másik része gátló hatást fejt ki a T-sejt-szignalizációra, és ezek összessége határozza meg az aktiváció bekövetkeztét (1). Ideális esetben az aktivációs hatások túlsúlyba kerülnek, a T-sejtek aktiválódnak, majd klonálisan felszaporodva a tumorba vándorolnak, ahol kapcsolatba lépnek a daganatsejtekkel és elpusztítják azokat.

Azonban az előzőekben felvázolt folyamat gyakran nem működik megfelelően, aminek hátterében számos, a daganat és a gazdaszervezet sajátos interakciójában gyökerező ok állhat (1–4). Az immunválasz aktiválásában kulcsfontosságúak a tumor-neoantigének. Minél több a mutáció egy daganatban, annál nagyobb az esélye, hogy a neoantigének között erős immunogenitásúak is megjelennek, illetve hogy összességük már erős immunválaszt képes kiváltani. Ezért a nagy tumor mutációs terheltséggel rendelkező daganatok, mint a dohányzás- és UV-indukált vagy a DNS-javító rendszerek (pl. mismatch repair [MMR], nukleotidexcízió repair [BRCA]) hibái következtében kialakuló tumorokban nagyobb eséllyel aktiválódnak az immunrendszer, általában erősebb a tumorinfiltráló immunsejtek (TIS) denzitása és a gyulladáshoz vezető mikroenvironment (3, 5). A TIS-denztás prognosztikus/prediktív értékkel bírhat (6), hiszen e sejtek nélkül az immunrendszer képtelen a daganatok elpusztítására és az immunellenőrző pontok gátlásán alapuló terápiák sem hatásosak.

A daganatos mikroenvironment azonban gátolhatja is a tumorantigének aktiválta immunválaszt a daganatos hipoxia T-sejt-funkciót csökkentő hatása és az antigénprezentáló vagy az effektorsejteket gátló citokinek, növekedési faktorok jelenléte

révén. Emellett a tumorsejtek rezisztenciát is kifejleszhetnek az immuneffektorsejtek citotoxikus proteázaival szemben (3, 7). A veszületett immunválaszban érintett egyes sejttípusok (makrofágok, mieloid sejtek) gyakran tumornövekedést és/vagy -progressziót elősegítő szerepet töltenek be egyes növekedési faktorok (pl. TGF- β), reaktív oxigénradikálok, angiogén faktorok, szövetbontó enzimek termelése révén, amivel egybek mellett a daganatellenes immunválaszt is blokkolhatják. Ebből a szempontból kiemelt jelentőségűek a tumorasszociált makrofágok, amelyek antigénprezentáló szerepüket elvesztve és a fenti mechanizmusok közrejátszásával gyakran immunválasz-blokkolók és tumornövekedést serkentő hatásúak (2).

Az immunszignalizáció folyamata igen komoly szabályozó mechanizmussal bír, mert az idegen-saját felismerés meglehetősen komplex feladat. Elégtelen működése fertőzések, daganatos betegségek gyakoribb előfordulását, túlműködése pedig autoimmun betegségek megjelenését okozhatja. A T-sejtek és az antigénprezentáló sejtek közötti MHC-függő és -független kapcsolatok sora szabályozza serkentő, illetve gátló módon a T-sejt-aktivációt. A B7 a legkiterjedtebb MHC-független molekulacsalád, mely önmagában is bemutatja a folyamat sokrétű szabályozását, hiszen egyes tagjai mind az antigénprezentáló, mind a T-sejtek felszínén megtalálhatóak, és mivel egy ligandum több különböző receptorhoz is kapcsolódhat, így ettől függően egyesek pozitív és negatív szabályozó funkciót is elláthatnak. Am közzük egyesek kitüntetett jelentőséggel bírnak a daganat elleni immunválaszban, így a CTLA-4, amely a fő T-sejt-kostimulátorok gátlója, vagy a PD-1, melynek ligandumaként a PD-L1 nemcsak az immunsejteken, hanem gyakran a daganatsejteken is kifejeződik (1, 8).

A PD-1/PD-L1 GÁTLÁS ELMÉLETI ALAPJAI

Mind a PD-1, mind a PD-L1 az immunfehérjékre jellemző részleteket hordoz. A PD-1 génje a 2-es kromoszóma hosszú karjának telomerikus végén található. A glikozilált, immunológiai aktív receptorfehérje kb. 50 kDa nagyságú 1-es típusú transzmembrán fehérje, extracelluláris részében variábilis immunoglobulin (IgV) doménnel. Intracelluláris szakaszának két immunreceptor-motívuma (ITIM és ITSM) közül elsődlegesen az ITSM felelős a PD-1 által közvetített immunszignalizáció és T-sejt-aktiváció gátlásáért (9). A PD-L1 génje a 9-es kromoszóma rövid karján található, és egy 40 kDa nagyságú, hosszabb extracelluláris szakasszal és rövid intracelluláris farokkal rendelkező 1-es típusú transzmembrán fehérjét kódol. Az extracelluláris rész immunoglobulinszerű felépítésű, proximálisan egy konstans (IgC) régióval, disztálisan pedig egy variábilis (IgV) doménnel. Az intracelluláris szakasz jelentősen különbözik a B7-család egyéb tagjaitól. Funkciója sokáig tisztázatlan volt, újabban egyre több adat utal arra, hogy jelátviteli szerepe van, melyben a konzervált RMLDVEKC és DTSSK motívumai működhetnek közre (10).

