

# Opterećenje tumora mutacijama kao prediktor odgovora na terapiju inhibitorima imunskih nadzornih točaka

---

Pejnović, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:860356>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Karlo Pejnović**

**Opterećenje tumora mutacijama kao prediktor  
odgovora na terapiju inhibitorima imunosnih  
nadzornih točaka**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2022.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Klinici za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Natalije Dedić Plavetić i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021./2022.

## **Popis oznaka i kratica**

**APC** – *antigen presenting cells*, antigen prezentirajuće stanice

**APOBEC** – *apolipoprotein B editing enzyme*

**B2M** – *Beta-2-Microglobulin*

**CGA** – *cancer germline antigens*, tumorski antigeni zametnih linija

**CGP** – *comprehensive genome profiling*

### **CheckMate studije**

**CPRC** – *castration-resistant prostate cancer*

**CTLA-4** – *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

**DCB** – *durable clinical benefit*, trajna klinička korist

**DCR** – *disease control rate*, stopa kontrole bolesti

**EBV** – Epstein-Barr virus

**F1CDx** – *FoundationOne CDx assay*

**FFPE** – *formaldehyde fixed-paraffin embedded*

**HLA** – *human leukocyte antigens*, ljudski leukocitni antigen

**HPV** – humani papiloma virus

**HR** – *hazard ratio*, omjer rizika

**ICI** – *immune checkpoint inhibitor*, inhibitor imunskih nadzornih točaka

**IFN** – interferon

**IHC** – imunohistokemija

**JAK1** – *Janus kinase 1*

**JAK2** – *Janus kinase 2*

**Lag-3** – limfocitni aktivacijski gen 3

**MHC** – *major histocompatibility complex*, glavni sustav tkivne snošljivosti

**MIBC** – muscle invasive bladder cancer

**MMR** – *mismatch repair*

**MSI** – *microsatellite instability*, mikrosatelitna nestabilnost

**MSS** – *microsatellite stable*, mikrosatelitno stabilni

**Mut/Mb** – mutacija po megabazi

**NDB** – *no durable benefit*, bez trajne koristi

**NGS** – *next generation sequencing*, sekvenciranje nove generacije

**NMIBC** – *non muscle invasive bladder cancers*

**NSCLC** – *Non-Small Cell Lung Cancer*, ne-malostanični karcinom pluća

**ORR** – *objective response rate*, stopa objektivnog odgovora

**OS** – *overall survival*, ukupno preživljenje

**PD-1** – *programmed cell death protein 1*

**PD-L1** – *programmed death-ligand 1*

**PFS** – *progression free survival*, preživljenje bez progresije bolesti

**STK11** – *Serine/threonine kinase 11*

**TAA** – *tumor associated antigens*, antigeni povezani s tumorom

**TCGA** – *The Cancer Genome Atlas*

**TMB** – *tumor mutational burden*, opterećenje tumora mutacijama

**TME** – *tumor microenvironment*, tumorski mikrookoliš

**TNBC** – *Triple negative breast cancer*, trostruko negativan karcinom dojke

**TSA** – *tumor specific antigens*, tumor specifični antigeni

**UV** – ultraljubičasto

**WES** – *whole exome sequencing*

## SADRŽAJ

Sažetak

Summary

1. UVOD .....	1
2. INTERAKCIJA IMUNOSNOG SUSTAVA I TUMORA .....	2
2.1 MHC varijabilnost i utjecaj na ICI terapiju .....	3
2.2 Tumorski antigeni .....	4
2.3 Tumorski mikrokoliš .....	5
2.4 Imunosne kontrolne točke .....	6
3. OPTEREĆENJE TUMORA MUTACIJAMA .....	6
3.1 Eksperimentalno određivanje TMB-a i izazovi pri njegovu određivanju .....	8
4. VARIJABILNOST TMB-A U RAZLIČITIM VRSTAMA TUMORA .....	12
5. TMB KAO PREDIKTOR ODGOVORA NA ICI TERAPIJU .....	13
5.1 Melanom .....	15
5.2 Karcinom pluća .....	16
5.3 Gastrointestinalni tumori .....	17
5.4 Karcinom urotela .....	18
5.5 Karcinom glave i vrata .....	19
5.6 Karcinom dojke .....	19
5.7 Karcinom prostate .....	21
6. ODGOVOR NA ICI TERAPIJU U TMB-L TUMORIMA .....	22
7. OPTIMIZACIJA TMB-A KAO PREDIKTIVNOG MARKERA .....	22
8. MUTACIJSKI POTPISI .....	23
9. MIKROSATELITNA NESTABILNOST I TMB .....	24
10. TMB I PD-L1 .....	26
11. TUMORSKI IMUNOGRAM .....	26
12. ZAKLJUČAK .....	29
ZAHVALE .....	30
POPIS LITERATURE .....	31
ŽIVOTOPIS .....	47

## Sažetak

Opterećenje tumora mutacijama kao prediktor odgovora na terapiju inhibitorima imunskih nadzornih točaka

Karlo Pejnović

Tumori su velik javnozdravstveni problem u svijetu te po učestalosti drugi uzrok smrti nakon kardiovaskularnih bolesti. Incidencija tumora raste iz godine u godinu, te je veća u starijoj populaciji. Liječenje tumora je izrazito kompleksan proces koji zahtjeva različite modalitete liječenja. Razvoj medicine i stjecanje novih spoznaja na području liječenja tumora dovelo je do razvoja imunoterapije kao jednog od temeljnih modaliteta liječenja uz kirurgiju, radioterapiju i kemoterapiju. Istraživanja u kojima je proučavana interakcija imunskog sustava i tumora dovela su do otkrića imunskih nadzornih točaka kao potencijalne mete za lijekove. Time je stvorena mogućnost istraživanja i razvoja inhibitora imunskih nadzornih točaka koji su promijenili paradigmu liječenja u onkologiji. Za uvođenje inhibitora imunskih nadzornih točaka u kliničku praksu bio je nužan razvoj biomarkera za određivanje pacijenata koji će potencijalno imati koristi od te terapije. Opterećenje tumora mutacijama je mjera koja kvantificira količinu mutacija po megabazi koja postoji u tumoru. Opterećenje tumora mutacijama se pokazao kao dobar prediktor odgovora na terapiju inhibitorima imunskih nadzornih točaka kod određenih vrsta tumora. Razvojem sekvenciranja nove generacije, smanjena je cijena i kompleksnost određivanja opterećenja tumora mutacijama te omogućena njegova primjena u kliničkom okružju. Iako je opterećenje tumora mutacijama odobreno za korištenje u kliničkom okružju otvorena su brojna nova pitanja vezana za njegovu sposobnost predikcije odgovora na terapiju inhibitorima imunskih nadzornih točaka kod različitih vrsta tumora, kao i za određivanje granične vrijednosti za podjelu tumora na one s visokim ili niskom opterećenjem. Podjelom pacijenata temeljenoj na vrijednosti TMB-a možemo bolje odabrati pacijente za liječenje terapijom inhibitorima imunskih nadzornih točaka.

Ključne riječi: opterećenje tumora mutacijama, imunoterapija, inhibitori imunskih nadzornih točaka

## Summary

Tumor mutational burden as a predictor of response to immune checkpoint inhibitor therapy

Karlo Pejnović

Cancer poses a major public health problem all over the world and it is the second leading cause of death after cardiovascular disease. The incidence of cancer increases every year, and is higher in the elderly population. Cancer treatment is an extremely complex process that requires different treatment modalities. The development of medicine and the acquisition of new knowledge in a field of cancer treatment has led to the development of immunotherapy as one of the fundamental modalities of treatment in addition to surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Research studying the interaction of the immune system and tumors have led to the discovery of immune checkpoints as potential targets for drugs. This created the possibility of research and development of immune checkpoint inhibitors that changed the treatment paradigm in oncology. The introduction of immune checkpoint inhibitors into clinical practice has necessitated the development of biomarkers to identify patients who will potentially benefit from that therapy. Tumor mutational burden is a measure that quantifies the number of mutations per megabase that exists in a tumor. It has been shown to be a good predictor of response to immune checkpoint inhibitor therapy in certain tumor types. With the development of new generation sequencing, the cost and complexity of determining tumor mutational burden has been reduced, which enabled its application in the clinical environment. Although tumor mutational burden is approved for the use in the clinical setting, a number of new questions have been raised regarding its ability to predict response to immune checkpoint inhibitor therapy in different tumor types, as well as determining cut-off values for classification of tumors into those with high or low mutational load. By dividing patients based on TMB values, patients can be selected better for the treatment with immune checkpoint inhibitor therapy.

Key words: tumor mutational burden, immunotherapy, immune checkpoint inhibitors



# 1. UVOD

Skloni smo mišljenju da je imunoterapija medicinsko dostignuće novijeg datuma, staro tek nekoliko desetaka godina. Iako je u tom razdoblju zanimanje za interakciju i utjecaj imunološkog sustava na tumore doživjelo velik zamah, prvi znanstveni pokušaj moduliranja imunološkog sustava za liječenje tumora može se pripisati dvojici liječnika Fehleisenu i Buschu, koji su neovisno primijetili značajnu regresiju tumora nakon infekcije erizipelom (1). Danas se ocem imunoterapije smatra američki kirurg William Bradley Coley, koji je 1891. objavio istraživanje u kojem je proučavao učinke injekcije bakterija *Streptococcus pyogenes* and *Serratia marcescens* inaktiviranih toplinom ("Coleyjevi toksini") u pacijente s neoperabilnim sarkomima kostiju (2).

Napredak u liječenju tumora imunoterapijom i ideja korištenja imunosnog sustava u borbi protiv tumora je dolaskom kemoterapije i radioterapije uz kirurgiju kao osnove liječenja tumora, bio zaustavljen. Međutim, s vremenom se vratio interes u proučavanje imunoterapije kao modaliteta liječenja tumora te su se uvidjele mogućnosti koje imunoterapija nudi. James P. Allison i Tasuku Honjo su 2018. godine dobili Nobelovu nagradu iz medicine za njihovo otkriće terapije tumora inhibicijom negativne imunološke regulacije te time potvrdili imunoterapiju kao jedan od glavnih modaliteta liječenja u onkologiji.

Jedna od vrsta imunoterapija je i inhibicija imunosnih nadzornih točaka (eng. *immune checkpoint inhibitors*, ICI) čijim su uvođenjem u široku primjenu u kliničkoj praksi otvorena brojna pitanja i nedoumice u vezi sigurnosti i koristi te vrste imunoterapije kao i mogućnosti načina određivanja tumora koji će najbolje na nju odgovoriti. Usporedo s razvojem imunoterapije razvijali su se i biomarkeri nužni za prepoznavanje onih pacijenata koji bi potencijalno mogli imati koristi od te terapije. Jedan od tih biomarkera je i opterećenje tumora mutacijama (eng. *Tumor mutational burden*, TMB). Cilj ovog rada je opisati opterećenje tumora mutacijama i njegovu ulogu kao prediktivnog biomarkera odgovora na terapiju inhibitorima imunosnih nadzornih točaka.

## 2. Interakcija imunskog sustava i tumora

Jedna od karakteristika tumora je mogućnost izbjegavanja imunskog sustava. Tumorske stanice eksprimiraju na površini stanice neoantigene koji se putem MHC-a (eng. *major histocompatibility complex*) prezentiraju T-stanicama, što omogućuje njihovu aktivaciju i uništenje tumorskih stanica. Međutim, tumorske stanice uspijevaju izbjeći imunski odgovor na nekoliko načina: mijenjanjem tumorskog mikrookoliša, lučenjem različitih citokina, promjenom metabolizma, ali i ekspresijom imunskih nadzornih točaka čime atenuiraju imunski odgovor kako na zdrave tako i na tumorske stanice. Blokiranjem imunskih nadzornih točaka, najčešće PD-1 ili CTLA4 inhibitorima, imunski se sustav može reaktivirati i prepoznati tumorske stanice te ih potom uništiti (3).

Prepoznavanje tumorskih stanica temelji se na prisutnosti eksprimiranih neoantigena. Povećanjem brojem mutacija u tumorskim stanicama, povećava se i broj neoantigena eksprimiranih na površini tumorskih stanica, te time i mogućnost da je neki od tih neoantigena imunogen i da će nakon prezentacije u sklopu MHC kompleksa aktivirati T-stanični imunski odgovor i eradikaciju tumora (4–6). Iz tog razloga TMB se pokazao kao dobar prediktor odgovora na ICI terapiju. S obzirom da imunogeni neoantigeni koje T-stanice mogu prepoznati nastaju i u tumorskim stanicama s manjim brojem mutacija, kao što i velik broj mutacija nužno ne znači stvaranje velikog broja imunogenih neoantigena, svaki pokušaj dihotomiziranja prediktivne vrijednosti TMB-a je naišao na prepreke (3). TMB kao prediktivni biomarker ima svoja ograničenja pogotovo kada se koristi izolirano, što je vidljivo u stopi odgovora od 45% na ICI terapiju u TMB-H (eng. *Tumor mutational burden high*)(>20 mut/Mb) tumora (7,8). Osim stvaranja imunogenih neoantigena, prepoznavanja od strane T-stanica te njihove aktivacije u obzir moramo uzeti i klonalnost tumora koja doprinosi sposobnosti generiranja specifičnog imunskog odgovora na tumorske stanice (9).

Tumorski mikrookoliš i čimbenici povezani s njim također utječu na sposobnost imunskog sustava da prepozna i uništi tumorske stanice kao i na sposobnost tumora da izbjegne imunski nadzor, mijenjanjem ravnoteže aktivirajućih i inhibitornih citokina, sprječavanjem infiltracije tumora T-stanicama, mijenjanjem metaboličkog statusa tumora i njegovog mikrookoliša te vrstama imunskih točaka koje tumor koristi (3). Iako postoji povezanost između TMB-H i boljeg kliničkog ishoda nakon ICI terapije, postoje i brojni

drugi čimbenici koji utječu na ishod liječenja ICI terapijom te da ih je potrebno uzeti u obzir pri optimiziranju predikcije ishoda liječenja (3).

## 2.1 MHC varijabilnost i utjecaj na ICI terapiju

MHC molekule su nužne za prezentiranje antigena na površini stanica da bi ih specifične T-stanice prepoznale i aktivirale specifičan imunski odgovor. MHC molekule su visoko polimorfne, s varijacijama u području veznog mjesta za peptide, pri čemu svaka varijanta veže specifični repertoar peptida (10). Upravo navedena polimorfnost i heterogenost MHC molekula su važne za oblikovanje specifičnog individualnog imunskog odgovora na tumore te poveznica s boljim odgovorom na ICI terapiju (3,10). Varijacije u MHC molekulama mogu utjecati na vezanje peptida u MHC kompleks tijekom antigenske prezentacije, s posljedičnim smanjenim repertoarom peptida prezentiranim T-stanicama u sklopu MHC I i II molekula (3). Afinitet vezanja MHC I kompleksa za peptide glavna je odrednica antigenosti i ovisi o tri gena smještene na lokusu humanog leukocitnog antigena (HLA) na kromosomu 6: HLA-A, HLA-B i HLA-C (11). U sklopu MHC molekula prezentiraju se i tumorski neoantigeni te je zbog toga promjena repertoara peptida koje se mogu vezati u MHC kompleks bitna u oblikovanju mutacijskog krajolika (eng. *mutational landscape*) tumora (12,13).

