

Bevezetés

Az immunellenőrzőpont-gátló kezelések megjelenése egy újabb terápiás lehetőséget adott az onkológusok kezébe, amelyhez egyes tumorfajták esetében a kezelés hatásosságát előre jelző prediktív szöveti markerek meghatározása szükséges. Az onkológiai immunterápiák működési elve azon alapul, hogy a neoplasztikus léziók elpusztítása az immunsejtek feladata. Erre azonban a makroszkóposan észlelhető stádiumot elérő invazív daganatok nagy részében a szervezet mégis képtelen. Ennek hátterében a daganatsejteket támadó effektor T-sejteket gátló ligand-receptor kapcsolatok állnak. [1,2]. Ezek közül a legismertebbek a CTLA4/CD86 valamint a PD-1/PD-L1, amelyek immuntoleranciát képesek kialakítani a daganatsejtekkel szemben. Ezért gátolt a PD-L1 expresszáló tumorsejtek elleni T-sejtes válasz, de ugyanerre vezethet az antigénprezentáló sejtek PD-L1 expressziója is. Ezen immunválaszt gátló kapcsolatok gátlása elvére alapozva fejlesztették ki a ma már egyre több onkológiai indikációban használt immunellenőrzőpont-gátló (immuncheckpoint inhibitor; ICI) gyógyszereket [3,4].

A tumor genomjában megjelenő mutációk változásokat alakítanak ki a daganatsejtek fehérjeiben és az így keletkező neoantigének, neoepitópok a daganatellenes immunválasz kiváltásának kulcstényezői. Minél nagyobb egy daganat mutációs terheltsége (tumor mutational burden – TMB) annál nagyobb valószínűséggel keletkeznek immunválasz kiváltására képes neoantigének a daganatos sejtekben [5]. A mutációs terhelés általában azon tumorokban fokozott, amelyek környezeti károsító ágensek krónikus behatása (pl. dohányzás, UV) vagy a DNS hibajavító rendszereinek (pl. MMR fehérjék, POLE) károsodása következtében alakulnak ki [6]. A génekben (akár kódoló vagy nem kódoló régiókban) elhelyezkedő mikroszatelliták olyan egy-hat bázispáros DNS motívumok többszörös ismétlődéséből felépülő szakaszok, melyek hossza (a motívum ismétlődésének száma) a DNS-polimeráz hibázásából adódóan megváltozhat. A mismatch-repair (MMR) fehérjék szerepe a DNS-polimeráz ilyen hibáinak korrekciója, így csökkent expressziójuk, teljes kiesésük illetve hibás működésük (MMR deficiencia, MMR-d) fokozott mutációs gyakorisággal jár, ami a mikroszatelliták hosszának megnövekedett változatosságában (mikroszatellita instabilitás, MSI) is megnyilvánul [7]. A fokozott mikroszatellita instabilitású (MSI-high/MSI-H) illetve magas TMB-jű (TMB-H) daganatok a fent leírt mechanizmus

révén általában fokozottabb neoantigén megjelenéssel bírnak. Jelenleg a mikroszatellita instabilitás vizsgálata is a rutin molekuláris patológiai diagnosztika részét képezi, MSI-H tumorok esetén a PD1-PD-L1 gátló terápiák alkalmazása nem igényli a szöveti PD-L1 expresszió immunhisztokémiai igazolását. Más esetekben viszont a PD-L1 expresszió szöveti kimutatása lehet szükséges.

A PD-L1 immunhisztokémiai reakciók kiértékelésének módszertana és gyakorlata

A PD1-PD-L1 gátló gyógyszerek törzskönyvi előírása rögzíti, hogy a PD-L1-expresszió meghatározására csak specifikált in vitro diagnosztikai (IVD) módszer használható, és ennek megfelelően egy adott hatóanyag prediktív diagnosztikájához milyen primer antitest szükséges, így pl. atezolizumab-SP142, durvalumab-SP263, nivolumab-28-8 és pembrolizumab-22C3 hatóanyag-antitest párosítások léteznek. Az egyes ellenanyagok legfontosabb tulajdonságait illetően további információk találhatóak korábbi közleményünkben: [1].

A PD-L1 immunhisztokémiai (IHC) tesztek minimális diagnosztikus kritériuma a legalább 100 (az SP142 esetében 50) viabilis daganatsejt vizsgálata formalin-fixált, paraffinba ágyazott szövettani blokk metszetén. A diagnosztikus IHC kitek kenetekre nem validáltak, így citológiai minta sejtblokk metszetén vizsgálható. Dekalcinálás szükségessége esetén csak EDTA alkalmazható, mivel a sav tartalmú oldatok az epitópok károsítása révén jelentősen csökkenthetik PD-L1 pozitív daganatos sejtek arányát. [8]. A vizsgálathoz frissen készített metszet ajánlott, hűtve tárolt metszet felhasználása sem javasolt 1 hónapon túl. A paraffinos blokk tárolási ideje kevésbé kritikus, akár évekkel korábbi minták is használhatóak. Viszont felmerülhet, hogy mennyiben reprezentálja egy jóval korábban, típusosan az eltávolított primer tumorból vett minta egy későbbi stádiumban lévő, recidív vagy áttétes betegség PD-L1-státuszát. Egyes adatok arra utalnak, hogy progresszió után a tumor nagyobb valószínűséggel PD-L1-expresszáló, tehát új mintavétel lehet szükséges, ha az eredeti anyagban nincs határértéket elérő PD-L1-expresszió [9].

