

1222 • 2022  
**800**  
ANNI



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE  
ONCOLOGICHE E GASTROENTEROLOGICHE

*Direttore: prof. Fabio Farinati*

ONCOLOGIA 2- ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO  
I.R.C.C.S

*Direttore: Prof.ssa Valentina Guarneri*

**TESI DI LAUREA**

**Marcatori circolanti predittivi della risposta agli  
inibitori dei checkpoint immunologici in pazienti con  
tumore del polmone non a piccole cellule: MAGnEtIC  
Trial**

**Relatore:** Prof.ssa Giulia Pasello

**Laureanda:** Cecilia Colomba

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**







## INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUZIONE</b> .....	11
<b>1. Carcinoma polmonare</b> .....	11
<b>1.1 Epidemiologia e fattori di rischio</b> .....	11
<b>1.2 Clinica, diagnosi e stadiazione</b> .....	16
<b>1.3 Classificazione istologica: NSCLC e SCLC</b> .....	24
<b>1.4 Classificazione molecolare</b> .....	27
<b>2. Strategia terapeutica per NSCLC in stadio avanzato</b> .....	35
<b>3. Immunoterapia e chemio-immunoterapia</b> .....	36
<b>3.1 Immunoterapia</b> .....	38
<b>4. Marcatori circolanti</b> .....	51
<b>OBIETTIVI DELLO STUDIO</b> .....	55
<b>1. Obiettivo primario</b> .....	55
<b>2. Obiettivi secondari</b> .....	55
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	57
<b>1. Disegno dello studio e criteri di eleggibilità</b> .....	57
<b>2. Dati clinici e traslazionali</b> .....	59
<b>3. Trattamento</b> .....	60
<b>4. Analisi traslazionali</b> .....	Errore. Il segnalibro non è definito.
<b>5. Valutazione della risposta alla terapia</b> .....	61
<b>6. Analisi statistica</b> .....	63
<b>RISULTATI</b> .....	65
<b>1. Caratteristiche cliniche dei pazienti</b> .....	65
<b>2. Analisi delle tossicità immunocorrelate (IRAE)</b> .....	66
<b>3. Analisi statistica</b> .....	Errore. Il segnalibro non è definito.
<b>DISCUSSIONE</b> .....	87
<b>1. Conclusioni</b> .....	91
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	91









## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio** Gli inibitori dei *checkpoint* immunitari (ICIs) nel trattamento del NSCLC avanzato inducono una risposta duratura e un aumento significativo della sopravvivenza solo in un numero limitato di pazienti. L'identificazione di biomarcatori circolanti predittivi potrebbe essere uno strumento promettente per ottimizzare la selezione dei pazienti e l'esito del trattamento con ICIs.

**Obiettivi** L'*endpoint* primario è l'analisi descrittiva delle caratteristiche cliniche dei pazienti, dell'esito del trattamento e del profilo di tossicità di una popolazione di 76 pazienti affetti da NSCLC avanzato trattato con ICIs. Gli *endpoints* secondari sono la valutazione della correlazione tra marcatori circolanti e la loro variazione a diversi *time point* con l'esito del trattamento in termini di tasso di risposta (RR), tasso di controllo della malattia (DCR), sopravvivenza libera da malattia (PFS) e sopravvivenza globale (OS) in un sottogruppo di 35 pazienti.

**Metodi** Lo studio MAGnEtIC è uno studio prospettico *real-world* che ha arruolato pazienti affetti da Melanoma e NSCLC in stadio avanzato provenienti da quattro centri italiani e trattati con ICIs.

I pazienti sono stati sottoposti a un prelievo di sangue, prima di ogni ciclo per 6 cicli (T1-T6) e alla valutazione del tumore fino alla progressione della malattia (PD) o per 2 anni. I livelli dei biomarcatori sono stati valutati con la tecnologia Lumine xMAP utilizzando kit R&S ad alta sensibilità. Ogni marcatore è stato classificato in base a livelli alti e bassi, massimizzando la sua capacità discriminativa, e l'associazione con l'esito è stata testata in analisi univariate e multiple.

**Risultati** Il follow up mediano registrato nello studio è stato di 5,6 mesi. La PFS mediana registrata nello studio è risultata di 5,72 mesi (IC 95%: 2,42-8,02), l'OS mediana è risultata pari a 9,7 mesi (IC 95%: 7,54-11,86). La RR è pari al 21%, la DCR è risultata pari al 63%.

Le concentrazioni sieriche in un sottogruppo di 35 pazienti (12 femmine e 23 maschi) con NSCLC avanzato di IL6 e IL8 sono risultate significativamente più elevate a T1 e T2 nei pazienti con PD (test di Kruskal-Wallis). L'aumento relativo mediano di IL8 è stato del 37% nei pazienti con PD ( $p = 0,0320$ ). All'analisi logistica multipla, IL8 al T1 e la RI di IL8 sono risultati fattori indipendenti che predicono la probabilità di DC, con un'accuratezza complessiva dell'83,9%. Alti livelli di IL8 a T1 erano significativamente associati a una bassa probabilità di DC (OR=0,07, 95%CI=0,00-0,51) e un aumento di RI di IL8 ha mostrato una probabilità significativamente minore di DC (OR aggiustato=0,04, 95% CI=0,00-0,30). Con un follow-up mediano di 10,6 mesi, la mPFS e la mOS sono state di 5,8 mesi (95% CI:2,3-7,4) e 8,3 mesi (95% CI:4,0-13,8).

Nel modello di regressione multivariata di Cox, elevati livelli di IL6 e IL8 al T1 (HR = 4,37, 95%CI: 1,62–13,75, HR = 3,10, 95%CI: 1,27–7,5), e RI di IL6 (HR=5,79, 95% CI= 1,91-21,53) sono rimasti significativamente associati a una PFS peggiore.

Nel modello di regressione multivariata di Cox, livelli elevati di IL8 a T1 (HR=3,43, 95% CI=1,29-9,61) e di RI di IL8 (HR=4,37, 95% CI=1,5-13,37) sono rimasti significativamente associati a una OS peggiore.

**Conclusioni** Livelli sierici elevati di IL8 e IL6 a T2, combinati con un aumento di IL8 dal basale sono forti perditori di PD, PFS e OS nei pazienti con NSCLC avanzato.

## ABSTRACT

**Background** ICIs lead to durable response and a significant survival improvement in a limited number of advanced stage NSCLC patients. The identification of predictive circulating biomarkers could be a promising tool to optimize pts' selection and outcome for ICIs treatment.

**Aim of the study** The primary endpoint is the descriptive analysis of the patients' clinical characteristics, treatment outcome and toxicity profile of a population of 76 patients with advanced NSCLC treated with ICIs. The secondary endpoints are the evaluation of the correlation between circulating markers and their variation at different time points with the outcome of the treatment in terms of response rate (RR), rate of disease control disease (DCR), disease-free survival (PFS) and overall survival (OS) in a subgroup of 35 patients.

**Methods** The MAGnEtIC study is a prospective real-world study that has enrolled patients with advanced melanoma and NSCLC from four Italian centers and treated with ICIs.

Patients underwent a collection of blood, before each cycle of therapy for 6 cycles (T1-T6) and evaluation of the tumor until disease progression (PD) or for 2 years. The levels of the biomarkers were assessed with Lumine xMAP technology using high-sensitivity R&D kits. Each marker was classified according to high and low levels, maximizing its ability to discriminate, and the association with the outcome was tested in analyses univariate and multiple analyses.

**Results** The median follow-up recorded in the study was 5.6 months. The median PFS recorded in the study was 5.72 months (95% CI: 2.42-8.02), median OS was 9.7 months (95% CI: 7.54-11.86). RR was 21%, DCR was 63%.

Serum concentrations in a subgroup of 35 patients (12 females and 23 males) with advanced NSCLC of IL6 and IL8 were significantly higher at T1 and T2 in patients with PD (Kruskal-Wallis' test). The median relative increase in IL8 was 37% in patients with PD ( $p = 0.0320$ ). At multiple logistic analysis, IL8 at T1 and the RI of IL8 were independent

predictors of the probability of DC, with an overall accuracy of 83.9%. Elevated levels of IL8 at T1 were significantly associated with low probability of DC (OR=0.07, 95%CI=0.00-0.51), and increased RI of IL8 showed significantly lower probability of DC (adjusted OR=0.04, 95% CI=0.00-0.30). With a median follow-up of 10.6 months, mPFS and mOS were 5.8 months (95% CI:2.3-7.4) and 8.3 months (95% CI:4.0-13.8).

In the multivariate Cox regression model, elevated levels of IL-6 and IL-8 at T1 (HR = 4.37, 95%CI: 1.62–13.75, HR =3.10, 95%CI: 1.27–7.5), and RI of IL6 (HR=5.79, 95% CI= 1.91-21.53) remained significantly associated with worse PFS. In the multivariate Cox regression model, high levels of IL8 at T1 (HR=3.43, 95% CI=1.29-9.61) and RI levels of IL8 (HR=4.37, 95% CI=1.5-13.37) remained significantly associated with worse OS.

**Conclusions** Elevated serum levels of IL8 and IL6 at T2 combined with increased IL8 from baseline are strong losers of PD, PFS, and OS in patients with advanced NSCLC.

## INTRODUZIONE

### 1. Carcinoma polmonare

Il carcinoma polmonare è la terza neoplasia per incidenza in Italia e la seconda nel mondo per entrambi i sessi, inoltre è la prima causa di morte per neoplasia nel mondo.

In oncologia rientra nei cosiddetti “*big killers*” per la tardiva insorgenza di segni e sintomi di malattia, che portano ad una diagnosi spesso in stadi avanzati (III-IV).

A livello istologico si identificano due macrocategorie di carcinomi polmonari: i *non small cell lung cancer* (NSCLC) e il *small cell lung cancer* (SCLC) o microcitoma polmonare. I primi sono di gran lunga più frequenti, costituendo circa l’80-85% di tutti i tumori polmonari, mentre il SCLC rappresenta il restante 10-15% (1,2).

#### 1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

L’incidenza del tumore al polmone è molto elevata, con 41953 diagnosi stimate in Italia nel 2020, di cui 28360 nell’uomo (65%) e 13584 nella donna (35%).

È la seconda neoplasia per incidenza nell’uomo (15%) e la terza nella donna (6%).

Nel 2021 sono stati stimati 34000 decessi per carcinoma polmonare, di cui 23100 nell’uomo e 10900 nella donna. È la prima causa di mortalità per neoplasia per l’uomo e la seconda nella donna, dopo il tumore al seno.

La sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è del 16% nell’uomo e del 23% nella donna (1,2). Considerando, invece, il trend di incidenza e mortalità si nota come sia in aumento per la donna e in calo per l’uomo (3).

La differenza di andamento nei due sessi riflette la diversa abitudine tabagica: le donne hanno iniziato a fumare soprattutto durante e dopo

la Seconda Guerra mondiale, a differenza degli uomini che hanno iniziato nei primi anni del ventesimo secolo (4).

Nel 1986 l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha classificato il fumo di tabacco come un agente cancerogeno per il tumore del polmone (5).

Il fumo è, infatti, il principale fattore eziologico, con circa il 90-95% dei nuovi casi di cancro al polmone correlati al fumo attivo di sigaretta (6). Dal 1950, in seguito ad un aumento dei casi di tumore al polmone nel ventennio precedente, vennero intrapresi una serie di studi per indagare la correlazione tra il tabagismo e il tumore al polmone: i primi (1950), di tipo retrospettivo, ipotizzarono un'associazione tra fumo e cancro al polmone (7), mentre i successivi (1954), di tipo prospettico, evidenziarono come la mortalità aumenta con l'aumentare del numero di sigarette fumate quotidianamente dal soggetto (8). La mortalità per tumore del polmone è strettamente correlata al numero quotidiano di sigarette, agli anni di abitudine al fumo e al grado di inalazione (9,10). Il rischio di sviluppare la patologia diminuisce se si smette di fumare: nello specifico la cessazione del vizio a 40 anni comporta una riduzione del rischio di sviluppo della malattia pari all'80%, mentre a 50 anni tale riduzione si attesta al 57% (10), nonostante alcune mutazioni genetiche indotte da agenti cancerogeni persistano per anni dopo l'abbandono dell'abitudine tabagica (9).

Anche se le sigarette sono il principale prodotto del tabacco fumato nei paesi occidentali, una relazione esposizione-risposta con rischio di tumore al polmone è stata notata anche per sigari, sigaretti e pipe (11). Il ricorso a sigarette a basso contenuto di catrame o nicotina non riduce il rischio neoplastico, in quanto il fumatore tende a usarne in numero maggiore e a inalare più profondamente (9).

Negli ultimi anni si è assistito ad una decrescita del tasso di mortalità del tumore al polmone (4) negli uomini e nelle donne si è raggiunto un plateau, e questo è il risultato di campagne di prevenzione primaria che includono l'aumento del prezzo del tabacco, il divieto di fumare in luoghi pubblici, la riduzione delle pubblicità e delle promozioni di

sigarette e l'offerta di trattamenti e consulenze per le dipendenze da tabacco (12).

Il fumo non costituisce un fattore di rischio solo per chi ne fa attivamente uso, ma anche per gli inalatori passivi non fumatori.

L'esposizione al fumo passivo è legata al rischio tumore al polmone da una relazione dose-dipendente, nonostante sia difficile stabilirne l'entità (12).

I non fumatori possono inalare e metabolizzare i cancerogeni contenuti nel fumo di tabacco addirittura in concentrazioni maggiori dei fumatori, che utilizzano, invece, il filtro delle sigarette (13).

Il rischio da fumo passivo è inferiore a quello legato al fumo attivo, con un aumento del 20-30% di cancro al polmone osservato in non fumatori sposati per molti anni con fumatori (14, 16).

Anche se il fumo di sigaretta costituisce la causa principale di cancro al polmone, sono stati identificati altri svariati fattori di rischio, considerando che molte delle nuove neoplasie colpiscono ex fumatori o non fumatori e che 1 donna su 5 e un uomo su 12 con diagnosi di tumore polmonare non ha mai fumato (9).

Tra questi nuovi fattori di rischio troviamo l'esposizione professionale ad alcune sostanze come asbesto, idrocarburi policiclici aromatici, radon, arsenico, cromo e nichel.

L'esposizione all'asbesto è correlata al tumore al polmone dagli anni 30 del secolo scorso. Il cancro al polmone asbesto-correlato è quantitativamente più importante del mesotelioma pleurico, ma è sottostimato a causa dell'effetto dominante del fumo di tabacco come cancerogeno (17).

Inoltre, l'esposizione all'asbesto in associazione al fumo di sigaretta ha un effetto sinergico, ovvero complessivamente maggiore della somma degli effetti di asbesto e fumo singolarmente (18).

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono sostanze chimiche prodotte dalla combustione di materiali organici. Un aumento del rischio di cancro al polmone è stato visto in diverse industrie con esposizione a queste sostanze come la produzione di alluminio, gassificazione del carbone, fusione di acciaio e metallo (19,20).

Il radon è un gas che deriva dal normale decadimento dell'uranio nel terreno e ha caratteristiche mutageniche. L'esposizione al radon, che colpisce chi lavora, ad esempio, nelle miniere in regioni geografiche con alte concentrazioni di uranio nel suolo, determina un rischio marcatamente aumentato di carcinoma squamoso (21). Più del 30% dei tumori al polmone nei non fumatori sono associati all'esposizione al radon (22).

L'arsenico è un metallo pesante classificato come un cancerogeno di gruppo 1 dalla IARC. Le fonti primarie sono le perdite di arsenico inorganico nelle falde sotterranee; quindi, le persone più esposte sono i lavoratori agricoli o chi beve acqua con alto contenuto di Ar (23). Diversi studi hanno mostrato una relazione esposizione(Ar)-effetto(K polmone) non lineare, senza effetto alcuno per esposizioni a basso dosaggio (19).

I composti del cromo (IV) aumentano il rischio di tumore al polmone nei lavoratori della produzione dei cromati, mentre questo rischio non è stato rilevato in soggetti esposti solo a composti di cromo (III) (19). Anche l'esposizione al nichel in lavoratori nelle miniere, nei produttori di leghe ad alto contenuto di nichel hanno mostrato un aumento del rischio di cancro al polmone (24,25).

La IARC ha classificato l'inquinamento ambientale come un cancerogeno di gruppo 1, basandosi su una sufficiente evidenza di cancerogenesi sugli uomini e sugli animali sperimentali. L'inquinamento ambientale è un misto di costituenti che nascono da fonti naturali e artificiali. La composizione e i relativi livelli di inquinanti sono piuttosto variabili, dipendendo dalla fonte e dei processi atmosferici (26).

L'aria può contenere un numero pericoloso di agenti e molti di questi sono generati dalla combustione di combustibili fossili, compresi cancerogeni come idrocarburi policiclici aromatici e metalli come arsenico e nichel.

Il particolato (PM) è quel componente dell'inquinamento ambientale che è stato maggiormente studiato come cancerogeno ed è emerso



che il rischio di cancro al polmone aumenta linearmente con l'esposizione a  $PM_{\geq 2,5} \mu m$  (27,28).

Anche la dieta può influire sul rischio cancerogeno: alcuni studi hanno dimostrato che una dieta ricca di frutta e verdura, in particolare di crucifere, ha un ruolo protettivo per lo sviluppo della patologia, mentre una scarsa introduzione ne aumenta in rischio (9,29).

Elevate assunzioni di carne, in particolare fritta o grigliata possono aumentare il rischio di tumore al polmone, a causa della formazione di nitrosammine durante la cottura (30).

Alcuni studi sui sopravvissuti alle bombe atomiche di Hiroshima e Nagasaki e altri su pazienti radiotrattati hanno evidenziato un aumento del tasso di neoplasie polmonari, riconoscendo le radiazioni ionizzanti come altri agenti cancerogeni (19).

Una metanalisi del 2011 ha indagato la correlazione tra le malattie polmonari e il tumore: patologie come la BPCO, le polmoniti e la tubercolosi sono le principali cause di infiammazione del parenchima e possono fungere da intermedi o catalizzatori nell'evoluzione a neoplasie polmonari. La metanalisi ha trovato la relazione tra queste condizione polmonare e aumentato rischio di tumore al polmone, in particolare nei non fumatori (31).

Anche l'HIV aumenta il rischio di tumore al polmone di 2,5 volte, a prescindere dall'abitudine tabagica. Infatti, con lo sviluppo di terapie antiretrovirali che proteggono contro le infezioni opportunistiche, la principale causa di morte in questi pazienti è proprio il tumore al polmone. Analogamente accade per i pazienti trapiantati che devono assumere terapie immunosoppressive (32).

I parenti di primo grado dei probandi affetti da cancro al polmone hanno un rischio 2 o 3 volte più alto di sviluppare la patologia o altri tipi di cancro, molti dei quali non collegati al fumo. Questi dati suggeriscono che geni e/o specifici polimorfismi possono contribuire alla suscettibilità del tumore al polmone (9).

Una storia familiare positiva per neoplasia polmonare è stata identificata come fattore di rischio per l'insorgenza precoce della neoplasia stessa. Recenti studi di analisi di linkage su genotipi ad alto

rischio hanno identificato dei loci più suscettibili al cancro al polmone: 15q25, 5p15, 6p21 (19,33).

Il locus 15q25 contiene tre geni per i recettori nicotinici dell'acetilcolina CHRNA3, CHRNA5 e CHRNA4 e sembra associato, oltre che ad un aumentato rischio di tumore al polmone, anche ad un aumento di dipendenza dalla nicotina (33).

Il locus 5p15 include i geni TERT (*human telomerase reserve transcriptase gene*) ovvero la riserva di trascrittasi dei telomeri responsabile del loro mantenimento e attiva in più del 90% dei tumori, e CLPTM1L (*cleft lip and palate transmembrane-1-like gene*) che codifica per una proteina che dà resistenza al cisplatino (19).

Il locus 6p21 codifica, invece, per un gene che regola il *signaling* di proteine G.

Il rischio di tumore al polmone è aumentato anche nel gene della Li-Fraumeni, caratterizzata da una mutazione *germline* nel gene oncosoppressore p53 (34).

## 1.2 Clinica, diagnosi e stadiazione

In più della metà dei pazienti la diagnosi di cancro al polmone si associa ad una patologia avanzata a livello locale o già metastatica; i sintomi, infatti, insorgono tardivamente e, se presenti, spesso sono aspecifici.