Prema teoriji imunskog nadzora tumora, imunološki sustav bi trebao vršiti negativan selektivni pritisak na populaciju tumorskih stanica kroz eliminaciju tumorskih stanica koje sadrže antigenske mutacije ili aberacije (12). Stanice prekursora tumora s antigenskim varijantama su pod većim rizikom za imunsko prepoznavanje i eliminaciju, odnosno populacije tumorskih stanica koje se dijele trebale bi biti usmjerene prema stanicama koje izbjegavaju proizvodnju neoantigena (12). Postoje brojna istraživanja koja potvrđuju da imunološki nadzor oblikuje genome tumora otkrivanjem i eliminacijom stanica raka u ranoj fazi tumorske progresije (9,14–17). Iz navedenog možemo zaključiti da su onkogene mutacije, koje dovode do stvaranja neoantigena, eliminirane tijekom ranih faza razvoja tumora mehanizmom koji ovisi o onkogenom peptidom predstavljenom putem MHC I kompleksa pojedinca (12). Maksimalna heterozigotnost MHC I lokusa (A, B i C), koja je povećala sposobnost domaćina da prezentira veći broj neoantigena, povezana je s duljim OS nakon ICI terapije u usporedbi s pacijentima koji su bili homozigoti za bar jedan lokus (10).

Određeni HLA podtipovi, kao što je većina članova HLA B44 podtipa, mogu preferencijalno prezentirati određene antigene, što dovodi do poboljšanog preživljavanja (10). Ti HLA podtipovi poboljšavaju pozitivan učinak TMB-H na preživljenje pacijenata (3). Nasuprot tome, tumori koji izgube HLA ekspresiju ili dođe do poremećaja funkcije zbog promjene u  $\beta$ 2-mikroglobulinu, mogu pokazati rezistenciju na ICI terapiju (18,19).

## 2.2 Tumorski antigeni

Tumorske antigene dijelimo na tumor specifične antigene (eng. *tumor specific antigens*, TSA) odnosno tumorske neoantigene, antigene povezane s tumorima (eng. *tumor associated antigens*, TAA) i tumorske antigene zametnih linija (eng. *cancer germline antigens*, CGA) (20–23). Tumor specifični antigeni ili neoantigeni su skupina tijelu stranih peptida eksprimiranih na površini tumorskih stanica u sklopu MHC kompleksa (24). Oni nisu kodirani normalnim genomom domaćina, a mogu predstavljati onkogene virusne proteine ili abnormalne proteine koji su nastali kao posljedica somatskih mutacija (25). Kod tumora koji u podlozi imaju virusnu etiologiju, kao što su cervikalni ili orofaringealni karcinom povezan s humanim papilomavirusom, karcinom Merkelovih stanica povezan s infekcijom poliomavirusom Merkelovih stanica, tumorima glave i vrata povezani s infekcijom Epstein-Barr virusom, bilo koji epitop dobiven iz otvorenog okvira čitanja (eng. *open reading frames*, ORF) virusnog genoma pridonosi kao potencijalni izvor neoantigena (26–28). U slučaju da nije u pitanju virusna etiologija, tumorski neoantigeni mogu nastati zbog nesinonimnih mutacija gena uključujući varijante jednog nukleotida (eng. *single nucleotide variants*, SNV), insercije i delecije (indel), fuzije gena, mutacije pomaka okvira čitanja (eng. *frameshift mutations*) i strukturalne varijante (7,29).

Antigeni povezani s tumorom i tumorski antigeni zametnih stanica su peptidi eksprimirani na površini tumorskih stanica, ali i na površini zdravih stanica i stanica reproduktivnog tkiva testisa, fetalnih ovarija i trofoblasta (30–32). Ti su peptidi kodirani normalnim genomom, a uključuju normalne diferencijacijske antigene, koji se u trenutnom stupnju diferencijacije ne bi trebali nalaziti u organizmu, ili abnormalno eksprimirane normalne proteine (25). Prekomjerno eksprimirani normalni nepromijenjeni proteini koji imaju funkciju poticanja rasta ili preživljenja stanica, kao što su protein Wilms tumor 1 i Her2/ neu, čine skupinu antigena povezanih s tumorom koji izravno sudjeluju u onkogenom

procesu (25,33,34). Antigenost TAA, s obzirom da su to normalni proteini, ovisi o razinama njihove ekspresije ili mogućnosti zaobilaženja mehanizama imunosne tolerancije (35,36).

Budući da su tumorski neoantigeni s gledišta imunološkog sustava potpuno strani tijelu, ne bi trebalo biti utjecaja središnje T-stanične tolerancije na kvalitetu reaktivnih T-stanica specifičnih za te neoantigene, koja normalno eliminira autoreaktivne T-limfocite (7). Antigeni povezani s tumorom, zbog toga što su to normalni proteini eksprimirani i na zdravim stanicama, imaju niži afinitet za vezanje na TCR u usporedbi s tumor specifičnim antigenima (37). Tijekom zadnjih nekoliko godina, istraživanja pružaju sve više dokaza da su tumorski neoantigeni važni čimbenici koji pokreću tumor specifični T-stanični odgovor u različitim vrstama tumora (7). Te dokaze možemo podijeliti u tri skupine: (1) pojava T-staničnog antitumorskog odgovora na neoantigene, (2) povezanost TMB-a i kliničkog ishoda liječenja ICI terapijom i (3) i antitumorski učinci terapijske manipulacije reaktivnošću neoantigen specifičnih T-stanica (25,29).

Razvoj sekvenciranja nove generacije (eng. *next generation sequencing*, NGS) dao nam je mogućnost otkrivanja somatskih mutacija specifičnih za tumore, usporedbom DNA izolirane iz tumora i normalne DNA (25,38). Također postoji mogućnost analize tumorske mRNA konverzijom u cDNA pomoću reverzne transkriptaze i stvaranje knjižnice prikladne za sekvenciranje (25). S obzirom na veličinu genoma i kompleksnost njegove analize, korištenje „hybrid capture“ ciljane NGS metode omogućilo je znanstvenicima fokusiranje na mali kodirajući dio genoma odnosno egzom (39–41). NGS se koristi i u kliničkom okruženju iako su i dalje otvorena pitanja dobivanja potrebne informacije u klinički relevantnom vremenskom okviru, male količine DNA ili RNA dobivene „core“ biopsijom i FFPE prezervacije tkiva koja utječe na DNA (25).

### **2.3 Tumorski mikrookoliš**

Tumorski mikrookoliš (eng. *tumor microenvironment*, TME ) odnosi se na stanični okoliš koji okružuje tumor (42,43). Osim tumorskih stanica TME čine i ekstracelularni matriks, krvne žile, druge ne-tumorske stanice i signalne molekule (citokini, faktori rasta, hormoni, itd.) (42,44,45). TME ima ključnu ulogu u tumorskoj inicijaciji, progresiji i metastaziranju, te utjecaj na terapijsku rezistenciju tumora (42). Ne-tumorske stanice identificirane unutar TME-a uključuju stromalne stanice, fibroblaste, stanice imunosnog

sustava (limfocite T i B, makrofage povezane s tumorom (eng. *tumor-associated macrophages*, TAM), NK stanice itd.), pericite i nešto adipocita (46).

## 2.4 Imunosne kontrolne točke

Tumorski mikrookoliš (TME) je infiltriran brojnim vrstama upalnih stanica urođenog i stečenog imunskog sustava čije su funkcije nadziranja tumorskog rasta suprimirane različitim mehanizmima (47,48). Imunosne kontrolne točke posreduju toleranciju i štite vlastita tkiva od imunskog sustava (49). Supresija imunskih kontrolnih točaka moguća je smanjenjem broja receptora i aktivnosti aktivirajućih imunoreceptora (eng. *down regulation*) te aktivacijom i povećanjem broja receptora inhibirajućih imunoreceptora (eng. *up-regulation*) (50). Trenutno znamo brojne molekule i receptore koji sudjeluju u kontroli i nadziranju rasta i progresije tumora. Interakcija između tumora i imunskog sustava potvrđena je nizom istraživanja te je otkriven velik broj inhibitornih imunskih receptora poput PD-1, CTLA-4, LAG3, TIM3, TIGIT, BTLA i drugih (50). To su receptori na površini stanica koji djeluju kao regulatori imunskog odgovora. Vežući se na aktivirane stanice imunskog sustava atenuiraju jakost imunskog odgovora. Inhibitorni receptori mogu između ostalog biti eksprimirani i na površini tumorskih stanica čime omogućuju njihovo preživljavanje. Postoje različiti signalni putevi putem kojih ligandom aktivirani receptori ostvaruju svoj inhibitorni učinak, a često korišteni su na tirozinu temeljeni inhibirajući motivi (eng. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) i na tirozinu temeljeni „switch“ motivi (eng. *immunoreceptor tyrosine-based switch motif*, ITSM) koji pripadaju skupini nekatalitičkih tirozin-fosforiliranih receptora (eng. *non-catalytic tyrosine-phosphorylated receptors*, NTRs) (50). Tumor koristi kontrolne točke kako bi smanjio imunski odgovor i reaktivnost T-stanica te time izbjegao eradikaciju.

## 3. Opterećenje tumora mutacijama

Opterećenje tumora mutacijama (TMB) je mjera kojom izražavamo količinu mutacija po megabazi koja postoji u tumoru (51). Dio tih mutacija može dovesti do sinteze neoantigena, nakon čega APC (antigen prezentirajuće stanice) mogu obraditi neoantigen i

prezentirati ga T-stanicama putem MHC molekula (3,52). Povećanjem broja mutacija povećava se i broj neoantigena te samim time i mogućnost prepoznavanja i uništenja putem stečenog i prirođenog imunskog sustava (3,52). Međutim, ne uzrokuju sve mutacije stvaranje novih neoantigena, odnosno nisu svi neopeptidi eksprimirani na površini tumorske stanice imunogeni (53). Samo mali broj mutacija stvara peptide koje APC mogu obraditi i predložiti u sklopu MHC-a, a tek dio njih mogu prepoznati T-stanice i aktivirati imunski odgovor (54,55). Osim imunogenih neoantigena postoje i drugi čimbenici koji mogu utjecati na sposobnost T-stanica za prepoznavanjem i ubijanjem tumorskih stanica kao npr. inaktivirajuće mutacije APC koje mogu smanjiti sposobnost prezentiranja tumorskih peptida imunskom sustavu (52). U tumorskim stanicama može doći i do mutacija imunološki relevantnih gena poput JAK1 (eng. *Janus kinase 1*), JAK2 (*Janus kinase 2*), B2M (eng. *Beta-2-Microglobulin*), STK11 (eng. *Serine/threonine kinase 11*) i dr. (19,56) čije prisustvo može promijeniti utjecaj TMB-a na terapijski odgovor ICI-a (52).

TMB postaje sve važniji u identifikaciji pacijenata koji imaju veću vjerojatnost odgovoriti na ICI terapiju te zato raste interes za određivanjem varijacija TMB-a u različitim vrstama tumora. Također, dokazane su velike varijacije TMB-a unutar iste vrste tumora. Brojne su studije, uključujući TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) studiju, koje su koristile WES (eng. *whole exome sequencing*) za mjerenje TMB-a, u različitim vrstama tumora ukazale na širok raspon vrijednosti TMB-a (57). Neke su vrste pedijatrijskih tumora pokazivale izrazito niske vrijednosti od oko 0.1 mutacija po megabazi, dok su tumori povezani s intenzivnim izlaganjem kancerogenima poput melanoma, zbog izlaganja UV zračenju, ili tumora pluća, zbog izlaganju dimu cigareta, pokazivali puno veće vrijednosti, s preko 400 mutacija po megabazi (58,59). Izrazito velika varijabilnost TMB-a je prisutna kod NSCLC (eng. *Non-Small Cell Lung Cancer*) pri čemu je medijan broja somatskih mutacija po megabazi veći za bivše ili trenutne pušače (10.5 mutacija po megabazi) u odnosu na ljude koji nikada nisu pušili (0.6 mutacija po megabazi) (60). Osim kancerogenog djelovanja pušenja na akumulaciju somatskih mutacija i samim time i na TMB kod NSCLC-a, utječu i drugi čimbenici uključujući mutacije gena za popravak i replikaciju DNA (57). U obzir treba uzeti i intratumorsku heterogenost – prisutnost genetički različitih subklonalnih populacija u tumoru, koja može utjecati na tumorski nadzor i antitumorsku imunost (61).

Visok TMB može biti važan za mjerenje antitumorske aktivnosti imunskog sustava i kao prognostički faktor ili prediktor odgovora na terapiju inhibitorima imunskih točaka ovisno o populaciji pacijenata (62). Nameće se pitanje kako visok TMB utječe na

imunogeničnost tumora? Opažanje da je broj nesinonimnih mutacija povezan s učinkovitosti pembrolizumaba (anti-PD-1 protutijelo) je u skladu s hipotezom da je identifikacija neoantigena koji su nastali kao posljedica somatskih mutacija, važan čimbenik za aktivnost terapije PD-1 inhibitora (63). Tumori pacijenata koji su imali DCB (eng. *durable clinical benefit*) su imali značajno veći TMB u usporedbi s pacijentima s NDB (eng. *no durable benefit*) i visok TMB je bio povezan s boljim preživljenjem bez progresije bolesti (eng. *progression free survival*, PFS) (63).

### 3.1 Eksperimentalno određivanje TMB-a i izazovi pri njegovu određivanju

TMB označava ukupan broj mutacija u tumoru. Međutim u toj definiciji ne saznajemo ništa o vrsti mutacija koje se u tumoru nalaze. Vrste mutacija koje uzimamo u obzir kod definiranja TMB-a razlikuju se ovisno o tome koju metodologiju koristimo (3,52). Za kvantifikaciju TMB-a mogu se koristiti različite metode, a kao zlatni standard se koristi sekvenciranje cijelog egzoma (eng. *whole exome sequencing*, WES) koji može otkriti mutacije u području kodirajućih regija gena (egzona) (3,64). Većina WES protokola zahtijeva 150-200 ng genomske DNA (57). Ako je dostupno i RNA sekvenciranje, nakon određivanja nesinonimnih kodirajućih mutacija putem WES-a zadržavaju se samo one mutacije koje se pojavljuju u eksprimiranom genu (64). Mutirani peptidi se identificiraju *in silico* te se evaluiraju masenom spektrometrijom ili algoritmima koji uzimaju u obzir predviđeni afinitet peptida prema MHC I molekuli (65). Iako je WES najpreciznija metoda za mjerenje TMB jer omogućuje njegovo direktno mjerenje, zbog cijene, potrebnog vremena i potrebe za dovoljnom količinom uzorka tkiva, nije primjeren za rutinsko korištenje u klinici (3).