A PD-L1 sejtfelszíni jelenléte az adaptív immunválasz elnyomására, az autoimmunitás gátlására fejlődött ki. A T- és

B-sejtek, makrofágok, dendritikus sejtek, hízósejtek mellett számos nem hematopoetikus normális sejtípus is kifejezi, így endotélsejtek, keratinociták, Langerhans-szigetsejtek, placenta-szinciciotrofoblaszt sejtek, asztriciták és a szaruhártya sejtjei (11). A PD-L1-et hordozó sejteket az immunrendszer tolerálja, másrészt az antigénprezentáló sejtek PD-L1-expressziója gátolja a T-sejteket, így az azok célpontjai elleni immunválaszt is. A PD-1-PD-L1 kapcsolat szerepe a daganatok iránti immuntoleranciában is kiemelt jelentőségű. Ugyanis a tumorsejtekből származó (neo)antigéneket az antigénprezentáló sejtek bemutatják a regionális nyirokszövetben a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejteknek, amelyek aktiválódnak, majd kifejezik felszínükön a PD-1-et. Ezután a tumorba visszajutva az aktivált T-limfociták interferon- γ (IFN- γ) termelése aktiválja a tumorellenes makrofágokat és fokozza a tumorsejtek antigénbemutatását. Másrészt azonban indukálja ugyanezen sejtek PD-L1-expresszióját is, a PD-L1 kifejeződése pedig a PD-1/CD8⁺ citotoxikus T-sejtek funkcionális gátlásához vezet (12). A PD-1-PD-L1 kapcsolat terápiás blokkolása ezt a gátlást oldja fel, így módon az effektor T-limfociták képesek lesznek támadni a tumorsejteket.

Fontos megjegyezni azt is, hogy az itt felvázolt adaptív, IFN- γ -indukált mechanizmuson túl létezik konstitutív PD-L1-expresszió is, melyet különféle jelátviteli pályák kóros aktivációja indukál és tart fent (12). A két eltérő háttérű PD-L1-kifejeződés a szöveti mintázatuk különbözőségében is megjelenik. Az adaptív típus változó intenzitást mutat, a PD-L1-expresszió típusosan az IFN- γ -t szekretáló TIS és a tumor találkozásánál, az ún. „immunfront” területén jelenik meg, az immunsejtekkel körbefogott daganatfészkek belsőbb területein nem látható. Ugyanakkor a konstitutív típus esetén egyenesen fejeződik ki a daganatsejtek felszínén a PD-L1, a daganatban pedig általában nincs jelentősebb TIS-megjelenés. A két típus kombinálódhat is, amikor a daganatsejtek konstitutív PD-L1-expresszióját az immunfrontban az ott szekretált gyulladáshoz kapcsolódó citokinek tovább emelik (ilyenkor a TIS-sel körbevett tumorrészek belsejében is van PD-L1-expresszió, csak alacsonyabb szintű, mint a TIS-hez közeli daganatsejtekben). Ezt a képet tovább árnyalja, hogy a tumorasszociált makrofágok is hozzájárulhatnak a citotoxikus T-sejtek daganatellenes hatásosságának csökkenéséhez. PD-1-expressziójuk ugyanis a tumorsejtek PD-L1-ével kapcsolatba kerülve e hisztiociták funkcionális gátlásához vezet, miközben maguk a makrofágok mintegy barriert képezve veszik körül a daganatfészkeket, és a köztük bejutni igyekvő CD8⁺ T-sejtekkel kapcsolatba lépve (akár saját PD-L1-expressziójuk révén, akár egyéb mechanizmusokkal) gátolják azokat a daganatsejtek elérésében (13, 14). Ez azért fontos tényező, minthogy csökkentheti az immunellenőrzőpont-gátló kezelések hatásosságát is (13). Végül érdemes megjegyezni, hogy bizonyos esetekben egyéb immunválaszgátlási mechanizmus is működhethet, mivel bár a daganatsejtek nem expresszálják PD-L1-et és a tumorinfiltráló limfociták jelen vannak, az immunválasz mégsem hatékony a daganat ellen

(15). Így a PD-L1-expresszió és a limfoid infiltráció alapján a rosszindulatú daganatok négy osztályba sorolhatók: PD-L1+/TIL+ (adaptív rezisztencia; a citotoxikus limfocitákat a daganatban a tumorsejtek adaptív PD-L1-expressziója gátolja), PD-L1+/TIL- (belső indukciós; a tumorsejtek jelátviteli pályái által indukált konstitutív PD-L1-expresszió miatt a TIL kiszorul a daganatból), PD-L1-/TIL+ (immunológiai tolerancia; PD-L1-független gátló mechanizmusok miatt a jelen lévő citotoxikus limfociták nem hatásosak), PD-L1-/TIL- (immunológiai ignorancia; az immunrendszert a daganat antigénjei nem aktiválják) (16).