La sintomatologia più comunemente associata al tumore al polmone è costituita da segni, sintomi o alterazioni delle analisi di laboratorio che possono essere attribuite alla lesione primaria, alle modalità di crescita locale, all'invasione o ostruzione delle strutture adiacenti, alla presenza di metastasi a distanza o a sindromi paraneoplastiche.

I segni e sintomi dipendono anche dalla localizzazione della neoplasia: tosse, emottisi, sibili e stridori respiratori, dispnea e polmonite ostruttiva sono segni e sintomi secondari alla crescita centrale o endobronchiale del tumore primitivo, mentre lo sviluppo periferico determina soprattutto dolore, dovuto alla compromissione pleurica o della parete toracica, e dispnea da insufficienza restrittiva.

Nel caso in cui il tumore si espandesse nel torace si assisterebbe a ostruzione della trachea, disfagia per compressione dell'esofago, disfonia per paralisi del nervo laringeo ricorrente, innalzamento dell'emidiaframma, dispnea per paralisi del nervo frenico e la sindrome di Claude-Bernard-Horner (ptosi, miosi, enoftalmo e anidrosi) per paralisi del ganglio stellato del sistema nervoso simpatico cervicale.

Il versamento pleurico può causare dolore, dispnea o tosse.

Altri problemi legati alla diffusione toracica comprendono la sindrome della vena cava superiore, interessamento del pericardio con possibili tamponamenti cardiaci, aritmie e insufficienza cardiaca, ostruzione dei vasi linfatici con versamento pleurico e dispnea.

I tumori dell'apice polmonare, detti anche "di Pancoast", possono determinare la sindrome omonima per diffusione locale, con interessamento dell'VIII nervo cervicale e del I e II nervo toracico. La sintomatologia associata è caratterizzata da brachialgia, erosioni distruttive a carico della prima e della seconda costa e può coesistere la sindrome di Claude Bernard Horner.

I sintomi aspecifici da neoplasia, che possono insorgere in qualsiasi momento, sono l'anoressia, il calo ponderale, l'astenia, la febbre e la sudorazione notturna.

Approssimativamente un soggetto su 3 si presenta con sintomi che sono il risultato di metastasi a distanza (9). I pazienti con metastasi al cervello possono manifestare cefalea, nausea e vomito, convulsioni o deficit neurologici, quelli con metastasi ossee possono mostrare dolori, fratture patologiche o compressione del midollo spinale. Individui con un'invasione del midollo possono presentare citopenia o leucoeritroblastosi, quelli con metastasi al fegato avranno epatomegalia, dolore nel quadrante superiore destro, febbre, anoressia e perdita di peso.

Le sindromi paraneoplastiche sono comuni in corso di carcinoma polmonare e talvolta rappresentano proprio i sintomi d'esordio o di ripresa di malattia, che regrediscono se il trattamento del tumore è efficace. L'ipercalcemia, causata dalla produzione ectopica di PTH o del peptide correlato al PTH, è una delle più frequenti e pericolose

sindromi paraneoplastiche associate al tumore al polmone, principalmente nel carcinoma squamoso, che determina nausea, vomito, dolori addominali, costipazione, poliuria, polidipsia e alterazione dello stato mentale.

Altre sindromi paraneoplastiche rilevanti possono essere l'iponatriemia da SIADH o da ANP ectopico e la sindrome di Cushing. L'inquadramento generale del paziente si basa sulla raccolta dei dati anamnestici, dei fattori di rischio, sulla sintomatologia e sulle comorbidità che possono influenzare la scelta del trattamento.

Le principali comorbidità riscontrate in associazione con il tumore al polmone sono la BPCO, il diabete e le malattie cardiovascolari.

La BPCO e il cancro al polmone coesistono nel 52% dei casi, e questo è probabilmente spiegato dal fatto che la BPCO è considerata un fattore di rischio del tumore al polmone per l'ambiente infiammatorio e ricco di stress ossidativo che comporta. La BPCO, inoltre, limita le possibilità di un trattamento radicale, ed è infatti stato dimostrato che i pazienti con NSCLC e BPCO hanno una mortalità aumentata del 20% rispetto a quelli senza comorbidità.

Le patologie cardiovascolari si sovrappongono al tumore al polmone con una prevalenza che va dal 13% fino al 43% dei casi. Secondo alcuni studi il tasso di mortalità è maggiore del 30% in pazienti con tumore al polmone e patologie cardiovascolari rispetto a quelli senza comorbidità.

Altri studi hanno dimostrato come il diabete peggiori la prognosi del tumore al polmone e anche in questo caso la mortalità sarà aumentata del 20 % nei pazienti con comorbidità rispetto a quelli senza. La prognosi peggiore di questi pazienti può essere dovuta a meccanismi legati all'iperglicemia, all'iperinsulinemia e all'infiammazione che determinano la proliferazione delle cellule tumorali e le metastasi (35). Dopo la raccolta anamnestica si prosegue con l'esame obiettivo, soffermandosi sul torace, sulla presenza di linfadenomegalie, sintomi neurologici e su dolori ossei che possono correlare a metastasi.

In caso di sospetta neoplasia si procede con indagini di imaging radiologico e analisi istologiche/citologiche sul tessuto, in modo da

poter stadiare e caratterizzare dal punto di vista molecolare la neoplasia e scegliere, quindi, il miglior trattamento per il caso specifico.

La radiografia del torace è la prima indagine non invasiva che viene svolta in caso di un sospetto diagnostico. Nel momento in cui si trova una lesione dubbia all'Rx si procede con una TC torace o total body con mezzo di contrasto per lo staging e per una miglior caratterizzazione della lesione.

Infatti, la TC risulta più specifica rispetto alla radiografia nel localizzare la lesione e nel definirne dimensioni, margini, densità, invasione delle strutture limitrofe e identificazione di linfonodi patologici (36), tuttavia la sensibilità della TC per i tumori a localizzazione centrale è significativamente inferiore rispetto ai tumori periferici (37) e presenta dei limiti nella valutazione dell'invasione di pleura e mediastino (38).

In questi casi, o se dovessero permanere dei dubbi riguardo a dimensioni o invasività, si possono eseguire altri esami come ecografie, RM, PET-TC con 18-FDG.

Il polmone è un organo difficile per la RM a causa di diverse limitazioni, come l'elevata suscettibilità della metodica agli artefatti di movimento dovuti respirazione, la bassa densità protonica intrinseca del parenchima polmonare e la diminuzione dell'intensità del segnale dovuta all'interfaccia aria-tessuto molle. Per questi motivi la RM è considerata uno strumento utile se associato alla TC, ad esempio per identificare l'invasione tumorale nella parete toracica o nelle strutture mediastiniche o nella differenziazione tra masse ilari solide e vascolari (39).

La RM è utile anche per indagare la presenza di metastasi a livello del SNC, ad esempio in presenza di sintomatologia neurologica, o per valutare un coinvolgimento del plesso brachiale.

La PET è una tecnica di imaging sensibile e specifica che consente di visualizzare in vivo il metabolismo dei tessuti. Il tracciante usato, l'FDG, ovvero una molecola di D-glucosio in cui il gruppo idrossile in posizione 2 è sostituito con un isotopo radioattivo di F18, viene assorbito e metabolizzato dalle cellule nello stesso modo del glucosio.

Le cellule maligne hanno un metabolismo del glucosio maggiore di quelle normali e quindi accumuleranno maggiori quantità di FDG (39). La PET, combinata alla TC o alla RM, consente di localizzare anatomicamente la zona di maggior captazione, ma non permette la diagnosi differenziale tra un tumore, un'infezione o un'infiammazione. La PET, inoltre, può dare falsi negativi in pazienti con diabete, lesioni <8 mm e in tumori a lenta crescita (9).

È richiesto un campionamento del tessuto per confermare la diagnosi in tutti i pazienti in cui si sospetti un cancro al polmone.

Le procedure comunemente utilizzate per il prelievo di tessuto polmonare, più o meno invasive, includono la broncoscopia a fibre ottiche con o senza agoaspirato transbronchiale (FNA), l'ecografia endobronchiale (EBUS) l'agoaspirato transtoracico (TTNA) guidato da imaging, la mediastinoscopia, l'analisi del liquido pleurico (toracentesi), la toracoscopia e gli approcci chirurgici (37).

Le linee guida ESMO individuano come mezzi più efficaci la broncoscopia o l'endoscopia e la biopsia percutanea TC guidata (36). La scelta tra le due tecniche dipende dalla localizzazione della massa da biopsiare, che può essere centrale o periferica.

Una lesione centrale può presentarsi come una massa endobronchiale, submucosale o peribronchiale; in questi casi viene biopsiata tramite pinze flessibili standard oppure tramite aghi transbronchiali (TBNA), se la massa si trova in prossimità di una struttura bronchiale viene usata un'ecoendoscopia con TBNA (EBUS-TBNA).

Le lesioni periferiche non sono facilmente raggiungibili tramite broncoscopia, pertanto in questi casi si preferisce procedere con la TTNA, anche se questa si associa ad un maggior rischio di pneumotorace.

Anche i linfonodi possono essere campionati in base alla loro localizzazione attraverso una biopsia ecoguidata in endoscopia transesofagea (EUS), tramite EBUS o tramite una biopsia alla cieca (9).

In caso di sospetto versamento pleurico maligno se la toracentesi è negativa, si raccomanda di ripeterla e/o procedere con una biopsia pleurica, o TC guidata o tramite Videotoroscopia (VATS), perchè nella maggior parte dei casi un versamento pleurico è di origine maligna (40).

L'analisi citologica dell'espettorato è poco costosa e non invasiva, ma ha minor significato diagnostico a causa della scarsa conservazione delle cellule e della maggior variabilità legata alla difficoltà nell'acquistare un campione di buona qualità. Il potere diagnostico di un'analisi citologica dell'espettorato è più alto per i tumori grandi e localizzati centralmente, come il carcinoma squamoso e il carcinoma a piccole cellule.

In generale, i campioni di espettorato non riescono a individuare i piccoli adenocarcinomi (diametro  $\leq 2$  cm) che hanno origine dalle ramificazioni delle vie aeree, come i piccoli bronchi, i bronchioli e gli alveoli. Questo aspetto è diventato più importante perché i cambiamenti nell'esposizione alle sigarette (filtri e diminuzione del contenuto di nicotina) hanno aumentato gli adenocarcinomi e diminuito i carcinomi squamosi.

La specificità per l'analisi citologica dell'espettorato si avvicina al 100%, anche se la sensibilità generalmente è al di sotto del 70%. L'accuratezza dell'esame citologico dell'espettorato aumenta con l'aumentare dei campioni analizzati, per cui sono raccomandate almeno le analisi di tre campioni di espettorato.

La citologia dell'espettorato non è sufficientemente sensibile o accurata per essere inclusa nel *workup* di *routine* di qualsiasi paziente con sospetto di cancro al polmone (9,37).

Il sistema TNM è un mezzo universalmente accettato per definire l'estensione anatomica della malattia neoplastica solida, applicato di *routine* nella pratica clinica per stimare la prognosi e per definire la strategia di trattamento più adeguata nel singolo paziente (41).

Il sistema TNM viene ideato tra il 1940 e il 1950 e nel 2017 è uscita l'VIII edizione, su cui ci si basa attualmente.

La stadiazione risulta utile per la progettazione del trattamento e successivamente per valutarne l'efficacia, per determinare la prognosi del paziente e per lo scambio di informazioni nei vari centri di cura, implementando la conoscenza e quindi la possibilità di elaborare nuove strategie e linee guida (42).

Il sistema TNM si basa sulla valutazione di tre parametri, che sono:

- *T-tumor*: indica l'estensione del tumore primitivo;
- *N-nodes*: presenza/assenza di metastasi ai linfonodi regionali;
- *M-metastasis*: presenza/assenza di metastasi a distanza.

I valori combinati di questi tre parametri permettono, infine, di stadiazione la malattia, distinguendo tra una malattia allo stadio iniziale (stadi I-II), localmente avanzato (stadio III) o avanzato/metastatico (stadio IV), con prognosi ed approccio terapeutico differente.

TABELLA 1 CLASSIFICAZIONE TNM (OTTAVA EDIZIONE)

<b>Classificazione TNM</b>	
<b>T- tumore primitivo</b>	
<b>TX</b>	Il tumore primitivo non può essere definito, oppure ne è provata l'esistenza per la presenza di cellule tumorali nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchiale, ma non è visualizzato con le tecniche per immagini o con la broncoscopia.
<b>T0</b>	Nessuna evidenza di tumore primitivo
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumore di 3 cm o meno di diametro massimo, circondato da parenchima polmonare o pleura viscerale, senza evidenza alla broncoscopia di invasione più prossimale del bronco lobare
<b>T1a(mi)</b>	Adenocarcinoma minimamente invasivo
<b>T1a</b>	Tumore non superiore a 1 cm nella dimensione maggiore
<b>T1b</b>	Tumore superiore a 1 cm ma non superiore a 2 cm nella dimensione maggiore
<b>T1c</b>	Tumore superiore a 2 cm ma non superiore a 3 cm nella dimensione maggiore



<b>T2</b>	Tumore superiore a 3 centimetri ma non superiore a 5 cm, o tumore con una qualunque delle seguenti caratteristiche: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interessamento del bronco principale, ma non della carena;</li> <li>• Invasione della pleura viscerale;</li> <li>• Associazione a polmonite ostruttiva o atelettasia.</li> </ul>
<b>T2a</b>	Tumore superiore a 3 cm ma non superiore a 4 cm nel diametro maggiore
<b>T2b</b>	Tumore superiore a 4 cm ma non superiore a 5 cm nel diametro maggiore
<b>T3</b>	Tumore superiore compreso tra i 5 e i 7 cm nel diametro maggiore o associato a nodulo(i) neoplastici separati nello stesso lobo del tumore primitivo o che invade direttamente una delle seguenti strutture: parete toracica (inclusa la pleura parietale ed i tumori del solco superiore), nervo frenico, pericardio parietale.
<b>T4</b>	Tumore superiore a 7 cm nel diametro maggiore o associato a nodulo(i) separato(i) in un lobo ipsilaterale, ma differente rispetto al lobo del tumore primitivo o che invade direttamente una delle seguenti strutture: diaframma, mediastino, cuore, grandi vasi, trachea, nervo laringeo ricorrente, esofago, corpo vertebrale, carena.
<b>N-linfonodi locoregionali</b>	
<b>NX</b>	I linfonodi regionali non possono essere valutati
<b>N0</b>	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
<b>N1</b>	Metastasi nei linfonodi peribronchiali e/o ilari ipsilaterali e intrapolmonari, incluso il coinvolgimento per estensione diretta
<b>N2</b>	Metastasi nei linfonodi mediastinici e/o sottocarenali ipsilaterali
<b>N3</b>	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, ilari controlaterali, scaleni o sovraclaveari ipsi- o contro-laterali
<b>M-metastasi a distanza</b>	
<b>M0</b>	Assenza di metastasi a distanza
<b>M1a</b>	Noduli tumorali in un lobo controlaterale rispetto al tumore primitivo; tumore con noduli pleurici/pericardici o versamento neoplastico pleurico o pericardico
<b>M1b</b>	Singola metastasi extra toracica
<b>M1c</b>	Multiple metastasi extra toraciche in uno o più organi

TABELLA 2 RAGGRUPPAMENTO IN STADI (OTTAVA EDIZIONE)

<b>Raggruppamento in stadi</b>			
<b>Stadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Stadio IA1</b>	T1a(mi)/T1a	N0	M0
<b>Stadio IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>Stadio IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>Stadio IB</b>	T2a	N0	M0
<b>Stadio IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>Stadio IIB</b>	T1a, b, c T2a, b T3	N1 N1 N0	M0
<b>Stadio IIIA</b>	T1a, b, c T2a, b T3 T4	N2 N2 N1 N0, N1	M0
<b>Stadio IIIB</b>	T1a, b, c T2a, b T3 T4	N3 N3 N2 N2	M0
<b>Stadio IIIC</b>	T3 T4	N3 N3	M0
<b>Stadio IVA</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1a, b
<b>Stadio IVB</b>	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1c

### 1.3 Classificazione istologica: NSCLC e SCLC

I tumori del polmone sono tradizionalmente suddivisi in base all'istotipo in carcinoma non a piccole cellule, NSCLC (*non small cell lung cancer*), e carcinoma a piccole cellule, SCLC (*small cell lung cancer*): il primo rappresenta più dell'80 % dei casi.

Il riconoscimento della diversità del NSCLC ha portato alla sua sottoclassificazione, culminata nelle classificazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2004 e del 2015.

I principali tipi di NSCC includono l'adenocarcinoma, il carcinoma a cellule squamose (SSC) e il carcinoma a grandi cellule (LCC) (43).

Lo SCLC, detto anche microcitoma, è una neoplasia di origine neuroendocrina di alto grado, scarsamente differenziata, con comportamento aggressivo e nella maggior parte dei casi viene trattata in modo non chirurgico.

È tipico dei forti fumatori e se ne riconoscono due sottotipologie: SCLC puro e SCLC combinato, che presenta componenti più tipiche di un NSCLC, come quelle squamose o ghiandolari.

### **1.3.1 Adenocarcinoma**

L'adenocarcinoma rappresenta il 38,5% dei tumori al polmone (il 60% dei NSCLC) ed è il tipo più comune di tumore polmonare primario.

Generalmente forma masse a localizzazione periferica, ma può anche dare una lesione centrale, consolidamento lobare diffuso, distribuzione multinodulare bilaterale e ispessimento pleurico (43).

Per definizione, l'adenocarcinoma polmonare è una neoplasia epiteliale maligna con differenziazione ghiandolare e che produce mucina.

Le cellule dell'adenocarcinoma sono solitamente positive per alcuni marcatori pneumocitici, come il fattore di trascrizione tiroideo (TTF-1) e NapsinA, una proteasi implicata nella produzione di surfactante. Questi marcatori sono espressi in oltre l'85% degli adenocarcinomi e vengono sfruttati per la diagnosi grazie a sensibilità e specificità comprese tra il 70 e il 100% (44).

La sottoclassificazione degli adenocarcinomi secondo la Classificazione WHO del 2021 è rimasta in gran parte invariata rispetto a quella del 2015. Gli adenocarcinomi invasivi sono: MIA (*minimally invasive adenocarcinoma*), adenocarcinoma non mucinoso invasivo, adenocarcinoma mucinoso invasivo, adenocarcinoma colloide, adenocarcinoma fetale, adenocarcinoma di tipo enterico.

Questi si distinguono dalle lesioni precancerose: AAH (iperplasia adenomatosa atipica), con dimensioni  $\leq 5$  mm e AIS (adenocarcinoma in situ), con dimensioni  $\geq 3$  cm senza invasione stromale.

Inoltre, l'adenocarcinoma del polmone può presentare diversi *pattern* di crescita: lepidico, acinare, papillare, micropapillare e solido.

Tra questi, il *pattern* lepidico è associato a una migliore prognosi, il papillare a prognosi intermedia, mentre il solido e il micropapillare sono associati a una cattiva prognosi (45).

### 1.3.2 Carcinoma squamocellulare

Il carcinoma squamoso, noto anche come carcinoma epidermoide, è il secondo istotipo più diffuso di NSCLC e si riscontra nel 20-30% dei casi.

Origina solitamente dalle cellule squamose nella parte centrale del polmone, in un bronco principale o lobare.

Il carcinoma squamocellulare è strettamente correlato al fumo di sigaretta; infatti, la loro incidenza è in calo, probabilmente grazie ai cambiamenti nei comportamenti dei fumatori.

L'esame microscopico mostra cheratinizzazione e ponti intercellulari, con modello di crescita solido e annidato ed esprime marcatori immunoistochimici tipici (43).

Possono essere presenti cheratinizzazioni di singole cellule maligne o di gruppi di cellule, che formano delle perle di cheratina posizionate centralmente alla massa tumorale. Nonostante la cheratinizzazione sia il segno distintivo di questi tumori non è sempre presente; infatti, i carcinomi squamocellulari si dividono ulteriormente in cheratinizzati, non cheratinizzati e basaloidi.

Contrariamente ai sottotipi di adenocarcinoma, tale sottoclassificazione non mostra un'apparente utilità prognostica, tranne che per gli SCC basaloidi, che hanno un profilo molecolare distinto che conferisce resistenza intrinseca alla chemioterapia (45).

Le lesioni precancerose sono la displasia e il carcinoma squamoso in situ.