U počecima istraživanja TMB-a, WES je bila glavna metoda za njegovo određivanje koje se provodilo na dva uzorka, tumorskoj i normalnoj ne-tumorskoj „matching“ DNA. Određivanje TMB-a putem WES-a uključuje somatske nesinonimne kodirajuće mutacije, a isključuje varijante zametne linije usporedbom s normalnim „matching“ uzorcima (3,52,64). U situacijama kada se sekvencira samo tumorska DNA, lažno pozitivne zametne varijante se mogu filtrirati korištenjem velikih javno dostupnih setova podataka zametnih varijanta pri čemu je od velike važnosti koristiti one setove podataka s dovoljno širokom zastupljenošću svih populacija (57). Zbog visoke cijene i kompleksnosti pri izvođenju WES-a traže se alternativne metode procjene TMB-a poput CGP-a (eng. *comprehensive genome profiling*)



(3,6). *Foundation Medicine* je razvila CGP test s 324 gena koji je validiran kao točna procjena TMB-a određenog WES-om (6). FDA je odobrio pembrolizumab za liječenje pacijenata s neresektabilnim ili metastatskim tumorom neovisno o histološkom tipu, koji pokazuje mikrosatelitnu nestabilnost i/ili deficijenciju MMR, progredirao je nakon prijašnjeg liječenja te je bez alternativne opcije liječenja (66). U odobrenju je TMB-H definiran kao >10 mutacija po megabazi određen uz pomoć testa ciljanog sekvenciranja *FoundationOne CDx (targeted sequencing FoundationOne CDx (F1CDx) assay)* (3,66). F1CDx test u procjeni TMB-a uzima u obzir ukupan broj sinonimnih i nesinonimnih mutacija u 324 ispitivanih gena povezanih s tumorom (3). U nesinonimne odnosno kodirajuće mutacije ubrojene su indel mutacije (indel mutacije– insertion/deletion mutacije), mutacije pomaka okvira čitanja i točkaste mutacije, pri čemu indel mutacije u intronima i sinonimne mutacije nisu obuhvaćene WES-om (3,52,66). Osim F1CDx testa FDA je odobrio još jedan NGS test, MSK IMPACT koji je razvio Memorial Sloan Kettering, a ima sposobnost prepoznavanja somatske kodirajuće nesinonimne mutacije u 468 gena povezanih s tumorima (67). Da bi se izračunao F1CDx TMB sve sinonimne i nesinonimne mutacije gena uključenih u F1CDx panel morale su se sumirati i normalizirati po ukupnom broju sekvenciranih baza (66). Za računanje MSK IMPACT TMB-a ukupni broj somatskih nesinonimnih baza uključenih u MSK IMPACT panel, se morao normalizirati po ukupnom broju sekvenciranih baza (67). Iako neki paneli mogu detektirati sinonimne mutacije, one ne utječu na stvaranje neoantigena te njihova inkluzija može poboljšati aproksimaciju TMB-a u cijelom genomu, smanjenjem „buke uzorkovanja“ (eng. *sampling noise*) ako su sekvencirane i tumorska i normalna pripadajuća (*matching*) DNA (6).

Pri analizi moramo uzeti u obzir nekoliko ključnih varijabli: dubina sekvenciranja (eng. *sequencing depth*), duljina sekvenciranih fragmenata (eng. *sequencing read length*), pokrivenost sekvence (eng. *sequencing coverage*), veličinu panela i gene koji su u njega uključeni, određivanje granične vrijednosti (*cut-off*), bioinformatičke „cjevovode“ (eng. *bioinformatic pipeline*) u koje uključujemo izbor algoritama poravnanja (eng. *aligner*), nukleotidnih varijanti (*variant caller*) i filtera koje ćemo koristiti (52,57,68). Sve navedeno može utjecati na dobivenu vrijednost TMB-a. Osim prije navedenih čimbenika, na iznos TMB-a mogu utjecati i preanalitički faktori koji utječu na količinu i kvalitetu dobivene DNA poput prikupljanja i obrade uzoraka i metode fiksacije. (52,57). Ciljani paneli imaju veću dubinu očitavanja od WES-a što znači da se postiže veća osjetljivost u uzorcima s niskim sadržajem tumorskih stanica (<10%), pogotovo kada je pokrivenost sekvence velika čime se

moгу detektirati i varijante nižih frekvencija što može imati utjecaja na kliničku primjenu (57). Primjer utjecaja preanalitičkih faktora na TMB jesu fiksativi i vrijeme fiksacije koji utječu na stupanj nastanka artefakata induciranih FFPE-om (eng. *formaldehyde fixed-paraffin embedded*) koji uključuju DNA fragmentaciju, denaturaciju i deaminaciju citozinskih baza pri čemu deaminacija ima najveći utjecaj na TMB (52,57).

Danas se najviše koriste MSK-IMPACT panel koji pokriva 468 gena i F1CDx panel koji pokriva 324 gena. Korištenjem panela koji pokrivaju manje regije genoma ili egzoma povećava se nesigurnost i interval pouzdanosti pri procjeni TMB u usporedbi s onima koji pokrivaju veće regije te s toga korištenje panela s manjom pokrivenošću genoma ili egzoma može dovesti do precjenjivanja ili podcjenjivanja TMB-a (69,70). Kao što je i prije navedeno za filtriranje varijanta zametnih linija mogu se koristiti usporedba ispitivanog uzorka s normalnim tkivom ili uzorkom krvi ili korištenjem javno dostupnih setova podataka zametnih linija kako bi se odvojile one lažno pozitivne, te korištenjem *in silico* bioinformatičkih „cjevovoda“ (71). Bioinformatičke „cjevovode“ definiramo kao bioinformatičke algoritme koji se izvode u unaprijed definiranom slijedu za procesiranje podataka dobivenih NGS-om (72). Oni se razlikuju ovisno o panelu koji se koristi i time utječu na procjenu TMB (52). Komercijalni laboratoriji koriste svoje bioinformatičke protokole te je tijekom rada optimiziran korištenjem metoda sekvenciranja, vrsta mutacija i filtara koji najbolje odgovaraju specifikacijama njihovih panela (71). Dobivanje TMB-a uz pomoć sekvenciranja temeljenih na panelima ima svoja ograničenja (6). Vrijednost TMB-a dobivenu pomoću ciljanih NGS panela, koja predstavlja broj mutacija u području cijelog egzoma, treba ekstrapolirati iz broja mutacija dobivenih u određenim regijama egzoma (73). NGS panel koji obuhvaća oko 1.1 Mb kodirajućeg genoma može točno procijeniti TMB u usporedbi s WES-om što znači da CGP koji obuhvaća područje kodirajućeg genoma od nekoliko stotina gena, pokriva dovoljan genomski prostor za točnu procjenu cjelokupnog mutacijskog opterećenja egzoma (6). Za NGS panele manje od 1 Mb, pragovi za odvajanje hipermutiranih od nehipermutiranih tumora padaju ispod 10 mutacija zbog čega će paneli netočno klasificirati tumore s graničnom vrijednošću TMB-a (73).

Na temelju navedenog otvara se pitanje je li moguće imati jedinstvenu granicu TMB-H tumora, za sve vrste tumora kao i za sve vrste ICI terapije? Na temelju prije spomenute KEYNOTE-158 studije, FDA je odobrio korištenje pembrolizumaba za liječenje pacijenata s neresektabilnim ili metastatskim TMB-H tumorom, te je određena granica od  $>10$  mut/Mb F1CDx testom za TMB-H tumore. Međutim KEYNOTE-158 studija se uglavnom temeljila

na istraživanjima NSCLC-a uključujući Checkmate studije (51). U pacijenata s TMB-H tumorom, koji je definiran kao onaj s  $>10$  mut/Mb, preživljenje bez progresije bolesti (PFS) je bilo značajno duže kod pacijenata liječenih nivolumabom i ipilimumabom nego samo kemoterapijom, neovisno o PD-L1 ekspresiji (74). Učinkovitost ICI terapije i kemoterapije je bila jednaka u pacijenata s TMB-L tumorima (74). Stoga granica od  $>10$  mut/Mb ima smisla za NSCLC tumore dok ju je za druge vrste tumora potrebno validirati (51).

Postoji potreba za standardiziranjem određivanja TMB-a kako bi se osigurala reproducibilnost (64,75). Podaci dobiveni u skupinama pacijenata s karcinomom pluća sugeriraju da je usklađivanje ciljanih panela moguće normalnom transformacijom praćenom standardizacijom na z rezultate (76). Usklađivanje TMB-a na različitim platformama omogućilo bi integraciju kliničkih podataka s ciljem boljeg opisivanja povezanosti između TMB-a i odgovora na ICI terapiju (76). Iako postoje brojni dokazi koji podupiru korištenje ICI terapije u određenim skupinama tumora hipermutatora, kao što je MSI-H kolorektalni karcinom, ostaje nejasno koji je, ako uopće postoji, optimalan prag za kvalificiranje tumora kao TMB-H za liječenje ICI terapijom i može li se isti princip generalizirati na sve vrste tumora (51,52,71,77–80). Postojanje granične vrijednosti ključno je za donošenje odluke o primjeni ICI terapije u kliničkom okružju.

U istraživanju Sha i sur. (71) predložili su tri načina određivanja granične vrijednosti TMB-a kao prediktivnog markera odgovora na ICI terapiju: 1) jedinstvena granična vrijednost za sve vrste tumora; 2) granične vrijednosti specifične za vrstu tumora; 3) varijabilna granica koja se odnosi na gornje percentile za pojedinu vrstu tumora (67). Iako je FDA odobrio korištenje pembrolizumaba na temelju jedinstvene granične vrijednosti za sve vrste tumora, s vremenom su uočena ograničenja u tom pristupu. Jedinstvena statička granična vrijednost nije optimalna za određivanje specifičnih vrsta tumora koji će odgovoriti na ICI terapiju (71). Pri graničnoj vrijednosti od 10 mut/Mb osjetljivost za predikciju odgovora na ICI terapiju kod melanoma, karcinoma pluća i mjehura je 75%, dok je specifičnost varirala ovisno o vrsti tumora, te je za melanom bila 44%, a za karcinom pluća i mjehura veća, 89% i 70% (71). Korištenjem te granične vrijednosti propustili bi oko 25% tumora koji bi odgovorili na ICI terapiju (71). Prema tome, smanjenje granične vrijednosti na 5 mut/Mb povećalo bi osjetljivost na račun smanjenja specifičnosti na 29%, 68% i 20% za melanom, karcinom pluća i mjehura (71). Odabirom granične vrijednosti specifične za vrstu tumora povećava se kompleksnost pri određivanju jer su potrebna prospektivna klinička istraživanja za validaciju granične vrijednosti TMB-a za svaku pojedinu vrstu tumora (71).

Zadnji pristup zahtijeva mjerilo za usporedbu prema kojem će se percentili za pojedinu vrstu tumora birati (71). Sva tri pristupa i njihove granične vrijednosti funkcija su korištenih genskih panela i usporedivost je moguća ako se koristi isti panel (71).

#### **4. Varijabilnost TMB-a u različitim vrstama tumora**

TMB može obuhvatiti širok spektar vrijednosti te je varijabilnost TMB-a prisutna između različitih vrsta kao i unutar iste vrste tumora (6,59,81). Najveće vrijednosti TMB-a imaju tumori koji u etiologiji imaju intenzivno i kronično izlaganje egzogenom kancerogenom čimbeniku kao što su karcinom pluća ili melanom, a najmanje vrijednosti TMB-a imaju pedijatrijski tumori i leukemije (59). Neke vrste tumora pokazuju veću varijabilnost kao što su karcinomi mjehura, kolona i uterusa, dok karcinomi pluća, glave i vrata pokazuju manju varijabilnost (82).

Istraživanje u kojem je analizirano 5722 tumora podijeljenih na 21 vrstu koristeći TCGA skup podataka pokazalo je da većina tumora, uključujući NSCLC i melanom, pokazuje unimodalnu distribuciju TMB vrijednosti s nakupljanjem rezultata oko graničnih vrijednosti (83). Bimodalna ili multimodalna distribucija uočena je kod tri vrste tumora, karcinoma kolorektuma, želuca i endometrija, u kojih je bi- ili multimodalna distribucija određena pojavom hipermutacija u MMR deficijntnim tumorima i/ili POLE/POLD1 mutiranim tumorima (83). Hipermutirani tumori, odnosno TMB-H, su definirani kao oni s  $>10$  mut/Mb (84). Granična vrijednost TMB-a je funkcija genskog panela koji se koristi pri njegovu određivanju (71). Zato nailazimo na problem pri uspoređivanju podataka dobivenih iz različitih genskih panela, s obzirom na to da podatke dobivene iz jednog genskog panela ne možemo bez korištenja algoritama pretvorbe izravno primijeniti na drugi panel (71). Postojanje TMB distribucija ovisnih o tipu tumora može biti relevantno za procjenu kliničke koristi i za određivanje optimalnih graničnih (eng. *cut-off*) vrijednosti za pojedine tumore (71). Na varijabilnost vrijednosti TMB-a osim vrste ciljanog panela koji se koristi za njegovu detekciju, utječe i njegova veličina (85). Varijabilnost TMB-a uzrokovana pogreškama u otkrivanju somatskih mutacija je umjerena u usporedbi sa stohastičkom pogreškom povezanom s veličinom panela i drugim faktorima zabune (86). Najveći doprinos odstupanju TMB dobivenog ciljanim panelima ima stohastička pogreška povezana s veličinom panela, pogotovo kod tumora s  $<20$  mut/Mb (85).

## 5. TMB kao prediktor odgovora na ICI terapiju

Podaci iz nekoliko studija pokazali su povezanost između TMB-a i dobrog ishoda nakon ICI terapije i između TMB-H i bolje stope objektivnog odgovora (eng. *objective response rate*, ORR) na terapiju u nekoliko vrsta tumora (8,87,88). U drugoj fazi KEYNOTE-158 studije prikazana je učinkovitost pembrolizumaba u pacijenata koji boluju od tumora s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI-H) nastalom zbog poremećaja popravka DNA, koji može rezultirati s većim TMB-om (89). KEYNOTE-158 studija je otvorena, multikohortna studija čiji je cilj procijeniti djelovanje monoterapije pembrolizumabom u pacijenata oboljelih od 10 vrsta tumora (51,89). Pacijenti su bili podijeljeni u skupine prema vrsti tumora i prema opterećenju tumora mutacijama na TMB-H s  $>10$  mut/Mb i TMB-L s  $<10$  mut/Mb (51,89). Od 805 pacijenata kojima je određena vrijednost TMB-a, njih 105 je imalo TMB-H (51,89). U skupini pacijenata s TMB-H tumorima 88% tumora su činili SCLC (eng. *Small cell lung cancer*) (n=34), karcinomi endometrija (n=15), karcinomi anusa (n=14), karcinomi cerviksa (n=16) i karcinomi vulve (n=15) (51,89). Iz navedenog je vidljivo da neki od tumora kao što su karcinomi dojke, prostate i mikrosatelitski stabilni kolorektalni karcinomi nisu bili uključeni u studiju, pri čemu su navedeni tumori poznati kao visoko rezistentni tumori na ICI terapiju te su ujedno i najčešće novo-dijagnosticiran karcinom u žena, najčešće novo-dijagnosticiran karcinom u muškaraca te treći najčešće novo-dijagnosticiran karcinom u oba spola (51,90). Iako je u većini individualnih kohorti udio pacijenata sa stopom objektivnog odgovora bio veći u TMB-H skupini, klinički odgovor na terapiju pembrolizumabom nije bio dosljedan za sve vrste tumora (89). Skupine tumora s TMB-H u kojih je ORR bio niži su karcinom anusa, bilijarni karcinom i mezoteliom (89). Pacijenti s TMB-H karcinomom anusa su imali ORR od 7%, dok su pacijenti s non-TMB-H karcinomom anusa imali ORR od 11% iz čega možemo vidjeti da u ovoj skupini tumora TMB nije dobar prediktor odgovora na terapiju ICI (51).