A PD-1/PD-L1 GÁTLÁS BIOMARKEREI

A személyre szabott orvoslás gyógymódjai esetében megszokott a terápiás válasz biomarkereken alapuló előrejelzése. Az immunellenőrzőpont-gátló kezelések hatásosságának predikciója minden ilyen korábbi megközelítésnél bonyolultabb helyzetet eredményezett (3). A hatóanyagokat fejlesztő gyógyszercégek a klinikai vizsgálatok során diagnosztikai partnerekkel társultak, és az előzőekben részletezett elméleti alapoknak megfelelően igyekeztek megtalálni, hogy a betegek mely köre profitál igazán e gyógymódokból. Ez azután sokrétű megközelítést eredményezett, mivel az adott hatóanyagtól, valamint a kezelni kívánt daganat fajtájától és/vagy molekuláris háttérétől, illetve PD-L1-expressziós mintázatától függően különböző stratégiákat engedélyeztek a gyógyszerhatóságok. Így egyes tumorok esetében nem találtak összefüggést a hatásosság és a PD-L1-expresszió között, ezért nem szükséges külön diagnosztika. Más esetekben a betegek teljes körében hatásos lehet a szer, de a PD-L1-expressziós szint alapján kiválaszthatóak azok, akiknél jelentősebb terápiás válasz várható, ezért ebben a körben ajánlott, bár nem kötelezően elvégzendő (kiegészítő forma). További daganatoknál viszont egyértelmű összefüggés mutatkozott a PD-L1-expresszió és a PD-1/PD-L1 gátlás hatásossága között, így itt a PD-L1-diagnosztika feltétele a gyógyszer alkalmazásának (kísérő/társított forma). Ez a kiegészítő vagy társított diagnosztika a PD-L1 fehérje expressziójának immunhisztokémiai detektálása, amely új jelenségként négy különböző primer antitest és a kapcsolt előhívó rendszereken alapuló *in vitro* diagnosztikumként (IVD) került törzskönyvezésre. Egy-egy ilyen IVD teszt csak az adott daganat adott gyógyszerrel alkalmazásához használható, ráadásul a PD-L1-meghatározás kiértékelési módja is csak a konkrét gyógyszer, diagnosztikum és daganatfajta kombinációra specifikus.

A hipermutációs fenotípussal (nagy neoantigén-terheléssel) asszociált elváltozások, mint a mismatch repair deficiencia (dMMR) és erős mikroszatellita-instabilitás (MSI-H) is biomarkerként szolgálhatnak. További ilyen lehet, bár még nem kiegészítő vagy társított marker, a BRCA-mutáció, de több tanulmányban igazolták a DNS-polimeráz-epszilon (POLE) exonukleáz domén mutáció hasonló szerepét is (17, 18). Emellett kiterjedten vizsgálják a tumor mutációs terheltség (TMB) biomarkerként való lehetséges alkalmazását is. Összességében elmondható, hogy az immunellenőrző-

1. TÁBLÁZAT. A PD-1/PD-L1 gátlószerek alkalmazására jóváhagyott indikációk és társult diagnosztikumai

	Pembrolizumab (anti-PD-1)	Nivolumab (anti-PD-1)	Atezolizumab (anti-PD-L1)	Durvalumab (anti-PD-L1)	Avelumab (anti-PD-L1)
NSCLC első vonal metasztatikus (monoterápiában)	ALK- és EGFR-negatív esetekben Kísérő IVD: 22C3 ≥50% TPS				
NSCLC első vonal metasztatikus nem laphám (kemoterápiával)	IHC nélkül alkalmazható ALK- és EGFR-negatív esetekben		IHC nélkül alkalmazható ALK- és EGFR-negatív esetekben		
NSCLC másodvonali	Kísérő IVD: 22C3 ≥1% TPS	IHC nélkül alkalmazható* Kiegészítő: 28-8 ≥1% TPS	IHC nélkül alkalmazható* Kiegészítő: SP142 ≥50% TC / ≥10% IC	Kísérő IVD: SP263° ≥1% TC	
SCLC (előrehaladott) első vonal (kemoterápiával)			IHC nélkül alkalmazható		
SCLC (előrehaladott) másodvonali		IHC nélkül alkalmazható			
Uroteliális első vonal (ciszplatinkezelésre alkalmatlanoknál)	Kísérő IVD: 22C3 ≥10 CPS		Kísérő IVD: SP142 ≥5% IC		
Uroteliális másodvonali (korábban platinaalapú kezelésen átesett)	IHC nélkül alkalmazható	IHC nélkül alkalmazható* Kiegészítő: 28-8 ≥1% TPS	IHC nélkül alkalmazható	Kiegészítő: SP263 ≥25% TC vagy >1% ICP és ≥25% IC vagy ICP=1% és IC=100%	IHC nélkül alkalmazható
Fej-nyaki laphámrák első vonal	Kísérő: 22C3 ≥1 CPS	IHC nélkül alkalmazható Kiegészítő: 28-8 ≥1% TPS			
Fej-nyaki laphámrák másodvonali	Kísérő IVD: 22C3 ≥50% TPS	IHC nélkül alkalmazható			
Klasszikus Hodgkin-limfóma másodvonali	IHC nélkül alkalmazható	IHC nélkül alkalmazható			
Melanóma	IHC nélkül alkalmazható	IHC nélkül alkalmazható			
RCC első vonal (kombinációban)	IHC nélkül alkalmazható	IHC nélkül alkalmazható			IHC nélkül alkalmazható
RCC másodvonali		IHC nélkül alkalmazható			
Tripla-negatív emlőrák			Kísérő IVD: SP142 ≥1% IC		
Méhnyakrák	Kísérő: 22C3 ≥1% TPS				
Gyomorrák	Kísérő: 22C3 ≥1% TPS				
HCC	IHC nélkül alkalmazható	IHC nélkül alkalmazható			
Merkel-sejtes karcinóma	IHC nélkül alkalmazható				IHC nélkül alkalmazható
Primer mediasztinális nagy B-sejtes limfóma	IHC nélkül alkalmazható				

1. TÁBLÁZAT. A PD-1/PD-L1 gátlószerek alkalmazására jóváhagyott indikációk és társult diagnosztikumai (folytatás)

	Pembrolizumab (anti-PD-1)	Nivolumab (anti-PD-1)	Atezolizumab (anti-PD-L1)	Durvalumab (anti-PD-L1)	Avelumab (anti-PD-L1)
dMMR/MSI-H kolorektális karcinóma	IHC nélkül alkalmazható	IHC nélkül alkalmazható			
dMMR/MSI-H (bármely tumor)	IHC nélkül alkalmazható				

