



**SAPIENZA**  
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE  
XXXI CICLO**

**BIOMARCATORI DI RISPOSTA IN PAZIENTI AFFETTI DA  
NEOPLASIA DEL POLMONE METASTATICO IN TRATTAMENTO  
CON IMMUNOTERAPIA**

**DOTTORANDO**

Dr. Andrea Botticelli

**DOCENTE GUIDA**

Prof. ssa Maria Rosaria Torrisi  
Prof. Paolo Marchetti

**COORDINATORE DEL DOTTORATO**  
Prof. Maurizio Sorice

INDICE

1. INTRODUZIONE

- IL TUMORE DEL POLMONE
- L'IMMUNOTERAPIA
- L'IMMUNOTERAPIA NEL TUMORE DEL POLMONE

2. MATERIALI E METODI

- PAZIENTI
- TRATTAMENTO IMMUNOTERAPICO
- ANALISI DELLE CHINURENINE
- ANALISI DEL MICROBIOMA
- ANALISI DEL FATTORE REUMATOIDE
- ANALISI STATISTICA

3. RISULTATI

- CHINURENINE E RISPOSTA
- MICROBIOMA E RISPOSTA
- FATTORE REUMATOIDE E RISPOSTA

4. DISCUSSIONE

5. FIGURE E TABELLE

6. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUZIONE

### **Il tumore del polmone**

Il tumore del polmone è ancora la principale causa di morte correlata al cancro, con circa 1,8 milioni di nuovi casi (12,9% del totale) e 1,6 milioni di morti (il 19,4% del totale) annui.

La classificazione istopatologica raccomandata è quella della WHO. Oltre il 95% dei carcinomi polmonari è riconducibile a quattro istotipi principali: carcinoma squamoso (CS), adenocarcinoma (ADC), carcinoma a grandi cellule (CGC) e carcinoma a piccole cellule o microcitoma. Nei paesi occidentali, la frequenza dell'ADC è in netto incremento (>50%), mentre CS e microcitoma sono in significativa riduzione. Negli ultimi anni, la precisa definizione istologica dei carcinomi del polmone non-a piccole cellule (NSCLC, *Non- Small Cell Lung Cancer*) è divenuta critica per le nuove terapie correlate con l'istotipo. La diagnosi può essere eseguita sull'attenta valutazione dei criteri morfologici convenzionali su ematossilina-eosina, ma la tecnica immunohistochimica (IHC) risulta fondamentale nella definizione dei NSCLC quando la neoplasia si presenta scarsamente differenziata o non-altrimenti specificata (N.A.S.). L'istotipo ADC è solitamente positivo per TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-I), citocheratina 7 (CK7) e napsina; il CS esprime p63, p40, citocheratine ad alto peso molecolare (ad es. CK5/6) e desmocollina-3. Cromogranina, sinaptofisina e CD56 sono i migliori marcatori per le neoplasie a differenziazione neuroendocrina del polmone come il microcitoma. Da ricordare che anche la metodica IHC non è perfetta e possono osservarsi immunofenotipi anomali (ad es. ADC positivi per p63 o CS positivo per CK7). Nella diagnosi differenziale tra ADC e CS, l'utilizzo di TTF-1 e p40 è

attualmente il migliore approccio, anche nell'ottica di preservare il tessuto neoplastico per ulteriori indagini molecolari. Le indagini di IIC possono essere applicate sia su campioni biotici fissati in formalina che su preparati citologici. Di grande utilità pratica è l'allestimento di cito-inclusi (*cell-block*) partendo da materiale citologico su versamento o materiale cito-aspirativo [1-4].

Negli ultimi anni lo studio delle caratteristiche molecolari dei tumori del polmone ha evidenziato un ruolo specifico di alcuni geni che rappresentano importanti bersagli terapeutici, tra cui EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) [5].

Nel NSCLC (in particolare nel 10-15% degli ADC dei pazienti caucasici e nel 40% dei pazienti asiatici) sono state identificate mutazioni attivanti *EGFR* a carico degli esoni 18, 19, 20 e 21, la cui presenza rappresenta il più importante fattore predittivo per adottare terapie a bersaglio molecolare con specifici inibitori tirosino-chinasici dell'EGFR. Recentemente, sono state documentate nuove alterazioni molecolari che identificano altri sottogruppi di ADC: sul braccio corto del cromosoma 2 il riarrangiamento dell'oncogene *ALK* con l'oncogene *EML-4* (o più raramente con altri geni di fusione) produce una specifica proteina ad attività tirosino-chinasica coinvolta nei processi di proliferazione e sopravvivenza cellulare. Esso è presente nel 3-7% circa degli ADC polmonari. La determinazione del riarrangiamento del gene *ALK* è necessaria per selezionare i pazienti da sottoporre a trattamento con inibitori tirosino-chinasici specifici di ALK (Crizotinib, il primo ad essere impiegato nella pratica clinica, e altri quali il Ceritinib e l'Alectinib). Altre alterazioni molecolari, particolarmente nell'ADC, con promettente ricaduta terapeutica per la disponibilità di inibitori specifici sono rappresentate dal riarrangiamento del gene *ROS1* (circa l'1-2% di ADC) e del gene *RET*, mutazioni attivanti di *BRAF* (sia V600E che non-V600E) ed *HER2* [6].

Attualmente, solo *EGFR* ed *ALK* rappresentano bersagli molecolari con terapia specifica disponibile, e dunque vanno sempre testati, (Crizotinib ha dimostrato elevata attività anche nei casi *ROS1+*). È buona pratica, tuttavia, cercare di testare subito anche *ALK* insieme a *EGFR* per cercare di ottimizzare l'utilizzo del materiale tumorale, spesso limitato. Mentre *EGFR* e *KRAS* sono solitamente alterazioni geniche mutualmente esclusive, il riarrangiamento di *ALK* è stato riscontrato nell'1-2% dei tumori *EGFR* mutati. L'ottenimento di maggiori quantità di materiale neoplastico, la conservazione adeguata delle cellule tumorali, la scelta della re-biopsia in caso di tumore *oncogene-addicted* (cioè con un preciso *driver* genetico) in corso di resistenza farmacologica, l'ottimizzazione della gestione del materiale da parte di patologi dedicati alla patologia polmonare, rappresentano punti chiave nelle scelte decisionali per quanto riguarda la patologia oncologica polmonare [7-8].

Attualmente la scelta del trattamento per i pazienti con NSCLC in stadio avanzato (stadio IIIB non suscettibile di trattamenti locoregionali e stadio IV) si basa su:

- istologia (squamosa verso non-squamosa)
- presenza di alterazioni molecolari 'driver' (principalmente mutazione di *EGFR* o riarrangiamento di *ALK*) che identificano una malattia oncogene-addicted
- livello di espressione di PD-L1
- caratteristiche cliniche del paziente (età, performance status, comorbidità).

### **Immunoterapia**

Nel corso degli anni, il trattamento del cancro ha visto il delinearsi di diversi e nuovi percorsi terapeutici che hanno permesso di superare molti aspetti critici permettendo di ottenere risultati migliori in termini di tossicità ed efficacia.

Negli anni 70 l'introduzione del Cisplatino, il primo farmaco utilizzato nella cura del cancro, ha rappresentato la prima grande rivoluzione dell'oncologia seguito poi dall'introduzione dei farmaci a bersaglio molecolare.

Il vero passo avanti è stato la comprensione di quanto fosse stretta l'associazione tra cancro e sistema immunitario e la consapevolezza di poter utilizzare il sistema immunitario come arma contro la progressione delle neoplasie [9-11].

Il primo a sperimentare questa innovativa idea fu Coley alla fine del XIX secolo e questa idea fu poi confermata nel 1950 da con Brunet e Thomas che postularono il concetto di "immunosorveglianza del cancro" che comprende tre fasi principali e sequenziali tra loro:

- eliminazione, può determinare la completa distruzione del tumore da parte del sistema immunitario dell'ospite;
- equilibrio, in cui le cellule tumorali, attraverso un processo di selezione operato dai linfociti T, diventano resistenti al controllo del sistema immunitario;
- escape o evasione, in cui le cellule malate si diffondono in modo incontrollato, originando neoplasie clinicamente rilevabili [12].