Studijom ispitivanja učinka TMB-a na klinički učinak ICI terapije, izmjenjenog pomoću MSK-IMPACT NGS testa, uočena je povezanost višeg TMB-a s boljim ukupnim preživljenjem (engl. *overall survival*, OS) (67). Međutim važno je napomenuti da su se granične vrijednosti razlikovale kod različitih tipova tumora. TMB podskupine su definirane prema percentilima unutar svakog histološkog tipa (TMB-H - 20% najviših unutar svakog), jer se pokazalo da medijan i raspon TMB variraju među različitim tipovima tumora (67). Stratificiranom analizom unutar svakog tipa tumora, odabirom gornjeg kvintila TMB-a za

svaki histološki tip, uočena je povezanost između većeg OS-a i višeg TMB-a u više različitih vrsta tumora nakon ICI terapije (67). Jedina iznimka je bio TMB-H gliom koji je pokazivao manji OS, odnosno lošije preživljenje nakon ICI terapije (67).

Istraživanja su pokazala da postoji povezanost između visokog opterećenja tumora mutacijama i kliničke koristi terapije inhibitorima imunskih nadzornih točaka. TMB-H povezan je s boljim ishodom u pacijenata oboljelih od melanoma liječenih ipilimumabom, anti-CTLA-4 protutijelom (91). Pacijenti oboljeli od karcinoma pluća ne-malih stanica (NSCLC) s TMB-H većim od 200 mut/Mb, liječeni anti-PD-1 protutijelom pembrolizumabom u monoterapiji pokazali su u 73% slučajeva kliničku korist (DCB) i preživljenje bez progresije bolesti (PFS) od 14.5 mjeseci u usporedbi s 3.7 mjeseci u onih s TMB-L (63). U Checkmate studijama uspoređivala se učinkovitost terapije ipilimumabom i nivolumabom u liječenju metastatskog NSCLC-a. TMB-H s više od 10 mut/Mb povezan je s boljim kliničkim ishodom u pacijenata oboljelih od NSCLC liječenih dvojnou terapijom anti-PD-1 protutijelom nivolumabom i anti-CTLA-4 protutijelom ipilimumabom (74,92). Zbog visoke stope odgovora na dvojnou terapiju anti-PD-1/CTLA-4 protutijelima, smatralo se da bi i pacijenti s TMB-L mogli imati koristi od dodavanja CTLA-4 protutijela u terapiju (52). Pokazalo se međutim da je korist od dvojne terapije neovisna o ekspresiji PD-1 u populaciji pacijenata oboljelih od NSCLC i s TMB-om od >10 mut/Mb (93). Ta zapažanja upućuju na to da je TMB, a ne PD-1 ekspresija, povezana s odgovorom na dvojnou terapiju te govori u prilog tome da su TMB-H tumori imunogeni, no da je kontrola infiltracije T-stanica i njihova aktivacija ovisna o CTLA-4 (52). Kontrola infiltracije i aktivacije T-stanica može se odvijati intrinzičnim putem up-regulacije CTLA-4 receptora na efektorskoj T-stanici ili trans-regulacijom putem regulatornih T-stanica s visokom ekspresijom CTLA-4, te upravo manjak infiltracije ili aktivacije T-stanica rezultira izostankom lučenja IFN- $\gamma$  u tumoru što je povezano s niskom ekspresijom PD-1 (52). Inhibicijom CTLA-4 dolazi do ponovne aktivacije efektorskih T-stanica, povećanog lučenja IFN- $\gamma$  i upregulacije PD-1, čime možemo objasniti sinergistički učinak dvojne terapije (52,94). TMB i ekspresija PD-1 pokazali su se kao nezavisni prediktori odgovora na terapiju koji bi se mogli koristiti zajedno (74,95,96).

U istraživanju McGrail i sur. su podijelili pacijente u dvije kategorije ovisno o povezanosti neoantigenskog opterećenja i razine CD8+ limfocita T; kategorija I je definirana kao ona s pozitivnom korelacijom, a kategorija II s negativnom (66). Velik broj tumora uključujući i one česte poput karcinoma dojke ili prostate, ne pokazuju pozitivnu korelaciju (97). U istraživanju su pokazali da je TMB-H prediktor odgovora na ICI terapiju u kategoriji

I tumora kojoj pripadaju melanom, NSCLC, karcinom endometrija, vrata maternice, kolorektalni karcinom, urotelni karcinom (66). TMB se nije pokazao kao prediktor odgovora na terapiju u kategoriji II tumora kojoj pripadaju karcinom anusa, želuca, svijetlostanični karcinom bubrega, trostruko negativan karcinom dojke (eng. *Triple negative breast cancer*, TNBC), karcinom prostate (66). TMB je bio značajno povezan s odgovorom na ICI terapiju u kategoriji I tumora ( $P = 2.4 \times 10^{-11}$ ), ali ne i u kategoriji II ( $P = 0.70$ ) (66). Također TMB-H je povezan s boljom prognozom i OS-om u kategoriji I ( $P = 9.8 \times 10^{-7}$ ), dok su u kategoriji II tumora TMB-H tumori imali manji OS i lošiju prognozu od TMB-L tumora (66).

## 5.1 Melanom

Melanom je jedan od najagresivnijih tumora koji čini svega 5% slučajeva svih kožnih tumora, ali i 80% smrtnih slučajeva od tumora kože (98). Melanom je zbog visoke imunogenosti nastale kao posljedica djelovanja UV zračenja, prikladan za korištenje imunoterapije u liječenju (99). U istraživanju Kanga i sur., u kojem su analizirani profili somatskih mutacija u uzorcima melanoma, pokazali su da su C>T mutacije činile većinu mutacija, što je u skladu s izlaganjem UV zračenju i stvaranju pirimidinskih dimera (100). Tri najčešće mutirana gena bili su TTN (72%), MUC16 (67%), BRAF (51%) (101). TTN (titin) mutacije su povezane s povećanim TMB-om, boljim odgovorom na ICI terapiju i boljom prognozom (102). Bolesnici u skupini s visokim TMB imali su značajno bolje ishode preživljavanja (101).

U meta analizi Ning i sur. (103). analizirali su podatke 1493 pacijenta iz 15 studija te su pokazali značajno poboljšanje OS-a (HR = 0.49, 95% CI: 0.33, 0.73;  $p = 0.001$ ) i PFS-a (HR = 0.47, 95% CI: 0.33, 0.68;  $p < 0.001$ ) u TMB-H melanomima u odnosu na TMB-L melanome liječene ICI monoterapijom. U navedenom su istraživanju postojali dokazi o pristranosti objavljivanja, s prisutnom asimetrijom u dijagramima lijevka (eng. *funnel plot*) (103).

Slične rezultate dobili su Johnson i sur. (104) u istraživanju gdje su ORR, OS i PFS bili veći u skupinama s većim TMB-om ( $>23.1$  mut/Mb) u usporedbom s onima s intermedijarnim (3.3–23.1 mut/MB) ili manjim ( $<3.3$  mut/MB) TMB-om (ORR: 82% vs 36% vs 10%,  $p=0.003$ ). Medijan TMB vrijednosti je značajno viši u skupini koja je odgovorila na terapiju od one koja nije (45.6 nasuprot 3.9 mut/Mb,  $p=0.003$ ) (104). TMB se značajno

razlikovao između podskupova definiranih „*driver* mutacijama“, sa značajnim razlikama između BRAF, NRAS, NF1 i trostruko divljeg tipa melanoma s medijanom vrijednosti TMB-a redom 12.0, 17.6, 62.7 i 2.2 mut/Mb ( $p < 0.001$ ) (104). Melanomi s NF1 mutacijama imaju viši TMB jer su povezani s kroničnim izlaganjem UV zračenju (104). TMB se razlikovao i između različitih podtipova melanoma pri čemu su kožni i okultni melanomi imali viši TMB i bolju stopu odgovora na ICI terapiju od akralnih i mukoznih (105).

## 5.2 Karcinom pluća

Tumori pluća, zbog izravne izloženosti mutagenim čimbenicima uslijed pušenja, imaju najveće vrijednosti TMB-a među solidnim tumorima (59,84,106,107). Medijan TMB-a u karcinomima pluća pušača je značajno viši u odnosu na TMB u karcinomu pluća nepušača (10.5 mut/Mb nasuprot 0.6 mut/Mb) (60). Sposobnost predikcije odgovora na terapiju anti-PD-1 protutijelom pembrolizumabom uz pomoć TMB-a prvi put je prikazana u pacijenata oboljelih od uznapredovalog NSCLC iz dvije neovisne kohorte (63).

U CheckMate026 studiji uspoređivan je nivolumab s kemoterapijom temeljenoj na platini kao prva linija liječenja, u bolesnika oboljelih od uznapredovalog NSCLC-a (108). Pacijenti s TMB-H tumorima imali su veći ORR (47% vs 28%) i PFS (medijan PFS: 9.7 vs 5.8 mjeseci, HR 0.62; 95% CI, 0.38 do 1.00) u skupini liječenoj nivolumabom nasuprot skupine liječene kemoterapijom (108). U prvom prospektivnom istraživanju CheckMate227, ispitivan je PFS kod terapije nivolumabom i ipilimumabom u usporedbi s kemoterapijom u pacijenata s uznapredovalim TMB-H NSCLC (74). TMB-H tumori u usporedbi s TMB-L tumorima (cutoff vrijednost  $>10$  mut/Mb) imali su veći ORR (45.3% vs 26.9%) i bolji medijan PFS (7.2 mjeseci vs 5.5 mjeseci, HR 0.58; 97.5% CI, 0.41 to 0.81;  $P < 0.001$ ) u skupini liječenoj nivolumabom i ipilimumabom u usporedbi sa skupinom liječenom kemoterapijom (74). U CheckMate568 studiji istraživala se efikasnost i sigurnost dvojne ICI terapije nivolumabom i ipilimumabom u pacijenata oboljelih od metastatskog NSCLC koji do tada nisu primali nikakvu terapiju (92). U 98 pacijenata s određenim TMB-om, ORR (44% vs 12%) i PFS (7.1 mjeseci vs 2.6 mjeseci) su bili veći u skupini TMB-H tumora u odnosu na TMB-L skupinu (cut-off vrijednost  $>10$  mut/Mb) (92). U fazi III MYSTIC studije 1118 pacijenata, s prethodno neliječenim metastatskim NSCLC bez genetskih promjena EFGR ili ALK, su randomizirani kako bi primili kemoterapiju na bazi platine, durvalumab s jednim



lijekom (anti-PD-L1 protutijelo) ili kombiniranu terapiju durvalumab s tremelimumabom (anti-CTLA-4 monoklonsko antitijelo) (109). Kod 488 pacijenata s PD-L1 ekspresijom na  $\geq$  25% tumorskih stanica primarni ishod nije postignut jer ni jedna skupina nije pokazala statistički značajno bolji OS u usporedbi s drugim skupinama (109). Kod 460 pacijenata u koji je određen TMB, skupina s TMB-H ( $>10$  mut/Mb) tumorima imala je dulji medijan OS-a iako ne statistički značajan (109). U metaanalizi visoki TMB je pokazao mogućnost predikcije značajno boljeg PFS-a (HR = 0.54, 95%CI: 0.46–0.63,  $P < 0.001$ ) i OS-a (HR = 0.70, 95%CI: 0.57–0.87,  $P = 0.001$ ), te višeg ORR-a (OR = 3.14, 95%CI: 2.28–4.34,  $P < 0.001$ ) u usporedbi s niskim TMB-om (110). U pacijenata s TMB-H NSCLC-om liječenje ICI terapijom je povezano s boljim PFS-om (HR = 0.62, 95%CI: 0.53–0.72), OS-om (HR = 0.67, 95%CI: 0.57–0.79) i ORR-om (OR = 2.35, 95%CI: 1.74–3.18) u usporedbi s kemoterapijom (110).

### 5.3 Gastrointestinalni tumori

Srednja vrijednost TMB-a različitih vrsta gastrointestinalnih tumora kod 4125 pacijenata, sekvenciranih NGS ciljanim panelom za 592 gena, je u rasponu od 5.1 mut/Mb do 13 mut/Mb (111). Adenokarcinom desnog kolona (13.0 mut/Mb) i karcinom tankog crijeva (10.2 mut/Mb) imaju najveću srednju vrijednost TMB-a (13.0 i 10.2 mut/Mb) te imaju najveću prevalenciju TMB-H tumora (14.6% and 10.2%) (111). Najmanju srednju vrijednost TMB-a imaju adenokarcinom gušterače (6.1 mut/Mb), neuroendokrini tumori gušterače (5.8 mut/Mb) i GIST (5.1 mut/Mb) (111). Tumore s najvišim vrijednostima TMB-a nazivamo ultramutiranim, a nastaju zbog mutacije u polimerazi epsilon (POLE) zbog čega dolazi do poremećaja u provjeri DNA (eng. *DNA proofreading*) (112). Mutacije zametne linije i somatske mutacije gena *POLE* pridonose ultramutiranom, ali MSS fenotipu, te su najčešće prisutni u kolorektalnom karcinomu i karcinomu endometrija (112,113).

Osim toga u hipermutirane tumore ubrajamo i MMR deficijentne tumore koji rezultiraju s visokom mikrosatelitnom nestabilnošću (MSI-H), te oni imaju veće vrijednost TMB-a u usporedbi s MMS tumorima, ali manje u usporedbi s *POLE* mutacijom (114–116). Postoje ograničeni podaci o povezanosti TMB-a i odgovora na ICI terapiju kod gastrointestinalnih tumora pri čemu najviše podataka postoji o MSI-H kolorektalnom

karcinomu (71). Povezanost TMB-a s odgovorom na ICI terapiju i MSI statusom opisan je u odlomku “Mikrosatelitna nestabilnost i TMB”.

## 5.4 Karcinom urotela

Urotelni karcinom je čest uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu s oko 150,000 smrtnih slučajeva godišnje (117). Pušenje je najvažniji faktor rizika za nastanak karcinoma mjehura, s populacijski pripisivim rizikom (eng. *population attributable risk*, PAR) od 50% u muškaraca i 52% u žena (118). TCGA analizom 130 invazivnih karcinoma mjehura prikazana je relativno visoka stopa mutacija sa srednjom vrijednošću od 7.7 mut/Mb i medijanom od 5.5 mut/Mb (119), dok je u drugom istraživanju analizom 472 urotelna karcinoma, koristeći ciljani panel koji pokriva 237 gena, određen medijan od 10.9 mut/Mb (120). Urotelni karcinom ima treću najveću stopu mutacija iza tumora pluća (adenokarcinoma i planocelularnog karcinoma) i melanoma (121). TMB je bio povišen u tumora višeg gradusa s ili bez invazije u mišićnu stijenku nasuprot tumora niskog gradusa (120). APOBEC (eng. *apolipoprotein B editing enzyme*) mutacija je bila dominantna mutacija u svim vrstama i lokacijama urotelnog karcinoma, snažno povezana s TMB-om, sa značajno većom učestalošću u karcinomu koji je invadirao mišićnu stijenku (eng. *muscle invasive bladder cancer*, MIBC) i karcinomu visokog gradusa koji nije invadirao mišićnu stijenku (eng. *non muscle invasive bladder cancers*, NMIBC) (120).