PD-1/PD-L1 gátlószerek alkalmazására az EU-ban jóváhagyott (zöld), közeli jóváhagyás előtt álló (sárga) és jóváhagyási vizsgálat alatt álló (narancs), továbbá az EU-ban nem, de az FDA által jóváhagyott indikációk. Az Európai Gyógyszerügynökség által kötelezően előírt diagnosztikai követelmények vastag betűvel szedve. ALK: anaplasztikus limfóma kináz, EGFR: epidermális növekedési faktor receptor, HCC: hepatocelluláris karcinóma, IHC: immunhisztokémia, IVD: in vitro diagnosztikum, dMMR: mismatch repair deficiencia, MSI-H: mikroszatellita-instabilitás, NSCLC: nem kissejtes tüdőrák, RCC: vesesejtes karcinóma, SCLC: kissejtes tüdőrák. *Az EU-ban PD-L1-expresszió meghatározása nélkül alkalmazható. A kiegészítő (opcionális) IVD feltüntetve. *Az EU-ban a pembrolizumab és a nivolumab diagnosztikájára is használható

pont-gátló kezelések sikerét a TMB, a CD8⁺ T-sejtek jelenléte és a PD-L1-expresszió együttesen határozzák meg (12). Egy friss tanulmányban 21 különböző daganattípus PD-1/PD-L1 gátlásának eredményessége alapján ezek közül összességében a CD8⁺ T-sejtek mennyiségét találták a terápiás eredmény legfontosabb prediktorának (19).

2019-re az Egyesült Államok Szövetségi Gyógyszerügyi Hatósága (FDA) és/vagy az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) már 14 specifikált daganatfajta plusz bármely dMMR/MSI-H szolid tumor kezelésében engedélyezte öt különféle PD-1/PD-L1 gátló hatóanyag közül egy vagy több alkalmazását. Ezek közül a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC), fej-nyaki laphámrák, valamint uroteliális karcinóma bizonyos eseteiben, továbbá vesesejtes karcinóma, hepatocelluláris karcinóma, Hodgkin-limfóma, primer mediasztinális nagy B-sejtes limfóma, Merkel-sejtes karcinóma, kissejtes tüdőrák (SCLC), melanóma és a dMMR/MSI-H daganatok kezelésében a PD-L1-expressziótól függetlenül alkalmazhatóak egyes hatóanyagok, a PD-L1 tesztelése nem szükséges (1. táblázat). További daganat-hatóanyag kombinációk viszont PD-L1-immunhisztokémiai diagnosztikát igényelhetnek, amit az alábbiakban tárgyalunk.

A PD-L1-EXPRESSZIÓ KIÉRTÉKELÉSI MÓDJAI

Ahogy azt bemutattuk, az egyes PD-1/PD-L1 gátlók esetében a PD-L1-expresszió meghatározására csak specifikált IVD módszer használható, ami négy primer antitesttel vég-

zett immunhisztokémiai vizsgálatnak akár daganatfajtákon belül is a kezelés módjától (pl. első vagy másodvonal) eltérő kiértékelési sémáját és határértékeit jelenti (1. és 2. táblázat). Alapszabályként a törzskönyvezés során egy hatóanyaghoz egy adott primer antitestet kapcsoltak, így az atezolizumab-SP142, durvalumab-SP263, nivolumab-28-8 és pembrolizumab-22C3 párosítások alakultak ki. A három nyúl monoklonális primer antitest közül az SP142 és SP263 a PD-L1 intracelluláris szakaszát, míg a 28-8 és az eger monoklonális 22C3 az extracelluláris domént ismeri fel (2. táblázat) (20, 21). A négy IVD teszt két diagnosztikai gyártó dedikált immunfestő automatáján végezhető (SP142 és SP263 – Ventana, 28-8 és 22C3 – Dako). Ezek jelentősége abban áll, hogy a PD-L1-diagnosztikában különösen fontos a nagy érzékenységgű előhívó rendszerek precíz használata, mivel a PD-L1 fehérje expressziós szintje gyakran alacsony a daganat- és immunsejteken. Másrészt mind az alul-, mind a túlhívás a reakció diagnosztikai küszöbértékének eltolódását okozhatja.

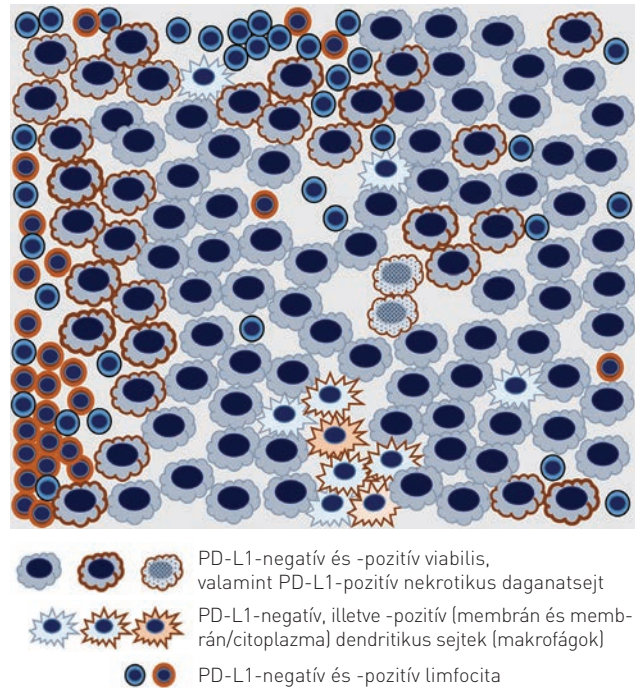
Egyedileg meghatározott, hogy az adott tumorban a daganatsejtek és/vagy a TIS festődését kell-e értékelni, és az immunsejtek mely típusai (makrofágok, limfociták, granulociták) veendőek figyelembe, milyen beszámítási mód szerint. Gyártótól függően TPS (Tumor Proportion Score, PD-L1-expresszálo tumorsejtek aránya) és CPS (Combined Positive Score, a PD-L1-et expresszálo tumor- és immunsejtek kombinált, össz-tumorsejtszámhoz viszonyított százalékos