Il sistema immunitario è in grado di controllare la malattia soprattutto nelle fasi iniziali, quando il tumore è ancora limitato ed è il tumore stesso, inoltre, esercitando una stimolazione antigenica continua, a poter provocare un esaurimento del sistema immunitario. Si avviano a questo punto una serie di meccanismi di controllo come l'espressione di molecole inibitorie come Cytotoxic T-Lymphocyte antigen (CTLA-4), programmed cell death protein-1 (PD-1) o il suo ligando programmed death-ligand-1 (PD-L1) (Figura 3).

Queste molecole espresse sulle cellule del sistema immunitario, insieme al rilascio di molecole immunosoppressive da parte del tumore, riducono l'attività e la proliferazione di linfociti T specifici rendendo la risposta immunitaria incapace di controllare la crescita tumorale.

I meccanismi attraverso i quali le cellule tumorali possono evadere il controllo del sistema immunitario sono molteplici, possono infatti: ridurre l'espressione antigenica, reclutare cellule immunosoppressive (Treg) e mieloidi soppressorie, indurre un esaurimento di risposta antitumorale specifica mediata da linfociti T e B attraverso stimolazione prolungata e inefficace, ridurre le molecole del complesso di istocompatibilità MHC I necessario per il riconoscimento dell'antigene tumorale da parte dei linfociti, rilasciare fattori che sopprimono l'attività immunitaria compresa l'adenosina, la prostaglandina E2 e l'enzima indoleamin 2,3-diossigenasi (IDO) [13].

La capacità di tutto il network immunitario di controllare la crescita della patologia neoplastica può risultare in un continuo rimodellamento molecolare e fenotipico delle cellule tumorali, che possono così sopravvivere anche in un ospite perfettamente immunocompetente.

Verso la fine degli anni '90, sono stati introdotti i primi farmaci immunologici volti alla distruzione delle cellule tumorali come il Bacillus Calmette e Guering per il carcinoma della vescica, IFN-alpha e IL-2 per il melanoma e il carcinoma a cellule renali, seguiti nel 2010 vaccino Sipuleucel-T nel trattamento del cancro alla prostata con risultati tuttavia non così entusiasmanti [14-15].

La vera svolta nel mondo dell'immunoterapia è arrivata quando il focus della ricerca si è spostato dalla stimolazione diretta della risposta immunitaria al tentativo di rimozione dell'inibizione indotta dalle stesse cellule tumorali, sbloccando così lo stato di anergia

dei linfociti T e B.

Gli inibitori dei checkpoint immunitari che hanno, ad oggi, dimostrato maggiore interesse hanno come bersagli CTLA-4 e PD-1/ PD-L1, ed hanno ottenenuto tassi di risposta del tumore del 20-30% (8) Nel melanoma, per esempio , una neoplasia a prognosi notoriamente infausta, ,grazie al trattamento con Ipilimumab, il 20% dei pazienti è vivo a 10 anni.

Il primo farmaco approvato con questo meccanismo d'azione è stato appunto l' Ipilimumab, nel 2011, una proteina che blocca il CTLA-4, una molecola di controllo inibitorio che contrasta il segnale co-stimolatorio di CD28, legandosi competitivamente ai suoi ligandi (B7.1 e B7 .2) L'Ipilimumab è ad oggi approvato nel trattamento del melanoma metastatico. Promettenti risultati a lungo termine in vari tumori sono stati resi possibili con lo sviluppo di alcuni farmaci come: inibitori di PD-1, Nivolumab e Pembrolizumab e anti PD-L1 come atezolizumab e durvalumab, approvati ad oggi in diverse patologie oncologiche.

Questo rivoluzionario approccio terapeutico stimola il sistema immunitario del paziente indipendentemente dal sito di tumore, istologia, stadio e grado di differenziazione [16-27].

### **Immunoterapia nel tumore del polmone**

Negli ultimi due decenni le doppiette a base di sali di platino hanno rappresentato lo standard terapeutico nel trattamento di prima linea per il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio avanzato, con una sopravvivenza mediana complessiva di poco superiore ai 12 mesi [28]. Dopo la progressione di malattia, la

terapia di seconda linea efficacemente comprovata risale al 1999, quando il Docetaxel divenne la terapia standard [29]. Da allora, pochi progressi terapeutici sono stati fatti per i pazienti con NSCLC in progressione dopo la prima linea. Sono state introdotte altre opzioni di trattamento (Pemetrexed solo per il non squamoso ed Erlotinib) che sono meglio tollerate ma non superiori al Docetaxel [30-31]. Complessivamente, la chemioterapia di seconda linea ha presentato tassi di risposta <10%, PFS mediana di 2 mesi e OS mediana di 7-8 mesi. Agenti più recenti, come l'inibitore dell'angiogenesi per via orale, Nintedanib e l'anti-VGFR2, Ramucirumab, entrambi approvati in combinazione con Docetaxel, il primo da EMA in Europa e il secondo da FDA negli Stati Uniti, hanno portato ad un guadagno assoluto della sopravvivenza di 1 mese e ad un aumento della tossicità rispetto al solo Docetaxel.

L'introduzione nella pratica clinica di farmaci che hanno come bersaglio i checkpoint immunitari (inibitori dei checkpoint immunitari ICI), ha straordinariamente rivoluzionato la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti.

Risultati in termini sia di efficacia che di sicurezza, sono stati recentemente riportati da numerosi studi di fase III che hanno investigato il ruolo degli ICIs nel NSCLC [32-36]. Ad oggi l'anti-PD1 Pembrolizumab deve essere considerato un trattamento standard di prima linea in pazienti con espressione di PD-L1  $\geq 50\%$  (studio KEYNOTE-024) ed un'opzione di seconda linea in pazienti con espressione di PD-L1  $\geq 1\%$  (studio KEYNOTE-010).

Anche Nivolumab, anti PD-1, rappresenta oggi lo standard terapeutico nei tumori del polmoni NSCLC sia squamosi che adenocarcinomi, dalla II Linea di trattamento.

L'approvazione di Nivolumab nella pratica clinica deriva dai risultati di 2 studi randomizzati di fase III il CheckMate-017 e CheckMate-057, rispettivamente per il

NSCLC squamoso e non squamoso [37]. La struttura dei due studi era di natura abbastanza simile, essendo due studi multicentrici, randomizzati, di fase III, che confrontavano Nivolumab con Docetaxel per il NSCLC nello stadio IIIB / IV con recidiva o progressione di malattia durante o dopo un precedente regime di chemioterapia a base di un derivato del platino. In totale, 272 pazienti con k squamoso e 582 con k non squamoso sono stati randomizzati (1:1) a ricevere Nivolumab 3 mg / kg ogni 2 settimane o Docetaxel 75 mg / mq ogni 3 settimane, fino a progressione di malattia e / o tossicità inaccettabile. Nel braccio del Nivolumab, in seguito a progressione iniziale di malattia, è stata consentita la continuazione del trattamento in studio se clinicamente vantaggioso e ben tollerato. La superiorità del Nivolumab rispetto al Docetaxel ha continuato ad essere mantenuta nel tempo, indipendentemente dall'istologia, con una riduzione relativa del rischio di morte del 28% (HR 0,72, IC 95% 0,62-0,84). Dopo un follow-up minimo di 24,2 mesi, la OS a 2 anni con Nivolumab rispetto a Docetaxel è stata del 23% contro l'8% nel NSCLC squamoso, e del 29% rispetto al 16% nel NSCLC non squamoso. Inoltre, i risultati di PFS e ORR continuavano a favorire il Nivolumab per entrambi i sottotipi di NSCLC.