U CheckMate 275 studiji monoterapija nivolumabom je bila povezana s klinički značajnim i održivim ORR-om od 19.6% u pacijenata s metastatskim ili lokalno uznapredovalim urotelnim karcinomom s progresijom bolesti nakon primjene kemoterapije platinom (122). Kod 139 od 270 pacijenata se mogao odrediti TMB (123). Viši TMB povezan je s boljim ORR-om, duljim PFS-om i duljim OS-om u pacijenata liječenim nivolumabom (123). U drugoj fazi studije u kojoj je ispitan je učinak atezolizumaba u 316 pacijenata oboljelih od metastatskog urotelnog karcinoma nakon neuspješnog liječenja kemoterapijom platinom, medijan TMB-a, određen u 150 pacijenata uz pomoć panela koji pokriva 315 gena, je bio značajno veći u skupini koja je odgovorila na terapiju u odnosu na skupinu koja nije (12.4 mut/Mb vs. 6.4 mut/Mb,  $p < 0.0001$ ) (124).

## 5.5 Karcinom glave i vrata

Incidencija planocelularnog karcinoma glave i vrata je 6. najviša u svijetu s 890,000 novooboljelih godišnje i 50%-tnom smrtnošću (125). Etiološki čimbenici povezani s razvojem karcinoma glave i vrata su pušenje, konzumacija alkohola i virusna infekcija (HPV, EBV) (126–128). U istraživanju provedenom na 132 pacijenata oboljelih od rekurentnog i metastatskog tumora glave i vrata medijan OS-a u pacijenata s visokim TMB-om, određen kao >10 mut/Mb, liječenih imunoterapijom je bio značajno dulji u odnosu onih s niskim TMB-om (25 vs 10 mjeseci) (129).

U drugom istraživanju od 126 pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata, koji su bili liječeni anti-PD-1/PD-L1 imunoterapijom, u njih 81 (64%) je određen TMB koji je bio u rasponu od 1.5 do 76 mut/Mb (medijan 7.6 mut/Mb) te 13% tumora s TMB-om >20 mut/Mb (130). TMB je bio značajno viši u skupini koja je odgovorila na terapiju u odnosu na onu koja nije (medijan 17.7 nasuprot 7.1,  $P < 0.01$ ) (130). Također, TMB je bio značajno viši kod pacijenata s tumorima kojima u podlozi nije virusni etiološki čimbenik (8.2 vs. 4.7,  $P < 0.01$ ) (130). TMB se pokazao kao dobar prediktor odgovora na anti-PD-1/PD-L1 te se može koristiti kod HPV i EBV negativnih tumora, ali ne i kod HPV i EBV pozitivnih tumora (130). U pacijenata oboljelih od rekurentnog i metastatskog tumora glave i vrata, liječenih durvalumabom (D) bez ili s tremelimumabom (D+T) medijan OS-a nije bio značajno različit u usporedbi s pacijentima liječenih kemoterapijom (SOC, eng. *Standard of care*) (OS D - 37.0%, D+T- 30.4%, SOC - 30.5%) (131).

## 5.6 Karcinom dojke

Karcinomi dojke imaju manji TMB u usporedbi s drugim prije navedenim tumorima kod kojih je imunoterapija u širokoj upotrebi. Unatoč tome TMB varira kod različitih tipova karcinoma dojke ovisno o njihovim histopatološkim i kliničkim značajkama (132). U studiji u kojoj su podaci o TMB-u dobiveni WES-om ili ciljanim genskim panelima od 3969 pacijenata oboljelih od karcinoma dojke, medijan TMB-a iznosio je 2.63 mut/Mb (133). Medijan TMB-a je značajno varirao ovisno o podtipu tumora (HR-/HER2- > HER2+ > HR+/HER2-,  $P < 0.05$ ) i vrsti uzorka (metastatski > primarni,  $P = 2.2 \times 10^{-16}$ ) (133). 5% pacijenata imalo je hipermutirane tumore (TMB >10 mut/Mb) (133). Trostruko negativni

karcinom dojke (TNBC) imao je značajno veći medijan TMB-a (1.8 mut/Mb) u usporedbi s hormon receptor-pozitivnim (HR-pozitivan) (1.1 mut/Mb,  $P = 2.8 \times 10^{-8}$ ) ili HER2-pozitivnim karcinomoma (1.3 mut/Mb,  $P = 0.003$ ) (133). 59.2% hipermutiranih karcinoma dojke pokazivalo je dominantni APOBEC mutacijski potpis, dok je u 36.4% hipermutiranih karcinoma dominantni mutacijski potpis bila MMR deficijencija (133). U KEYNOTE-119 studiji uspoređivan je učinak monoterapije pembrolizumabom i kemoterapije u 622 pacijenata s liječenim, metastatskim TNBC-om (134). Od 253 pacijenata u kojih je određen TMB njih 26 (10.3%) je imalo TMB-H ( $\geq 10$  mut/Mb) (134). Postojala je pozitivna povezanost između TMB-a i kliničkog odgovora na pembrolizumab (ORR  $p = 0.154$ , PFS  $p = 0.014$ , OS  $p = 0.018$ ), ali ne i na kemoterapiju (ORR  $p = 0.114$ , PFS  $p = 0.478$ , OS  $p = 0.906$ ) (134).

U studiji faze II TAPUR evaluirala se monoterapija pembrolizumabom u 28 pacijenata s prethodno liječenim metastatskim karcinomom dojke (135). Kod TMB-H tumora ORR je 21% (95% CI 8–41%) i stopa PFS-a 10.6 tjedana (95% CI 7.7–21.1 tjedana) (135). U retrospektivnoj analizi 62 pacijenta s metastatskim TNBC-om su uključena u studiju te su primili anti-PD-1/PD-L1 monoterapiju (23%), anti-PD-1/PD-L1 terapiju u kombinaciji s ciljanom terapijom (19%) ili kemoterapiju (58%) (136). 60% pacijenata je primilo jednu ili više prethodnih terapija za metastatsku bolest (136). TMB-H tumori imali su značajno viši PFS (12.5 vs 3.7 mjeseca,  $p = 0.03$ ), dulji OS (29.2 vs 14.2 mjeseci,  $p = 0.06$ ) i četverostruko više šanse za odgovor na terapiju od pacijenata koji nemaju TMB-H (odds ratio = 4.32, 95% CI 1.05–19.89) u multivarijantnim analizama (136).

Međutim, u ARTEMIS studiji pacijenti s TNBC koji nisu postigli značajno smanjenje volumena tumora nakon prve faze neoadjuvantne terapije adriamicinom/ciklofosfamidom, primili su jednu od ciljanih imunoterapija u kombinaciji s nab-paklitakselom (137). U pacijenata s TMB-H tumorima koji su primili neoadjuvantno kombinaciju anti-PD-L1 i nab-paklitaksela, ekvivalentna stopa odgovora (potpuni patološki odgovor ili minimalna rezidualna bolest u vrijeme kirurške resekcije) uočena je u pacijenata koji su primali ICB u usporedbi s drugim terapijama (137). U pacijenata s MSS metastatskim TNBC nije došlo do objektivnog odgovora kod nijednog od 10 TMB-H tumora, u usporedbi sa stopom odgovora od 20,5% kod TMB-L tumora (66).

Kao što je i prije navedeno tumori u kategoriji II po McGrail-u u koji pripada i karcinom dojke nisu pokazivali povezanost TMB-H s odgovorom na ICI terapiju (66).

Dostupni su ograničeni i oprečni podaci o TMB-u kao prediktivnom markeru odgovora karcinoma dojke na ICI terapiju te su potrebna daljnja istraživanja koja će razjasniti njegovu ulogu i korist u kliničkom okruženju.

## 5.7 Karcinom prostate

FDA je odobrio nekoliko vrsta imunoterapije za liječenje metastatskog karcinoma prostate rezistentnog na kastraciju (eng. *castration-resistant prostate cancer*, CRPC) (138). Unatoč tome učinkovita uporaba imunoterapijskih sredstava, između ostalih i ICI, za ovu bolest još uvijek nedostaje (138). Karcinom prostate se dugo vremena smatrao „imunološkom pustinjom“, zbog slabe infiltracije tumora imunološkim stanicama i metabolički neprijateljskog tumorskog mikrookoliša koji suprimira infiltraciju i funkciju T-stanica (138). Iako karcinom prostate ima nizak TMB, odnosno nisku ekspresiju neoantigena na površini stanica, nakuplja velik broj oštećenja DNA i defekte mehanizama popravka DNA te stoga postoji potencijalan odgovor na imunoterapiju (139–142).

Vrste imunoterapija koje se koriste u liječenju karcinoma prostate su tumorska cjepiva Sipuleucel-T, GVAX i PROSTVAC, ICI terapija, adoptivna stanična terapija i onkolitička virusna terapija (138). Od ICI terapije pembrolizumab se pokazao učinkovit za nisku stopu hipermutiranih podtipova raka prostate (143). Učinak pembrolizumaba je proučavan kod 258 pacijenata podijeljenih u skupine 1, 2 i 3 ovisno o tome jesu li imali PD-L1 pozitivnu, PD-L1 negativnu ili koštano predominantnu bolest (144). ORR je bio 5% (95% CI, 2% to 11%) u skupini 1 i 3% (95% CI, < 1% to 11%) u skupini 2, a medijan OS je bio 9.5 mjeseci u skupini 1, 7.9 mjeseci u skupini 2, i 14.1 mjeseci u skupini 3 (144).

U drugom istraživanju u pacijenata s karcinomom prostate liječenih anti-CTLA4 terapijom postotak pacijenata koji su postigli kliničku korist bio je nešto veći u TMB-L tumorima (36,8%) u odnosu na TMB-H skupinu tumora (25,0%), iako nisu uočeni objektivni odgovori u cijeloj skupini (66). Na temelju navedenog vidljivo je da su potrebna daljnja dublja i sveobuhvatnija istraživanja kako bi se odredila učinkovitost i korist ICI terapije u liječenju tumora prostate.

## 6. Odgovor na ICI terapiju u TMB-L tumorima

Iako je učinkovitost ICI terapije veća u TMB-H tumorima, i dio pacijenata s TMB-L tumorima odgovara na liječenje. Istraživanja su pokazala da je ICI terapija kod TMB-L tumora efektivna u 4.3% slučajeva (8). TMB-L tumori koji u većoj mjeri odgovaraju na ICI terapiju su tumori virusne etiologije. Za karcinom Merkelovih stanica ORR je 56%, a PFS u 6 mjeseci 67% (145). Karcinom Merkelovih stanica može biti povezan s infekcijom poliomavirusom Merkelovih stanica kod kojeg su vrijednosti TMB-a niske, ili povezan s UV potpisom (eng. *UV signature*) kod kojeg su vrijednosti TMB-a visoke (146–148). Odgovori na ICI terapiju su bili prisutni i u TMB-H i TMB-L skupini odnosno virus pozitivnoj i virus negativnoj skupini (145). Razlog visokog odgovora na ICI terapiju u TMB-L karcinomu Merkelovih stanica je prisutnost virusnih antigena koji su imunogeni i mogu aktivirati imunski odgovor (145). Isto tako kod Kaposijevog sarkoma u 67% pacijenata postignuta je kompletna ili parcijalna remisija anti-PD-1 monoterapijom, pri čemu je Kaposijev sarkom TMB-L i PD-1 negativan (149). Osim navedenih TMB-H gliom je pokazivao manji OS, odnosno lošije preživljenje nakon ICI terapije u odnosu na TMB-L (67).

## 7. Optimizacija TMB-a kao prediktivnog markera

Trenutno se istražuje nekoliko strategija optimizacije TMB-a kao prediktora odgovora na ICI terapiju. Kao pokušaj smanjenja mogućnosti pogreške klasifikacije tumora u dosadašnjoj binarnoj klasifikaciji (visoki i niski TMB) uvedena je i klasifikacija u tri stupnja (visoki, srednji i niski TMB) koja je pokazala bolju učinkovitost u usporedbi s binarnom (66,104). S obzirom na korištenje različitih vrsta genskih panela pri određivanju TMB-a javila se potreba za standardizacijom dobivenih podataka kako bi se omogućila njihova usporedivost. Već spomenuta transformacija neusklađenih TMB vrijednosti, koja pretvara desno zakrivljene TMB distribucije u normalne distribucije, praćena standardizacijom na z rezultate, predložena je za standardizaciju i usporedbu TMB vrijednosti dobivenih na panelima s različitih platformi za sekvenciranje (76). Osim toga strategije za optimizaciju TMB-a kao prediktivnog markera uključuju i probir za biomarkere ili mutacije koje su meta postojećih ili terapija u razvoju, rafiniranje predikcije odgovora na imunoterapiju (kao što su

negativni prediktori odgovora i varijante koje predisponiraju toksičnim učincima), usklađivanje TMB vrijednosti dobivene uz pomoć panela s referentnom TMB vrijednosti temeljenom na WES-u kako bi se osigurala dosljednosti svim panelima, standardiziranje bioinformatičkih algoritama (71). Točnije predviđanje odgovora postići će se samo testovima koji odražavaju složenu prirodu interakcije između komponenti tumorskog mikrokoliša, stanica raka i tumorske genetike (83). Genski testovi koji se trenutno koriste u klinikama u najboljem su slučaju neizravan odraz prostorne organizacije i gustoće imunološkog infiltrata u TME, koje je ključno za razlikovanje tumora koji će vjerojatno reagirati na imunoterapiju od onih koji neće (83).

## 8. Mutacijski potpisi

Mutacijski potpisi (eng. *mutational signatures*) su specifični genetski obrasci koji nastaju kao posljedica mutacijskih procesa nastalih uslijed izlaganja egzogenim i endogenim čimbenicima, nepouzdanosti DNA replikacijske mašinerije, enzimatske modifikacije DNA i poremećaja popravka DNA (59). Mutacijski potpisi su definirani obrascima od tri uzastopna nukleotida, uzimajući u obzir jednu bazu 3' i jednu 5' od nukleotidne supstitucije odnosno mutirane baze (59). S obzirom da postoji 6 tipova supstitucija baza C>A, C>G, C>T, T>A, T>C, T>G postoji ukupno 96 mogućih mutacija u ovoj klasifikaciji (59). Primjenom ovog pristupa na 30 vrsta tumora prva velika studija somatskih mutacija otkrila je 21 različitih mutacijskih potpisa (59). Mutacijski potpisi su zabilježeni i objavljeni u bazi podataka COSMIC (eng. *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) (150). Do danas je otkriveno ukupno 49 supstitucijskih mutacijskih potpisa (150). Specifični mutacijski potpisi povezani su sa specifičnim mutagenim biološkim procesima u koje ubrajamo egzogene mutagene (pušenje, UV zračenje), poremećaje popravka DNA, deaminaciju povezanu sa starenjem, ekspresiju APOBEC enzima (83). Jedan od tih mutagenih procesa je i deficijencija popravka krivo sparenih baza (eng. *mismatch repair*, MMR) koja rezultira mikrosatelitnom nestabilnošću.