2. TÁBLÁZAT. A PD-L1-diagnosztikában használt primer antitestek fontosabb jellemzői

Primer antitest klónja	Primer antitest fajtája	PD-L1-epitóp	Gyártó (primer, előhívó rendszer)	Hatóanyag (gyártó)
28-8	nyúl (monoklonális)	extracelluláris	Dako	nivolumab (BMS)
22C3	eger (monoklonális)	extracelluláris	Dako	pembrolizumab (MSD)
SP142	nyúl (monoklonális)	intracelluláris	Ventana	atezolizumab (Roche)
SP263	nyúl (monoklonális)	intracelluláris	Ventana	durvalumab (AstraZeneca)

aránya), valamint TC (% Tumor Cell, ugyanaz, mint a TPS; PD-L1-expresszáló tumorsejtek százalékos aránya), ICP (Immune Cell Present, a daganat területéből a tumorasszociált immunsejtek által lefedett arány) és IC (% Immune Cell, a daganat területéből a PD-L1-expresszáló tumorasszociált immunsejtek által lefedett arány) kiértékelési módokat, illetve ezek esetleges kombinációit különböztetjük meg [1. ábra] [22, 23]. Fontos még tudni, hogy a daganatsejtek esetében csak a komplett vagy részleges membranózus festődés, míg az immunsejtek esetében általában mind a membrán-, mind a citoplazmatikus reakció pozitívitásként értékelendő. A TPS-hez és TC-hez csak a daganatsejtek, CPS esetén a tumorsejtek mellett a makrofágok és limfociták, míg IC-hez csak az immunsejtek (de ide értve a tumort infiltráló granulocitákat is) pozitívitását értékeljük. A diagnosztikus küszöbértékek egyedileg meghatározottak, akár még ugyanazon tumor első és másodvonalbeli kezelésénél sem azonosak [1. táblázat].

Tovább komplikálja a kérdést, hogy egyes diagnosztikumokat a gyártók az eredeti törzskönyvi előírásokon túl más hatóanyagok terápiás döntéseihez is jóváhagyattak. Így a húgyhólyagrák és NSCLC durvalumabkezeléséhez kiegészítő diagnosztikumként törzskönyvezett SP263 az Európai Unióban CE jelzést kapott az NSCLC pembrolizumab- és nivolumabterápiájához is (<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/tests/ventana-pd-l1-sp263-assay2.html#productSpecs>). Továbbá validációs vizsgálatok alapján az NSCLC pembrolizumabkezelésének 22C3 antitesttel történő diagnosztikája nem csak Dako Link 48 immunfestő automatán, hanem Ventana Benchmark Ultra platformon is végezhető [24]. Ezek a törekvések azonban oda vezethetnek, hogy az eredeti hatóanyag-diagnosztikum kombináción meghatározott diagnosztikus küszöbértékek megkérdőjelezhetővé válnak, ahogy erre egyes tanulmányok fel is hívták a figyelmet [25]. A különböző primer antitestek és diagnosztikus platformok összehasonlítására épp ezért számos tanulmány született. Ezek mind uroteliális karcinóma [26], mind NSCLC [24, 27–29] esetében kimutatták, hogy a négy primer antitest közül az SP142 alulteljesíti a tumorsejtek PD-L1-expressziójának kimutatásában, miközben az SP263, a 28-8 és a 22C3 e tekintetben egyenértékű. Ugyanezen tanulmányok azt is megmutatták, hogy az immunsejtek PD-L1-festődése jóval nagyobb variációt mutat a primer antitesttől függően, mint a tumorsejteké. A tüdőrák PD-L1-diagnosztikája nagyszabású nemzetközi összehasonlító tanulmányának (Blueprint-projekt) első része [27] arra is rámutat, hogy törzskönyvileg jóváhagyott módon kiértékelve a négy antitest festődését, az SP142-vel jóval több olyan esetet értékelték pozitívként, ami mindhárom másik antitesttel negatív volt. Az SP263-mal viszont hasonló nagyságrendben minősítettek negatívnak a másik három teszttel pozitív eseteket. Felhívánk azonban a figyelmet arra, hogy ebből az adott antitest klinikailag releváns diagnosztikus teljesítményét megítélni nem lehet, mivel más-más gátlószer hatásosságának előjelzésére hivatottak, amelyek különböző PD-1/PD-L1 epitópokhoz kötődnek, így eltérő terápiás eredményt adhatnak