A PD-L1 IHC-k kiértékelési sémája ugyancsak a törzskönyvileg rögzített, azt és a pozitivitási kritériumát (diagnosztikai küszöbértékét) az alkalmazni kívánt gátlószer és az ahhoz rendelt primer ellenanyag fajtája valamint az adott daganattípus és annak kezelési módja (első- / másodvonal) határozza meg. A kiértékelési séma lehet TPS (tumor proportion score - tumorsejt arány), CPS (combined proportion score - kombinált sejtarány), TC (% tumor cell - tumor sejt %) és IC (% immune cells - tumor infiltráló immunsejt %)

meghatározás. A TPS és TC érték egyazon séma más-más gyártóknál használt elnevezése, mely esetén a PD-L1 pozitív daganatsejtek százalékat határozzuk meg az összes viabilis tumorsejt arányában. CPS érték esetében a PDL1 pozitív daganatsejtek valamint a pozitív makrofágok és limfociták összegének az összes viabilis tumorsejt mennyiségére vetített arányát adjuk meg [10,11]. Az IC a tumort infiltráló, PD-L1-expresszáló immunsejtek által a daganat területéből lefedett arány (tehát itt nem sejtszázalékot, hanem a tumorsejtek+stróma területének arányában a PD-L1 pozitív immunsejtek által lefedett területet adjuk meg) [10,12].

Az egyes antitestek kiértékelési sémájának felcserélhetőségét több tanulmányban is megvizsgálták, ám ezek végkonklúziója szerint az eredmény prediktív értékének lehető legjobb megőrzéséhez szükséges, hogy egy adott indikációban a klinikai vizsgálatok során validált, törzskönyvezett ellenanyagot és kiértékelési sémát használjunk [1,13]. Az IHC festéshez használt automata és előhívó rendszer egyes vizsgálatoknál felcserélhető, de ismernünk kell olyan sajátosságokat is, hogy pl. Ventana rendszeren erősebb a jelamplifikáció a Dako-hoz képest és ezt figyelembe kell venni a kiértékelésnél.

A hazai ICI prediktív diagnosztikát áttekintő tanulmányunk alapján a mindennapi hazai gyakorlatban a tüdőrákok esetében történik a legtöbb PD-L1 IHC vizsgálat [14], minthogy itt az elsők között kerültek törzskönyvezésre gátlószerek és közülük a pembrolizumab kezelés előfeltétele a kapcsolt PD-L1-diagnosztika (22C3 IHC) pozitív eredménye. Emellett az urothelialis carcinomák (pembrolizumab - 22C3, atezolizumab - SP142), továbbá fej-nyaki laphámrákok (pembrolizumab - 22C3) és tripla-negatív emlőrákok (atezolizumab - SP142) esetében végezzük még a PD-L1 expresszió IVD meghatározását gyakrabban. Ezen európai (EMA) törzskönyvezéssel bíró terápiák mellett egyedi méltányossági kérelem alátámasztására az amerikai (FDA) jóváhagyással rendelkező daganatfajták (többek között colorectalis és gyomor adenocarcinomák, nyelöcső laphámrák, méhnyakrák) esetében is kérnek PD-L1 expressziós vizsgálatot az onkológusok, illetve egyéb daganatfajták, úgy mint melanomák, mesotheliomák, pancreas, ovárium, duodenum, endometrium, cholangio- és adrenocorticalis carcinomák PD-L1 vizsgálatát is indikálták már. Emellett az MMR immunhisztokémia valamint az MSI és TMB molekuláris diagnosztika is a PD1-PD-L1 inhibitorok prediktív patológiai diagnosztikájának részét képezi.

Mindezek alapján elmondható, hogy a patológusokra, molekuláris patológusokra is egyre nagyobb felelősség hárul abban, hogy megfelelő képzettségük birtokában a PD-L1

expresszió immunhisztokémiai kiértékelésével illetve egyéb vizsgálataikkal segítsék a PD1-PD-L1 gátlók klinikai alkalmazását.

Irodalomjegyzék:

1. 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], *Magyar Onkologia*. **63**, 183-191. (2019)
2. Seliger B. Basis of PD1/PD-L1 Therapies, *J Clin Med*. **8**. (2019)
3. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets, *Nat Rev Drug Discov*. **14**, 561-84. (2015)
4. Topalian et al. Mechanism-driven bio-markers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16:275–287, 2016)
5. Tunger A, Sommer U, Wehner R, Kubasch AS, Grimm MO, et al. The Evolving Landscape of Biomarkers for Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy, *J Clin Med*. **8**. (2019)
6. 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)
7. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade, *Clin Cancer Res*. **22**, 813-20. (2016)
8. Forest F, Cote G, Laville D, Da Cruz V, Dal Col P, et al. Impact of delayed fixation and decalcification on PD-L1 expression: a comparison of two clones, *Virchows Arch*. **475**, 693-699. (2019)
9. 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*. **33**, 109-117. (2020)
10. Schildhaus HU. [Predictive value of PD-L1 diagnostics], *Pathologe*. **39**, 498-519. (2018)
11. Roach C, Zhang N, Corigliano E, Jansson M, Toland G, et al. Development of a Companion Diagnostic PD-L1 Immunohistochemistry Assay for Pembrolizumab Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **24**, 392-7. (2016)
12. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients, *Nature*. **515**, 563-7. (2014)

13. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, 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)
14. Regős E, Lotz G: Az immuncheckpoint-gátlók biomarkereinek molekuláris diagnosztikai vizsgálata. *Orvosképzés.* **96**(2), 469-477. (2021)