## 9. Mikrosatelitna nestabilnost i TMB

DNA MMR je visoko konzerviran biološki put nužan za prepoznavanje i popravak nekomplementarnih baza te insercija i delecija koje nastaju u procesu DNA replikacije i rekombinacije ili prilikom oštećenja DNA s ciljem održavanja genomskog integriteta (151). Deficijencija MMR puta uzrokuje pojavu nestabilnosti u mikrosatelitnim regijama najčešće u obliku dinukleotidnih ponavljanja baza, kao posljedica mutacija gena za MMR proteine (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) (152). Tumori s deficijentnim MMR (dMMR) nakupljaju više promjena u molekuli DNA što uzrokuje stvaranje mikrosatelitske nestabilnosti i time MSI-H fenotipa (153). S obzirom na frekvenciju ponavljanja mikrosatelita, mikrosatelitne nestabilnosti možemo podijeliti na visoke (MSI-H) i niske (MSI-L) te mikrosatelitnu stabilnost (154). Prvotno se deficijencija MMR-a dokazivala kombinacijom PCR-a i sekvenciranja specifične mikrosatelitne regije radi detekcije mikrosatelitne nestabilnosti te imunohistokemijom (eng. *immunohistochemistry*, IHC) radi procjene promijenjene razine ekspresije MMR proteina u tumoru (153). NGS, s ciljanim sekvenciranjem ili sekvenciranjem cijelog genoma, se pojavila kao nova metoda identifikacije pacijenata s MMR deficijencijom (155–157). NGS omogućuje istovremeno istraživanje velikog broja mikrosatelita, sveobuhvatniji je i nije specifičan za tip raka te potencijalno je bolja strategija za utvrđivanje MSI statusa kod svih vrsta raka (158). Uz to, prevladava probleme osjetljivosti i specifičnosti povezanih uz konvencionalne metode identifikacije MSI nestabilnosti poput PCR-a i IHC-a (158).

MSI-H tumori su u 83% slučajeva TMB-H s  $>20$  mut/Mb, a 97% ih je imalo  $>10$  mut/Mb (6). Obrnuto, međutim, ne vrijedi jer samo 16% TMB-H tumora je bilo klasificirano i kao MSI-H što nas upućuje na to da postoje i drugi čimbenici koji utječu na TMB (6). Studije su također pokazale veliku varijabilnost u vrijednosti TMB-a u MSI-H tumorima (152). Učestalost MSI u različitim vrstama tumora je varijabilna (159). Primjeri tumora s MSI-H frekvencijom  $>10\%$  su kolorektalni karcinom, karcinom želuca i karcinom endometrija, oni s MSI-H frekvencijom 2-10% karcinom jajnika, cerviksa i štitnjače te oni s MSI-H frekvencijom  $<2\%$  karcinom prostate, NSCLC i sporadični glioblastom (158). FDA je 2017. godine odobrila pembrolizumab za liječenje metastatskih neresektabilnih MSI-H ili MMR deficijentnih tumora, koji rezultiraju stvaranjem hipermutatornog fenotipa, u odraslih i pedijatrijskih pacijenata (66). To je ujedno bilo i prvo odobrenje terapije raka za indikaciju



koja se temelji na biomarkeru, a ne na primarnoj lokaciji (160). Odobrenje se temeljilo na podacima dobivenim iz 5 kliničkih ispitivanja (160). ORR na terapiju pembrolizumabom je bio 39,6% kod 149 pacijenata s MSI-H ili MMR deficijntnim tumorima u 15 različitih vrsta tumora (160). Od onih koji su odgovorili na terapiju 48 pacijenata je imalo djelomičan, a 11 potpun odgovor (159). Međutim, ICI terapija se pokazala učinkovitom i u pacijenata oboljelih od MSS tumora s TMB-H (161). Medijan PFS-a za pacijente s MSS/TMB-*High* tumorima je bio 26.8 mjeseci dok je za MSS/TMB-*Low* ili TMB-*Intermediate* bio 4.3 mjeseca (161). Također učestalost MSS/TMB-H tumora je veća od MSI-H tumora (7,972/148,803 (6.6%) nasuprot 2,179/148,803 (1.5%) pacijenata) (161).

MSI-H status pokazuje povezanost s odgovorom na ICI terapiju. Dio tumora s MSI-H su usko povezani s povećanom ekspresijom PD-1/PD-L1-a i pokazuju trajne odgovore na anti-PD-1 terapiju (159). To je dovelo do pretpostavke da MSI-H fenotip označava određene podskupine tumora u različitim tipovima raka, te izdvaja MSI-H kao biomarker prediktivan za odgovor na ICI neovisan o histologiji tumora, a ovisan o genetskom statusu tumora (162,163). Od 124 pacijenta s MSI-H/dMMR kolorektalnim karcinomom koji su liječeni pembrolizumabom u sklopu KEYNOTE-164 studije, sveukupno ORR je bio 33%, a medijan PFS 2.3 mjeseca ( $\geq 2$  prethodne linije liječenja) ili 4.1 mjesec ( $\geq 1$  prethodne linije liječenja) (164). U studiji druge faze CheckMate-124 nivolumab je imao ORR od 31%, stopu kontrole bolesti (eng. *disease control rate*, DCR) od 69% i 12-mjesečni OS od 73% u prethodno liječenih pacijenata s dMMR/MSI-H metastatskim kolorektalnim karcinomom (165). Kombinirana terapija nivolumabom i ipilimumabom pokazala je ORR od 55%, stopu PFS od 71% (nakon 12 mjeseci), 12-mjesečnu stopu OS-a od 85% (165). U studiji u kojoj su 22 pacijenta oboljela od MSI-H kolorektalnog karcinoma, liječeni PD-1/L1 inhibitorima, medijan TMB-a je bio značajno veći u skupini koja je odgovorila na terapiju u odnosu na onu koja nije (54 mut/Mb vs 29 mut/Mb,  $p < 0.001$ ) (116). Kod svih 13 pacijenata s TMB-H tumorom, definirani kao oni s  $\geq 37-41$  mut/Mb, uočen je objektivni odgovor na terapiju, dok je samo 3 od 9 pacijenata (33%) s TMB-L tumorima imalo kontrolu bolesti (116). Navedeni podaci ukazuju da je visok TMB u MSI-H/dMMR tumorima povezan s boljim i trajnim odgovorima na ICI terapiju (78,166,167) te da je TMB važan neovisni biomarker za identifikaciju pacijenata oboljelih od MSI-H kolorektalnih karcinoma koji će odgovoriti na ICI terapiju (116).

## 10. TMB i PD-L1

PD-L1 i TMB su se pokazali kao važni biomarkeri odgovora na ICI terapiju. Iako se oba markera rutinski koriste u kliničkoj praksi pitanje njihove povezanosti u različitim vrstama tumora ostaje nerazjašnjeno (168). Bilo bi racionalno pretpostaviti da visoki TMB inducira nakupljanje neoantigen specifičnih tumor infiltrirajućih limfocita, što dovodi do pojačanog lučenja IFN- $\gamma$  i up-regulacije PD-L1 na površini tumorskih stanica (169,170). Međutim istraživanje molekularnih karakteristika tumora povezanih s odgovorima na ICI terapiju u bolesnika oboljelih od NSCLC Hellmana i sur. (93) tu pretpostavku nije potvrdilo (93). To sugerira da bi PD-L1 i TMB mogli biti neovisni prediktivni biomarkeri pri čemu svaki može doprinijeti identifikaciji pacijenata za ICI terapiju (168). U svim vrstama tumora postojala je neznatna pozitivna korelacija između TMB-a i ekspresije PD-L1 (168). Međutim korelacija nije bila konzistentna među različitim tipovima tumora, pri čemu je najveća bila u karcinomu želuca i endometrija (168). Zbog relativne neovisnosti ekspresije PD-L1 i TMB-a kod većine tipova tumora, TMB i PD-1 zasebno mogu informirati o korištenju ICI terapije u tumorima sa specifičnim tumorskim mikrookruženjem te definirati imunološki status tumorskog mikrookoliša kao hipermutiran, upalni ili neupalni (168).

U istraživanju Sha i sur. (71) među 24 vrste tumora uključenih u TCGA bazu podataka značajna korelacija između TMB-a i PD-1 uočena je u 5 od 24 tumora, u adenokarcinomu kolorektuma, želuca, uterusa, karcinomu prijelaznih stanica i karcinomu dojke. U retrospektivnoj analiza 26 različitih tipova tumora u 11348 pacijenata Vanderwaldea i sur. od 7.7% TMB-H tumora 44% je bilo i PD-1 pozitivno (171). Postoji značajan broj dokaza koji upućuju na to da komplementarna upotreba TMB-a i PD-L1 može bolje predvidjeti odgovor na ICI terapiju nego bilo koji od njih pojedinačno (92,172).

## 11. Tumorski imunogram

Uz TMB postoji i drugi čimbenici koji nam mogu ukazati na imunološki status tumora i odgovor tumora na ICI terapiju. Kako bi se obuhvatilo što više čimbenika i samim time razvio okvir s ciljem dobivanja podataka koji će nam pomoći pri odabiru liječenja razvijen je tumorski imunogram. Tumorski imunogram je novi način prikaza imunoloških

karakteristika tumora, a sastoji se od teoretskog okvira za opisivanje interakcija između tumora i imunskog sustava pojedinaca. (173,174). Sedam skupina parametara čini osnovu za stvaranje imunograma s ciljem obuhvaćanja najvažnijih čimbenika koji utječu na imunološki odgovor (173,174). U njih ubrajamo: 1) antigenska stranost tumora (eng. *tumor foreignness*), 2) opći imunski status, 3) infiltraciju imunskim stanicama, 4) nedostatak imunskih kontrolnih točaka, 5) nedostatak topivih inhibitora, 6) nedostatak inhibitorynog tumorskog metabolizma, 7) osjetljivost tumora na efekte imunskog sustava (174).

Antigenska stranost tumora u najvećoj je mjeri određena ekspresijom neoantigena koji potiču imunski odgovor prezentiranjem u sklopu MHC kompleksa (174). Uočena je korelacija između TMB-a kao mjere količine mutacija u tumorima i odgovora na ICI terapiju u određenim vrstama tumora kao što su NSCLC i melanom (63,175). Također postoji povezanost između niske intratumorske genetičke heterogenosti i odgovora na ICI terapiju (176).

Opći status imunskog sustava odnosi se na analizu stanica imunskog sustava pri čemu su smanjeni broj limfocita i povećanje omjera neutrofila i leukocita povezani s lošijim ishodom terapije melanoma CTLA-4 inhibitorom ipilimumabom (177,178).

Infiltracija tumora upalnim stanicama, a pogotovo reaktivnim T-stanicama specifičnim za tumor, važan je preduvjet za antitumorsku aktivnost. Tumorski mikrokoliš infiltriran CD8<sup>+</sup> limfocitima T ima ključnu ulogu u antitumorskoj imunosti te je povezan s duljim preživljenjem u različitim vrstama tumora (179). T-stanice koje infiltriraju tumor karakteriziraju tri različita fenotipa: imunološki upalni fenotip (eng. *immune-inflamed phenotype*), imunološki isključen fenotip (eng. *immune-excluded phenotype*) i fenotip imunološke pustinje (eng. *immune-desert phenotype*) (180). Svaki od navedenih fenotipova je povezan sa specifičnim mehanizmima koji sprječavaju odgovor imunskog sustava domaćina na tumor (180). Imunološki upalni fenotip karakteriziran je prisustvom CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita, ali i drugih stanica imunskog sustava, monocita i mijeloidnih stanica, u neposrednoj blizini tumora (170,181–188). U uzorcima dobivenim iz tumora s upalnim imunološkim fenotipom izražena je ekspresija PD-L1 proteina na imunskim stanicama i na tumorskim stanicama kao i brojni proinflammatorni citokini (181,185,186,188–190). Na temelju navedenog možemo zaključiti da je postojao antitumorski imunski odgovor koji je immunosupresivnim djelovanjem tumora i njegovog mikrokoliša zaustavljen. U prilog tome nam govori i bolji klinički odgovor na anti-PD-1/PD-L1 terapiju u bolesnika s tumorom

upalnog fenotipa (181,184,186,191). Imunološki isključen fenotip karakteriziran je prisustvom velikog broja upalnih stanica koje ne ulaze u parenhim tumora nego ostaju zarobljene u stromi i okružuju tumorske stanice (181,192–194). Zato je odgovor na anti-PD-1/PD-L1 terapiju slabiji, jer unatoč aktivaciji T-stanica, ne dolazi do infiltracije tumorskog tkiva (180). Fenotip imunološke pustinje karakteriziran je oskudnom infiltracijom upalnim stanicama i parenhima tumora i njegove strome (181,183,194,195). Ovaj fenotip rijetko odgovori na anti-PD-1/PD-L1 terapiju (181,183,194,195).

Nedostatak imunskih kontrolnih točaka važan je čimbenik koji utječe na odgovor na ICI terapiju. Ekspresija imunskih kontrolnih točaka i njihovih liganada na imunskim i tumorskim stanicama moguć je biomarker potencijalnih terapijskih meta (174). PD-L1 ekspresija u melanomu povezana je s boljim ishodom pri dvojnomo liječenju PD-1 i CTLA-4 inhibitorima (196–199). Osim PD-1 i CTLA-4 postoje i druge imunskie nadzorne točke koje su proučavane u kliničkim istraživanjima, a mogle bi biti potencijalne mete lijekova. Neke od njih su TIM-3, Lag-3, ITIM i drugi. Te imunskie kontrolne točke mogu biti eksprimirane od početka ili mogu biti inducirane inhibicijom PD-1/PD-L1, što nam ukazuje da te molekule nastaju kao mehanizam rezistencije na prethodnu terapiju (200,201). Melanom refraktoran na anti-PD-1 terapiju pokazao je stopu odgovora od 16% na dvojnomo terapiju anti-PD-1/Lag-3, te veću stopu odgovora kod pacijenata s Lag-3 pozitivnim intratumorskim imunskim stanicama (202,203). U bolesnika koji su prvotno imali odgovor na anti-PD-1 monoterapiju, povećanje ekspresije Lag-3 je moguć mehanizam nastanka stečene rezistencije (204,205).

Tumorski mikrookoliš može sadržavati različite topive čimbenike koji mogu potaknuti ili inhibirati rast tumorskih stanica. Upala povezana s tumorom karakterizirana je prisustvom različitih podvrsta neutrofila, T-stanica i makrofaga koji luče proupalne čimbenike kao što su VEGF-A, CSF (*colony stimulating factors*), interleukine IL-1, IL-6, IL-17, i CXCL1 (eng. *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) (174). Učinci upale povezane s tumorom na promicanje tumora mogu biti posredovani supresijom reaktivnosti T stanica što je povezano s lošijim ishodom nakon terapije anti-CTLA-4 (174,206).

Tumorski metabolizam je, kao i morfologija i funkcija tumorskih stanica, promijenjen. Glavna karakteristika tumorskog tkiva i njegovog mikrookoliša je konstantno stanje acidoze koja nastaje kao rezultat povećane proizvodnje laktata. Unatoč normalnom prisustvu kisika i funkcionalnim mitohondrijima, tumorsko tkivo povećava brzinu unosa glukoze i preferira glikolizu i proizvodnju laktata iz piruvata, fenomen poznat kao

Warburgov efekt (207). Visoke koncentracije LDH u krvi povezane su s lošim odgovorom na terapiju CTLA-4 i PD-1 inhibitorima, pri čemu se LDH tradicionalno smatra pokazateljem visokog opterećenja tumora mutacijama (208,209).