1. ÁBRA. Rosszindulatú daganat PD-L1-expressziójának kiértékelése. Az ábrán 100 viabilis daganatsejt látható, melyek közül 30 mutat valamely intenzitású komplett vagy inkomplett membranózus PD-L1-pozitívitást, tehát a TPS (Tumor Proportion Score), illetve a TC (% Tumor Cell) ez esetben 30%. A tumorinfiltráló immunsejtek (TIS) közül 25 PD-L1-pozitív és 35 -negatív limfocita, valamint 5 PD-L1-pozitív és 5 -negatív dendritikus sejt (makrofág) látható [az immunsejtek esetében nem csak a membrán-, hanem a citoplazmatikus festődés, illetve ezek kombinációja is pozitívitásnak értékelendő]. A CPS (Combined Positive Score) a pozitív daganatsejtek, valamint a pozitív makrofágok és limfociták összegének az összes viabilis daganatsejt mennyiségére vetített aránya. Jelen esetben ez $[(30+25+5)/100] \times 100$, tehát a CPS 60 (a CPS értéket nem százalékként adjuk meg, továbbá matematikailag a számolás eredménye lehet 100 feletti, de ez esetben is maximum 100-at adhatunk meg a CPS értékének). Az IC (% Immune Cell) a daganat területéből a PD-L1-expresszáló tumorasszociált immunsejtek által lefedett arány (tehát itt nem a tumorsejtek számához viszonyított pozitív sejtszámot határozzuk meg, hanem a tumorsejtek+stróma területének arányában vizsgáljuk a pozitív immunsejtek által lefedett területet). Jelen esetben a pozitív immunsejtek által lefedett rész az összes terület 10%-a, tehát az IC 10%. Az ICP (Immune Cell Present) az összes immunsejt (PD-L1-pozitív + -negatív) által lefedett terület, ami jelen esetben 22%. Bár az ábrán az egyszerűség kedvéért csak limfocitákat és makrofágokat tüntettünk fel a TIS részeként, de a CPS-sel szemben az IC-nél és ICP-nél ezeken kívül a granulociták pozitívitását, illetve jelenlétét is figyelembe kell venni. Ugyanakkor a nekrotizhoz társuló gyulladásozó sejteket figyelmen kívül kell hagyni mind a CPS, mind az IC vagy ICP esetében, csakúgy, mint a PD-L1-pozitív nekrotikus daganatsejteket a TPS és TC, illetve a CPS meghatározásánál

ugyanazon betegben is. De a Blueprint-projekt keretében azt is megvizsgálták, hogy bír-e klinikai relevanciával a négy primer antitest kiértékelési algoritmusának egymással felcserélése. Ez egyértelműen kimutatta, hogy az adott antitest csak a hozzárendelt sémával értékelhető ki, különben a diagnosztikus teljesítményük romlik. A Blueprint-projekt második fázisában [28]

az avelumab egyes törzskönyvezési eljárásai során használt Dako 73-10 primer antitestet is tesztelték. Mivel az e klinikai vizsgálatok alapján terápiás célpontként jóváhagyott tumorerő esetében (urotelialis és Merkel-sejtes karcinóma) nem találtak a PD-L1-expressziótól függő jelentősebb hatáskülönbséget (30, 31), és NSCLC-nél is csak mérsékelt összefüggés volt tapasztalható (32), így a 73-10 nem került még kiegészítő vagy társított diagnosztikum státuszba. Ugyanakkor a Blueprint eredményei alapján érzékenyebben detektálja a tüdőráksejtek PD-L1-expresszióját, mint a másik 4 antitest.

Összességében ezek a tanulmányok megerősítették, hogy a PD-L1-diagnosztikában az adott PD-1/PD-L1 gátlószerhez előírt specifikus tesztet kell alkalmazni mindaddig, amíg klinikai hatástanulmány nem igazolja, hogy más diagnosztikum megközelítőleg hasonló vagy jobb klinikai relevanciával képes a terápia hatáskörének előrejelzésére. A reakció kivitelezésére használt immunfestő automata és előhívó rendszer felcserélése lehetséges, ám a patológusnak tisztában kell lennie az alkalmazott rendszer sajátosságaival (pl. a Ventana platform erőteljesebb a jelamplifikáció, mint a Dako esetében), és ezt figyelembe véve (akár saját validációs vizsgálattal/külső minőségbiztosítással kontrollálva) alkalmazni az előírt diagnosztikum határértékeket a kiértékelésnél.

A PD-L1-EXPRESSZIÓ MEGHATÁROZÁSÁNAK GYAKORLATI KÉRDÉSEI

A PD-L1-expresszió analízisének számos kritikus tényezője van, így a minta minősége, mennyisége (műtéti preparátum vs. biopszia vs. citológia), a preanalitikai tényezők (a minta kezelése, az IHC kivitelezése), a megfelelő pozitív és negatív kontrollok, az immunhisztokémiai reakció kiértékelésének problémái vagy a PD-L1-expresszió heterogenitása a tumoron belül mind befolyásolhatja a végső eredményt.

A PD-L1-fehérje-expresszió vizsgálata a primer szövettani diagnózishoz képest általában későbbi időpontban történik (mivel jellemzően az onkológus indikálta, kérésére történő vizsgálat). Minthogy pl. a tüdőrákok esetében a minta gyakran kis méretű, ezért fontos, hogy a feldolgozás során biztosítani tudjuk a később történő vizsgálatok kivitelezhetőségét, hiszen a PD-L1-IHC a KRAS-, EGFR-, BRAF-, ALK-, ROS1-meghatározásokkal párhuzamos eljárás. Immunhisztokémiai vizsgálatra a citológiai minták egy része alkalmas csupán. A standard PD-L1-reakció formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintát igényel, így keneteken értelemszerűen nem végezhető. Azonban a citológiai mintavételből nyert, folyadék fázisba felvett sejteket beágyazva sejtblokk is készíthető, és az ezekből készült metszeteken végzett PD-L1-IHC a szöveti metszetekhez hasonló eredményt ad (28). A minta nagyságától függ, hogy alkalmas-e PD-L1-vizsgálatra, illetve alkalmasság esetén mennyire reprezentatív eredményű a rajta végzett IHC. Az alkalmassági küszöb minimálisan 100 tumorsejt, ennek megfelelően a műtéti preparátumok szövetblokkjai a leginkább alkalmasak, de pl. a tüdődiagnosztikában a bronhusexcízió, a transztorakális core-biopszia és a pleurális folyadékából