I marcatori espressi sono p40, p63 e la citocheratina 5/6. P40 e p63 sono espresse dallo strato basale dell'epitelio bronchiale. P40 presenta una sensibilità minore, ma una specificità maggiore rispetto a p63 (44).

### **1.3.3 Carcinoma a grandi cellule**

Il carcinoma a grandi cellule costituisce una minoranza dei casi di NSCLC, rappresentando circa il 3% di tutti i tumori polmonari.

È una neoplasia priva di differenziazione, non mostra aspetti istologici o immunoistochimici tipici delle altre forme di NSCLC. Può essere talvolta positivo alle citocheratine, ma è negativo per TTF1 e p40 e per i marcatori di differenziazione neuroendocrina (46).

Il carcinoma a grandi cellule è solitamente localizzato in periferia, è voluminoso e di aspetto necrotico. Le cellule sono di grandi dimensioni e formano foglietti o nidi (44).

## **1.4 Classificazione molecolare**

Nel 2000, Hanahan e Weinber nell'articolo "*the hallmarks of cancer*" definirono i sei tratti distintivi del cancro: il mantenimento della segnalazione proliferativa, l'elusione dei soppressori della crescita, la resistenza alla morte cellulare, l'immortalità replicativa, l'induzione dell'angiogenesi e l'attivazione dell'invasione e delle metastasi (47).

I progressi degli ultimi decenni hanno permesso di aggiungere a questo elenco altri due segni distintivi: la riprogrammazione del metabolismo energetico e l'elusione della risposta immunitaria (48).

L'ordine con cui queste caratteristiche vengono acquisite appare abbastanza variabile e cambia da tumore a tumore, ma quello che avviene generalmente è la perdita di funzione di geni oncosoppressori (mutazioni LOF) e il guadagno di funzione di geni oncogeni (mutazioni GOF).

Spesso, le mutazioni avvengono in geni codificanti per proteine che hanno un ruolo cruciale per la crescita cellulare o per regolazione

cellulare. Si parla di *oncogene addiction* quando la mutazione *driver* di un gene garantisce un vantaggio di crescita e mantiene il processo tumorale.

Oltre alle mutazioni *driver* se ne accumulano anche altre che non danno un vantaggio selettivo alla cellula tumorale e che vengono chiamate *passanger*; queste sono la risultante dell'instabilità genomica delle neoplasie.

La terapia mira all'eliminazione delle cellule con la mutazione *driver*, in modo da arginare la crescita neoplastica.

La caratterizzazione molecolare delle neoplasie polmonari risulta, quindi, di fondamentale importanza per la possibilità di somministrare al paziente dei trattamenti a bersaglio molecolare specifico, in base all'alterazione che essi presentano.

Le attuali linee guida nazionali AIOM e internazionali sul trattamento del NSCLC raccomandano di analizzare di routine i campioni tumorali dei pazienti per verificare la presenza di mutazioni *driver* nei geni EGFR, ALK, ROS1, BRAF V600E, NTRK1-3, RET, KRAS, MET e l'espressione di PD-L1 mediante immunohistochimica (46).

#### **1.4.1 EGFR**

Il gene EGFR si trova sul braccio corto del cromosoma 7 in posizione 12.

La proteina codificata da questo gene è una glicoproteina transmembrana, la cui attivazione sottende a dei processi di crescita cellulare, sopravvivenza, invasione ed angiogenesi (49).

Fa parte della superfamiglia delle protein-chinasi, protooncogeni, ERBB (HER), che comprendono EGFR (ERBB1), HER2/neu (ERBB2), HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4). Questi geni codificano per recettori di superficie cellulare e presentano un dominio extracellulare per il ligando, una struttura transmembrana e un dominio tirosin chinasi (TK) intracellulare. Il legame del ligando (EGF) al recettore attiva la dimerizzazione e l'autofosforilazione di TK, dando luogo a una cascata di eventi intracellulari con attivazione della via di trasduzione a valle (9).

L'EGFR è sovraespresso nel 40-80% dei casi di NSCLC, ma anche in molti altri tumori epiteliali.

Queste mutazioni si verificano soprattutto a livello degli esoni 18-21, che codificano per una porzione del dominio chinasi dell'EGFR, sono eterozigotiche e l'allele mutato va incontro ad amplificazione nella maggior parte dei casi (50). Il gene mutato codifica per una chinasi costitutivamente attivata, indipendentemente dal legame con il ligando.

Circa il 90% di queste mutazioni si trova nell'esone 19 nelle delezioni da CTG a CGG o nell'esone 21 al nucleotide 25, che comporta la sostituzione della leucina con l'arginina nel codone 858 (L858R).

Le mutazioni dell'EGFR si trovano più spesso nei tumori di donne, di non fumatori e negli adenocarcinomi.

Tuttavia, mutazioni dell'EGFR possono essere riscontrate anche in pazienti con altre caratteristiche clinico patologiche, compresi gli ex fumatori e i fumatori attuali, nonché in altri tipi istologici.

I tumori con mutazioni dell'EGFR sono altamente responsivi al trattamento con gli inibitori della tirosin-chinasi dell'EGFR (EGFR TKIs) come Gefitinib, Erlotinib e l'Afatinib (50).

In aggiunta alle più comuni mutazioni ne esistono di più rare e complesse, spesso resistenti alla terapia target anti-EGFR.

Tra le mutazioni rare quelle maggiormente identificate sono le inserzioni sull'esone 20 di 1-7 amminoacidi tra il C-terminale e l' $\alpha$ -C-elica, oppure la mutazione puntiforme S768I sempre a livello della  $\alpha$ -C-elica.

L'esone 21 può essere interessato, invece, dalla mutazione puntiforme L861Q (che interessa l'*attivazione loop* di EGFR).

Ancora più rare sono le mutazioni sull'esone 18, come delezioni e la mutazione puntiforme E709X, o le inserzioni sull'esone 19.

Infine, si possono verificare duplicazioni della regione chinasi, che riguardano gli esoni 18-25 o 18-26.

Le mutazioni complesse, invece, possono essere delle combinazioni di mutazioni classiche (L858R o ExDel19) e mutazioni rare, oppure

combinazione di diverse mutazioni rare o ancora combinazione delle due mutazioni classiche.

I pazienti che presentano queste tipologie di alterazioni hanno dimostrato una buona risposta agli immunoterapici (51).

#### **1.4.2 BRAF**

BRAF è una serina/treonina chinasi che fa parte della via RAS/MAPK e contribuisce alla trasmissione di segnali di proliferazione, differenziazione, migrazione e apoptosi.

Il gene che codifica per BRAF è situato sul braccio lungo del cromosoma 7 in posizione 34 (52), ed è un oncogene.

Le mutazioni di BRAF sono presenti nell'1-4% dei tumori del polmone, mentre sono molto più comuni in altre neoplasie, come, ad esempio, nel melanoma (50-70%) (53).

Le alterazioni più frequenti sono a livello del dominio chinasi: la V600E (sostituzione di una valina con glutammato) sull'esone 15, la G469A sull'esone 11 e la D594G sull'esone 15 (54).

La mutazione V600E è tipica del melanoma e si verifica meno spesso nel tumore al polmone. Inoltre, è una mutazione mutualmente esclusiva con le mutazioni di EGFR e KRAS.

Le mutazioni di BRAF si riscontrano più frequentemente negli adenocarcinomi, in fumatori attuali o ex fumatori.

In questi pazienti è stata dimostrata l'efficacia di farmaci come Vemurafenib e Dabrafenib, inibitore specifico di BRAF mutato V600E. Anche la combinazione di Trametinib e Dabrafenib ha dimostrato un beneficio clinico in pazienti V600E-mutati (50).

#### **1.4.3 ROS1**

Il protooncogene ROS1 si trova sul braccio lungo del cromosoma 6 in posizione 22, e fa parte della famiglia dei geni tirosin-chinasi del recettore dell'insulina, che può funzionare come recettore di fattori di crescita o di differenziazione cellulare.

I riarrangiamenti di ROS1 danno origine a proteine di fusione costitutivamente attive e sono rilevati in circa l'1-2% dei NSCLC (55),



specialmente nell'adenocarcinoma, nei non fumatori, nei fumatori lievi e nei pazienti giovani (>50 anni) (50).

Sono mutazioni mutualmente esclusive rispetto alle mutazioni di EGFR, KRAS e ALK (56).

Il riarrangiamento di ROS1 è un fattore predittivo di risposta a Crizotinib e ad altri inibitori tirosin-chinasici di generazioni più recenti come Lorlatinib, a prescindere dal tipo di riarrangiamento che presentano (57).

#### 1.4.4 ALK

ALK è la chinasi del linfoma anaplastico ed è un recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica, coinvolto nello sviluppo neuronale del sistema nervoso centrale.

Il gene ALK si trova sul braccio corto del cromosoma 2 in posizione 23 (58).

Il coinvolgimento di ALK nei tumori è stato originariamente scoperto a seguito di traslocazioni cromosomiche che portavano alla produzione di proteine di fusione costituite dal dominio chinasico C-terminale di ALK e le porzioni N-terminali di altri geni (50).

La traslocazione di ALK è stata identificata in circa il 3-7% dei tumori polmonari (59).

La nucleofosmina (NPM) è il principale *partner* di fusione di ALK e rappresenta l'80% delle sue traslocazioni, ma sono stati identificati almeno altri sei *partner* di fusione (60).

Nel NSCLC, le varianti di fusione di ALK più comuni coinvolgono porzioni del gene EML4. EML4-ALK è un gene di fusione aberrante che codifica una proteina chimerica citoplasmatica costitutivamente attiva (50).

Le fusioni EML4-ALK si riscontrano più comunemente in pazienti giovani che non hanno mai fumato o che hanno una storia di fumo lieve e in pazienti con adenocarcinomi con pattern di crescita acinare. Nella maggior parte dei casi, i riarrangiamenti di ALK sono mutualmente esclusivi rispetto alle mutazioni di EGFR e KRAS (60).

A livello farmacologico a fusione di ALK è targettabile con inibitori selettivi come Crizotinib, tuttavia si sono sviluppate resistenze al farmaco per cui sono stati elaborati farmaci di seconda generazione come Alectinib e Ceritinib, e farmaci di terza generazione, come Lorlatinib (50).

Le mutazioni di resistenza sono a carico del gene ALK e sono dovute a sostituzioni di basi azotate, che risultano in una sostituzione amminoacidica: le due mutazioni riconosciute più spesso sono la C1156Y (sostituzione di cisteina con tirosina) e la L1196M (sostituzione di leucina con metionina) (60).

#### **1.4.5 NTRK**

NTRK è un recettore ad attività tirosin-chinasi della superfamiglia dei recettori TRK (*tropomyosin-related kinases*), codificato dal gene NTRK1, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 (61).

La sua azione è volta al controllo della crescita e alla differenziazione cellulare attraverso la MAPK, la PI3K e PLC-gamma, quando attivata dal suo ligando NGF (*nerve growth factor*) (62).

Fusioni di NTRK sono state riscontrate nel 3,3% dei pazienti con adenocarcinoma del polmone, ma anche nel cancro del colon, della tiroide e nel glioblastoma multiforme (63).

Le fusioni di NTRK1 portano ad una sua attivazione costitutiva attraverso autofosforilazioni.

L'importanza delle fusioni NTRK1 sta nel fatto che i pazienti rispondono bene ad alcuni inibitori di tirosin chinasi, come ad esempio Entrectinib (50).

#### **1.4.6 Altre mutazioni**

Altre alterazioni molecolari recentemente riscontrate nell'adenocarcinoma, per le quali vi sono terapie target efficaci disponibili nel contesto di studi clinici e/o programmi uso compassionevole/accesso allargato, sebbene non ancora approvati e rimborsati in Italia, includono: i riarrangiamenti dei geni RET (1-2%), le mutazioni che causano una maturazione aberrante del trascritto a

livello dell'esone 14 di MET (1-2%), la mutazione G12C dell'esone 2 del gene KRAS (11%) e le mutazioni attivanti del gene HER2 (2%) . L'amplificazione di FGFR1, le mutazioni a carico del gene PI3KCA e di PTEN, l'amplificazione e la mutazione di PDGFR, nonché le mutazioni di DDR2 sono invece alterazioni molecolari che potrebbero avere in futuro implicazioni terapeutiche nel carcinoma squamoso (41).

In dettaglio:

- KRAS è un oncogene localizzato sul braccio corto del cromosoma 12, che codifica per la proteina omonima coinvolta nella regolazione della divisione cellulare della via RAS/MAPK. Le mutazioni puntiformi del gene KRAS sono state rilevate in circa il 15-25% dei pazienti con adenocarcinoma polmonare. Le alterazioni di KRAS sono associate a tumori di ex-fumatori, fumatori correnti e più raramente non fumatori. KRAS è un importante predittore di resistenza ai TKI anti-EGFR, poiché agisce nella *pathway* a valle di EGFR.

Qualsiasi mutazione attivante KRAS rende costitutivamente attiva la via segnale, a prescindere dallo stato di inibizione di EGFR (64).

- Il gene MET codifica per un recettore con attività tirosin-chinasica, coinvolto in diversi processi fisiologici di proliferazione, motilità, invasione e sopravvivenza (65).

Il gene MET è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7, in posizione 31 e può presentare mutazioni attivanti o può essere amplificato, soprattutto a livello dell'esone 14. Nel NSCLC, la sovraespressione della proteina MET nel tessuto tumorale è stata associata a un più alto stadio patologico del tumore e a una prognosi peggiore. I pazienti con questa mutazione possono rispondere a Capmatinib e a Tepotinib (50).

- HER2, noto anche come ERBB2, NEU è un recettore tirosin chinasico della famiglia EGFR e svolge un ruolo importante nella crescita, nella differenziazione e nella sopravvivenza cellulare. Il gene di HER2 è localizzato sul cromosoma 17 (66).

La proteina HER2, a differenza delle altre della stessa famiglia, non ha un proprio dominio di legame, ma eterodimerizza con altri membri della famiglia, che invece legano un ligando, stabilizzando il legame e potenziando l'attività chinasi a valle. In circa il 5% del NSCLC sono state riportate mutazioni attivanti HER2, specie in pazienti di etnia asiatica, sesso femminile, non fumatori, con adenocarcinoma con *pattern* di crescita lepidico (67).

Tuttavia, le mutazioni di HER2 possono essere riscontrate anche in altre pazienti con NSCLC, compresi gli ex fumatori e i fumatori attuali. Le mutazioni sono soprattutto duplicazioni, inserzioni o amplificazioni, specialmente a livello dell'esone 20. Gli inibitori di HER2 presentano un'attività modesta sui tumori polmonari, specie se confrontata a quella di altri farmaci diretti contro diversi *target* molecolari (50).

- Il gene RET si trova sul braccio lungo del cromosoma 10 e codifica per una tirosin-chinasi coinvolta nella proliferazione, nella migrazione e nella differenziazione cellulare (68). Le mutazioni puntiformi e le fusioni di RET sono conosciute da tempo nei carcinomi della tiroide, ma sono state scoperte di recente anche nei NSCLC. Sono stati identificati riarrangiamenti di RET nell'1-2% dei NSCLC, in pazienti fumatori, giovani (<60 anni) e soprattutto negli adenocarcinomi più scarsamente differenziati (69).

I riarrangiamenti di RET sono di solito mutuamente esclusivi con alterazioni genetiche in altri *driver* oncogeni, come EGFR, KRAS, ALK e ROS1 (50). Il riarrangiamento di RET è predittivo di risposta a RETinibitori come Pralsetinib o Selpercatinib.

#### 1.4.7 PD-L1

PD-L1 è una molecola chiave nell'immunoregolazione tumorale: attraverso l'interazione col suo recettore, PD-1, inibisce la risposta citotossica dei linfociti T CD8+ e conseguentemente la risposta

immunitaria antitumorale permettendo alla neoplasia di crescere e metastatizzare.

A differenza delle alterazioni genomiche *driver*, che dovrebbero essere presenti in tutte le cellule tumorali, l'espressione della proteina PD-L1 è spesso eterogenea all'interno di un tumore e potrebbe essere dinamica o influenzata da precedenti trattamenti (45). L'inibizione di checkpoint immunitari come PD-L1 può scatenare il sistema immunitario contro le cellule tumorali.

Sono stati sviluppati anticorpi molecolari diretti contro PD-1, come Pembrolizumab e Nivolumab, e contro PD-L1, come Atezolizumab e Durvalumab. PD-L1 è un fattore predittivo di risposta all'immunoterapia.

Pembrolizumab è approvato in prima linea nei pazienti non *oncogene addicted* che presentano dei livelli di espressione di PD-L1 > 50% (si valuta il numero di cellule neoplastiche che esprimono PD-L1 in un campione di 100 cellule), mentre sono eleggibili al trattamento con l'immunoterapico quei pazienti che hanno un livello di espressione di almeno l'1% (50).

## **2. Strategia terapeutica per NSCLC in stadio avanzato**

La scelta del trattamento di prima linea per NSCLC in stadio avanzato si basa sulla valutazione di diversi parametri: istologia, presenza di mutazioni driver (EGFR, ALK, ROS1, BRAF), livello di espressione di PD-L1, caratteristiche cliniche del paziente, comorbidità e Performance Status (PS).

In caso di una malattia *oncogene-addicted*, la terapia di prima linea sarà una terapia a bersaglio molecolare specifica per la mutazione, la cui ricerca è consigliata dalle linee guida nazionali e internazionali.

In Italia sono ad oggi approvati e rimborsati farmaci inibitori tirosin-chinasici di EGFR, ALK, ROS1, BRAF e NTRK. (70)

Gli TKI anti EGFR, come Gefitinib, Erlotinib, Osimertinib e Afitinib vengono usati per NSCLC in stadio avanzato e con mutazioni classiche di EGFR.

La scelta terapeutica di prima linea nel caso di riarrangiamenti di ALK è data da TKI anti-ALK, come Alectinib, Crizotinib, Ceritinib e Brigatinib.

Per i riarrangiamenti di ROS1 l'unico farmaco approvato e rimborsato in Italia è Crizotinib, ma sono attualmente oggetto di studio anche Lorlatinib, Entrectinib e Repotrectinib.

Per i pazienti con la mutazione V600 di BRAF, le linee guida consigliano la combinazione Dabrafenib/Trametenib.

Nei pazienti con NSCLC avanzato non *oncogene addicted* attualmente la scelta del trattamento si basa principalmente sull'istologia, sulle condizioni generali del paziente e sue comorbidità, e sul livello di espressione di PD-L1.

In questi casi le linee guida AIOM consigliano la valutazione del livello di espressione di PD-L1:

- PD-L1 $\geq$ 50%, l'indicazione di prima linea è l'immunoterapia con Pembrolizumab o con Atezolizumab;
- 1%>PD-L1< 50%, l'indicazione di prima linea è una combinazione di Pembrolizumab/Pemetrexed e chemioterapici a base di platino nell'istologia non squamosa, e Carboplatino, Paclitaxel o Nabpaclitaxel e Pembrolizumab nell'istologia squamosa.

Nei pazienti affetti da NSCLC localmente avanzato o metastatico con controindicazioni assolute o relative (PD-L1 <1%) a un trattamento immunoterapico, la terapia di prima linea prevede la chemioterapia con schemi a base di platino.

### **3. Immunoterapia e chemio-immunoterapia**

La crescita e la diffusione del cancro non dipendono solo dalle caratteristiche delle cellule tumorali, ma sono anche influenzate dall'interazione con il sistema immunitario (71).

Da tempo è noto che il sistema immunitario e le cellule maligne coesistono in un equilibrio dinamico e che il rapporto tra i due può determinare il decorso della malattia (72): alcuni tipi di risposte infiammatorie possono promuovere la crescita tumorale, altre possono potenzialmente eliminare le cellule neoplastiche.

La teoria della sorveglianza immunitaria stabilisce che le cellule del sistema immunitario forniscono una continua e ampia sorveglianza dell'intero organismo e sono proattivamente in grado di eliminare le cellule anormali che esprimono antigeni alterati, ovvero i neoantigeni tumorali. Il fumo di tabacco, ad esempio, con la sua azione cancerogena, induce numerose mutazioni sul DNA delle cellule esposte, creando moltissimi neoantigeni, che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario. Dunque, i tumori nei pazienti fumatori o ex fumatori sono maggiormente immunogenici rispetto a quelli dei non fumatori.

Il sistema immunitario, però, viene indebolito dal tumore stesso mediante l'*immunoediting*, processo dinamico avviato dalle cellule tumorali in risposta all'immunosorveglianza del sistema immunitario.