Za prepoznavanje tumorskih stanica od strane imunskog sustava potrebna je očuvana funkcija antigen prezentirajućih stanica. U slučaju inaktivacije bilo kojeg dijela mehanizma koji sudjeluje u prezentaciji stranih antigena T-stanicama, dolazi do smanjene mogućnosti prepoznavanja tumora od strane imunskog sustava te zaobilazjenja imunskog nadzora.

## **12. Zaključak**

Velik broj istraživanja ukazuje da TMB može poslužiti kao prediktivni biomarker odgovora na ICI terapiju kod više različitih vrsta tumora. Korištenje TMB-a postalo je dio svakodnevne kliničke prakse u onkologiji, a temelji se na odobrenju pembrolizumaba od strane FDA, za liječenje TMB-H tumora, definiranih kao oni s  $>10$  mut/Mb. Iako se u određenim skupinama tumora ta granica pokazala korisnom u predikciji odgovora na ICI terapiju, ostaju otvorena pitanja opravdanosti ekstrapolacije te vrijednosti na sve vrste tumora ili nužnosti određivanja optimalne granične vrijednosti za svaku pojedinu vrstu tumorskog sijela kao i njihove podtipove. Također, postoji potreba za provođenjem prospektivnih studija za daljnju evaluaciju i validaciju prediktivne vrijednosti TMB-a u kliničkoj praksi. Nadalje, postoji hitna potreba uskladiti i standardizirati mjerenje TMB-a i platformi za testiranje s ciljem osiguravanja reproducibilnosti i mogućnosti integracije kliničkih podataka kako bi se mogla bolje opisati povezanost između TMB-a i odgovora na ICI terapiju. Veći skupovi podataka vezani uz TMB i klinički ishod pacijenata liječenih ICI terapijom omogućit će lakšu optimizaciju graničnih vrijednosti TMB-a za pojedine vrste tumora i time potencijalno proširiti korištenje imunološke terapije na veće populacije pacijenata. Iako se TMB pokazao kao koristan neovisan biomarker za predikciju odgovora na ICI terapiju, komplementarna uporaba TMB, PD-L1 i MSI-H ima potencijal predvidjeti odgovor na ICI terapiju bolje od svakog pojedinačno.

## **Zahvale**

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Dedić Plavetić na pomoći i korisnim savjetima pri izradi ovog diplomskog rada te na izdvojenom vremenu i strpljenju.

Zahvaljujem svojoj obitelji, majci Jelici, ocu Zdravku, sestrama Petri i Luciji i prijateljima na pruženoj podršci, razumijevanju, ljubavi i strpljenju tijekom cijelog studija.

## Popis literature

1. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. 2017;3(10):250.
2. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*. 1991;(262):3–11.
3. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*. 2021;39(2):154–73.
4. Chabanon RM, Pedrero M, Lefebvre C, Marabelle A, Soria JC, Postel-Vinay S. Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(17):4309–21.
5. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and Genetic Properties of Tumors Associated with Local Immune Cytolytic Activity. *Cell*. 2015;160(1–2):48–61.
6. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R i sur. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine*. 2017;9(1):34.
7. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annual Review of Immunology*. 2019;37(1):173–200.
8. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V i sur. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2017;16(11):2598–608.
9. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ i sur. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. 2012;482(7385):400–4.
10. Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, Weber JK, Samstein RM, Makarov V i sur. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science (1979)*. 2018;359(6375):582–7.
11. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC Immunology*. 2008;9(1):1.
12. Marty R, Kaabinejadian S, Rossell D, Slifker MJ, van de Haar J, Engin HB i sur. MHC-I Genotype Restricts the Oncogenic Mutational Landscape. *Cell*. 2017;171(6):1272–1283.e15.
13. Mage MG, Dolan MA, Wang R, Boyd LF, Revilla MJ, Robinson H i sur. The Peptide-Receptive Transition State of MHC Class I Molecules: Insight from Structure and Molecular Dynamics. *The Journal of Immunology*. 2012;189(3):1391–9.

14. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ i sur. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107–11.
15. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ i sur. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903–7.
16. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ i sur. Demonstration of an interferon  $\gamma$ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(13):7556–61.
17. DuPage M, Mazumdar C, Schmidt LM, Cheung AF, Jacks T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature*. 2012;482(7385):405–9.
18. Rodig SJ, Gusenleitner D, Jackson DG, Gjini E, Giobbie-Hurder A, Jin C i sur. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Science Translational Medicine*. 2018;10(450).
19. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S i sur. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(9):819–29.
20. Heemskerk B, Kvistborg P, Schumacher TNM. The cancer antigenome. *EMBO J*. 2013;32(2):194–203.
21. Vigneron N, Stroobant V, van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immun*. 2013;13:15.
22. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(8):615–25.
23. Coulie PG, van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(2):135–46.
24. Jiang T, Shi T, Zhang H, Hu J, Song Y, Wei J i sur. Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12(1):93.
25. Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(9):3413–21.
26. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* (1979). 2008;319(5866):1096–100.
27. Gillison ML. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709–20.
28. Walboomers JMM, Jacobs M v., Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K v. i sur. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of Pathology*. 1999;189(1):12–9.



29. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* (1979). 2015;348(6230):69–74.
30. Kalejs M, Erenpreisa J. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and “brain-storming” session. *Cancer Cell International*. 2005;5(1):4.
31. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(8):615–25.
32. Ward JP, Gubin MM, Schreiber RD. The Role of Neoantigens in Naturally Occurring and Therapeutically Induced Immune Responses to Cancer. In 2016. p. 25–74.
33. Kawashima I, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Sette A, Celis E. Identification of HLA-A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res*. 1999;59(2):431–5.
34. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*. 2000;95(1):286–93.
35. Pardoll D. Does the Immune System See Tumors as Foreign or Self? *Annual Review of Immunology*. 2003;21(1):807–39.
36. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(10):772–82.
37. Stone JD, Harris DT, Kranz DM. TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Current Opinion in Immunology*. 2015;33:16–22.
38. Mardis ER. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2013;6(1):287–303.
39. Blumenstiel B, Cibulskis K, Fisher S, DeFelice M, Barry A, Fennell T i sur. Targeted Exon Sequencing by In-Solution Hybrid Selection. *Current Protocols in Human Genetics*. 2010;66(1).
40. Albert TJ, Molla MN, Muzny DM, Nazareth L, Wheeler D, Song X i sur. Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nature Methods*. 2007;4(11):903–5.
41. Hodges E, Rooks M, Xuan Z, Bhattacharjee A, Benjamin Gordon D, Brizuela L i sur. Hybrid selection of discrete genomic intervals on custom-designed microarrays for massively parallel sequencing. *Nature Protocols*. 2009;4(6):960–74.
42. Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*. 2017;387:61–8.
43. Arneth B. Tumor Microenvironment. *Medicina (B Aires)*. 2019;56(1):15.
44. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346–54.

45. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 2013;19(11):1423–37.
46. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*. 2015;368(1):7–13.
47. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M i sur. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*. 2018;24(5):541–50.
48. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH i sur. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*. 2018;48(4):812-830.e14.
49. Xu J, editor. Regulation of Cancer Immune Checkpoints. Vol. 1248. Singapore: Springer Singapore; 2020.
50. He X, Xu C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*. 2020;30(8):660–9.
51. Strickler JH, Hanks BA, Khasraw M. Tumor Mutational Burden as a Predictor of Immunotherapy Response: Is More Always Better? *Clinical Cancer Research*. 2021;27(5):1236–41.
52. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A i sur. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Annals of Oncology*. 2019;30(1):44–56.
53. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A i sur. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Annals of Oncology*. 2019 Jan;30(1):44–56.
54. Coulie PG, van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(2):135–46.
55. Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, Kaabinejadian S, Hundal J, Petti AA i sur. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science (1979)*. 2015;348(6236):803–8.
56. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF i sur. *STK11/LKB1* Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in *KRAS* -Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discovery*. 2018;8(7):822–35.
57. Meléndez B, van Campenhout C, Rorive S, Remmelink M, Salmon I, D’Haene N. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Translational Lung Cancer Research*. 2018;7(5):661–7.
58. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KRM, Ozenberger BA, Ellrott K i sur. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*. 2013;45(10):1113–20.

59. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A v. i sur. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415–21.
60. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL i sur. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. *Cell*. 2012;150(6):1121–34.
61. Morris LGT, Riaz N, Desrichard A, Şenbabaoğlu Y, Hakimi AA, Makarov V i sur. Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity as a prognostic determinant of survival. *Oncotarget*. 2016;7(9):10051–63.
62. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*. 2016;17(12):e542–51.
63. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ i sur. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (1979)*. 2015;348(6230):124–8.
64. Fancello L, Gandini S, Pelicci PG, Mazzarella L. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2019;7(1):183.
65. Yadav M, Jhunjunwala S, Phung QT, Lupardus P, Tanguay J, Bumbaca S i sur. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. 2014;515(7528):572–6.
66. McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M i sur. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Annals of Oncology*. 2021;32(5):661–72.
67. Samstein RM, Lee CH, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY i sur. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genetics*. 2019;51(2):202–6.
68. Qiu P, Pang L, Arreaza G, Maguire M, Chang K, Marton M i sur. Data Interoperability of Whole Exome Sequencing (WES) Based Mutational Burden Estimates from Different Laboratories. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(5):651.
69. Buchhalter I, Rempel E, Endris V, Allgäuer M, Neumann O, Volckmar AL i sur. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *International Journal of Cancer*. 2019;144(4):848–58.
70. Garofalo A, Sholl L, Reardon B, Taylor-Weiner A, Amin-Mansour A, Miao D i sur. The impact of tumor profiling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. *Genome Medicine*. 2016;8(1):79.
71. Sha D, Jin Z, Budczies J, Kluck K, Stenzinger A, Sinicrope FA. Tumor Mutational Burden as a Predictive Biomarker in Solid Tumors. *Cancer Discovery*. 2020;10(12):1808–25.

72. Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE i sur. Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2018;20(1):4–27.
73. Buchhalter I, Rempel E, Endris V, Allgäuer M, Neumann O, Volckmar AL i sur. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *International Journal of Cancer*. 2019;144(4):848–58.
74. Hellmann MD, Ciuleanu TE, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C i sur. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(22):2093–104.
75. Büttner R, Longshore JW, López-Ríos F, Merkelbach-Bruse S, Normanno N, Rouleau E i sur. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements. *ESMO Open*. 2019;4(1):e000442.
76. Vokes NI, Liu D, Ricciuti B, Jimenez-Aguilar E, Rizvi H, Dietlein F i sur. Harmonization of Tumor Mutational Burden Quantification and Association With Response to Immune Checkpoint Blockade in Non–Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precision Oncology*. 2019;(3):1–12.
77. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA i sur. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2017;18(9):1182–91.
78. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD i sur. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(26):2509–20.
79. Prasad V, Addeo A. The FDA approval of pembrolizumab for patients with TMB >10 mut/Mb: was it a wise decision? No. *Annals of Oncology*. 2020;31(9):1112–4.
80. Addeo A, Banna GL, Weiss GJ. Tumor Mutation Burden—From Hopes to Doubts. *JAMA Oncology*. 2019;5(7):934.
81. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR i sur. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nature Medicine*. 2017;23(6):703–13.
82. Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, Funari V, Chen SJ, White JR i sur. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2020;8(1):e000147.
83. Budczies J, Seidel A, Christopoulos P, Endris V, Kloor M, Györfy B i sur. Integrated analysis of the immunological and genetic status in and across cancer types: impact of mutational signatures beyond tumor mutational burden. *OncoImmunology*. 2018;7(12):e1526613.

84. Campbell BB, Light N, Fabrizio D, Zatzman M, Fuligni F, de Borja R i sur. Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell*. 2017;171(5):1042-1056.e10.
85. Budczies J, Kazdal D, Allgäuer M, Christopoulos P, Rempel E, Pfarr N i sur. Quantifying potential confounders of panel-based tumor mutational burden (TMB) measurement. *Lung Cancer*. 2020;142:114–9.
86. Stenzinger A, Endris V, Budczies J, Merkelbach-Bruse S, Kazdal D, Dietmaier W i sur. Harmonization and Standardization of Panel-Based Tumor Mutational Burden Measurement: Real-World Results and Recommendations of the Quality in Pathology Study. *Journal of Thoracic Oncology*. 2020;15(7):1177–89.
87. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J i sur. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade–based immunotherapy. *Science (1979)*. 2018;362(6411).
88. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(25):2500–1.
89. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K i sur. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *The Lancet Oncology*. 2020;21(10):1353–65.
90. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(1):7–30.
91. van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L i sur. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science (1979)*. 2015;350(6257):207–11.
92. Ready N, Hellmann MD, Awad MM, Otterson GA, Gutierrez M, Gainor JF i sur. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(12):992–1000.
93. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, Creelan BC, Sanchez-Vega F, Ahuja A i sur. Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(5):843-852.e4.
94. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E i sur. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell*. 2018;33(4):649-663.e4.
95. Peters S, Gettinger S, Johnson ML, Jänne PA, Garassino MC, Christoph D i sur. Phase II Trial of Atezolizumab As First-Line or Subsequent Therapy for Patients With Programmed Death-Ligand 1–Selected Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer (BIRCH). *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(24):2781–9.

96. Seiwert TY, Haddad R, Bauml J, Weiss J, Pfister DG, Gupta S i sur. Abstract LB-339: Biomarkers predictive of response to pembrolizumab in head and neck cancer (HNSCC). In: Clinical Research (Excluding Clinical Trials). American Association for Cancer Research; 2018. p. LB-339-LB-339.
97. McGrail DJ, Federico L, Li Y, Dai H, Lu Y, Mills GB i sur. Multi-omics analysis reveals neoantigen-independent immune cell infiltration in copy-number driven cancers. *Nature Communications*. 2018;9(1):1317.
98. León-Letelier RA, Bonifaz LC, Fuentes-Pananá EM.OMIC signatures to understand cancer immunosurveillance and immunoediting: Melanoma and immune cells interplay in immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2019;105(5):915–33.
99. Read J, Wadt KAW, Hayward NK. Melanoma genetics. *Journal of Medical Genetics*. 2016;53(1):1–14.
100. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K i sur. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017;545(7653):175–80.
101. Kang K, Xie F, Mao J, Bai Y, Wang X. Significance of Tumor Mutation Burden in Immune Infiltration and Prognosis in Cutaneous Melanoma. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.
102. Jia Q, Wang J, He N, He J, Zhu B. Titin mutation associated with responsiveness to checkpoint blockades in solid tumors. *JCI Insight*. 2019;4(10).
103. Ning B, Liu Y, Wang M, Li Y, Xu T, Wei Y. The Predictive Value of Tumor Mutation Burden on Clinical Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.
104. Johnson DB, Frampton GM, Rioth MJ, Yusko E, Xu Y, Guo X i sur. Targeted Next Generation Sequencing Identifies Markers of Response to PD-1 Blockade. *Cancer Immunology Research*. 2016;4(11):959–67.
105. Liu D, Schilling B, Liu D, Sucker A, Livingstone E, Jerby-Arnon L i sur. Integrative molecular and clinical modeling of clinical outcomes to PD1 blockade in patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine*. 2019;25(12):1916–27.
106. Davis AA, Chae YK, Agte S, Pan A, Mohindra NA, Villaflor VM i sur. Association of tumor mutational burden with smoking and mutation status in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(7\_suppl):24–24.
107. Pfeifer GP. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. *Genome Medicine*. 2010;2(8):54.
108. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M i sur. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(25):2415–26.