Più interessante è stato che la risposta al Nivolumab era mantenuta a lungo termine: 10 su 27 (37%) responder tra gli squamosi e 19 su 56 (34%) responder tra i non squamosi avevano ancora risposta in corso di trattamento alla data di cut-off, mentre nessun paziente nel braccio del Docetaxel ha dimostrato beneficio a lungo termine. Inoltre, la mediana della risposta con Nivolumab è stata di 25,5 mesi e 17,2 mesi, rispetto a 8,4 mesi e 5,6 mesi con Docetaxel, rispettivamente nel NSCLC squamoso e non squamoso. In accordo con i precedenti risultati, il trattamento con Nivolumab è risultato sicuro e meglio tollerato rispetto al Docetaxel. Gli eventi avversi correlati al trattamento erano più bassi nei bracci del Nivolumab (indipendentemente dal grado, 68% vs 88%),

principalmente di grado intermedio (grado 3-4, 10% vs 55%) e con un profilo di tossicità coerente con quello atteso per questo farmaco. Gli eventi avversi selezionati (in quanto

potenzialmente ad eziologia immune) di qualsiasi grado correlati al trattamento più frequentemente osservati sono stati: ipotiroidismo (4% con Nivolumab vs 0% con Docetaxel), diarrea (8% vs 20%), polmonite (5% vs 0%), aumento della creatinina (3% vs 2%) e rash (4% vs 6%). Inoltre, dalle prime analisi non sono stati segnalati decessi correlati al trattamento.

Nonostante gli entusiasmanti risultati, solo il 30-40% dei pazienti presentò un beneficio a lungo termine dall'immunoterapia mentre il restante 60-70% presentò progressione dopo i primi mesi di trattamento.

La ricerca di biomarcatori in grado di selezionare i pazienti responsivi dai pazienti non responsivi rappresenta oggi la vera sfida dell'immuno-oncologia.

In questo scenario si inserisce questo lavoro che ha l'obiettivo di investigare il ruolo prognostico/predittivo di alcuni biomarcatori. In particolare valuteremo il ruolo del pathway di IDO, il possibile ruolo del microbioma e il ruolo del fattore reumatoide.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **Pazienti**

Sono stati arruolati pazienti affetti NSCLC in stadio IV seguiti presso Azienda Ospedaliera Sant'Andrea di Roma, Facoltà di Medicina e Psicologia Sapienza Università di Roma, da giugno 2016 a luglio 2017. I criteri di inclusione erano: età > 18 anni; diagnosi di NSCLC istologicamente documentati; performance status Eastern

Cooperative Oncology (ECOG)  $\leq$  2; trattamento di seconda linea con anti-PD-1 Nivolumab; adeguata funzione cardiaca, polmonare, renale, epatica e midollare; firma del consenso informato. I criteri di esclusione erano: malattia autoimmune; malattia polmonare interstiziale sintomatica e qualsiasi altra comorbidità significativa; immunosoppressione sistemica; precedente trattamento con agenti antitumorali immunostimolanti inclusi agenti mirati al checkpoint.

### **Trattamento immunoterapico**

Il trattamento con Nivolumab è stato somministrato a una dose standard di 3 mg / kg ogni 2 settimane fino a progressione di malattia o sviluppo di tossicità inaccettabile. La risposta radiologica è stata valutata con i criteri RECIST e classificati in base al controllo della malattia (risposta completa, risposta parziale e malattia stabile) e progressione di malattia. Tutta la tossicità è stata classificata secondo il sistema di segnalazione degli eventi avversi del National Cancer Institute (Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)) (versione 4.0) e valutazione della tossicità eseguita al giorno 1 di ogni ciclo fino alla fine del trattamento. La sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) è stata definita come il tempo dalla registrazione del paziente alla sperimentazione clinica fino alla prima progressione del tumore documentata o morte per qualsiasi causa. La sopravvivenza globale (OS) è stata definita come il tempo dalla registrazione del paziente fino a morte per qualsiasi causa. Abbiamo definito come progressori precoci, coloro che manifestavano progressione di malattia entro tre mesi dall'inizio del Nivolumab. Lo studio è stato condotto secondo la buona pratica clinica delle linee guida e la dichiarazione di Helsinki. La versione finale del protocollo è stata approvata dal Comitato etico istituzionale.

### **Analisi delle Chinurenine**

Abbiamo valutato i livelli sierici di trp, kyn e acido chinolinico con una cromatografia liquida modificata-metodo spettrometria di massa tandem (LC-MS / MS), [ADHD]. Sono stati raccolti campioni di siero e conservati a -80 °C fino all'analisi. 50 µl di campione del siero sono stati deproteinizzati usando 50 µl della soluzione dello standard interno (IS) (50 µM in TCA 4%), passata al vortex e centrifugata a 14.000 rpm per 15 minuti. 20 µl della fase superiore sono stati iniettati nel sistema cromatografico. La separazione cromatografica degli analiti è stata eseguita utilizzando un sistema di cromatografia liquida Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, USA), con colonna di bifenile (100 x 2,1 mm, Kinetex 2,6 µm di bifenile, 100 Å, Phenomenex, CA, USA) equipaggiati con precolonna di sicurezza (Phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase mobile consisteva in una soluzione di acido formico acquoso allo 0,1% (A) e metanolo al 100% (B); l'eluizione è stata eseguita a una portata di 400 µl / min, utilizzando un gradiente di eluizione. La spettrometria di massa è stata eseguita su un sistema a tripla quadrupolo 3200 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipaggiato con una sorgente di ionizzazione. Il rilevatore era in modalità ione positivo. Lo strumento è stato impostato nella modalità di monitoraggio multiplo (MRM). I dati sono stati acquisiti ed elaborati dal software Analyst 1.5.1.

### **Analisi del microbioma**

*Analisi di microbiomi: integrazione di metagenomica, metabolomica, fenomeni e omicheMG mirato del microbiota intestinale. Estrazione del DNA genomico, pirosequenziamento e analisi quantitativa della composizione del microbioma.*

Ogni campione di feci è stato raccolto e processato. Il DNA genomico è stato isolato dall'intero set di campioni, utilizzando il kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Germania). La regione V1-V3 del locus RNA ribosomiale 16S (rRNA) è stata

amplificata per la successiva fase di pirosequenziamento su un sequenziatore genoma 454-Junior (Roche 454 Life Sciences, Branford, USA). Le letture sono state analizzate da Quantitative Insights in Microbial Ecology (QIIME, v.1.8.0), raggruppate in unità tassonomiche operative (OTU) con un livello di similarità di sequenza del 97% da PyNAST per l'assegnazione tassonomica e allineate da UCLUST per OTU corrispondenti a Database di Greengenes (v. 13.8).

### *Bioinformatica*

Un filtraggio del primo risultato è stato ottenuto usando l'elaborazione del segnale di 454 Amplicon; quindi le sequenze saranno analizzate utilizzando il software Quantitative Insights in Microbial Ecology (QIIME 1.8.0) (Caporaso et al., 2010). Al fine di garantire un livello superiore di accuratezza in termini di rilevazione delle Unità tassonomiche operative (OTU), dopo la demultiplexing, le letture con un punteggio medio di qualità inferiore a 25, inferiore a 300 bp e con una chiamata ambigua di base sono state escluse dall'analisi. Le sequenze che hanno superato il filtro di qualità sono state escluse e i singleton sono stati esclusi. Gli OTU definiti da un 97% di somiglianza sono stati scelti usando il metodo uclust e le sequenze rappresentative sono state sottoposte a PyNAST e il metodo usato è stato UCLUST e il database per l'abbinamento OTU è stato Greengenes (v 13.8). L'ultimo passo consisteva nella costruzione di una tabella OTU con l'assoluta abbondanza di ciascuna OTU su tutti i campioni, seguita dall'assegnazione tassonomica; è fornito come una tassonomia profonda di 6 livelli (da regno a specie) e sono stati presi in considerazione sia gli OTU non assegnati che i livelli non specificati.