L'*immunoediting* comprende tre fasi: eliminazione, equilibrio e fuga.

Nella fase di eliminazione le cellule tumorali sono identificate e distrutte efficacemente dal sistema immunitario. L'eliminazione delle cellule maligne da parte dei linfociti T CD8+ è un processo complesso e suddiviso in fasi, ognuna delle quali può essere regolata per rafforzare o ridurre l'intensità della risposta immunitaria. I neoantigeni tumorali vengono riconosciuti come non-self dalle cellule presentanti l'antigene, APC, che a loro volta li presenteranno ai linfociti del linfonodo drenante. Nel linfonodo avviene il riconoscimento da parte del TCR delle cellule T del complesso MHC-neoantigene delle APC; inoltre, il linfocita riceve dei segnali co-stimolatori per la sua attivazione e proliferazione. In seguito alla proliferazione dei linfociti T-tumore specifici e alla loro fuoriuscita dal linfonodo, queste cellule

raggiungono il tumore e incontrano una serie di meccanismi di immunosoppressione locale. Infine, le cellule T attivate attaccano le cellule tumorali e si generano le cellule della memoria, importanti per il controllo delle micrometastasi (73).

Nella fase di equilibrio il sistema immunitario non è in grado di eliminare completamente tutte le cellule tumorali, ma è in grado di controllare o prevenire ulteriori crescite. Nella fase di fuga il sistema immunitario non è più in grado di eliminare e controllare la crescita del tumore perché le cellule maligne, sotto la pressione selettiva esercitata dall'immunità stessa, hanno acquisito la capacità proliferare e diffondersi, eludendo le difese dell'organismo.

Per prevenire eventuali danni indesiderati ai tessuti circostanti causati dalle cellule T attivate, il sistema immunitario ha sviluppato dei checkpoint inibitori che modulano la durata e l'ampiezza della risposta immunitaria, ad esempio up-regolando i recettori co-inibitori.

Le cellule tumorali si sono evolute creando molteplici meccanismi, come i difetti nella presentazione dell'antigene, l'up-regolazione di vie regolatorie inibitorie e il reclutamento di popolazioni cellulari immunosoppressive, per sfuggire alla sorveglianza immunitaria (74).

Sarà l'equilibrio tra segnali co-stimolatori e co-inibitori a dettare il destino delle cellule T attivate.

L'obiettivo dell'immunoterapia è quello di potenziare o ripristinare la capacità del sistema immunitario di rilevare e distruggere le cellule tumorali superando i meccanismi con cui eludono e sopprimono la risposta immunitaria (75).

La chemio-immunoterapia, ovvero l'associazione tra chemioterapia e immunoterapia, rappresenta un'opzione terapeutica emergente; il rationale di questa terapia sta nel fatto che l'effetto citotossico della chemioterapia cambia anche l'assetto molecolare della cellula tumorale, facilitando, dunque, l'azione dell'immunoterapia.

### **3.1 Immunoterapia**



Il fatto che un'infezione batterica acuta possa indurre la regressione di un tumore è noto da centinaia di anni, ma solo nel 1861 il dottor William B. Coley descrisse l'uso dell'immunoterapia per il trattamento delle neoplasie.

Coley ipotizzò che un'infezione attorno al sito del tumore potesse indurre una reazione citotossica diretta, ed utilizzò quella che poi venne definita "tossina di Coley", un vaccino streptococcico, per trattare una serie di malattie maligne (76).

Decenni dopo, sono state elaborate le terapie con virus oncolitici, che sfruttano virus geneticamente modificati per infettare le cellule tumorali, stimolando così un ambiente pro infiammatorio e aumentando l'immunità antitumorale sistemica (77).

Nel corso degli anni sono stati tentati diversi approcci all'immunoterapia, come l'aumento del numero di cellule T tumore specifico attraverso la somministrazione di vaccini antitumorali, la somministrazione di citochine (IL-2), il trasferimento adottivo di linfociti infiltranti il tumore (TIL), il miglioramento della presentazione dei neoantigeni o ancora l'attivazione dell'immunità innata nel microambiente tumorale con IFN e con agonisti del recettore TLR (77).

Recentemente, grazie ad una migliore comprensione dei meccanismi di regolazione immunitaria, mediata dall'antigene associato ai linfociti T citotossici (CTLA4) e dal recettore di morte programmata (PD-1) con il suo ligando (PD-L1), sono state sviluppate nuove terapie in grado di modulare i checkpoint immunologici.

Gli inibitori dei checkpoint immunologici sono stati progettati per rinvigorire le risposte immunitarie antitumorali, interrompendo le vie di segnalazione co-inibitorie e per promuovere l'eliminazione immunomediata delle cellule maligne (75).

### **3.1.1 Inibizione di CTLA-4**

La proteina antigene-4 dei linfociti T citotossici (CTLA-4) è il primo checkpoint immunologico ad essere stato testato con successo come bersaglio di immunoterapia (78).

È espressa sulla superficie delle cellule T attivate e la sua azione consiste nel down-regolare l'attivazione dei linfociti T, competendo con il segnale co-stimolatorio di CD28 per il legame a B7. Infatti, sia CTLA-4 che CD28 legano CD80, ma CTLA-4 ha una maggiore affinità per il ligando, limitando in questo modo la risposta delle cellule T.

Gli anticorpi contro CTLA-4 bloccano l'inibizione dell'attivazione delle cellule T CD28/B7 e prolungano l'attività antitumorale (79).

Ipilimumab è un anticorpo monoclonale completamente umanizzato, il primo checkpoint inhibitor ad essere stato approvato dalla FDA, che si lega a CTLA-4 e gli impedisce di legarsi al suo ligando (71); un altro anticorpo anti-CTLA4 del tutto simile al precedente è Tremelimumab. Una review, pubblicata nel 2022 per il decimo anniversario dell'approvazione di Ipilimumab da parte delle FDA, ricalca le tappe fondamentali degli studi che lo riguardano (80).

I primi studi clinici su Ipilimumab hanno testato infusioni a singola dose di 3mg/kg, in pazienti con melanoma, tumore ovarico e cancro alla prostata, ma le risposte significative e durature sono state osservate in uno studio successivo multidose in pazienti con melanoma, che combinava 3 mg/kg di Ipilimumab ogni tre settimane con due vaccini peptidici per l'antigene di differenziazione dei melanociti, gp100 (81).

Queste prime risposte antitumorali hanno dato il via a una serie di studi sul melanoma, che prevedevano anche combinazioni con una serie di altri metodi terapeutici. In questi studi si è notato che la comparsa di nuove lesioni o l'aumento di dimensioni di lesioni precedenti non sempre indicava il fallimento del trattamento, e che alcune di queste lesioni si riducevano o scomparivano con il proseguimento dello stesso trattamento. Per questo motivo sono stati elaborati nuovi criteri per la valutazione clinica dell'attività di Ipilimumab, diversi dai classici RECIST (*response evaluation criteria in solid tumors*) poi estendibile alle altre immunoterapie. Questi criteri prendono il nome di irRC (*immune-related response criteria*) (82).

Il piano iniziale per la ricerca dell'approvazione si basava, però, sui criteri di risposta convenzionali utilizzati per terapie antitumorali non immunitarie.

Tale piano, preparato in consultazione con la FDA, prevedeva tre diversi studi di fase II. Tra il 2007 e il 2008 due di questi studi non hanno soddisfatto i criteri precedentemente definiti e questo ha portato a rivedere il piano per l'approvazione. I nuovi studi richiesti per l'approvazione furono due studi randomizzati di fase III: il primo di questi prevedeva una divisione dei pazienti in tre bracci, trattati con Ipilimumab, con e senza peptide gp100, e peptide gp100 da solo e ha dimostrato un aumento della sopravvivenza globale mediana di circa 4 mesi dei pazienti trattati con Ipilimumab rispetto al controllo trattato con solo peptide gp100.

Gli eventi avversi sono stati osservati nel 10-15% dei pazienti nei gruppi Ipilimumab contro il 3% dei pazienti del gruppo peptidico.

Questi risultati hanno portato all'approvazione di Ipilimumab per il trattamento del melanoma metastatico nel marzo 2011.

Oltre alla nuova attività antitumorale di Ipilimumab, il suo sviluppo clinico ha portato anche alla luce una serie di nuovi effetti collaterali, definiti IRAE (*immune-related adverse events*). Gli IRAE di Ipilimumab si concentrano per lo più sulla pelle, sul colon e sul sistema endocrino, ma possono colpire anche altri organi (83).

### 3.1.2 Inibizione di PD-1 e PD-L1

PD1 (*programmed death receptor 1*) è un recettore transmembrana *checkpoint* immunitario espresso dai linfociti T (CD4+ e CD8+) attivati, ma anche sui linfociti B, sui NK, sui macrofagi e sulle cellule dendritiche.

L'interazione con i suoi ligandi, le proteine transmembrana PD-L1 e PD-L2 (proteine *B7-like*) espresse sulle cellule tumorali, sui linfociti T regolatori (CD4+,CD25+) e sui linfociti infiltranti il tumore, induce una regolazione negativa dei linfociti attivati nei tessuti periferici (84): i tumori possono sfruttare questo *checkpoint* e rendere i TIL incapaci di eliminarli.

PD-L1 è espresso sulle cellule tumorali di circa il 50 % dei NSCLC e la sua espressione contribuisce ad una prognosi sfavorevole, poiché

sopprime la funzione delle cellule T (85), ed è associata ad un aumento della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule tumorali, oltre che ad un aumento dell'apoptosi dei linfociti.

L'espressione di PDL1 può essere regolata attraverso meccanismi intrinseci ed estrinseci: i più comuni meccanismi intrinseci sono legati alla disregolazione di cascate di segnalazione derivanti da specifiche mutazioni oncogeniche, come EGFR, mentre i meccanismi estrinseci riguardano le risposte all'infiammazione attraverso la segnalazione di IFN-gamma, che deriva sia dalle cellule immunitarie del microambiente tumorale che dalle cellule tumorali stesse (80).

Oltre che nel tumore al polmone, PD-L1 è up-regolato in diversi tumori solidi, tra cui il melanoma e i tumori ovarici.

Il blocco di PD1 impedisce l'interazione PD1 e PDL1, incrementando la risposta delle cellule T e modulando l'attività anti-tumorale (86).

Gli anticorpi monoclonali Nivolumab e Pembrolizumab sono IgG4 umanizzati che legano PD-1 inibendo la sua interazione con i ligandi PD-L1 e PD-L2. Il legame con PD-1 non impegna i recettori Fc e non attiva il complemento, pertanto sono privi di attività citotossica.

Pembrolizumab è stato testato clinicamente in una serie di studi KEYNOTE per l'utilizzo nella terapia del NSCLC avanzato.

Lo studio KEYNOTE-001 (87) è uno studio multicorte, aperto, di fase I in cui 550 pazienti con NSCLC in stadio avanzato o metastatico (101 mai trattati in precedenza e 449 precedentemente trattati) sono stati trattati con pembrolizumab a 10 mg/kg ogni 2-3 settimane. Il tasso di risposta obiettiva (ORR) è stato del 19,4%, leggermente maggiore nei pazienti *naïve* al trattamento. La durata mediana della risposta è stata di 12,5 mesi, significativamente maggiore, 23,3 mesi, per i pazienti *naïve* alla terapia rispetto a 10,4 mesi per i pazienti precedentemente trattati. La PFS mediana era di 3,7 mesi per tutti i pazienti e l'OS mediana di 12 mesi, entrambe per tutti i pazienti.

Con questo studio si è inoltre stabilito il *cutoff* di espressione di PDL1  $\geq 50\%$  come potenziale biomarcatore per prevedere le risposte a Pembrolizumab: per i pazienti con PD-L1  $\geq 50\%$  l'ORR era di 45,2%,

per i pazienti con PD-L1 compreso tra 1 e 49% l'ORR era del 16,5%, mentre se PDL1 < 1% l'ORR risultava del 10,7%.

Lo studio KEYNOTE-010 (88) è uno studio randomizzato, in aperto, di fase II/III in cui si è voluto testare l'uso di Pembrolizumab rispetto a quello di Docetaxel in pazienti NSCLC precedentemente trattati, con espressione di PD-L1 almeno superiore all'1%. I 1304 pazienti reclutati sono stati assegnati in modo casuale a ricevere in uno schema trisettimanale Pembrolizumab 2 mg/kg, Pembrolizumab 10 mg/kg o Docetaxel 75 mg/m<sup>2</sup> ogni tre settimane.

Tutti i pazienti erano *naïve* al Docetaxel e i trattamenti precedenti comprendevano la chemioterapia a base di platino e/o un'appropriata terapia *target*. Tra gli *endpoint* primari c'erano OS e PFS dell'intera coorte, risultate rispettivamente significativamente superiore nei gruppi Pembrolizumab e comparabile per i tre gruppi, e in secondo luogo OS e PFS nei pazienti con PD-L1 ≥ 50%, entrambe significativamente aumentate.

Nello studio gli eventi avversi si sono verificati nel 63% dei pazienti trattati con Pembrolizumab 2 mg/kg, nel 66% dei pazienti con Pembrolizumab 10 mg/kg e nell'88% dei pazienti con Docetaxel, e inoltre gli eventi avversi di grado elevato (3-5) si sono sviluppati molto più frequentemente nel gruppo Docetaxel rispetto che negli altri due. Gli effetti collaterali legati all'immunità si sono verificati nel 20% dei pazienti trattato con Pembrolizumab, quasi tutti di grado 1-2, fatta eccezione per alcune polmoniti, di cui due mortali, e alcune reazioni cutanee di grado 3.

Questi risultati hanno dimostrato che Pembrolizumab ha prolungato la OS e la PFS nel NSCLC precedentemente trattato, con PDL1 come valido biomarcatore per predire la risposta. Lo studio KEYNOTE-024 (89) è un trial di fase III randomizzato in aperto, multicentrico, condotto su 305 pazienti affetti da NSCLC metastatico, senza mutazione di EGFR o riarrangiamento di ALK, con espressione di PD-L1 ≥ 50%, e con *performance status* di 0-1. Lo studio voleva valutare una terapia con Pembrolizumab (200mg e.v. ogni tre settimane fino a 35 cicli) confrontata con un regime chemioterapico standard. La terapia con

Pembrolizumab ha dimostrato un incremento significativo della PFS (*endpoint* primario) e dell'OS (*endpoint* secondario) nei pazienti trattati con Pembrolizumab rispetto a quelli trattati con chemioterapia standard. Pembrolizumab ha, inoltre, incrementato le risposte obiettive e la durata della risposta. Nel complesso, il profilo di tollerabilità è stato più favorevole per il Pembrolizumab rispetto alla chemioterapia, sia per quanto riguarda l'incidenza di eventi avversi di qualsiasi grado, che gli eventi avversi di grado 3-5. Lo studio randomizzato di fase III, "KEYNOTE-042" (90), ha valutato l'efficacia della mono-immunoterapia con Pembrolizumab rispetto alla chemioterapia standard di I linea in pazienti affetti da NSCLC avanzato di qualsiasi istologia, con espressione di PD-L1  $\geq 1\%$ . Lo studio ha dimostrato un vantaggio statisticamente significativo in termini di OS (*endpoint* primario) in favore di Pembrolizumab in tutti i sottogruppi, un profilo di tossicità migliore rispetto alla chemioterapia in termini di incidenza di eventi avversi correlati al trattamento, ad eccezione degli eventi avversi immuno-correlati che, come atteso, sono stati più frequenti nel braccio del Pembrolizumab. Non sono però emerse differenze significative in termini di OS tra i due bracci per i pazienti con PD-L1 1%-49%, suggerendo che il beneficio osservato con Pembrolizumab nell'intera popolazione in studio sia determinato principalmente dal vantaggio ottenuto dall'immunoterapia nei pazienti con espressione di PD-L1  $\geq 50\%$ .

Nivolumab è stato il primo inibitore di PD-1 a dimostrare un'attività clinicamente significativa nel NSCLC.

Nivolumab è approvato negli Stati Uniti, nell'Unione Europea e in altri Paesi per il trattamento di seconda linea del NSCLC avanzato, sulla base di un miglioramento della sopravvivenza globale (OS) e di un profilo di sicurezza favorevole rispetto al Docetaxel in due studi randomizzati, in aperto, di fase III nel NSCLC avanzato squamoso, CheckMate 017 (91), e non squamoso CheckMate 057 (92), con progressione della malattia dopo chemioterapia a base di platino.

CheckMate 017 e CheckMate 057 sono stati studi internazionali, randomizzati, in aperto, di fase III, in cui i pazienti sono stati assegnati in modo casuale 1:1 a ricevere Nivolumab (3 mg/kg una volta ogni 2 settimane) o Docetaxel (75 mg/m<sup>2</sup> una volta ogni 3 settimane) in entrambi gli studi. Il trattamento è proseguito fino a progressione della malattia o in caso di tossicità inaccettabile.

Un follow up a 5 anni dagli studi Checkmate-017 e -057 (93) dimostra che i tassi di OS a cinque anni in *pool* sono stati rispettivamente del 13,4% contro il 2,6%; i tassi di PFS a cinque anni sono stati rispettivamente dell'8% contro lo 0%. I pazienti trattati con Nivolumab senza progressione della malattia a 2 e 3 anni avevano rispettivamente l'82,0% e il 93,0% di probabilità di sopravvivenza e il 59,6% e il 78,3% di rimanere liberi da progressione a 5 anni.

Atezolizumab è, invece, il primo anticorpo diretto contro PDL1 ad entrare in clinica; è un IgG1 umana ingegnerizzata diretta contro il ligando L1 del recettore PD-1: legandosi a PD-L1 ne impedisce l'interazione con i recettori. In tal modo, Atezolizumab sblocca l'inibizione della risposta immunitaria antitumorale, senza alcuna induzione della citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente. Atezolizumab non interferisce con l'interazione tra L2 e PD-1, consentendo la persistenza dei segnali inibitori mediati da L2. Gli anticorpi anti-PD1 e anti-PDL1 agiscono in maniera differente ed è inoltre evidente che lavorino di concerto, ma non è ancora stato condotto nessuno studio a riguardo (80).

Lo studio randomizzato di fase 3 "IMpower110" (94) ha confrontato la terapia con Atezolizumab e la chemioterapia standard nella prima linea di trattamento di pazienti affetti da NSCLC avanzato, di qualsiasi istologia, con espressione di PD-L1  $\geq 1\%$ . I risultati dello studio, recentemente aggiornati, hanno confermato un vantaggio statisticamente significativo e clinicamente rilevante in termini di OS (*endpoint* primario) in favore di Atezolizumab nell'analisi condotta nel sottogruppo di pazienti con espressione di PD-L1  $\geq 50\%$ . Atezolizumab è risultato, inoltre, essere meglio tollerato rispetto alla

chemioterapia con eventi avversi immuno-correlati solitamente di basso grado.

Lo studio "IMpower131" (95), invece, è uno studio di fase III in aperto che ha randomizzato pazienti con diagnosi di NSCLC ad istologia squamosa in tre bracci, a cui venivano somministrati Atezolizumab + Carboplatino + Paclitaxel, Atezolizumab + Carboplatino + Nab-paclitaxel, oppure Carboplatino + Nab-paclitaxel, per 4-6 cicli. La PFS dei pazienti trattati con Atezolizumab in aggiunta alla chemioterapia a base di Carboplatino + Paclitaxel è aumentata, mentre l'OS non ha mostrato differenze statisticamente significative.

Lo studio POPLAR (96) è uno studio di fase 2 randomizzato in aperto, multicentrico, condotto su 287 pazienti affetti da NSCLC, in stadio IIIB o IV, precedentemente trattati con una o due linee di chemioterapia e con *performance status* di 0-1.

I pazienti sono stati randomizzati 1:1 a ricevere Atezolizumab (1200 mg ev) o Docetaxel (75 mg/mq), ogni tre settimane.

Gli *endpoints* primari dello studio erano la OS di tutta la popolazione e nei sottogruppi di espressione PD-L1. La OS mediana è stata significativamente maggiore per Atezolizumab rispetto a Docetaxel nella popolazione complessiva e aumenta nei sottogruppi di espressione di PD-L1 all'aumentare del livello di espressione. In termini di PFS e RR non vi erano differenze significative tra i due bracci, se non per qualche variazione tra i sottogruppi di espressione di PD-L1.