származó sejtblokk többnyire megfelelő, míg a transztorakális tüdő- vagy transzbronhiális nyirokcsomó-aspirátum sejtblokkja esetenként nem tartalmaz elég sejtet a PD-L1-IHC-hoz. Azonban a 100 sejtet nemcsak horizontálisan, egy metszetben, de továbbmetszésből a minta mélységében újabb sejtrétegeket elérve is megpróbálhatjuk biztosítani szükség esetén, több metszeten elvégezve a reakciót és egybeszámítva azok eredményét. De fontos törekedni a minél nagyobb mintából történő meghatározásra, mivel tanulmányok igazolták, hogy a minta méretének csökkenésével nő a vizsgálati eredmény bizonytalansága, ugyanis a PD-L1-expresszió jelentős intratumorális heterogenitást mutathat (25, 33, 34). A preanalitikai tényezők szerepe is lényeges, az eltávolított szövet fixálását amint lehet, meg kell kezdeni, 2 óránál hosszabb „hideg iszkémia” esetén a minta nem megfelelő. A fixálás időtartama szintén befolyásolja az immunreakció minőségét (a minta nagyságától függően 6–48 óra az ideális, maximálisan 72 óra). A beágyazásnál a paraffin hőfoka nem lehet 60 °C-nál magasabb. Csontáttétek is vizsgálhatóak, ám ügyelni kell arra, hogy dekalcinálásra csak az EDTA-s módszer megfelelő, mert savas kezelés tönkreteszi az epitópokat. A vizsgálatot ideális frissen készített metszeten végezni, a tárolásra a gyártó adott daganattípusra specifikus útmutatója irányadó, de hűtve tárolt metszet felhasználása sem javasolt 1 hónapon túl. A paraffinos blokk tárolási ideje nem kritikus kérdés, akár évekkel korábbi minták is használhatóak (nagyobb méretű szövetblokk lehetőséget ad mélyebb síkból történő metszésre, aminek használatával biztosabban elkerülhető a felületi oxidáció okozta esetleges minőségromlás).

Viszont érdekes, és a klinikai gyakorlatban nagy jelentőséggel bíró kérdés, hogy mennyiben reprezentálja egy jóval korábban vett minta, típusosan az eltávolított primer tumor, egy későbbi stádiumban lévő, akár már áttétes betegség PD-L1-státuszát. Erre Skov és munkatársai friss tanulmánya ad választ (35), melyben kimutatták, hogy az előrehaladottabb NSCLC-esetekben szignifikánsan gyakoribb a PD-L1-expresszió, és ez alapján a korábbi, primer daganatból származó anyag nem feltétlenül tükrözi a progresszió utáni PD-L1-státuszt, ami nagyobb valószínűséggel PD-L1-expresszázó, mint az eredeti. Tehát új mintavétel lehet szükséges, ha az eredeti anyagban nincs határértéket elérő PD-L1-expresszió. Minden diagnosztikus PD-L1-vizsgálathoz megfelelő pozitív és negatív kontrollokat kell társítani. Pozitív kontrollként a gyártó ajánlásától függően tonzilla- vagy placentaszövetet használunk, de az egyes IVD termékek mellé biztosított ismert expressziójú daganatsejt-tenyészetek, illetve ezek kombinációja még pontosabb beállítást tesz lehetővé, mivel a daganatsejtek pozitivitásának pontos aránya kalibrálható.

A PD-L1-meghatározás gyakorlatát az NSCLC másodvonalbeli kezelésén keresztül mutatjuk be, minthogy ebben az indikációban az elsők között indult el a PD-L1-diagnosztika, és mind a négy gátlószer-IVD kombináció elérhető. Az FDA a 22C3-at kísérő IVD tesztként engedélyezte a pembrolizumab-kezeléshez, míg a 28-8 a nivolumab, az SP142 az atezolizumab kiegészítő (opcionális) diagnosztikum. Az Egyesült Államok-

ban a durvalumab ebben az indikációban nem jóváhagyott (bár a Blueprint-projektben $\geq 25\%$ TC-vel vizsgálták), de az Európai Unióban igen, $\geq 1\%$ -os TC-határértékkel (1. táblázat). A négy teszt közül a 22C3, a 28-8 esetében 1%-os TPS, az SP263-nál 1%-os TC, míg az SP142 esetében 50% TC/10% IC kiértékelési séma alkalmazandó. Tehát a PD-L1-pozitivitás kimondásához a 22C3, a 28-8 és az SP263 esetén a viabilis tumorsejtek legalább 1%-ában kell bármely erősségű, komplett vagy részleges membranózus pozitivitást detektálni. Az SP142-nél első lépésben ugyanígy értékeljük a tumorsejtek pozitivitását, ha ez eléri/meghaladja az 50%-ot, akkor PD-L1-pozitív a daganat. 50% alatti TC esetén második lépésben az IC-t vizsgáljuk. Ekkor a PD-L1-pozitivitás feltétele, hogy a pozitív TIS (membrán- és/vagy citoplazma-pozitív limfociták, makrofágok/dendritikus sejtek és granulociták) a daganat területének (tumorsejtek+stróma) legalább 10%-át elfoglalják. A kiértékelésnél különös figyelmet érdemelnek a tumorasszociált makrofágok, mivel megjelenésük gyakran tumorsejtekre emlékeztet, így a gyakran megfigyelhető membránpozitivitásuk tévesen a TPS/TC részeként értékelhető. Ezenkívül a nekrotikus/apoptotikus tumorsejtek, illetve a nekrotikus területekhez társult gyulladásosejtek valamennyi tesztnél figyelmen kívül hagyandók.