109. Waqar SN, Govindan R. The Mystic Role of Tumor Mutational Burden in Selecting Patients With Lung Cancer for First-Line Immunotherapy. *JAMA Oncology*. 2020;6(5):674.
110. Meng G, Liu X, Ma T, Lv D, Sun G. Predictive value of tumor mutational burden for immunotherapy in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2022;17(2):e0263629.
111. Salem ME, Puccini A, Grothey A, Raghavan D, Goldberg RM, Xiu J i sur. Landscape of Tumor Mutation Load, Mismatch Repair Deficiency, and PD-L1 Expression in a Large Patient Cohort of Gastrointestinal Cancers. *Molecular Cancer Research*. 2018;16(5):805–12.
112. Castellucci E, He T, Goldstein DY, Halmos B, Chuy J. DNA Polymerase  $\epsilon$  Deficiency Leading to an Ultramutator Phenotype: A Novel Clinically Relevant Entity. *The Oncologist*. 2017;22(5):497–502.
113. Gong J, Wang C, Lee PP, Chu P, Fakhri M. Response to PD-1 Blockade in Microsatellite Stable Metastatic Colorectal Cancer Harboring a *POLE* Mutation. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2017;15(2):142–7.
114. Innocenti F, Ou FS, Qu X, Zemla TJ, Niedzwiecki D, Tam R i sur. Mutational Analysis of Patients With Colorectal Cancer in CALGB/SWOG 80405 Identifies New Roles of Microsatellite Instability and Tumor Mutational Burden for Patient Outcome. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(14):1217–27.
115. Fabrizio DA, George Jr TJ, Dunne RF, Frampton G, Sun J, Gowen K i sur. Beyond microsatellite testing: assessment of tumor mutational burden identifies subsets of colorectal cancer who may respond to immune checkpoint inhibition. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2018;9(4):610–7.
116. Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS i sur. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2019;30(7):1096–103.
117. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69–90.
118. Freedman ND. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA*. 2011;306(7):737.
119. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315–22.
120. Nassar AH, Umeton R, Kim J, Lundgren K, Harshman L, van Allen EM i sur. Mutational Analysis of 472 Urothelial Carcinoma Across Grades and Anatomic Sites. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(8):2458–70.
121. Kim J, Akbani R, Creighton CJ, Lerner SP, Weinstein JN, Getz G i sur. Invasive Bladder Cancer: Genomic Insights and Therapeutic Promise. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(20):4514–24.

122. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J i sur. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(3):312–22.
123. Galsky MD, Sazi A, Szabo PM, Han GC, Grossfeld G, Collette S i sur. Nivolumab in Patients with Advanced Platinum-resistant Urothelial Carcinoma: Efficacy, Safety, and Biomarker Analyses with Extended Follow-up from CheckMate 275. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(19):5120–8.
124. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar A v, Necchi A i sur. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2016;387(10031):1909–20.
125. Johnson DE, Burtneess B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):92.
126. Fernandes Q, Merhi M, Raza A, Inchakalody VP, Abdelouahab N, Zar Gul AR i sur. Role of Epstein–Barr Virus in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers and Its Potential as an Immunotherapeutic Target. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
127. Mashberg A, Boffetta P, Winkelmann R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer*. 1993;72(4):1369–75.
128. Gillison ML. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709–20.
129. Peng YP, Wang R, Liu QD, Xu XW, Wei W, Huang XT i sur. Combination of Tumor Mutational Burden and Specific Gene Mutations Stratifies Outcome to Immunotherapy Across Recurrent and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Genetics*. 2021;12.
130. Hanna GJ, Lizotte P, Cavanaugh M, Kuo FC, Shivdasani P, Frieden A i sur. Frameshift events predict anti–PD-1/L1 response in head and neck cancer. *JCI Insight*. 2018;3(4).
131. Ferris RL, Haddad R, Even C, Tahara M, Dvorkin M, Ciuleanu TE i sur. Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Annals of Oncology*. 2020;31(7):942–50.
132. O’Meara TA, Tolaney SM. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response in breast cancer. *Oncotarget*. 2021;12(5):394–400.
133. Barroso-Sousa R, Jain E, Cohen O, Kim D, Buendia-Buendia J, Winer E i sur. Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020;31(3):387–94.
134. Winer EP, Lipatov O, Im SA, Goncalves A, Muñoz-Couselo E, Lee KS i sur. Association of tumor mutational burden (TMB) and clinical outcomes with



- pembrolizumab (pembro) versus chemotherapy (chemo) in patients with metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) from KEYNOTE-119. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(15\_suppl):1013–1013.
135. Alva AS, Mangat PK, Garrett-Mayer E, Halabi S, Alvarez RH, Calfa CJ i sur. Pembrolizumab (P) in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC) with high tumor mutational burden (HTMB): Results from the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15\_suppl):1014–1014.
  136. Barroso-Sousa R, Keenan TE, Pernas S, Exman P, Jain E, Garrido-Castro AC i sur. Tumor Mutational Burden and *P TEN* Alterations as Molecular Correlates of Response to PD-1/L1 Blockade in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(11):2565–72.
  137. Yam C, Hess KR, Litton JK, Yang WT, Piwnica-Worms H, Mittendorf EA i sur. A randomized, triple negative breast cancer enrolling trial to confirm molecular profiling improves survival (ARTEMIS). *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15\_suppl):TPS590–TPS590.
  138. Chakravarty D, Huang L, Kahn M, Tewari AK. Immunotherapy for Metastatic Prostate Cancer: Current and Emerging Treatment Options. *Urologic Clinics of North America*. 2020;47(4):487–510.
  139. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, de Sarkar N, Abida W, Beltran H i sur. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(5):443–53.
  140. Freedland SJ, Aronson WJ. Commentary on “Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer” . *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2017;35(8):535.
  141. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G v., Cibulskis K, Sivachenko A i sur. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–8.
  142. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD i sur. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011–25.
  143. Pritchard CC, Morrissey C, Kumar A, Zhang X, Smith C, Coleman I i sur. Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nature Communications*. 2014;5(1):4988.
  144. Antonarakis ES, Piulats JM, Gross-Goupil M, Goh J, Ojamaa K, Hoimes CJ i sur. Pembrolizumab for Treatment-Refractory Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Multicohort, Open-Label Phase II KEYNOTE-199 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(5):395–405.
  145. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L i sur. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(26):2542–52.

146. Goh G, Walradt T, Markarov V, Blom A, Riaz N, Doumani R i sur. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget*. 2016;7(3):3403–15.
147. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu YM, Dhanasekaran SM i sur. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Research*. 2015;75(18):3720–7.
148. Wong SQ, Waldeck K, Vergara IA, Schröder J, Madore J, Wilmott JS i sur. UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas. *Cancer Research*. 2015;75(24):5228–34.
149. Galanina N, Goodman AM, Cohen PR, Frampton GM, Kurzrock R. Successful Treatment of HIV-Associated Kaposi Sarcoma with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunology Research*. 2018;6(10):1129–35.
150. Pandey P, Yang Z, Shibata D, Marjoram P, Siegmund KD. Mutational signatures in colon cancer. *BMC Research Notes*. 2019;12(1):788.
151. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*. 2008;18(1):85–98.
152. Salem ME, Bodor JN, Puccini A, Xiu J, Goldberg RM, Grothey A i sur. Relationship between <sc>MLH1</sc> , <sc>PMS2</sc> , <sc>MSH2</sc> and <sc>MSH6</sc> gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *International Journal of Cancer*. 2020;147(10):2948–56.
153. Mardis ER. Neoantigens and genome instability: impact on immunogenomic phenotypes and immunotherapy response. *Genome Medicine*. 2019;11(1):71.
154. Yang G, Zheng R yi, Jin Z shun. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2019;145(12):2891–9.
155. Woerner SM, Yuan YP, Benner A, Korff S, von Knebel Doeberitz M, Bork P. SelTarbase, a database of human mononucleotide-microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Research*. 2010;38(suppl\_1):D682–9.
156. Timmermann B, Kerick M, Roehr C, Fischer A, Isau M, Boerno ST i sur. Somatic Mutation Profiles of MSI and MSS Colorectal Cancer Identified by Whole Exome Next Generation Sequencing and Bioinformatics Analysis. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e15661.
157. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite Instability Detection by Next Generation Sequencing. *Clinical Chemistry*. 2014;60(9):1192–9.
158. Baretta M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*. 2018;189:45–62.

159. Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2018;26(2):e15–21.
160. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(13):3753–8.
161. Goodman AM, Sokol ES, Frampton GM, Lippman SM, Kurzrock R. Microsatellite-Stable Tumors with High Mutational Burden Benefit from Immunotherapy. *Cancer Immunology Research*. 2019;7(10):1570–3.
162. Naboush A, Roman CAJ, Shapira I. Immune checkpoint inhibitors in malignancies with mismatch repair deficiency: a review of the state of the current knowledge. *Journal of Investigative Medicine*. 2017;65(4):754–8.
163. Dudley JC, Lin MT, Le DT, Eshleman JR. Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(4):813–20.
164. Le DT, Kim TW, van Cutsem E, Geva R, Jäger D, Hara H i sur. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability–High/Mismatch Repair–Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *Journal of Clinical Oncology*. 2020;38(1):11–9.
165. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M i sur. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(8):773–9.
166. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK i sur. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (1979)*. 2017;357(6349):409–13.
167. Germano G, Lamba S, Rospo G, Barault L, Magrì A, Maione F i sur. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature*. 2017;552(7683):116–20.
168. Yarchoan M, Albacker LA, Hopkins AC, Montesion M, Murugesan K, Vithayathil TT i sur. PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers. *JCI Insight*. 2019;4(6).
169. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA i sur. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*. 2017;19(6):1189–201.
170. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT i sur. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and T<sub>regs</sub> in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8<sup>+</sup> T Cells. *Science Translational Medicine*. 2013;5(200).
171. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Medicine*. 2018;7(3):746–56.

172. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D i sur. Molecular Determinants of Response to Anti–Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti–Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Profiled With Targeted Next-Generation Sequencing. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(7):633–41.
173. van Dijk N, Funt SA, Blank CU, Powles T, Rosenberg JE, van der Heijden MS. The Cancer Immunogram as a Framework for Personalized Immunotherapy in Urothelial Cancer. *European Urology*. 2019;75(3):435–44.
174. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The “cancer immunogram.” *Science (1979)*. 2016;352(6286):658–60.
175. van Allen EM, Miao D, Schilling B, Shukla SA, Blank C, Zimmer L i sur. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science (1979)*. 2015;350(6257):207–11.
176. O’Connor JPB, Rose CJ, Waterton JC, Carano RAD, Parker GJM, Jackson A. Imaging Intratumor Heterogeneity: Role in Therapy Response, Resistance, and Clinical Outcome. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(2):249–57.
177. Postow MA, Chasalow SD, Kuk D, Panageas KS, Cheng ML, Yuan J i sur. Absolute lymphocyte count as a prognostic biomarker for overall survival in patients with advanced melanoma treated with ipilimumab. *Melanoma Research*. 2020;30(1):71–5.
178. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Yuan J, Postow MA, Wong P, Capone M i sur. Increases in Absolute Lymphocytes and Circulating CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Are Associated with Positive Clinical Outcome of Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(19):4848–58.
179. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic Effect of Epithelial and Stromal Lymphocyte Infiltration in Non–Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(16):5220–7.
180. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer–immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321–30.
181. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS i sur. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–7.
182. Gajewski TF. The Next Hurdle in Cancer Immunotherapy: Overcoming the Non–T-Cell–Inflamed Tumor Microenvironment. *Seminars in Oncology*. 2015;42(4):663–71.
183. Gajewski TF, Woo SR, Zha Y, Spaapen R, Zheng Y, Corrales L i sur. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*. 2013;25(2):268–76.
184. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L i sur. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568–71.

185. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanzetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J i sur. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016;387(10030):1837–46.
186. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar A v, Necchi A i sur. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2016;387(10031):1909–20.
187. McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, Massard C, Gordon MS, Hamid O i sur. Atezolizumab, an Anti–Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(8):833–42.
188. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingsluff C i sur. Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8<sup>+</sup> T-Cell Recruitment. *Cancer Research*. 2009;69(7):3077–85.
189. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithel FS, Loriot Y, Cruz C i sur. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014;515(7528):558–62.
190. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH i sur. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti–PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(19):5064–74.
191. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP i sur. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(21):2018–28.
192. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A i sur. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(3):899–910.
193. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science (1979)*. 2015;348(6230):74–80.
194. 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. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(8):1865–74.
195. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: seven steps to success (or failure). *Annals of Oncology*. 2016;27(8):1492–504.
196. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D i sur. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(21):2006–17.

197. Selby M, Engelhardt J, Lu LS, Quigley M, Wang C, Chen B i sur. Antitumor activity of concurrent blockade of immune checkpoint molecules CTLA-4 and PD-1 in preclinical models. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(15\_suppl):3061–3061.
198. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM i sur. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(2):122–33.
199. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(9):4275–80.
200. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450–61.
201. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252–64.
202. Ascierto PA, Melero I, Bhatia S, Bono P, Sanborn RE, Lipson EJ i sur. Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti-LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15\_suppl):9520–9520.
203. Ascierto PA, McArthur GA. Checkpoint inhibitors in melanoma and early phase development in solid tumors: what's the future? *Journal of Translational Medicine*. 2017;15(1):173.
204. Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ, Maris CH, Hipkiss EL, de Marzo A i sur. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(11):3383–92.
205. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A i sur. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*. 2009;10(1):29–37.
206. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.
207. Liberti M v., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 2016;41(3):211–8.
208. van Wilpe S, Koornstra R, den Brok M, de Groot JW, Blank C, de Vries J i sur. Lactate dehydrogenase: a marker of diminished antitumor immunity. *OncoImmunology*. 2020;9(1).
209. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S i sur. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2017;545(7652):60–5.

## Životopis

Rođen sam 28. studenog 1997. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu sam pohađao u Sisku te ih završio s odličnim uspjehom. Tijekom osnovne i srednje škole trenirao sam tenis i sudjelovao na brojnim natjecanjima te učio engleski u školi stranih jezika. Medicinski fakultet u Zagrebu upisao sam 2016. godine. Dobitnik sam dekanove nagrade za postignut uspjeh na 4. godini studija u akademskoj godini 2019./2020. Tijekom studija bio sam demonstrator na kolegiju Medicinska kemija i biokemija 1 te na kolegiju Patofiziologija. Pasivno sam sudjelovao na 2. kongresu HDND-a „Nutricionizam & dijetetika“ 2018. godine, simpoziju Komorbiditet, reziliencija i epigenetike iz perspektive prediktivne, preventivne i personalizirane medicine 2019. godine i stručnom skupu Dan svjesnosti o upalnim bolestima crijeva 2018. godine. U 2019. godini pohađao sam ljetnu školu Klinička prehrana i dijetoterapija (*The Summer school of Clinical Nutrition and Diet Therapy*) u sklopu projekta EXPAND. Aktivno se služim engleskim jezikom.