Atezolizumab è risultato meglio tollerato di Docetaxel, con una minor incidenza di eventi avversi di grado 3-4 correlati al trattamento.

In Italia, sulla base di questi studi e delle linee guida internazionali:

- a. Nivolumab (alla dose flat di 240 mg e.v. in 60 minuti ogni due settimane) è approvato per il trattamento del NSCLC avanzato dopo una precedente chemioterapia, indipendentemente dall'espressione di PD-L1;
- b. Pembrolizumab è approvato alla dose di 200 mg e.v. in 30 minuti ogni 2 settimane in prima linea in caso di



NSCLC avanzato se PD-L1 $\geq$ 50%, o in seconda linea alla dose di 2 mg /kg dopo almeno una precedente chemioterapia e con PD-L1  $\geq$  1%.

Pembrolizumab può essere utilizzato in prima linea anche nei pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato con espressione di PD-L1 < 50% e con buon *performance status* (0-1), in associazione a platino e pemetrexed, seguito da una terapia di mantenimento con pemetrexed e pembrolizumab in caso di risposta o stabilità di malattia dopo 4 cicli di trattamento;

- c. Atezolizumab (alla dose flat di 1200 mg ev ogni tre settimane) è approvato per il trattamento del NSCLC avanzato dopo una precedente chemioterapia, indipendentemente dall'espressione di PD-L1 (i pazienti positivi per EGFR o ALK devono aver ricevuto anche una terapia a bersaglio molecolare prima di ricevere atezolizumab). È possibile utilizzare atezolizumab anche in prima linea in caso di PD-L1  $\geq$  50%.

TABELLA 3 TRATTAMENTO CON INIBITORI DEI CHECKPOINT IMMUNITARI APPROVATI IN ITALIA

	Valori PD-L1	Linea trattamento	Associazione chemioterapia
Nivolumab	qualsiasi	II-III	no
Pembrolizumab	$\geq$ 50% <50% >1%	I I II	no Pemetrexed +platino no
Atezolizumab	qualsiasi $\geq$ 50 %	II I	no no

### 3.1.3 Effetti avversi immunoterapia

Sebbene i meccanismi precisi con cui si verificano gli IRAE (*immune-related Adverse Events*) non siano stati completamente scoperti, si pensa che siano dovuti all'attivazione delle cellule T (97).

Una serie di studi suggerisce che gli IRAE siano innescati da antigeni comuni sia al tumore che all'organo infiammato: secondo questo modello, le cellule T scatenate colpirebbero entrambi i tessuti, producendo sia tossicità che risposta (98).

Altri studi suggeriscono, invece, che possono esistere meccanismi di tossicità autoimmune indipendenti dalla risposta antitumorale (97). Nella maggior parte dei casi, la tossicità degli inibitori dei *checkpoint* immunologici è lieve o moderata (G1-G2), sebbene si possano verificare anche reazioni indesiderate più gravi (G3-G4). L'insorgenza degli effetti collaterali immuno-relati è subdola, può presentarsi in qualsiasi momento del trattamento, a volte anche quando questo è già stato interrotto, e può interessare molteplici organi (99).

Di seguito vengono riportati i più frequenti IRAE riscontrati (97):

- Reazioni cutanee: sono le più comuni (30-70% dei pazienti, soprattutto se trattati con Ipilimumab) e quelle che compaiono più precocemente, circa 2-3 settimane dopo l'inizio del trattamento e di solito sono di lieve entità. Le più frequenti sono prurito, rash maculopapulare, eritema, alopecia, e vitiligine.
- Reazioni gastrointestinali: compaiono di solito tra le 5 e le 10 settimane dopo la seconda dose, e tipicamente sono diarrea, colite, nausea, vomito, gastrite, pancreatite. Interessano circa il 15-40% dei pazienti.
- Reazioni epatiche: compaiono 12-16 settimane dopo l'inizio del trattamento, e si manifestano con un innalzamento delle transaminasi, spesso sono asintomatiche o accompagnate da affaticamento e febbre.
- Reazioni endocrine: di solito compaiono dopo 9 settimane dall'inizio del trattamento; possono essere iper/ipotiroidismo, insufficienza surrenalica e diabete. Sono difficili da

diagnosticare a causa di sintomi aspecifici come affaticamento, anoressia, nausea e cefalea.

- Reazioni polmonari: possono essere polmonite, pleurite, e granulomatosi simil-sarcoidea. La polmonite è la più frequente e compare nei 5-7% dei pazienti trattati con ICIs, deve essere esclusa in tutti i pazienti che iniziano a manifestare progressiva mancanza di respiro, tosse secca e febbre. Gli esami radiologici del torace e l'esecuzione delle prove di funzionalità respiratoria possono permettere una diagnosi tempestiva di tale complicanza.
- Altre reazioni: ci può essere coinvolgimento oculare (congiuntivite, blefarite), renale (IRA, nefrite interstiziale granulomatosa), del SNC (encefalopatie, sindrome di Guillain-Barrè, miastenia grave), del sistema emopoietico (anemia emolitica, citopenie) e del sistema cardiovascolare (miocardite, pericardite).

Saper riconoscere precocemente i primi segnali di una tossicità immuno-correlata e gestirla di conseguenza, è di fondamentale importanza. Infatti, un intervento precoce nei confronti di eventuali effetti collaterali secondari a una immunoterapia si traduce generalmente in una riduzione della severità e della durata della tossicità stessa.

Negli ultimi anni sono state sviluppate molte linee guida, tutte concordi sull'utilizzo di corticosteroidi e di agenti immunomodulanti.

Il *Gustave Rousy Cancer Center* ha pubblicato una linea guida che comprende cinque pilastri: si tratta di prevenire, anticipare, individuare, trattare e monitorare gli IRAE (100).

Nella prevenzione, è importante conoscere lo spettro di tossicità immunitaria e identificare i fattori di rischio di alterate risposte immunitarie, come la storia personale e familiare di malattie autoimmuni o la presenza di infezioni opportunistiche, perché la somministrazione di un blocco del checkpoint immunitario potrebbe

essere responsabile di reazioni infiammatorie contro tali agenti patogeni (101).

Per quanto riguarda l'anticipare, sono state sviluppate delle liste di controllo per identificare precocemente gli IRAE a partire da anomalie o lievi alterazioni. Una volta individuato l'IRAE bisogna scegliere come gestirlo. La gestione della tossicità immuno-correlata dipende fortemente dalla severità dell'evento avverso e dal tipo di organo interessato. In generale, la riduzione del dosaggio del farmaco non ha alcun ruolo nella gestione di tali tossicità, ma una sospensione del trattamento con un'adeguata terapia immunosoppressiva di tipo steroideo è importante nei casi di tossicità impegnativa. I corticosteroidi devono essere impiegati alle dosi iniziali utilizzate per il trattamento delle malattie autoimmuni (1mg/kg/die o più), la durata è generalmente di 2-4 settimane e il 58-85% della tossicità è reversibile con il trattamento steroideo. Successivamente, i corticosteroidi devono essere ridotti gradualmente per un periodo di almeno 1 mese per evitare che le IRAE si ripresentino. Quando i sintomi sono refrattari agli steroidi possono essere efficaci gli immunomodulatori o gli immunosoppressori, come Azatioprina o il Micofenolato Mofetile.

Nel caso di una tossicità da farmaci immunoterapici, la ripresa del trattamento con tali farmaci è controindicata se la tossicità è stata molto grave. Al momento non vi è nessuna evidenza scientifica che i farmaci cortisonici utilizzati per trattare gli effetti collaterali immuno-correlati determinino una riduzione dell'effetto terapeutico (99).

Un altro punto chiave è se la gestione debba essere ambulatoriale o ospedaliera; le linee guida suggeriscono che le IRAE di grado  $\geq 3$  dovrebbero essere trattate in regime di ricovero

Infine, per monitorare l'evoluzione, il tempo necessario per la risoluzione delle IRAE può variare notevolmente tra i vari tipi di tossicità. Ad esempio, il tempo mediano per la risoluzione delle IRAE di qualsiasi grado secondarie a Nivolumab variava da 3,3 settimane per le AE epatiche a 28,6 settimane per quelle cutanee.

#### 4. Marcatori circolanti

L'avvento dell'immunoterapia con gli inibitori dei *checkpoint* immunologici ha rivoluzionato il trattamento del cancro al polmone e di altre neoplasie, ma le risposte cliniche sono molto eterogenee nei diversi pazienti, spesso sono presenti eventi avversi e l'impatto economico non è trascurabile.

L'identificazione di marcatori circolanti predittivi della risposta all'immunoterapia potrebbe favorire l'identificazione precoce delle risposte al trattamento, evitando sospensioni premature della terapia o un prolungamento inutile della stessa, migliorando la loro sostenibilità (102).

Con l'avvicinarsi dell'immunoterapia alla medicina personalizzata, un pannello composito di biomarcatori genomici e proteomici avrà un'enorme utilità nel processo decisionale terapeutico. I biomarcatori potrebbero essere ricercati nel microambiente tumorale oppure nel siero dei pazienti.

I biomarcatori che riflettono il microambiente immunitario del tumore e le caratteristiche intrinseche delle cellule tumorali, ottenuti direttamente da campioni di tumore, sono stati studiati come potenziali marcatori di risposta all'immunoterapia. I primi biomarcatori proposti per predire la risposta tumorale all'immunoterapia erano basati sull'espressione di PD1/PDL1, ma il loro valore predittivo è limitato a tumori o popolazioni di pazienti specifici (103,104).

Nel caso del NSCLC, attualmente, l'unico biomarcatore usato nella pratica clinica per selezionare i pazienti che hanno maggiori probabilità di ottenere risultati duraturi dall'immunoterapia è proprio il livello di espressione di PD-L1 sulle cellule tumorali. L'espressione di PD-L1, però, non è sempre un marcatore predittivo efficace; infatti, anche nei pazienti con un'elevata espressione di PD-L1, circa il 50% non risponde alla terapia con ICIs e alcuni pazienti negativi per PD-L1 sperimentano risposte forti e durature. Tassi di risposta migliori, a parità di espressione di PD-L1, sono stati osservati nei fumatori

rispetto ai non fumatori, sono, quindi, associati a tumori che presentano un elevato carico di mutazioni (105)

Alti marcatori tissutali potrebbero essere la densità dei linfociti infiltranti il tumore (TIL), il carico mutazionale del tumore (TMB), la trascrittoma del tumore e la carenza di *mismatch repair*, che hanno già dimostrato di poter predire gli effetti del trattamento immunoterapico (106).

Tuttavia, questi marcatori richiedono metodiche invasive e il rapporto rischio/beneficio per il monitoraggio della risposta al trattamento è elevato.

I biomarcatori circolanti sono promettenti metriche predittive della risposta all'immunoterapia, in quanto si ottengono con prelievi non invasivi per i pazienti e possono essere ripetuti nel tempo (107).

Tra i marcatori circolanti possiamo identificare i valori dei diversi leucociti del paziente e i rapporti tra loro, come ad esempio il rapporto neutrofili/linfociti (NLR) prognostico di un aumento di sopravvivenza se il valore è alto, la conta assoluta dei linfociti (ALC) positivamente correlata alla sopravvivenza e la lattato deidrogenasi sierica (LDH), correlata invece ad una prognosi negativa se aumentata (108).

Le varianti di splicing di PD-L1 che mancano del dominio transmembrana o di quello intracellulare portano alla secrezione di PD-L1 solubile (sPD-L1), che potrebbe diventare uno dei marcatori circolanti per il monitoraggio della terapia con inibitori dei *checkpoint* immunologici: analogamente a PD-L1 legato alla membrana, anche sPD-L1 ostacola l'attivazione e la proliferazione delle cellule T. Un aumento del livello di sPD-L1 prima del trattamento si associa a una prognosi sfavorevole, attribuita all'elevato carico tumorale, all'elevato *splicing* alternativo e all'esaurimento della risposta immunitaria. Alcuni studi hanno riscontrato che un elevato sPD-L1 al basale si correla ad un maggior rischio di progressione del tumore. Tuttavia, il rapido aumento del livello di sPD-L1 dopo il trattamento con inibitori del *checkpoint* immunitario indicava una potente risposta immunitaria

tumore-specifica e un elevato tasso di risposta parziale (circa il 70%) (106).

Altri potenziali biomarcatori correlati positivamente con una risposta attiva sono gli antigeni tumorali mutati e le diverse citochine. Le citochine sono proteine che svolgono il ruolo di messaggeri dell'immunità innata e adattativa, consentendo alle cellule del sistema immunitario di comunicare a breve distanza, in modo paracrino o autocrino. Nel contesto tumorale, le citochine possono sia aumentare la crescita (citochine oncogene), sia limitarla (citochine antitumorali), regolando le relative vie di segnalazione come la proliferazione, la crescita, le metastasi e l'apoptosi.

Nel cancro del polmone, l'espressione delle citochine cambia in base alle condizioni fisiologiche del sistema immunitario e le citochine infiammatorie sono associate alla sua progressione. Il profilo di espressione delle citochine può essere utilizzato non solo per la diagnosi, ma anche per la prognosi, la previsione della risposta terapeutica e la sopravvivenza dei pazienti affetti da cancro del polmone (109).

Le citochine periferiche, inoltre, riflettono lo stato del microambiente immunitario del tumore e la risposta al trattamento anti-PD-1/PD-L1. Ad esempio, i livelli sierici dell'interleuchina 6, citochina sia pro- che antinfiammatoria, la cui espressione è indotta da TNF-Alpha e da IL-1, sono aumentati in diversi tipi di cancro, tra cui quello al polmone, e correlano con una prognosi negativa (110). Uno studio di fase 2 sul melanoma ha rivelato che livelli elevati di IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 nel sangue periferico prima del trattamento si associano ad una riduzione del tasso di risposta nei pazienti che assumono Nivolumab (111). L'IL-8 è un membro della famiglia delle chemochine CXC e ha il ruolo di attivatore e chemoattrattore dei neutrofili. È prodotta anche dalle cellule tumorali in più di dieci tipi diversi di cancro, tra cui quello al polmone e la sua concentrazione sierica è stata associata alle dimensioni della neoplasia e all'aumento dello stadio di malattia (110). È stata recentemente osservata una sua correlazione con la risposta

al trattamento con inibitori dei *checkpoint* immunologici, sia nel melanoma avanzato che nel NSCLC. In uno studio, 29 pazienti con melanoma e NSCLC, trattati con Nivolumab o Pembrolizumab, sono stati sottoposti a prelievi dopo 2 e 4 settimane dalla terapia per valutare i livelli di IL-8. Nei pazienti che hanno risposto, i livelli sierici di IL-8 sono diminuiti significativamente tra il basale e la migliore risposta e sono aumentati significativamente alla progressione. Nei pazienti non *responder*, i livelli di IL-8 sono aumentati significativamente tra il basale e la progressione. Una diminuzione precoce dei livelli sierici di IL-8 è stata associata a una sopravvivenza globale più lunga. I livelli sierici di IL-8 hanno anche riflesso correttamente la vera risposta in tre pazienti che presentavano una pseudoprogressione (112).



## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Nonostante la terapia con inibitori dei *checkpoint* immunitari abbia modificato radicalmente la sopravvivenza del NSCLC avanzato, l'interpretazione delle risposte radiologiche e l'identificazione dei pazienti in grado di beneficiarne rimane ancora una problematica clinica di rilievo. Gli ICIs inducono una risposta clinica in circa 12 settimane e soltanto nel 15-60% dei pazienti (97), alcune risposte tardive sono state osservate dopo l'interruzione del trattamento a causa di tossicità e fino al 15% dei pazienti può andare incontro a pseudoprogressione.

La ricerca di nuovi marcatori predittivi della risposta potrebbe portare all'identificazione precoce dei pazienti responsivi ai CIS, evitando il trattamento ad una proporzione di pazienti resistenti, e conseguentemente migliorando la sostenibilità economica.

Lo studio oggetto della presente tesi ha la finalità di descrivere le caratteristiche cliniche e gli esiti del trattamento con ICIs in una popolazione di pazienti affetti da NSCLC della reale pratica clinica e di valutare la correlazione tra i valori basali e le variazioni temporali di alcuni marcatori circolanti con la risposta al trattamento.

### **1. Obiettivo primario**

Obiettivo primario della presente tesi di laurea è l'analisi descrittiva delle caratteristiche cliniche dei pazienti, dell'esito del trattamento e del profilo di tossicità di una popolazione di pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato trattato con inibitori del *checkpoint* immunitario in un contesto *real-world*

### **2. Obiettivi secondari**

Obiettivo secondario della presente analisi è la valutazione della correlazione tra biomarcatori circolanti e loro variazione a diversi *time-point* con l'esito del trattamento in termini di: tasso di risposte (RR); tasso di controllo di malattia (DCR); sopravvivenza libera da progressione (PFS) e globale (OS), in un sottogruppo di pazienti per cui l'analisi dei biomarcatori sia valutabile alla data *cut-off* del 31 luglio 2022.

## MATERIALI E METODI

### 1. Disegno dello studio e criteri di eleggibilità

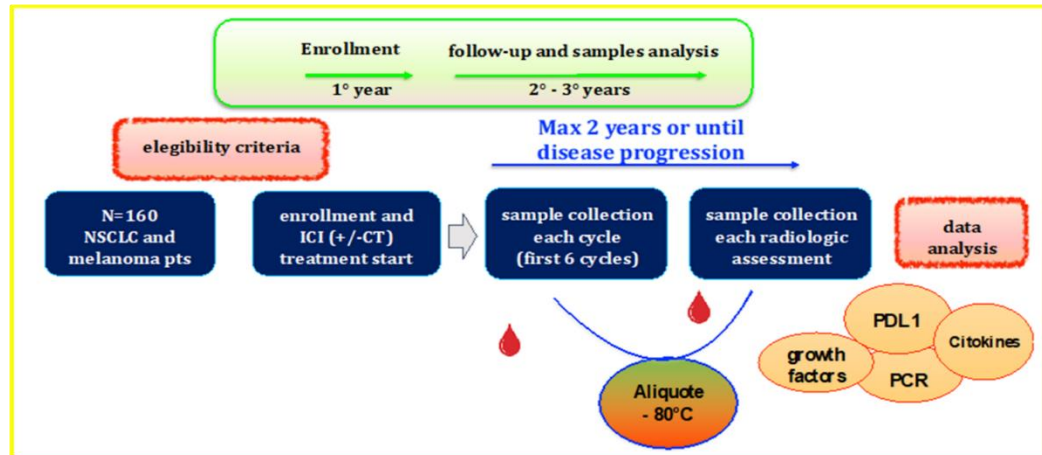


FIGURA 1 DISEGNO DELLO STUDIO

Lo studio MAGnEtIC (*circulating MARKers as GeNder-specific predictor of rEsoponse to Immune Checkpoint inhibitors in melanoma and non small cell lung cancer patients*), osservazionale, prospettico, multicentrico, *real world* ha coinvolto 160 pazienti da quattro centri italiani (nello specifico Padova, Treviso, Belluno e Mestre); la popolazione di studio ha incluso 80 pazienti affetti da melanoma avanzato (coorte A) e 80 da NSCLC avanzato (coorte B) in un periodo complessivo di tre anni. Lo studio prevedeva un anno di arruolamento, e due anni di follow-up. Lo studio ha concluso l'arruolamento in agosto 2022.

I campioni ematici richiesti per le analisi sono stati raccolti al primo ciclo (basale), ad ogni somministrazione di farmaco per le prime 6 dosi, al momento delle rivalutazioni strumentali di malattia per due anni, oppure in caso di progressione di malattia e sono stati ripetuti alla successiva rivalutazione strumentale di conferma.

I campioni ematici sono stati effettuati in concomitanza con quelli per monitorare la terapia; pertanto, i pazienti non sono stati sottoposti ad ulteriori procedure rispetto a quelle impiegate per pratica clinica.

Nel presente progetto di tesi sono stati analizzati i dati raccolti da 76 pazienti affetti da NSCLC in stadio avanzato arruolati nei quattro centri.

Sono stati inclusi i pazienti con conferma istologica di NSCLC avanzato-metastatico candidati alla terapia con anti-PD-L1 e anti-PD-1, secondo le indicazioni regolamentate dall'AIFA.

Lo stadio di malattia avanzato-metastatico coincide con lo stadio III non resecabile o lo stadio IV secondo la classificazione TNM dell'*American Joint Committee on Cancer Staging System (AJCC)*, ottava edizione (113).