ÖSSZEFOGLALÁS

A PD-L1-diagnosztikában az adott gátlószerhez előírt specifikus tesztet kell alkalmazni, az IVD diagnosztikumokat nem lehet egymással helyettesíteni, a kiértékelési módokat sem szabad felcserélni. A reakció kivitelezésére használt immunfestő automata és előhívó rendszer helyettesítése egyes esetekben megfelelő validációs vizsgálatok alapján lehetséges. Mivel ezen immunhisztokémiai reakciók minden korábbi diagnosztikus/prediktív teszténél bonyolultabb, daganattípusonként eltérő kiértékelést kívánnak, ezért azt csak dedikált patológus végezheti, megfelelő továbbképzés alapján. Alapvető jelentőségűnek tartjuk, hogy az ilyen diagnosztikát végző patológiai osztályok részt vegyenek az Európai Patológus Társaság éves rendszerességgel szervezett minőségbiztosítási ellenőrző programjaiban. A klinikus-patológus együttműködés is a szokásosnál szorosabb kell legyen, hiszen az onkológusnak nemcsak arról szükséges informálnia a vizsgálóhelyet, hogy PD-1/PD-L1 gátló kezeléshez kér diagnosztikát, de a használni kívánt hatóanyag megadása is szükséges, hogy az ennek megfelelő diagnosztikai tesztel és a hozzá tartozó kiértékelési sémával történjen a vizsgálat.

IRODALOM

- Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov* 14:561–854, 2015
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 35:185–198, 2015
- Tímár J, Ladányi A. A daganatok immunterápiájának prediktív markerei, a PD-L1-meghatározás gyakorlati kérdései. *Magy Onkol* 61:158–166, 2017
- 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
- Nabouh A, Roman CA, Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. *J Invest Med* 65:754–758, 2017
- Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immuno-score' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232:199–209, 2014
- Wei Y, Zhao Q, Gao Z, et al. The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy. *J Clin Invest* 129:3347–3360, 2019
- 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
- Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 19:813–824, 2007
- Escors D, Gato-Cañas M, Zuazo M, et al. The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct Target Ther* 3:26, 2018
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity* 48:434–452, 2018
- Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16:275–287, 2016
- Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumour cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:E4041–E4050, 2018
- Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545:495–499, 2017
- Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 75:2139–2145, 2015
- Sanmamed MF, Chen L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J* 20:256–261, 2014
- Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, et al. Association of polymerase e-mutated and microsatellite instable endometrial cancers with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes, and expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol* 1:1319–1323, 2015
- Oliveira AF, Bretes L, Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 inhibitors in metastatic dMMR/MSI-H colorectal cancer. *Front Oncol* 9:396, 2019
- Lee JS, Ruppel E. Multiomics prediction of response rates to therapies to inhibit programmed cell death 1 and programmed cell death 1 ligand 1. *JAMA Oncol* 2019, doi:10.1001/jamaoncol.2019.2311
- Teixidó C, Vilariño N, Reyes R, Reguart N. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol* 10:1758835918763493, 2018
- Rebelatto MC, Midha A, Mistry A, et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagn Pathol* 11:95, 2016
- Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, et al. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med* 143:330–337, 2019
- Ma J, Li J, Qian M, et al. PD-L1 expression and the prognostic significance in gastric cancer: a retrospective comparison of three PD-L1 antibody clones (SP142, 28-8 and E1L3N). *Diagn Pathol* 13:91, 2018
- Hendry S, Byrne DJ, Wright GM, et al. Comparison of four PD-L1 immunohistochemical assays in lung cancer. *J Thorac Oncol* 13:367–376, 2018
- Munari E, Rossi G, Zamboni G, et al. PD-L1 assays 22C3 and SP263 are not interchangeable in non-small cell lung cancer when considering clinically relevant cutoffs: an interclone evaluation by differently trained pathologists. *Am J Surg Pathol* 42:1384–1389, 2018
- Eckstein M, Erben P, Kriegmair MC, et al. Performance of the Food and Drug Administration/EMA-approved programmed cell death ligand-1 assays in urothelial carcinoma with emphasis on therapy stratification for first-line use of atezolizumab and pembrolizumab. *Eur J Cancer* 106:234–243, 2019

27. 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
28. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 immunohistochemistry comparability study in real-life clinical samples: results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol* 13:1302–1311, 2018
29. Adam J, Le Stang N, Rouquette I, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 29:953–958, 2018
30. Rao A, Patel MR. A review of avelumab in locally advanced and metastatic bladder cancer. *Ther Adv Urol* 11:1756287218823485, 2019
31. Shirley M. Avelumab: a review in metastatic Merkel cell carcinoma. *Target Oncol* 13:409–416, 2018
32. Barlesi F, Vansteenkiste J, Spigel D, et al. Avelumab versus docetaxel in patients with platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer (JAVELIN Lung 200): an open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 19:1468–1479, 2018
33. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol* 27:147–153, 2016
34. Li C, Huang C, Mok TS, et al. Comparison of 22C3 PD-L1 expression between surgically resected specimens and paired tissue microarrays in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 12:1536–1543, 2017
35. Skov BG, Rørvig SB, Jensen THL, Skov T. The prevalence of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer in an unselected, consecutive population. *Mod Pathol* 2019, doi: 10.1038/s41379-019-0339-0