La diversità ecologica per ciascun campione è stata valutata da i) numero di OTU ottenuti per ciascun campione; ii) indice di Shannon, che fornisce le informazioni sull'entropia delle abbondanze osservate OTU e tiene conto sia della ricchezza che

dell'andine; iii) metrica Chao1 che stima la ricchezza delle specie; iv) distanza filogenetica (PD\_whole\_tree) per valutare la misura quantitativa della diversità filogenetica; v) metrica delle specie osservate, conteggio di OTU unici trovati nel campione; vi) la copertura del bene, che misura quale percentuale della specie totale è rappresentata in un campione. La  $\beta$ -diversità, che rappresenta il confronto tra le comunità microbiche in base alla loro composizione dissimile, è stata calcolata da uniforme UNIFRAC e ponderata Bray-Curtis. La diversità  $\alpha$  e  $\beta$  e il test di Kruskal Wallis sono stati eseguiti dal software QIIME, utilizzando gli script "alpha\_rarefaction.py, beta\_diversity\_through\_py, group\_significance.py". Inoltre, per misurare la robustezza di questi dati verrà eseguita un'analisi di jackknifing su sottoinsiemi di dati e il metodo risultante del gruppo di coppie non pesate con albero Aritmetico (UPGMA) verrà confrontato con l'intera struttura dell'insieme di dati (jackknifed\_beta\_diversity.py -i otus / otu\_table.txt -t otus / rep\_set.tre -m Fasting\_Map.txt -o wf\_jack -e). Questo processo verrà ripetuto con molti sottoinsiemi casuali di dati (il 75% del numero minimo di sequenze per i campioni) e i nodi dell'albero che risultano più coerenti tra i set di dati jackknif saranno considerati più robusti.

### **Analisi del Fattore Reumatoide**

In una coorte di pazienti con tumore del polmone non a piccole cellule metastatici (NSCLC), trattati con Nivolumab in seconda linea, abbiamo determinato i livelli sierici di pre-trattamento di FR (kit ELISA in fase solida, valori superiori a 16 U / ml sono stati considerati positivi). L'associazione tra FR e progressione iniziale, definita come sopravvivenza libera da progressione inferiore a 3 mesi, è stata analizzata utilizzando il test esatto di Fisher. Esperimenti in vitro sono stati condotti su cellule T CD3 purificate da donatori sani.

## **Analisi statistica**

Nell'analisi descrittiva, le variabili quantitative sono state descritte come media e intervallo, mentre le variabili qualitative come numero e percentuale. PFS e OS sono stati stimati utilizzando il metodo Kaplan-Meier, il confronto tra i gruppi è stato fatto utilizzando il logrank test e il metodo Mantel-Cox è stato utilizzato per generare il rapporto di rischio (HR) e il 95% di intervalli di confidenza (CI). La correlazione è stata stimata utilizzando il rho di Spearman e il confronto è stato valutato utilizzando il test non parametrico U di Mann-Whitney. Per determinare i fattori associati ai progressori precoci di malattia, sono stati usati i modelli di regressione logistica multivariata. I risultati dell'analisi multivariata sono stati espressi in odds ratio e 95% IC. Il livello di significatività è stato impostato a  $p < 0,05$ . Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando IBM SPSS Statistics per Window Version 23.0 (Armonk, NY, USA) o GraphPad Prism (GraphPad, Inc, San Diego, CA, USA).

## **3. RISULTATI**

### **Associazione tra chinurenine e risposta all'immunoterapia**

Sono stati arruolati in questo studio 26 pazienti con NSCLC in stadio IV trattati con Nivolumab in seconda linea. Le caratteristiche clinico-patologiche di base dei pazienti sono riassunte nella Tabella 1. Tra queste, 19 pazienti avevano carcinoma squamoso e il rimanente presentava istologia non squamosa (6 adenocarcinoma e 1 indifferenziato). 20 pazienti erano di sesso maschile (76,9%) ed età media 65 anni. La mediana del rapporto kyn / trp era 0,06  $\mu\text{g} / \text{ml}$  e la mediana dell'acido chinolinico era 68,45 ng / ml.

Con un follow-up mediano di 6,9 mesi, 7 (27%), 5 (19%) e 14 (54%) pazienti avevano rispettivamente una malattia stabile (SD), una risposta parziale (PR) e una malattia progressiva (PD), secondo i criteri RECIST v1.1. Tutti i pazienti sono stati valutati al tempo 0 per i livelli sierici di trp, kyn e acido chinolinico. I pazienti che hanno mostrato una progressione precoce (entro 3 mesi) con Nivolumab (n = 14) avevano una concentrazione più alta del rapporto kyn / trp rispetto agli altri (0,09 vs 0,05, rispettivamente, p = 0,01) e un livello più alto di acido chinolinico (121,15 vs 55,12, rispettivamente, p = 0,01) (Figura 1). Sull'analisi multivariata (Tabella 2), il rapporto kyn / trp era significativamente associato ad una progressione precoce (p = 0,01). Abbiamo osservato una correlazione significativa solo tra la progressione precoce e il rapporto kyn / trp e concentrazione di acido chinolinico (rispettivamente p = 0,017 e p = 0,005).

La PFS mediana era di 4 mesi e la OS mediana era di 6,5 mesi nell'intera coorte. I pazienti sono stati stratificati in base al valore mediano del valore sierico di kyn / trp (0,06 µg / ml) e della concentrazione sierica di acido chinolinico (68,45 ng / ml). La PFS era significativamente più lunga nei pazienti che presentavano valori inferiori di kyn / trp rispetto a pazienti con valori più elevati di kyn / trp (PFS mediana non raggiunta a 3 mesi; HR: 0,2; IC 95%: 0,06-0,62; p = 0,001). Risultati simili sono stati osservati in pazienti stratificati per valori di acido chinolinico (PFS mediana non raggiunta rispetto a 3 mesi mediani; HR: 0,3; CI 0,1-0,9; p = 0,018). (Figura 2A). I pazienti con un valore inferiore del rapporto kyn / trp hanno mostrato una OS significativamente migliore rispetto ai pazienti con un rapporto kyn / trp più elevato (OS mediana non raggiunta rispetto a 3 mesi della mediana; HR: 0,18; 95% CI: 0,06-0,56; p = 0,0005). Risultati simili sono stati osservati in pazienti stratificati per valori di acido chinolinico (OS mediana non raggiunta rispetto a 3 mesi della mediana; HR: 0,2; IC

95%: 0,06-0,660;  $p = 0,0077$ ). (Figura 2B).

### **Associazione tra microbioma e risposta all'immunoterapia**

La composizione del microbioma è stata studiata in uno studio caso-controllo di età pari a 11 pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) trattati con Nivolumab rispetto a 11 controlli sani (CTRL). I campioni di feci di pazienti NSCLC sono stati raccolti ai cicli 1, 3 e 5. È stata effettuata una analisi di confronto tra pazienti responder e pazienti non responder e tra i diversi cicli sequenziali di trattamento

La meta-tassonomia del microbiota è stata descritta per i pazienti con NSCLC rispetto ai CTRL e ad ogni periodo di trattamento con Nivolumab (C1-C5). Nei pazienti affetti da NSCLC Rikenellaceae, Prevotella, Streptococco, Lactobacillus ( $p < 0,05$ ), Bacteroides plebeius, Oscillospira, Enterobacteriaceae ( $p < 0,05$ ) sono risultati aumentati rispetto ai CTRL. I non responder avevano Ruminococcus bromii, Dialister, Sutterella più abbondante dei pazienti responder alla terapia ( $p < 0,05$ ). Un po' aumentato nei responder è apparso Akkermansia muciniphila, Bifidobacterium longum e Faecalibacterium prausnitzii ( $p < 0,05$ ). Propionibacterium acnes, Veillonella, Staphylococcus aureus, Peptostreptococcus apparivano significativamente sovraespressi, mentre il Clostridium perfringens era significativamente ridotto al C1 rispetto al punto temporale C3 del trattamento. (FIG 5 )

### **Associazione tra Fattore Reumatoide e risposta all'immunoterapia**

Nella presente analisi, abbiamo arruolato 35 pazienti affetti da NSCLC (7 donne, età media 65 anni, range 44-80). Durante il follow-up, 13 pazienti (37%) presentavano una progressione precoce. Al basale, 7 pazienti (20%) erano positivi alla RF. La progressione precoce della malattia è risultata significativamente più frequente nei

pazienti con RF positiva (5/7, 71,4%) rispetto a quelli negativi (8/28, 28,6%,  $p < 0,0001$ ). Inoltre, FR era in grado di inibire in vitro il legame degli anticorpi anti-CD3 o anti-PD-1 (Nivolumab) ai linfociti T. ( FIG 6)

#### 4. DISCUSSIONE

Nonostante l'indiscusso successo dell'impiego dell'immunoterapia nel trattamento delle neoplasie solide, solo il 30-40% dei pazienti presenta un beneficio a lungo termine, mentre il restante 60-70% dei pazienti presentano una rapida progressione di malattia, indice di una resistenza innata o acquisita.