I criteri di eleggibilità prevedevano anche che i pazienti coinvolti nello studio avessero un *Performance Status (PS)* compreso tra 0 e 2, secondo la scala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) (114); una buona funzione renale (creatinina sierica  $\leq 5$  mg/dL o *clearance* della creatinina  $\geq 60$  mL/min negli uomini e  $\geq 50$  mL/min nelle donne, calcolata secondo la formula *Cockcroft-Gault*) ed epatica (bilirubina totale  $\leq 1,5$  x limite superiore al normale (ULN) e aspartato aminotransferasi (AST)/alanina aminotransferasi (ALT)  $\leq 2,5$  x ULN,  $< 5$ xULN se presenti metastasi epatiche), e un'aspettativa di vita maggiore di tre mesi.

Dallo studio sono stati esclusi soggetti con metastasi cerebrali sintomatiche o carcinomatosi meningeae, con precedente trattamento con anti-PD-1 o anti-PD-L1 (solo per NSCLC), con malattia autoimmune, sospetta o accertata, in fase attiva, fatta eccezione per vitiligine, psoriasi, alopecia, diabete mellito di tipo I e ipotiroidismo che richiedono terapia ormonale sostitutiva. Altri criteri di esclusione erano tutte le condizioni cliniche che richiedono trattamenti steroidei sistemici a dosaggi immunosoppressivi o immunosoppressori, epatiti B e C attive o test positivo per HIV, ma anche condizioni psichiatriche o fisiche che avrebbero potuto ostacolare l'adesione al protocollo.

## 2. Dati clinici e traslazionali

I dati raccolti hanno incluso informazioni cliniche inerenti al paziente (età, sesso, PS secondo ECOG, abitudine tabagica, esposizione professionale, BMI), la patologia oncologica (stadio di malattia alla diagnosi, caratteristiche biologiche del tumore) e il trattamento antitumorale (dosaggi terapeutici e tossicità, trattamenti precedenti).

I campioni di sangue periferico sono stati raccolti mediante prelievo venoso e sono state preparate aliquote di siero e campioni di plasma CTAD che sono stati conservati a -80 °C fino all'analisi.

Sono stati misurati i livelli plasmatici di Proteina C Reattiva (PCR) mediante immunoturbidimetria (analizzatore automatico AU 5822 - Beckman Coulter Inc, CA, USA). Le citochine sieriche e i livelli di fattori di crescita sono stati analizzati con la tecnologia *multiplexing* (xMAP) mediante *Magnetic Luminex Assays* (R&D Systems Inc, MN, USA): *Human Cytokine Premixed Kit A Performance Assay and Human Premixed Multi-Analyte Kit Screening Assay*.

I livelli sierici di PDL-1 sono stati analizzati mediante *Human/Cynomolgus Monkey PD-L1/B7-H1 Quantikine ELISA kit*. Tutti i campioni di uno stesso paziente sono stati analizzati in un unico saggio sulla stessa piastra.

Nella prima parte dello studio è stata definita la distribuzione dei marcatori infiammatori e immunocorrelati, al fine di selezionare i marcatori misurabili nel siero o nel plasma. I marcatori analizzati sono GM-CSF, IL1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10 e TNF $\alpha$ , selezionati sulla base delle loro implicazioni nell'immunomodulazione dei *checkpoint* immunologici, nella patogenesi o progressione tumorale e nel loro coinvolgimento con le risposte immunitarie.

Nella seconda fase dello studio è stata verificata l'associazione dei suddetti biomarcatori e la risposta clinica agli inibitori dei *checkpoint* immunitari nei pazienti trattati.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Oncologico Veneto e dei centri partecipanti, e tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato al momento dell'arruolamento.

### 3. Trattamento

Lo studio non ha previsto alcuna variazione della pratica clinica per quanto riguarda il trattamento dei pazienti.

I pazienti con NSCLC avanzato potevano ricevere:

- Nivolumab: in pazienti già trattati con una precedente linea chemioterapica, somministrato alla dose flat di 240 mg per via endovenosa in 60 minuti ogni 2 settimane fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile;
- Pembrolizumab: somministrato alla dose fissa di 200 mg per via endovenosa in 30 minuti ogni 3 settimane fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile come prima linea in pazienti con tumori ad elevata espressione di PD-L1, definita come un *Tumor Proportion Score* (TPS)  $\geq 50\%$ ; o in seconda linea se TPS  $\geq 1\%$ . I pazienti con mutazioni di ALK o EGFR dovevano aver ricevuto precedentemente una terapia target (115);
- Atezolizumab: somministrato ad una dose di 1200 mg per via endovenosa in 60 minuti (se la prima infusione è stata tollerata, tutte le infusioni successive potevano essere somministrate nell'arco di 30 minuti) ogni 3 settimane fino a progressione di malattia o tossicità inaccettabile in pazienti con NSCLC avanzato precedentemente sottoposti a chemioterapia. I pazienti con mutazioni di ALK o EGFR dovevano aver ricevuto precedentemente una terapia *target*.

L'interruzione del trattamento era prevista in caso di progressione confermata, di eventi avversi, di anomalie di laboratorio, di patologie

intercorrenti che indicassero che la partecipazione al protocollo non fosse la migliore opzione terapeutica e in caso di gravidanza.

Durante il trattamento previsto dallo studio era proibita l'assunzione di farmaci immunosoppressori, a meno che non venissero impiegati per il trattamento di una tossicità farmaco correlata, di corticosteroidi a dosi immunosoppressive >10 mg di prednisone, a meno che non venissero impiegati per il trattamento di una tossicità farmaco correlata, e di altri trattamenti neoplastici concomitanti.

Ai soggetti arruolati nello studio era permesso l'uso di corticosteroidi topici, intraoculari, intra-nasali e inalatori e di corticosteroidi sistemici (cortisone acetato) con finalità sostitutiva, anche se il dosaggio superava l'equivalente di 10 mg di prednisone.

Era, inoltre permesso l'impiego di corticosteroidi per brevi lassi di tempo come profilassi o per trattamento di condizioni non autoimmuni. Era, infine permesso l'utilizzo di farmaci anti-VEGF per via intra-vitrea.

#### **4. Valutazione della risposta alla terapia**

Al fine di standardizzare i risultati dei diversi centri, ad ogni rivalutazione di malattia è stata necessaria l'effettuazione di una TAC encefalo, torace, addome, o altri distretti corporei, con mezzo di contrasto iodato. Poteva essere impiegata la RMN encefalica con mdc come integrazione alla TAC, se necessario.

La valutazione pretrattamento (basale) e le successive venivano effettuate in accordo con le tempistiche suggerite da AIFA.

Nei pazienti con NSCLC avanzato le rivalutazioni di malattia sono state effettuate secondo il seguente schema:

- pazienti trattati con Pembrolizumab, la prima è stata effettuata alla settimana  $9 \pm 1$  e la seconda alla settimana  $15 \pm 1$ . In caso di PD alla RIV1, la RIV2 è stata anticipata alla settimana  $13 \pm 1$ . Le successive sono state effettuate ogni 12 settimane;

- pazienti trattati con Nivolumab, la RIV1 è stata effettuata alla settimana  $9 \pm 1$  e la RIV2 alla settimana  $15 \pm 1$ . Le successive ogni 12 settimane;
- pazienti trattati con Atezolizumab: la RIV1 verrà effettuata alla settimana  $9 \pm 1$  e la RIV2 alla settimana  $15 \pm 1$ . le successive ogni 12 settimane.

La risposta al trattamento è stata analizzata in accordo con i criteri RECIST versione 1.1 (116).

Sono state considerate misurabili le lesioni con diametro maggiore  $\geq 10$  mm alla TAC/RMN o  $\geq 10$  mediante misurazione manuale all'esame clinico o linfonodi con asse corto  $\geq 15$  mm alla TAC/RMN.

Sono state considerate non misurabili tutte le altre lesioni, incluse quelle realmente non misurabili (carcinomatosi leptomeningea, ascite, versamento pleurico e pericardico, linfangite cutanea o polmonare, masse addominali).

Quando era presente al basale più di una lesione misurabile, sono state identificate e scelte come *target* le 5 lesioni più rappresentative degli organi coinvolti (fino ad un massimo di 2 lesioni per organo). Le restanti sono state registrate come non *target*. È stata calcolata e riportata al basale la somma dei diametri delle lesioni *target* (diametro minore per lesioni linfonodali e maggiore per quelle non linfonodali).

Per le altre lesioni non *target* non è stata richiesta una misurazione e sono state descritte nel tempo come "presenti" o "assenti".

È stata considerata come risposta completa (RC) la scomparsa di tutte le lesioni *target*. Era necessario che i linfonodi patologici avessero una riduzione dell'asse corto inferiore a 10 mm.

È stata definita come risposta parziale (RP) una riduzione  $\geq 30\%$  nella somma dei diametri delle lesioni *target* prendendo come riferimento il valore basale.

È stata definita come progressione di malattia (PD) un incremento  $\geq 20\%$  della somma dei diametri delle lesioni *target* prendendo come riferimento il valore basale o quello della risposta migliore.

La comparsa di una o più nuove lesioni è considerata PD.



TABELLA 4 CRITERI RECIST V. 1.1 PER LA VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

Lesioni target	Lesioni non target	Nuove lesioni	Miglior risposta
CR	CR	no	CR
CR	non CR/ non PD	no	PR
CR	non valutate	no	PR
PR	non PD o non tutte valutate	no	PR
SD	non PD o non tutte valutate	no	SD
Non tutte valutate	non PD	no	non valutabile
PD	qualsiasi	sì o no	PD
qualsiasi	PD	sì o no	PD
qualsiasi	qualsiasi	si	PD

## 5. Analisi statistica

Tutte le variabili continue sono state descritte utilizzando la mediana, il primo e il terzo quartile.

Le variabili nominali e ordinali sono state descritte mediante tavole di contingenza.

È stata valutata la distribuzione dei marcatori in relazione ai livelli di risposta al trattamento secondo i criteri RECIST utilizzando mediana, primo e terzo quartile ed è stato applicato il test di Kruskal-Wallis nei pazienti con progressione di malattia.

I risultati sono stati riportati come odds ratio (OR) con un intervallo di confidenza al 95%.

La relazione tra il controllo della malattia e la sopravvivenza con le alterazioni dei livelli sierici dei marcatori è stata testata a differenti *time-point* con un modello di regressione logistica univariata e multivariata e con la regressione di Cox.

Il diverso impatto dei marcatori sulla PFS e sull'OS è stato stimato utilizzando i modelli non parametrici di regressione di Cox. La PFS è stata determinata dalla prima dose di terapia alla data di progressione di malattia o di morte per qualsiasi causa. I pazienti vivi senza evidenza di progressione di malattia al momento dell'analisi sono stati censurati con la data dell'ultima rivalutazione strumentale. L'OS è stata determinata dalla prima dose di terapia fino alla morte per qualsiasi causa. I pazienti vivi al momento dell'analisi sono stati censurati con la data dell'ultima rivalutazione strumentale. Le curve di sopravvivenza sono state disegnate con il metodo di Kaplan Meier e confrontate con i vari gruppi di interesse mediante log-rank test.

I risultati sono stati espressi in termini di tassi di sopravvivenza con un intervallo di confidenza del 95%.

Le tossicità correlate al farmaco sono state registrate e classificate in accordo con i criteri *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria for Adverse Events* (NCI CTC-AE ver 4.03). È stato considerato come significativo un *p-value* inferiore a 0,05.

## RISULTATI

### 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti

Le caratteristiche clinico patologiche dei pazienti arruolati nello studio sono riassunte nella tabella 5.

TABELLA 5 CARATTERISTICHE CLINICHE DEI 76 PAZIENTI CON NSCLC AVANZATO

NSCLC		TOTALE (N=76)
<b>GENDER</b>	Male	50 (66%)
	Female	26 (34%)
<b>AGE</b>	Median (Q1; Q3)	70 (65; 75)
<b>BMI</b>	Median (Q1; Q3)	24,49 (21,70; 27,50)
<b>PS ECOG</b>	0	18 (24%)
	1	47 (62%)
	2	11 (14%)
<b>CURRENT STAGE</b>		3 (4%)33 (43%)
	IIIB	34 (45%)
	IVA	6 (8%)
	IVB	
	Missing	
<b>NSCLC RISK FACTORS</b>	-Tobacco and smoking	64 (84%)
	-Exposure to cancer causing agents in the workplace	12 (16%)
	-Alcohol	6 (8%)
	-Other	3 (4%)
<b>HISTOLOGICAL DIAGNOSIS OF NSCLC</b>	-Adenocarcinoma	53 (70%)
	-Squamous cell carcinoma	17 (22%)
	-Others	6 (8%)

Sono stati arruolati nello studio 76 pazienti con diagnosi di NSCLC avanzato, provenienti da 4 centri (45 da Padova I.O.V., 2 da Mestre, 17 da Belluno e 12 da Treviso), i cui dati sono stati raccolti entro il 30 luglio 2022.

Di questi, 50 (66%) sono uomini e 26 (34%) sono donne.

L'età mediana alla diagnosi di malattia avanzata è stata di 70 anni, con un range che varia dai 52 agli 83 (Q1= 65 anni, Q3=75 anni).

Il BMI mediano è stato 24,49 Kg/m<sup>2</sup>, con un range che va da 14,67 kg/m<sup>2</sup> a 35,26 Kg/m<sup>2</sup> (Q1= 21,70 kg/m<sup>2</sup>, Q3= 27,50 kg/m<sup>2</sup>).

Nei criteri di inclusione allo studio era richiesto un PS secondo ECOG compreso tra 0 e 2 (0=*full activity*, 1= *restricted activity*, 2= *in bed*<50% *of the time*); dei pazienti arruolati, 18 (24%) avevano un PS 0, 47 (62%) avevano un PS 1, e 11(14%) avevano un PS 2.

Alla diagnosi di NSCLC avanzato, 3 (4%) rientravano in uno stadio IIIB, 33 (43%) in uno stadio IVA e 34 (45%) in stadio IVB; di 6 (8%) pazienti il dato non è noto.

Per quanto riguarda i fattori di rischio, 12 pazienti (16%) hanno avuto esposizione ad agenti cancerogeni sul luogo di lavoro, 1 (1%) ha avuto esposizione ad agenti cancerogeni non sul luogo di lavoro, 6 (8%) pazienti hanno avuto esposizione all'alcol, mentre 64 pazienti (84%) sono fumatori o ex fumatori; 3 pazienti (4%) sono stati a contatto con altri fattori di rischio non specificati.

L'istologia predominante nel campione è quella dell'adenocarcinoma, diagnosticato in 53 pazienti (70%), seguito dal carcinoma squamoso presente in 17 soggetti (22%), mentre nei restanti 6 (8%) sono state identificate altre istologie.

## **2. Analisi delle tossicità immunocorrelate (IRAE)**

Sono stati registrati tutti gli eventi avversi riportati dai pazienti riconducibili al trattamento con immunoterapia e il relativo grado, attraverso i criteri comuni di terminologia degli eventi avversi

(*Common Terminology Criteria for Adverse Events – CTCAE*) versione 5.0 (117).

Gli eventi avversi immunorelati (IRAE) e il loro grado sono stati riassunti nella tabella 6.

TABELLA 6 ANALISI IRAE NEI 76 PAZIENTI CON NSCLC AVANZATO

	<b>Qualsiasi grado</b>	<b>G4</b>	<b>G3</b>	<b>G2</b>	<b>G1</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>qualsiasi tossicità</b>	54 (71%)	2 (4%)	5 (9%)	24 (44%)	23 (43%)
<b>polmonite</b>	4 (7%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (7%)	0 (0%)
<b>diarrea</b>	16 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (20%)	5 (9%)
<b>↑ lipasi ↑amilasi</b>	2 (4%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)
<b>↑ALT ↑AST</b>	11 (20%)	0 (0%)	3 (5%)	2 (4%)	6 (11%)
<b>reazioni cutanee</b>	7 (13%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	6 (11%)
<b>tossicità endocrinologiche</b>	6 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4%)	4 (7%)
<b>altre tossicità</b>	8 (15%)	1 (2%)	2 (4%)	3 (5%)	2 (4%)

Dei 76 pazienti arruolati 41 (54%) hanno sviluppato almeno un evento avverso, ma gli IRAE totali registrati sono stati 54 in totale: alcuni pazienti hanno avuto più di un evento avverso. Nessuno ha riscontrato eventi avversi di grado 5, 2 (4%) hanno avuto IRAE di grado 4, 5 (9%) di grado 3, mentre la maggior parte degli eventi riscontrati sono stati di grado 2 (24 pazienti, 44%) e 1 (23 pazienti, 43%).

L'evento avverso più comune è stata la diarrea, che si è riscontrata in 16 pazienti (30%), in grado G2 in 11 pazienti (20%), G1 in 5 pazienti (10%).

A seguire, l'aumento delle transaminasi ALT e AST si è verificato in 11 (20%) pazienti, di cui di grado G3 in 3 (5%), G2 in 2 (4%), e G1 in 6 (11%).

Le reazioni cutanee sono insorte in 7 (13%) pazienti, 6 di grado G1 (11%) e soltanto 1 (2%) di grado G2.

Alterazioni di tipo endocrinologico sono state 6 (11%), sempre di grado G1 (4 pazienti, 7%) o G2 (2 pazienti, 4%).

La polmonite immuno-correlata è stata osservata in 4 (7%) pazienti in grado G2.

L'aumento delle Amilasi e delle lipasi, come indice di tossicità pancreatica, è stato rilevato in 2(4%) pazienti, uno in grado G2 e uno in grado G4.

Altre tossicità potenzialmente legate all'immunoterapia, come citopenie, anoressia, fatigue, vertigini, e artralgie sono state riscontrate in 8 (15%) pazienti, una di grado G4 (2%), due di grado G3 (4%), tre di grado G2 (5%) e ancora due di grado G1 (4%).

26 (48%) tossicità hanno richiesto un'interruzione della terapia, e di queste 17 (31%) consentono di ricominciare la terapia, mentre le 9 (17%) restanti no.

Nessuna delle tossicità ha richiesto il ricovero ospedaliero del paziente, mentre 24 (44%) hanno richiesto l'uso di corticosteroidi per ridurre la sintomatologia dell'IRAE.

### **3. Attività ed Efficacia del trattamento**

La durata mediana del follow up al 30 luglio 2022, è stata di 5,63 mesi. Il tasso di risposta, RR, (*response rate*), è stato del 21% (16 pazienti su 76), il tasso di controllo della malattia, DCR, (*disease control rate*) è stato dell'63%, ovvero 48 pazienti su 76, mentre il 37 % dei pazienti è andato incontro a progressione nel corso del follow up.

La PFS (*Progression free survival*) mediana è stata di 5,72 mesi (95% IC=2,42-8,02), l'OS (*Overall survival*) mediana di 9,7 mesi (95% IC=7,54-11,86).

Le curve di sopravvivenza per PFS e OS di questi pazienti vengono riportate nelle figure sottostanti.

### Survival Analysis

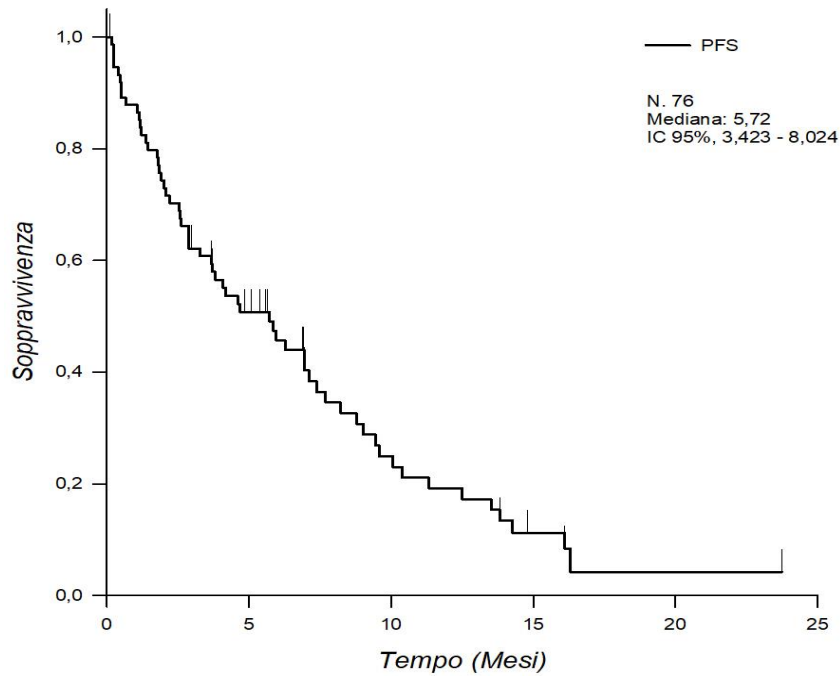


FIGURA 2 CURVA DI SOPRAVVIVENZA PER PFS NEI 76 PAZIENTI CON NSCLC AVANZATO

### Survival Analysis

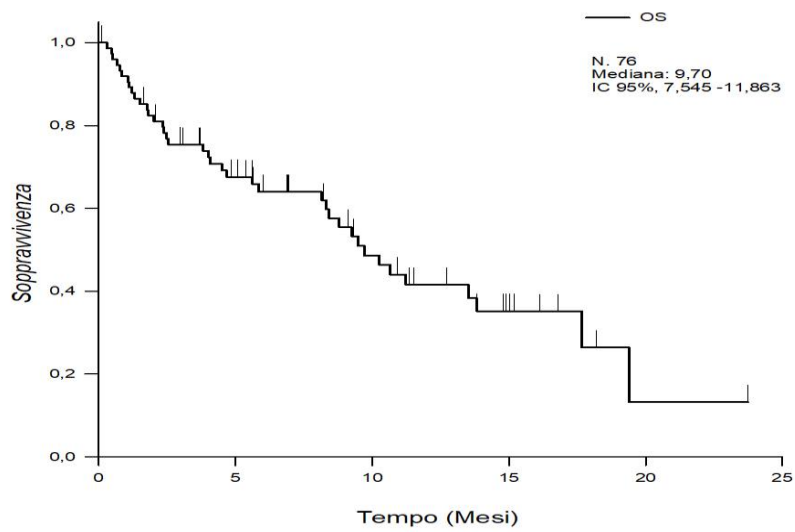


FIGURA 3 CURVA DI SOPRAVVIVENZA PER OS NEI 76 PAZIENTI CON NSCLC AVANZATO

#### 4. Analisi della correlazione tra marcatori e risposta clinica agli ICIs

Nella tabella 7 sono riassunte le caratteristiche clinico patologiche del sottogruppo su cui si sono concentrate le analisi preliminari relative all'obiettivo secondario.

TABELLA 7 CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DI UN SOTTOGRUPPO DI 35 PAZIENTI CON NSCLC AVANZATO

NSCLC		Male (N=23)	Female (N=12)	Total (N=35)	<i>p value</i>
age	Median (Q1, Q3)	69.00 (63.50, 77.00)	68.50 (64.50, 71.75)	69.00 (63.50, 75.00)	0.8210
weight	Median (Q1, Q3)	75.00 (71.50, 84.50)	61.00 (53.25, 65.50)	72.00 (63.00, 80.00)	<b>0.0001</b>
height	Median (Q1, Q3)	175.00 (170.00, 182.00)	162.50 (160.00, 165.50)	170.00 (164.00, 178.00)	<b>0.0001</b>
bmi	Median (Q1, Q3)	25.15 (22.61, 28.07)	22.93 (20.05, 24.60)	24.46 (21.48, 26.93)	0.0580
ecog_ps	NMiss	1	1	2	
	0	5 (22.7%)	2 (18.2%)	7 (21.2%)	0.5330
	1	15 (68.2%)	9 (81.8%)	24 (72.7%)	
	2	2 (9.1%)	0 (0.0%)	2 (6.1%)	
Current stage	N-Miss	4	4	8	
	IIIB	1 (5.3%)	0 (0.0%)	1 (3.7%)	
	IVA	12 (63.2%)	2 (25.0%)	14 (51.9%)	
	IVB	6 (31.6%)	6 (75.0%)	12 (44.4%)	
NSCLC Risk factors	Exposure to cancer causing agents in the workplace	6 (26.1%)	2 (16.7%)	8 (22.9%)	0.5290
	Alcohol	0 (0.0%)	1 (8.3%)	1 (2.9%)	0.1600
	Exposure to cancer causing agents	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.0630
	Tobacco and smoking	19 (82.6%)	9 (75.0%)	28 (80.0%)	0.5930
	Other	1 (4.3%)	0 (0.0%)	1 (2.9%)	0.4640
Primary site of NSCLC	NMiss	3	2	5	
	Left lower lobe	3 (15.0%)	2 (20.0%)	5 (16.7%)	0.4830
	Left upper lobe	4 (20.0%)	1 (10.0%)	5 (16.7%)	
	Right lower lobe	3 (15.0%)	4 (40.0%)	7 (23.3%)	
	Right middle lobe	2 (10.0%)	0 (0.0%)	2 (6.7%)	
	Right upper lobe	8 (40.0%)	3 (30.0%)	11 (36.7%)	



Histologic diagnosis of NSCLC	NMiss	2	1	3	
Adenocarcinoma		15 (71.4%)	10 (90.9%)	25 (78.1%)	0.4260
Squamous cell carcinoma		5 (23.8%)	1 (9.1%)	6 (18.8%)	
Others		1 (4.8%)	0 (0.0%)	1 (3.1%)	
Metastasis	Adrenal	5 (21.7%)	0 (0.0%)	5 (14.3%)	0.081
	Bone	5 (21.7%)	1 (8.3%)	6 (17.1%)	0.3180
	Brain	3 (13.0%)	1 (8.3%)	4 (11.4%)	0.6780
	Kidney	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Liver	4 (17.4%)	1 (8.3%)	5 (14.3%)	0.4670
	Lung	4 (17.4%)	2 (16.7%)	6 (17.1%)	0.9570
	Lymph nodes	4 (17.4%)	4 (33.3%)	8 (22.9%)	0.2860
	Mediastinum	1 (4.3%)	1 (8.3%)	2 (5.7%)	0.6300
	Peritoneum	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Pleura	3 (13.0%)	1 (8.3%)	4 (11.4%)	0.678
	Rectum	0 (0.0%)	1 (8.3%)	1 (2.9%)	0.16
	Skin	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Soft tissue	1 (4.3%)	0 (0.0%)	1 (2.9%)	0.4640
	Stomach	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Other	2 (8.7%)	1 (8.3%)	3 (8.6%)	0.9710

La

Tabella 8 riporta la distribuzione dei marcatori in base alla risposta RECIST al trattamento.

IL6 e IL8 erano significativamente più espresse al basale e al ciclo 2 per i pazienti con progressione di malattia (PD), valutato tramite test di Kruskal-Wallis, rispetto ai pazienti con controllo di malattia (CR/PR/SD). I valori mediani di IL6 al ciclo 1 erano di 3,56 (2,37;5,89) pg/mL nei pazienti con malattia controllata, mentre nei pazienti con progressione di malattia il valore mediano era di 8,13 (4,78; 16,98) pg/mL. Al ciclo 2, invece, i valori mediani di IL6 nei pazienti con DC scendevano a 2,98 (2,21; 4,38) pg/mL, e nei pazienti con PD aumentavano a 11,54 (5,92; 18,44).

I valori mediani di IL8 al ciclo 1 erano di 27,03 (16,06; 41,37) pg/mL nei pazienti con malattia controllata, mentre nei pazienti con progressione di malattia il valore mediano era di 57,75 (33,16; 75,98) pg/mL. Al ciclo 2, invece, i valori mediani di IL8 nei pazienti con DC scendevano a 24,74 (20,62; 40,19) pg/mL e nei pazienti con PD aumentavano a 58,11 (33,92; 112,03) pg/mL.

Inoltre, l'aumento relativo mediano di IL8 è stato del 37% per i pazienti con PD, significativamente più alto rispetto ai pazienti con DC.

**TABELLA 8** DISTRIBUZIONE DEI MARCATORI IN BASE AL CONTROLLO DELLA MALATTIA. I VALORI SONO MEDIANA, PRIMO E TERZO QUARTILE

<b>NSCLC</b>		CR/PR/SD	PD	Total	<i>p value</i>
cycle 1	<b>N</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>35</b>	
	gmcsf	2.10 (1.67, 2.83)	2.58 (1.83, 3.06)	2.20 (1.73, 3.06)	0.2300
	il1beta	0.99 (0.81, 1.38)	1.25 (0.80, 1.62)	1.00 (0.80, 1.50)	0.4940
	il2	1.64 (1.00, 2.28)	1.55 (1.19, 2.59)	1.59 (1.13, 2.38)	0.8410
	il4	37.45 (22.32, 46.73)	38.92 (36.52, 48.30)	38.21 (27.34, 48.16)	0.2050
	il5	0.43 (0.24, 0.74)	0.61 (0.46, 0.92)	0.53 (0.33, 0.92)	0.1930
	il6	3.56 (2.37, 5.89)	8.13 (4.78, 16.98)	5.29 (2.74, 9.86)	<b>0.0080</b>
	il8	27.03 (16.06, 41.37)	57.75 (33.16, 75.98)	34.90 (19.97, 67.87)	<b>0.0090</b>
	il10	0.85 (0.71, 1.62)	1.47 (0.97, 3.47)	1.30 (0.72, 2.07)	0.1470
	tnfalpa	17.84 (14.78, 20.06)	17.76 (15.48, 20.57)	17.76 (14.91, 20.57)	0.8940
cycle 2	<b>N</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>31</b>	
	gmcsf	1.79 (1.33, 2.68)	2.12 (1.63, 2.88)	2.10 (1.52, 2.77)	0.3720
	il1beta	0.74 (0.61, 0.97)	1.04 (0.65, 1.68)	0.80 (0.61, 1.25)	0.3010
	il2	1.34 (0.90, 2.86)	1.42 (1.29, 1.90)	1.41 (0.96, 2.26)	0.8710
	il4	30.58 (20.28, 44.44)	39.62 (30.39, 49.25)	36.56 (23.17, 46.77)	0.1140
	il5	0.58 (0.38, 0.81)	0.72 (0.60, 1.06)	0.63 (0.42, 0.97)	0.3010
	il6	2.92 (2.21, 4.38)	11.54 (5.92, 18.44)	5.23 (2.61, 9.05)	<b>0.0001</b>
	il8	24.74 (20.62, 40.19)	58.11 (33.92, 112.03)	35.35 (22.74, 64.55)	<b>0.0080</b>
	il10	1.35 (1.15, 1.97)	2.77 (1.66, 4.71)	1.81 (1.16, 3.66)	0.1500
	tnfalpa	19.14 (15.36, 22.51)	18.14 (15.85, 19.88)	18.33 (15.73, 22.09)	0.3940
(cycle_2 – cycle_1)/cycle_1	<b>N</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>31</b>	
	gmcsf	-0.15 (-0.27, 0.14)	0.03 (-0.31, 0.32)	-0.12 (-0.29, 0.18)	0.5980
	il1beta	-0.20 (-0.35, 0.18)	0.05 (-0.23, 0.21)	-0.11 (-0.34, 0.22)	0.3510
	il2	0.16 (-0.38, 0.40)	-0.07 (-0.28, 0.30)	0.05 (-0.32, 0.40)	0.9030
	il4	-0.09 (-0.19, 0.04)	-0.02 (-0.19, 0.14)	-0.09 (-0.19, 0.10)	0.4650
	il5	0.11 (-0.04, 1.03)	0.11 (-0.29, 0.83)	0.11 (-0.12, 0.86)	0.4650
	il6	0.11 (-0.39, 0.57)	0.24 (-0.11, 0.71)	0.15 (-0.20, 0.63)	0.3110
	il8	-0.00 (-0.21, 0.20)	0.37 (0.07, 0.82)	0.07 (-0.08, 0.37)	<b>0.0320</b>
	il10	0.57 (0.13, 0.92)	0.37 (0.13, 1.55)	0.47 (0.12, 0.99)	0.9680
	tnfalpa	0.07 (-0.07, 0.22)	0.13 (-0.05, 0.17)	0.13 (-0.06, 0.21)	0.8390

Per definire un'associazione tra il controllo della malattia (CR, PR, SD) e la sopravvivenza, ogni marcatore è stato categorizzato in livelli alti e

bassi, massimizzando la sua capacità discriminativa (tabella 9), e l'associazione con l'esito è stata testata secondo i modelli di regressione logistica univariata e multivariata e i modelli di regressione di Cox.

Dalla tabella 9 emerge che al ciclo 1 IL6 era distribuita ugualmente in valori alti e bassi (50%) in pazienti con malattia controllata, mentre nei pazienti con PD risultava alta nell'86,7% dei casi.

L'andamento di IL8 al ciclo 1 era analogo a quello di IL6: nei pazienti con DC risultava basso nel 45% dei casi, alto nel 55%, mentre in caso di PD, i valori alti erano l'86,7%.

Al ciclo due, invece, i valori di IL6 e IL8 erano significativamente più bassi nei pazienti con DC (rispettivamente 73,7% e 63,2%), e più alti nei pazienti con PD (rispettivamente 100% e 75%).

Al ciclo 2 anche i valori di IL1 beta e di IL10 trovano un'associazione con l'andamento della malattia: IL1 beta ha valori bassi nell'84,2% dei pazienti con DC, mentre IL10 ha valori bassi nel 78,9 % dei pazienti con DC. Per entrambi questi ultimi due marcatori la distribuzione di valori in alti e bassi nei pazienti con PD è simile (50%;50% e 41,7%;58,3% rispettivamente).

**TABELLA 9 ASSOCIAZIONE TRA CR/PR/SD E PD E OGNI MARKER CATEGORIZZATO IN ALTO/BASSO**

<b>NSCLC</b>			CR/PR/SD	PD	Total	<i>p value</i>
cycle_1	<b>N</b>		<b>20</b>	<b>15</b>	<b>35</b>	
	gmcsf	low ( $\leq 2.14$ )	11 (55.0%)	5 (33.3%)	16 (45.7%)	0.2030
		high	9 (45.0%)	10 (66.7%)	19 (54.3%)	
	il1beta	low ( $\leq 3.09$ )	14 (70.0%)	7 (46.7%)	21 (60.0%)	0.1630
		high	6 (30.0%)	8 (53.3%)	14 (40.0%)	
	il2	low ( $\leq 1.21$ )	5 (25.0%)	2 (13.3%)	7 (20.0%)	0.3930
		high	15 (75.0%)	13 (86.7%)	28 (80.0%)	
	il4	low ( $\leq 1.22$ )	15 (75.0%)	9 (60.0%)	24 (68.6%)	0.3440
		high	5 (25.0%)	6 (40.0%)	11 (31.4%)	
	il5	low ( $\leq 0.98$ )	8 (40.0%)	2 (13.3%)	10 (28.6%)	0.0840
		high	12 (60.0%)	13 (86.7%)	25 (71.4%)	
	il6	low ( $\leq 1.26$ )	10 (50.0%)	2 (13.3%)	12 (34.3%)	<b>0.0240</b>
		high	10 (50.0%)	13 (86.7%)	23 (65.7%)	

	il8	low ( $\leq 46.36$ )	9 (45.0%)	2 (13.3%)	11 (31.4%)	<b>0.0460</b>
		high	11 (55.0%)	13 (86.7%)	24 (68.6%)	
	il10	low ( $\leq 53.58$ )	12 (60.0%)	5 (33.3%)	17 (48.6%)	0.1180
		high	8 (40.0%)	10 (66.7%)	18 (51.4%)	
	tnfalpa	low ( $\leq 0.35$ )	15 (75.0%)	9 (60.0%)	24 (68.6%)	0.3440
		high	5 (25.0%)	6 (40.0%)	11 (31.4%)	
cycle_2	<b>N</b>		<b>19</b>	<b>12</b>	<b>31</b>	
	gmcsf	low ( $\leq 1.2$ )	16 (84.2%)	10 (83.3%)	26 (83.9%)	0.9480
		high	3 (15.8%)	2 (16.7%)	5 (16.1%)	
	il1beta	low ( $\leq 3.77$ )	16 (84.2%)	6 (50.0%)	22 (71.0%)	<b>0.0410</b>
		high	3 (15.8%)	6 (50.0%)	9 (29.0%)	
	il2	low ( $\leq 3.69$ )	9 (47.4%)	2 (16.7%)	11 (35.5%)	0.0820
		high	10 (52.6%)	10 (83.3%)	20 (64.5%)	
	il4	low ( $\leq 23.36$ )	18 (94.7%)	9 (75.0%)	27 (87.1%)	0.1100
		high	1 (5.3%)	3 (25.0%)	4 (12.9%)	
	il5	low ( $\leq 34.22$ )	16 (84.2%)	10 (83.3%)	26 (83.9%)	0.9480
		high	3 (15.8%)	2 (16.7%)	5 (16.1%)	
	il6	low ( $\leq 1.24$ )	14 (73.7%)	0 (0.0%)	14 (45.2%)	<b>0.0001</b>
		high	5 (26.3%)	12 (100.0%)	17 (54.8%)	
	il8	low ( $\leq 2.14$ )	12 (63.2%)	3 (25.0%)	15 (48.4%)	<b>0.0380</b>
		high	7 (36.8%)	9 (75.0%)	16 (51.6%)	
	il10	low ( $\leq 19.27$ )	15 (78.9%)	5 (41.7%)	20 (64.5%)	<b>0.0350</b>
		high	4 (21.1%)	7 (58.3%)	11 (35.5%)	
	tnfalpa	low ( $\leq 24.49$ )	17 (89.5%)	11 (91.7%)	28 (90.3%)	0.8410
		high	2 (10.5%)	1 (8.3%)	3 (9.7%)	
(cycle_2 – cycle_1)/cycle_1	<b>N</b>		<b>19</b>	<b>12</b>	<b>31</b>	
	gmcsf	low ( $\leq 0.03$ )	13 (68.4%)	6 (50.0%)	19 (61.3%)	0.3050
		high	6 (31.6%)	6 (50.0%)	12 (38.7%)	
	il1beta	low ( $\leq 0.1$ )	14 (73.7%)	6 (50.0%)	20 (64.5%)	0.1790
		high	5 (26.3%)	6 (50.0%)	11 (35.5%)	
	il2	low ( $\leq -0.27$ )	7 (36.8%)	3 (25.0%)	10 (32.3%)	0.4920
		high	12 (63.2%)	9 (75.0%)	21 (67.7%)	
	il4	low ( $\leq 0.03$ )	14 (73.7%)	6 (50.0%)	20 (64.5%)	0.1790
		high	5 (26.3%)	6 (50.0%)	11 (35.5%)	
	il5	low ( $\leq -0.02$ )	5 (26.3%)	6 (50.0%)	11 (35.5%)	0.1790
		high	14 (73.7%)	6 (50.0%)	20 (64.5%)	
	il6	low ( $\leq 0.16$ )	12 (63.2%)	5 (41.7%)	17 (54.8%)	0.2420
		high	7 (36.8%)	7 (58.3%)	14 (45.2%)	
	il8	low ( $\leq 0.01$ )	12 (63.2%)	2 (16.7%)	14 (45.2%)	<b>0.0110</b>
		high	7 (36.8%)	10 (83.3%)	17 (54.8%)	

	il10	low ( $\leq 1.15$ )	16 (84.2%)	8 (66.7%)	24 (77.4%)	0.2550
		high	3 (15.8%)	4 (33.3%)	7 (22.6%)	
	tnfalpha	low ( $\leq 0.03$ )	9 (47.4%)	4 (33.3%)	13 (41.9%)	0.4400
		high	10 (52.6%)	8 (66.7%)	18 (58.1%)	

La regressione logistica univariata (tabella 10) per determinare la probabilità di DC ha dimostrato che alti livelli di IL6 al ciclo 1 erano significativamente associati a una bassa probabilità di DC (OR=0,19, 95% CI:0,03-0,82).

Analogamente, al ciclo 2, alti livelli di IL6 erano significativamente associati a una bassa probabilità di DC (OR=0,02, 95%CI=0,0-0,15). Al ciclo due anche alti valori di IL8 erano significativamente associati ad una bassa probabilità di DC (OR=0,22, 95% CI=0,04-0,95).

Al ciclo due anche alti livelli di IL1beta e di IL10 si associano a una bassa probabilità di DC (IL1beta OR=0,21, 95% CI=0,04-0,99; IL10 OR=0,21, 95% CI=0,04-0,93).

Un aumento della variazione relativa tra il ciclo 1 e il ciclo 2 di IL8 mostrava una probabilità significativamente bassa di avere un controllo della malattia (OR=0,14, 95% CI=0,02-0,67).