È stato inoltre descritto un nuovo gruppo di pazienti denominati iperprogressori che hanno un tasso accelerato di crescita del tumore ed una sopravvivenza media di appena 3 mesi.

Quindi la ricerca di biomarcatori di risposta o meglio di resistenza rappresenta oggi la vera sfida dell'immuno-oncologia.

Fino ad oggi non sono stati identificati fattori predittivi affidabili nell'NSCLC, sebbene alcuni parametri clinici sembrerebbero avere un valore predittivo negativo, come per esempio un elevato carico tumorale, il versamento pleurico maligno, uno scarso performance status, una malattia rapidamente progressiva o la presenza di metastasi cerebrali.

Tuttavia questi fattori non sono rappresentativi della risposta immunitaria del paziente e dei meccanismi immunologici in atto.

Fino ad ora il biomarker più ampiamente studiato è stato il PD-L1, che è espresso sia sulle cellule tumorali che sulle cellule infiammatorie infiltrate. Tuttavia, la determinazione del PD-L1 presenta diversi limiti: in primo luogo PD-L1 è un marcatore estremamente dinamico, in secondo luogo per la sua determinazione esistono diversi anticorpi, test e diversi cut-off, e infine le biopsie polmonari potrebbero non essere rappresentative dell'intero tumore [38].

Nonostante il suo ruolo ancora controverso, diversi studi hanno comunque dimostrato un'associazione tra alto livello di espressione di PD-L1 su cellule tumorali e maggiore possibilità risposta al trattamento anti-PD-1 / PD-L1, come nel caso del Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab e Durvalumab.

Un altro biomarcatore promettente è il carico mutazionale del tumore, che è ben noto per riflettere il carico di neoantigeni potenzialmente riconosciuti dal sistema immunitario. È stato dimostrato che questo correla con una migliore risposta anti-PD-1 sia per Pembrolizumab che per Nivolumab. Gli stessi

risultati sono stati dimostrati nello studio OAK considerando il carico mutazionale identificato su sangue periferico, e non più su biopsia, e la risposta all'Atezolizumab [39].

Un altro campo di ricerca è quello inerente all'influenza del microbiota e del microbioma nella risposta all'immunoterapia.

Il microbiota è una comunità di microrganismi che colonizzano dalla nascita diverse aree del corpo umano prevalentemente intestinale, mucosa orale e nasale, tratto vaginale, ecc. È una popolazione dinamica di oltre un trilione di microbi che include batteri appartenenti alle diverse famiglie, virus e funghi che interagiscono l'uno con l'altro, con l'habitat e l'ambiente locale. Il microbioma è l'incredibile numero di geni che

possono essere estrapolati da questa complessa comunità di cellule 100 volte più grande dell'intero genoma.

Il microbiota è strettamente associato all'immunità e allo sviluppo di un sistema immunitario sano, non sorprende il fatto che l'esito delle strategie immunoterapeutiche nei pazienti oncologici possa dipendere dal microbioma intestinale.

La possibilità che la risposta all'immunoterapia (ICI), in particolare l'anti-CTLA-4, potrebbe essere associata alla composizione del microbioma è stata inizialmente suggerita dal gruppo di Zitvogel nel 2015 nel melanoma. Altri gruppi hanno confermato ed esteso le conoscenze anche mediante modelli sperimentali. Molto recentemente l'osservazione è stata estesa ai tumori epiteliali. È stato dimostrato infatti su una corte di 60 pazienti affetti da NSCLC e 40 pazienti affetti da RCC che una sovrarappresentazione dei Firmicutes *Akkermansia muciniphila* nel microbiota fecale era associato ad una maggiore PFS e risposta all'immunoterapia. Inoltre, gli antibiotici potrebbero compromettere l'efficacia del blocco PD-1. I risultati sono stati ulteriormente confermati utilizzando il modello "avatar topi" in cui i topi sono stati ricolonizzati mediante trapianto di microbiota fecale da pazienti trattati con ICI non responder e responder. L'immunità ripristinata e l'attività antitumorale di ICI potrebbero essere raggiunti solo con il trapianto di campioni di feci da pazienti responder. I meccanismi immunologici alla base di questi risultati sono ancora in fase di completa delucidazione. Una specifica risposta Th1 contro *A. muciniphila* è stata rilevata associata a prolungata sopravvivenza libera da progressione (PFS) nei pazienti e nei modelli di topi disbiotici indotti dall'antibiotico e l'aggiunta di *Akkermansia* era in grado di aumentare il ricircolo delle cellule T nei linfonodi e nei letti del tumore. Lo stretto legame con l'immunità mediata da antitumorali Th1 è stato già dimostrato poiché le cellule dendritiche stimulate dal microbiota (DC) sono più efficienti nell'attivare le risposte delle cellule T.

A tale proposito i risultati del nostro studio, in linea con quanto descritto in letteratura, confermano come non solo diversi profili di microbioma siano associati a rischio diverso di sviluppare cancro del polmone, ma anche come siano associati a differente risposta all'immunoterapia. In particolare *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium longum* e *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p < 0,05$ ). *Propionibacterium acnes*, *Veillonella*, *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus* appari sembrerebbero essere predittori positivi mentre *Ruminococcus bromii*, *Dialister*, *Sutterella* sembrerebbero essere associati a resistenza [40].

Recentemente, l'attività di indoleamina 2,3diossigenasi (IDO) è stata proposta come possibile meccanismo di resistenza al trattamento anti-PD-1 che crea a un microambiente immunosoppressivo.

L'Indoleamina 2,3diossigenasi (IDO) è un enzima chiave catalizzante la prima fase e limitante la velocità della via delle chinurenine (kyn) del metabolismo del triptofano (trp) al di fuori del fegato, e converte l'amminoacido essenziale l-trp nel metabolita principale kyn (Figura 4). L'indoleamina 2,3-diossigenasi ha dimostrato di agire come controllo immunitario coinvolto nella tolleranza immunitaria periferica poiché è in grado di inibire le cellule T in proliferazione causando la deplezione del trp e sensibilizzando le cellule T all'apoptosi. Inoltre, IDO favorisce la differenziazione delle cellule T naïve in cellule T regolatorie, con proprietà immunosoppressive, attraverso la produzione di kyn. L'aumento dell'espressione di IDO sia sulle cellule tumorali sia sulle cellule immunitarie infiltranti il tumore, come le cellule dendritiche, sono state riportate in una varietà di tumori maligni, in cui si pensa medino i meccanismi di fuga dal sistema immunitario. Nel NSCLC, l'aumento del catabolismo del trp con conseguente maggiore concentrazione sierica delle kyn è stata collegata ad uno stadio più avanzato alla diagnosi, prognosi peggiore e minore probabilità di risposta alla chemioterapia.

Inoltre, dati recenti hanno mostrato che un più alto rapporto kyn / trp post chemioterapia iniziale, un marker surrogato dell'attività di IDO, è stato associato con OS peggiore nello stadio III del NSCLC sottoposto a trattamento multimodale. È interessante notare che l'evidenza preclinica suggerisce che possa essere coinvolto un aumento dell'attività di IDO nella resistenza all'inibizione del checkpoint. IDO rappresenta quindi uno dei tratti distintivi più rilevanti di immunosoppressione nel cancro. La disponibilità nel prossimo futuro di piccole molecole con target IDO, attualmente in studio di fase III in combinazione con l'immunoterapia, si spera possa avere un impatto significativo nella pratica clinica. Nel presente studio, abbiamo mirato ad indagare se l'attività di IDO, espressa come rapporto kyn / trp, possa dare informazioni sulla risposta al Nivolumab, in particolare identificando quei pazienti resistenti al blocco di PD-1 in una coorte di NSCLC precedentemente trattati.

Abbiamo dimostrato come pazienti con elevato rapporto kyn/trp e di di acido chinolinico nel sangue periferico, quindi con elevata attività di IDO, sono caratterizzati da una prognosi estremamente infausta e da una resistenza primaria agli anti PD-1.

In questi paziente la componente immunosoppressoria rappresentata da IDO potrebbe rendere il blocco di PD-1 inefficace e sono questi i pazienti che potrebbero beneficiare di una terapia di combinazione con anti PD-1 e IDO- inibitore piuttosto che di una monoterapia.

Nonostante il piccolo campione, il nostro studio suggerisce che IDO possa rappresentare un biomcatore facile da valutare ed economico particolarmente utile per identificare i pazienti che abbiano maggiori probabilità di avere un beneficio con una combinazione di anti-PD-1 e anti-IDO. Sperimentazioni cliniche future sono necessarie per confermare il suo ruolo di biomarker predittivo oltre che target terapeutico, introducendo l'immuno-oncologia nello scenario di immuno-oncologia di precisione.

Un altro aspetto interessante del nostro lavoro è stata la valutazione l'associazione tra la presenza di elevate concentrazioni sieriche di fattore reumatoide nel sangue e resistenza al trattamento con anti PD-1.

In letteratura è stato ampiamente descritto come la positività del fattore reumatoide (RF), anticorpo diretto contro la regione Fc dell'immunoglobulina G, rappresenta un fattore prognostico negativo nei pazienti affetti da artrite reumatoide ed è associata alla morte correlata al cancro [41]. Inoltre la positività del FR nei pazienti con carcinoma gastrointestinale non è rara e può essere correlata al carico tumorale, mentre circa l'85% dei pazienti con carcinoma mammario o polmonare diventa FR positivo dopo radioterapia o chemioterapia. Dato assolutamente interessante e in accordo con i nostri risultati di laboratorio è che in vitro è stato dimostrato come il FR sia in grado di abolire l'attività citotossica dei linfociti T.

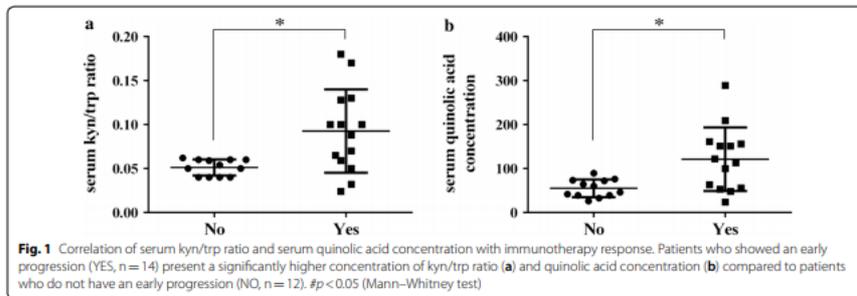
L'ipotesi che spiegherebbe tale fenomeno è che il FR è un Ig-M con elevata affinità per Ig-G2 ed Ig-G1 e potrebbe fungere da trap sia per i linfociti T che per il Nivolumab, che è esso stesso un anticorpo monoclonale. (FIG 7)

Ovviamente queste prime evidenze andranno maggiormente investigate per capire il rapporto di interazione tra anti- PD-1, FR e linfociti T.

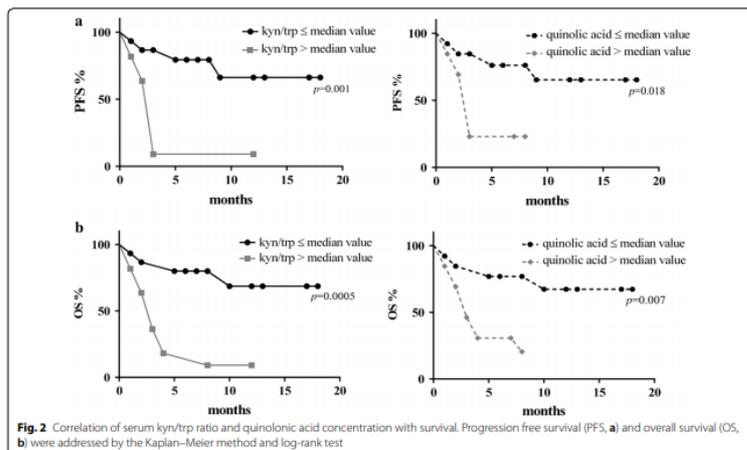
I nostri dati si inseriscono nello scenario della medicina di precisione ed in particolare della immuno-oncologia di precisione in cui la ricerca del biomarcatore di risposta o resistenza è cruciale nel selezionare il paziente e ottimizzare le risorse ed i trattamenti disponibili.

## 5. FIGURE E TABELLE

**Fig 1: Correlazione del rapporto sierico kyn / trp e concentrazione sierica di acido chinolinico con la risposta all'immunoterapia.**



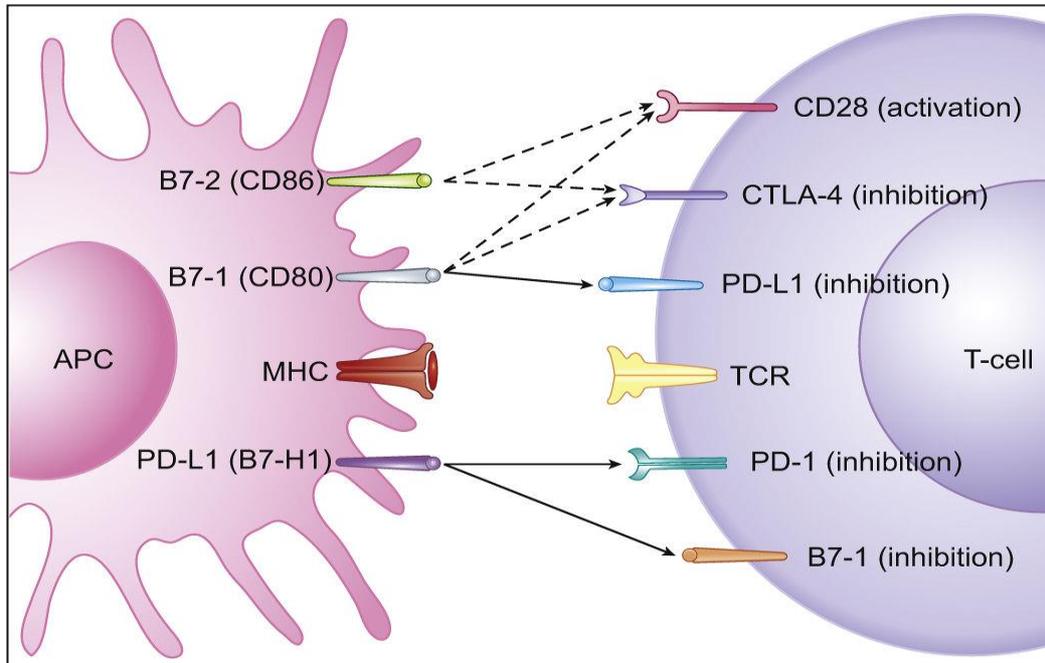
**Fig 2: Correlazione del rapporto sierico kyn / trp e concentrazione dell'acido chinolinico con la sopravvivenza.**



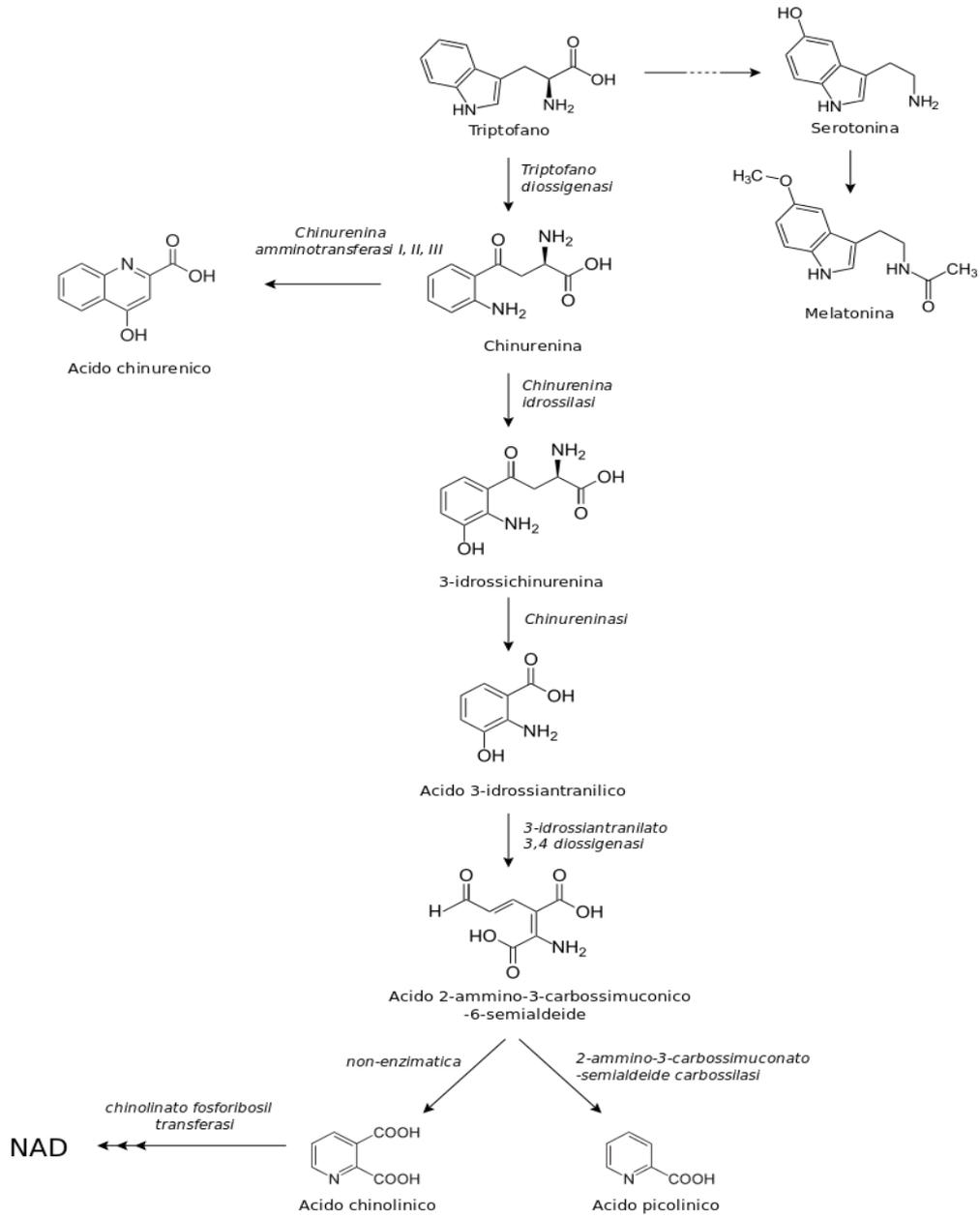
La sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS, A) e la sopravvivenza globale (OS, B) sono state calcolate con il metodo Kaplan-Meier e con il log-rank test.

**Fig 3. Segnali co-stimolatori e inibitori per le cellule T.** L'inibizione mediata da PD-L1 delle cellule T avviene tramite legame a PD-1 e B7-1 su cellule T (frecche complete) e attraverso

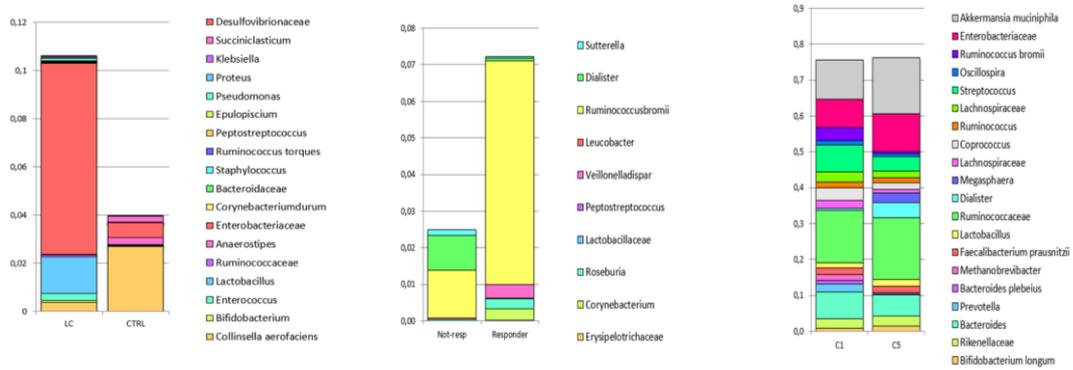
l'inibizione della segnalazione inversa tramite legame a B7-1 su APC (freccia piena). Sono anche rappresentati segnali co-stimolatori e inibitori mediati da CD28 e CTLA-4 su cellule T, rispettivamente, tramite legame a B7-1 e B7-2 su APC (freccie tratteggiate).



**Fig 4. La via della chinurenina o via delle chinurenine.**



**Fig 5 Associazione tra microbioma e risposta all'immunoterapia**



**Fig 6 . Fattore reumatoide e risposta**

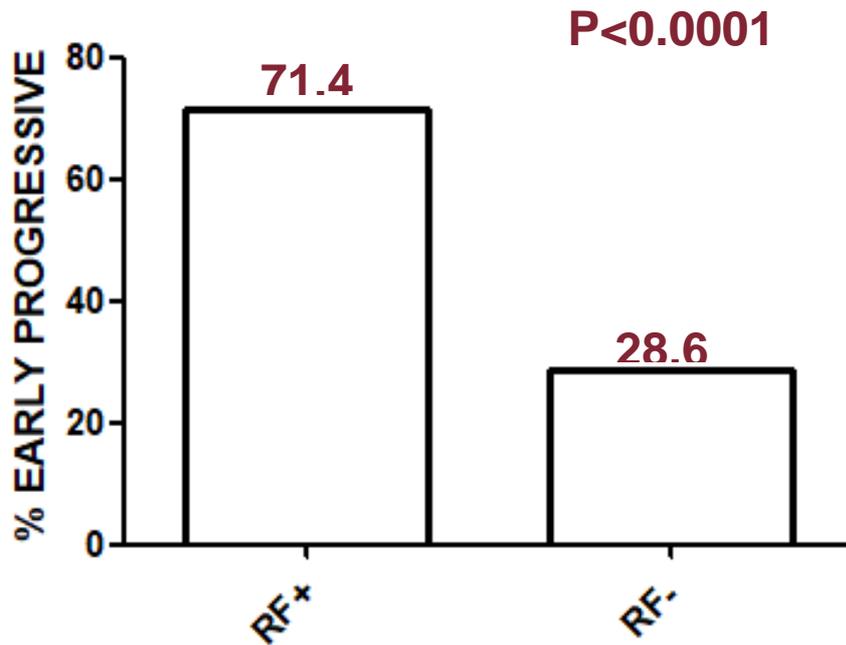
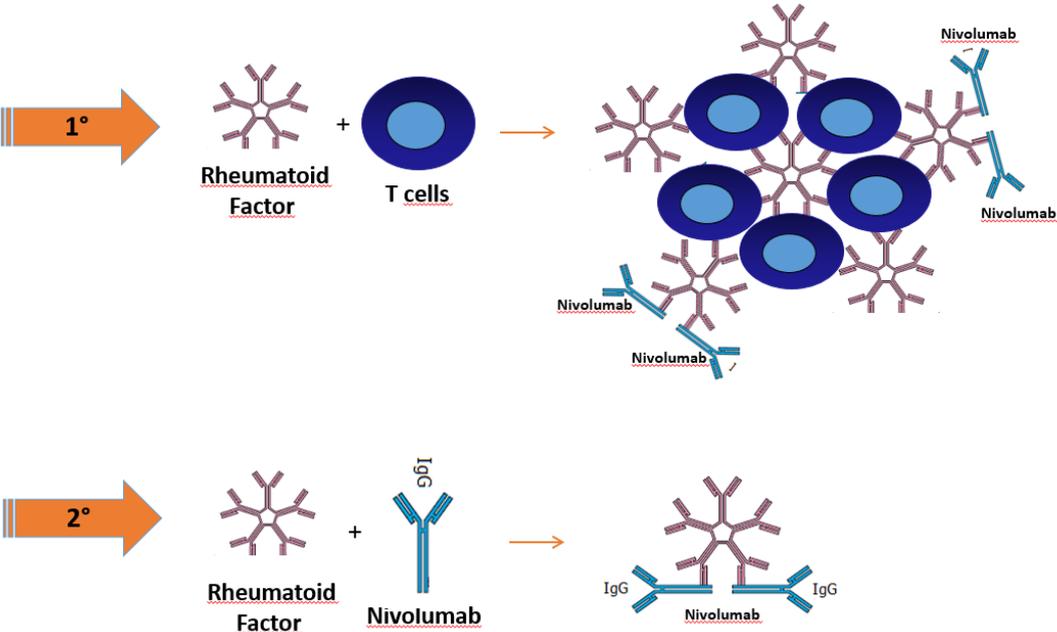


Fig 7. Ipotesi di interazione FR, nivolumab , linfocita T



**Table 1. Main baseline characteristics of the study population**

	<b>N (%)</b>	<b>Serum kyn/trp ratio (µg/ml)</b>	<b>Serum quinolic acid concentration (ng/ml)</b>
<b>Age</b>			
<65	11 (42,3)	0,06±0,03	74,47±45,93
65+	15 (57,7)	0,08±0,05	102,55±72,99
<b>Sex</b>			
Male	20 (76,9)	0,08±0,04	99,21±69,37
Female	6 (23,1)	0,05±0,02	62,22±24,24
<b>Histology</b>			
Adenocarcinoma	6 (23,1)	0,09±0,04	127,85±59,78
Squamous-cell carcinoma	19 (73,1)	0,07±0,04	79,69±63,25
Undifferentiated tumor	1 (3,8)	0,04	76,2
<b>ECOG PS</b>			
0-1	25 (96,2)	0,07±0,03	88,26±63,54
>1	1 (3,8)	0,18	151
<b>Cerebral metastasis</b>			
Yes	3 (11,5)	0,05±0,04	91,54±64,77
No	23 (88,5)	0,08±0,04	84,03±64,14
<b>Plueral effusion</b>			
Yes	6 (23,1)	0,07±0,04	79,24±45,54
No	20 (76,9)	0,09±0,05	110,39±99,95
<b>Early progressor</b>			
Yes	14 (53,8)	0,09±0,05	121,15±72,34
No	12 (46,2)	0,05±0,01	55,12±20,18

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of lung tumors. Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10:1243-1260.
2. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137:668-684.
3. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol.* 2013;31:992-1001.
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:244-285.
5. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511:543-550.
6. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;489:519-525.
7. Liu X, Wang P, Zhang C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget.* 2017. doi: 10.18632/oncotarget.
8. Metro G, Tazza M, Matocci R, et al. Optimal management of ALK-positive NSCLC progressing on crizotinib. *Lung Cancer.* 2017;106:58-66.
9. [Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 2006;90:51–81.
10. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011;29:235–71.

11. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer Immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480:21–9.
12. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol* 2014;5:197.
13. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer Immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480:21–9.
14. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol* 2014;5:197.
15. Floros T, Tarhini AA. Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon- $\alpha$ 2, interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol* 2015;42:539e48.
16. Lipson EJ, Forde PM, Hammers HJ, Emens LA, Taube JM, Topalian SL. Antagonists of PD-1 and PD-L1 in cancer treatment. *Semin Oncol* 2015;42:587e600.
17. Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP: Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2006, 18:206–213.
18. Wolchok JD, Saenger Y: The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist* 2008, 13:2–9.
19. McDermott DF, Drake CG, Sznol M, et al. Survival, durable response, and long-term safety in patients with previously Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627-39.
20. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
21. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10027):1540-50.
22. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1889-94
23. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711-23
24. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammer HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal cell carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373:1803e13.
25. Ferris RL, Blumenschein GR, Fayette J, et al. Further evaluations of nivolumab (nivo) versus

- investigator's choice (IC) chemotherapy for recurrent or metastatic (R/M) squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): CheckMate 141. Clin Oncol 34, 2016 (suppl; abstr 6009)
26. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. N Engl J Med. 2015;373:23-34. ]
  27. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier A, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. N Engl J Med 2015;372:2521e32.
  28. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, Kerr K, Popat S, Reck M, Senan S, Simo GV, Vansteenkiste J, Peters S, ESMO Guidelines Committee. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2016;27:v1–v27. doi:10.1093/annonc/mdw326.
  29. Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. J Clin Oncol 2000; 18: 2095-103.
  30. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. J Clin Oncol 2004; 22: 1589-97.
  31. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2005; 353: 123-32.
  32. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Cancer. N Engl J Med. 2015 Jul 9;373(2):123-35. doi: 10.1056/NEJMoa1504627. Epub 2015 May 31.
  33. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015 Oct 22;373(17):1627-39. doi: 10.1056/NEJMoa1507643. Epub 2015 Sep 2.
  34. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al: Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. Lancet 387:1540-1550, 2016.
  35. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2016 Nov 10;375(19):1823-1833. Epub 2016 Oct 8.
  36. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. . Lancet. 2017 Jan 21;389(10066):255-265. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X. Epub 2016 Dec 13.
  37. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, et al. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two

- Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol*. 2017 Dec 10;35(35):3924-3933. doi: 10.1200/JCO.2017.74.3062. Epub 2017 Oct 12.
38. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376:2415-26.
39. Brahmer J, Horn L, Jackman DM, et al: Five-year follow-up from the CA209-003 study of nivolumab in previously treated advanced non-small cell lung cancer: Clinical characteristics of long-term survivors. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Washington, DC, 2017 [abstr CT077].
40. Gut microbiome influences efficacy of PD-1 based immunotherapy against epithelial tumors. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, Fidelle M, Flament C, Poirier-Colame V, Opolon P, Klein C, Iribarren K, Mondragón L, Jacquelot N, Qu B, Ferrere G, Clémenson C, Mezquita L, Masip JR, Naltet C, Brosseau S, Kaderbhai C, Richard C, Rizvi H, Levenez F, Galleron N, Quinquis B, Pons N, Ryffel B, Minard-Colin V, Gonin P, Soria JC, Deutsch E, Llorca Y, Ghiringhelli F, Zalcman G, Goldwasser F, Escudier B, Hellmann MD, Eggermont A, Raouf D, Albiger L, Kroemer G, Zitvogel L. *Science*. 2018 Jan 5;359(6371):91-97. doi: 10.1126/science.aan3706. Epub 2017 Nov 2.
41. Rheumatoid factor positivity increases all-cause and cancer mortality: a cohort study. Ahn JK, Hwang J, Chang Y, Ryu S. *Rheumatol Int*. 2017 Jul;37(7):1135-1143. doi: 10.1007/s00296-017-3738-x. Epub 2017 May 17.