**TABELLA 10** REGRESSIONE LOGISTICA UNIVARIATA DETERMINANTE LA PROBABILITÀ DI MALATTIA CONTROLLATA

NSCLC			DC/N	%	OR <sub>Firth</sub> (95%CI)	<i>p-value</i>
cycle_1						
	gmcsf	low ( $\leq 2.14$ )	11/16	45.7%	1	
		high	9/19	54.3%	0.43 (0.11,1.62)	0.2152
	il1beta	low ( $\leq 3.09$ )	14/21	60.0%		
		high	6/14	40.0%	0.4 (0.1,1.5)	0.1731
	il2	low ( $\leq 1.21$ )	5/7	20.0%		
		high	15/28	80.0%	0.52 (0.08,2.59)	0.4336
	il4	low ( $\leq 1.22$ )	15/24	68.6%		
		high	5/11	31.4%	0.52 (0.12,2.09)	0.3538
	il5	low ( $\leq 0.98$ )	8/10	28.6%		
		high	12/25	71.4%	0.27 (0.04,1.23)	0.0932
	il6	low ( $\leq 1.26$ )	10/12	34.3%		
		high	10/23	65.7%	0.19 (0.03,0.82)	<b>0.0255</b>
	il8	low ( $\leq 46.36$ )	9/11	31.4%		
		high	11/24	68.6%	0.22 (0.04,1)	0.0502

	il10	low ( $\leq 53.58$ )	12/17	48.6%		
		high	8/18	51.4%	0.36 (0.09,1.34)	0.1270
	tnfalpa	low ( $\leq 0.35$ )	15/24	68.6%		
		high	5/11	31.4%	0.52 (0.12,2.09)	0.3538
cycle_2						
	gmcsf	low ( $\leq 1.2$ )	16/26	83.9%	1	
		high	3/5	16.1%	0.89 (0.15,6.15)	0.9000
	il1beta	low ( $\leq 3.77$ )	16/22	71.0%		
		high	3/9	29.0%	0.21 (0.04,0.99)	<b>0.0479</b>
	il2	low ( $\leq 3.69$ )	9/11	35.5%		
		high	10/20	64.5%	0.26 (0.04,1.23)	0.0909
	il4	low ( $\leq 23.36$ )	18/27	87.1%		
		high	1/4	12.9%	0.22 (0.02,1.57)	0.1318
	il5	low ( $\leq 34.22$ )	16/26	83.9%		
		high	3/5	16.1%	0.89 (0.15,6.15)	0.9000
	il6	low ( $\leq 1.24$ )	14/14	45.2%		
		high	5/17	54.8%	0.02 (0,0.15)	<b>0.0000</b>
	il8	low ( $\leq 2.14$ )	12/15	48.4%		
		high	7/16	51.6%	0.22 (0.04,0.95)	<b>0.0426</b>
	il10	low ( $\leq 19.27$ )	15/20	64.5%		
		high	4/11	35.5%	0.21 (0.04,0.93)	<b>0.0399</b>
	tnfalpa	low ( $\leq 24.49$ )	17/28	90.3%		
		high	2/3	9.7%	1.1 (0.13, 13.11)	0.9339
(cycle_2 – cycle_1)/cycle_1						
	gmcsf	low ( $\leq 0.03$ )	13/19	61.3%	1	
		high	6/12	38.7%	0.48 (0.11,2.01)	0.3158
	il1beta	low ( $\leq 0.1$ )	14/20	64.5%		
		high	5/11	35.5%	0.38 (0.08,1.62)	0.1906
	il2	low ( $\leq -0.27$ )	7/10	32.3%		
		high	12/21	67.7%	0.61 (0.12,2.72)	0.5257
	il4	low ( $\leq 0.03$ )	14/20	64.5%		
		high	5/11	35.5%	0.38 (0.08,1.62)	0.1906
	il5	low ( $\leq -0.02$ )	5/11	35.5%		
		high	14/20	64.5%	2.64 (0.62, 12.01)	0.1906
	il6	low ( $\leq 0.16$ )	12/17	54.8%		
		high	7/14	45.2%	0.44 (0.1,1.8)	0.2544
	il8	low ( $\leq 0.01$ )	12/14	45.2%		
		high	7/17	54.8%	0.14 (0.02,0.67)	<b>0.0122</b>
	il10	low ( $\leq 1.15$ )	16/24	77.4%		
		high	3/7	22.6%	0.4 (0.07,2.03)	0.2665
	tnfalpa	low ( $\leq 0.03$ )	9/13	41.9%		
		high	10/18	58.1%	0.59 (0.13,2.42)	0.4622

La regressione logistica multipla (tabella 11) per stabilire la probabilità di DC, ha confermato che IL8 al ciclo 1 e la variazione relativa di IL8 erano fattori indipendenti che predicavano la probabilità di controllo della malattia, con un'accuratezza complessiva dell'83,9%.

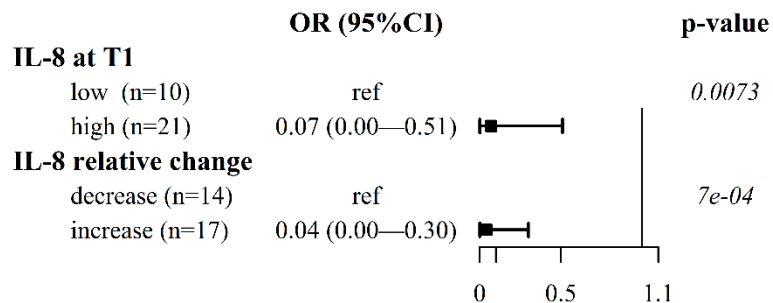
In dettaglio, alti livelli di IL8 al ciclo 1 erano significativamente associati a una bassa probabilità di DC (OR=0,07, 95%CI: 0,00–0,51), e un

aumento della variazione relativa tra il ciclo 1 e il ciclo 2 mostrava una probabilità significativamente più bassa di avere un controllo della malattia (OR aggiustato: 0,04, 95%CI: 0,00–0,30).

TABELLA 11 REGRESSIONE LOGISTICA MULTIPLA CHE DETERMINA LA PROBABILITÀ DI CONTROLLO DI MALATTIA

Accuracy=83.9%		OR (95%CI)	p-value
<b>cycle_1</b>			
il8	low	1	
	high	0.07 (0,0.51)	<b>0.0073</b>
<b>(cycle_2 –cycle_1)/cycle_1</b>			
il8	low	1	
	high	0.04 (0,0.3)	<b>0.0007</b>

FIGURA 4 REGRESSIONE LOGISTICA MULTIPLA CHE DEFINISCE LA PROBABILITÀ DI MALATTIA CONTROLLATA



# Disease control events: 19; Accuracy Index: 0.84

La tabella 12, invece, rappresenta la regressione univariata secondo il modello di Cox per determinare la probabilità di progressione libera da malattia (PFS).

Al ciclo 1 valori elevati di IL6 (HR=2,51, 95% CI=1,05-7,15), IL8 (HR=3,43, 95% CI=1,55-8,04), IL10 (HR=3,64, 95% CI= 1,2-9,67) e IL5 (HR=24,49, 95% CI=3,19-3158,77) erano significativamente associati a una PFS più breve.

Al ciclo 2 si riscontra una situazione analoga al ciclo 1: valori elevati di IL6 (HR=3,8, 95% CI=1,54-10,1), IL8 (HR=3,61, 95% CI=1,48-9,23), IL10 (HR=2,86, 95% CI= 1,13-6,95), IL5 (HR=3,14, 95% CI=1,22-

10,07) e anche di TNF $\alpha$  (HR=0,26, 95% CI=0,08-0,67) si associavano a una PFS peggiore.

Un aumento della variazione relativa tra il ciclo 1 e il ciclo 2 di IL8 mostra una probabilità di più breve PFS (HR= 3,46, 95% CI=1,2-13,55).

**TABELLA 12** REGRESSIONE UNIVARIATA DI COX CHE DETERMINA LA PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE DI MALATTIA

NSCLC			PD/N	median (95%CI)	logrank <i>p</i>	HR <sub>Firth</sub> (95%CI)	<i>p</i> - value
cycle_1							
	gmcsf	1.70	5/8	5.95 (1.81, NA)	0.4673	1	
		high	21/27	3.29 (1.84,7.36)		1.34 (0.56,3.83)	0.5349
	il1beta	1.38	16/23	5.85 (2.595,9.56)	0.7261		
		high	10/12	2.27 (0.657,16.3)		1.19 (0.51,2.62)	0.6820
	il2	0.72	2/4	5.95 (2.53, NA)	0.4527		
		high	24/31	4.01 (2,7.36)		1.42 (0.46,7.07)	0.5835
	il4	20.33	2/4	16.3 (5.85, NA)	0.1660		
		high	24/31	3.29 (2,7.36)		2.22 (0.7, 11.15)	0.1929
	il5	0.24	1/5	16.3 (16.3, NA)	<b>0.0013</b>		
		high	25/30	2.63 (2,6.28)		24.49 (3.19, 3158.77)	<b>0.0002</b>
	il6	2.84	5/10	16.3 (2.6, NA)	<b>0.0395</b>		
		high	21/25	2.53 (1.81,7.1)		2.51 (1.05,7.15)	<b>0.0387</b>
	il8	34.90	10/18	9.56 (3.29, NA)	<b>0.0017</b>		
		high	16/17	2.23 (1.18,5.95)		3.43 (1.55,8.04)	<b>0.0024</b>



	il10	2.22	21/28	5.95 (2.595,9.56)	<b>0.0146</b>		
		high	5/7	1.18 (0.493, NA)		3.64 (1.2,9.67)	<b>0.0242</b>
	tnfalpha	19.24	17/24	5.95 (2.53,9.56)	0.3307		
		high	9/11	2.3 (0.493, NA)		1.53 (0.66,3.35)	0.3072
cycle_2							
	gmcsf	2.15	15/17	4.01 (1.81,7.72)	0.2147	1	
		high	8/14	7.1 (2, NA)		0.6 (0.25,1.36)	0.2238
	il1beta	0.84	12/16	5.85 (2.53,13.8)	0.8833		
		high	11/15	6.28 (1.22,7.72)		1.07 (0.47,2.4)	0.8741
	il2	1.20	7/11	7.36 (2.6, NA)	0.2618		
		high	16/20	3.32 (1.81,7.1)		1.6 (0.69,4.07)	0.2781
	il4	20.33	4/6	13.8 (5.85, NA)	0.1260		
		high	19/25	3.29 (2.23,7.1)		2.1 (0.81,6.83)	0.1355
	il5	0.48	4/10	16.3 (1.84, NA)	<b>0.0177</b>		
		high	19/21	3.29 (2,7.1)		3.14 (1.22, 10.07)	<b>0.0161</b>
	il6	5.20	10/15	9.56 (4.01,16.3)	<b>0.0026</b>		
		high	13/16	2.38 (1.22,6.28)		3.8 (1.54,10.1)	<b>0.0036</b>
	il8	36.98	11/17	9.56 (2.63,16.3)	<b>0.0033</b>		
		high	12/14	2.27 (1.22,5.95)		3.61 (1.48,9.23)	<b>0.0048</b>
	il10	2.66	15/21	7.36 (2.628,13.8)	<b>0.0217</b>		
		high	8/10	2.04 (0.657,5.95)		2.86 (1.13,6.95)	<b>0.0280</b>
	tnfalpha	19.67	17/19	3.29 (1.81,7.1)	<b>0.0051</b>		

		high	6/12	13.8 (2.3, NA)		0.26 (0.08,0.67)	<b>0.0046</b>
(cycle_2 - cycle_1)/cycle_1							
	gmcsf	0.48	20/27	5.95 (2.53,7.72)	0.6548	1	
		high	3/4	9.3 (2.23, NA)		0.86 (0.22,2.44)	0.7912
	il1beta	-0.46	2/4	16.3 (1.84, NA)	0.2488		
		high	21/27	5.85 (2.3,7.36)		1.92 (0.6,9.74)	0.3037
	il2	0.36	19/22	4.01 (2.234,7.36)	0.0781		
		high	4/9	NA (0.657, NA)		0.43 (0.13,1.1)	0.0805
	il4	-0.17	10/11	5.85 (1.22,7.72)	0.1650		
		high	13/20	6.28 (2.3,16.3)		0.55 (0.24,1.28)	0.1626
	il5	-0.04	10/11	2.63 (1.18,7.1)	0.0864		
		high	13/20	7.36 (2.3,16.3)		0.48 (0.21,1.12)	0.0891
	il6	-0.35	4/6	10.76 (5.85, NA)	0.1089		
		high	19/25	3.29 (2.23,7.36)		2.19 (0.84,7.1)	0.1156
	il8	-0.11	3/7	13.8 (2.6, NA)	<b>0.0231</b>		
		high	20/24	3.65 (2,7.36)		3.46 (1.2, 13.55)	<b>0.0199</b>
	il10	0.82	14/20	6.28 (2.53,9.56)	0.5975		
		high	9/11	4.01 (1.84, NA)		1.28 (0.54,2.89)	0.5635
	tnfalpha	0.40	23/30	5.85 (2.53,7.72)	0.1103		
		high	0/1	NA (NA, NA)		0.17 (0,1.44)	0.1251

Nel modello di regressione multipla di Cox (tabella 13) per stabilire la probabilità di sopravvivenza libera da progressione, IL-6 e IL-8 elevati al ciclo 1 (HR=4,37, 95%CI: 1,62–13,75, HR=3,01, 95%CI: 1,27–7,5) e una RI di IL-6 (HR=5,79, 95%CI: 1,91–21,53) sono rimasti significativamente associati a una PFS peggiore.

**TABELLA 13** REGRESSIONE MULTIPLA DI COX PER DETERMINARE LA PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA LIBERA DA PROGRESSIONE

c-index=0.78		HR (95%CI)	p-value
<b>cycle_1</b>			
IL6	low	1	
	high	4.37 (1.62, 13.75)	<b>0.0031</b>
IL8	low	1	
	high	3.01 (1.27,7.5)	<b>0.0126</b>
<b>(cycle_2 –cycle_1) /cycle_1</b>			
IL6	low	1	
	high	5.79 (1.91, 21.53)	<b>0.0014</b>

Con un follow-up mediano stimato di 10,6 mesi (95% CI 8,5-13,1), i tempi mediani di PFS e OS sono stati di 5,8 mesi (95%CI: 2,3-7,4) e 8,3 mesi (95%CI: 4,0–13,8) rispettivamente.

I grafici sottostanti mostrano le curve di sopravvivenza Kaplan Meier, per la progressione libera da malattia (PFS) dei pazienti con valori alti/bassi di IL8 e IL6 e per un'alta/bassa variazione relativa di IL6.

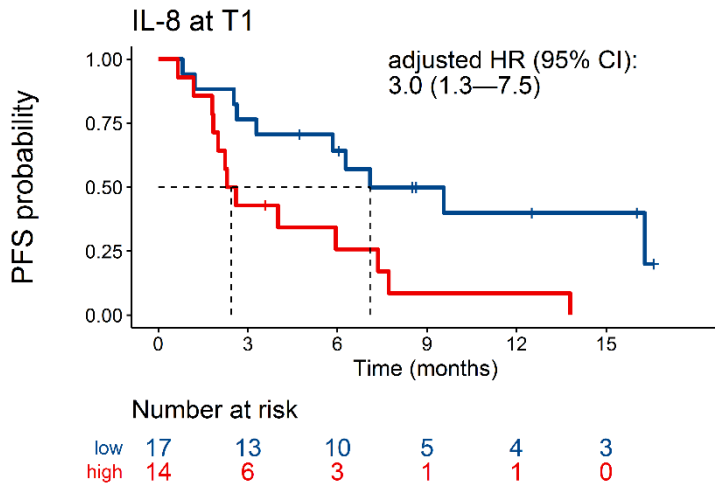


FIGURA 5 CURVA DI SOPRAVVIVENZA PFS PER PAZIENTI CON ALTI/BASSI LIVELLI DI IL8

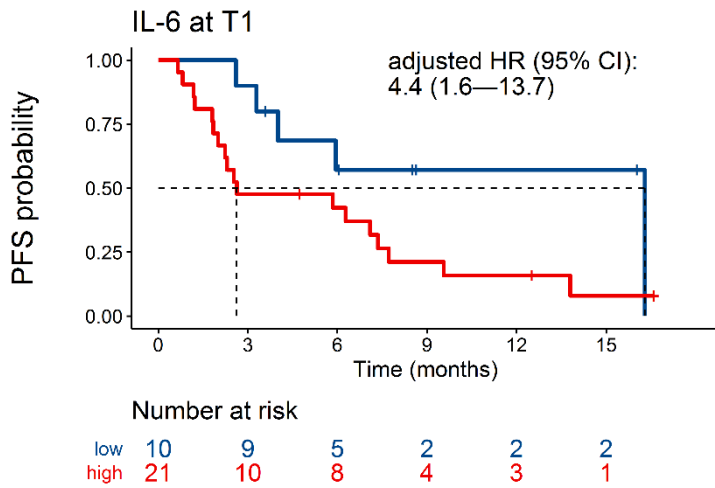


FIGURA 6 CURVA DI SOPRAVVIVENZA PFS PER PAZIENTI CON VALORI ALTI/BASSI DI IL6

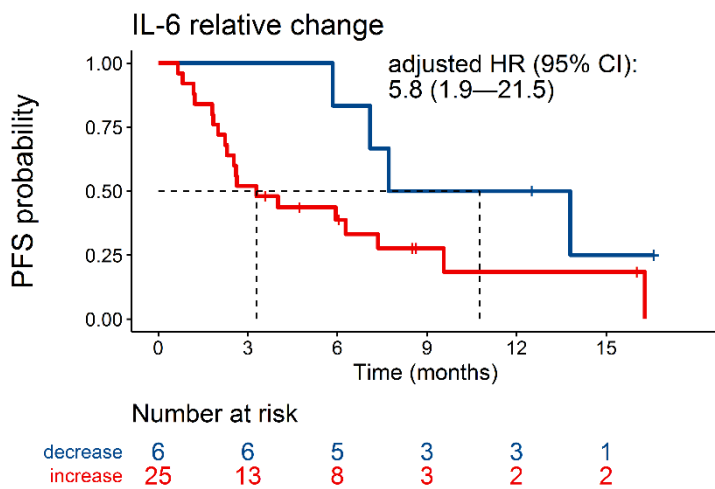


FIGURA 7 CURVA DI SOPRAVVIVENZA PFS PER VARIAZIONE RELATIVA DI IL6

La tabella 14 mostra la probabilità di sopravvivenza globale (OS), calcolata secondo una regressione univariata di Cox.

Al ciclo 1 valori elevati di IL5 (HR=5,56, 95% CI=1,4-51,84), IL8 (HR=4,42, 95% CI=1,79-11,81) e di IL10 (HR=4,77, 95% CI= 1,5-13,99) correlano a una OS peggiore.

Al ciclo 2, invece, valori elevati di IL6 (HR=4,87, 95% CI=1,5-24,7), IL8 (HR=4,75, 95% CI=1,79-13,77) e di IL10 (HR=5,32, 95% CI=1,87-16,66) correlano a una peggiore OS.

Infine, un aumento della variazione relativa di IL8 (HR=4,93, 95% 1,72-14,85) correla con una minor OS.

**TABELLA 14** REGRESSIONE UNIVARIATA DI COX PER DETERMINARE LA PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA GLOBALE

NSCLC			death/N	median (95%CI)	logrank p	HR <sub>Firth</sub> (95%CI)	p-value
cycle_1							
	gmcsf	1.84	10/14	8.31 (1.81,13.8)	0.7235	1	
		high	13/21	8.15 (2.46, NA)		0.85 (0.37,1.98)	0.7045
	il1beta	1.38	14/23	9.46 (4.501,13.8)	0.5131		
		high	9/12	5.57 (0.657, NA)		1.35 (0.57,3.11)	0.4853
	il2	0.72	2/4	9.46 (8.31, NA)	0.5753		
		high	21/31	8.15 (2.46,13.8)		1.26 (0.39,6.36)	0.7309
	il4	40.40	15/21	5.85 (2.33,10.6)	0.1952		
		high	8/14	11.2 (1.28, NA)		0.58 (0.23,1.34)	0.2054
	il5	0.24	1/5	16.66 (NA, NA)	<b>0.0170</b>		
		high	22/30	5.85 (2.46,10.6)		5.65 (1.4, 51.84)	<b>0.0113</b>
	il6	2.84	5/10	16.66 (4.01, NA)	0.2213		
		high	18/25	8.15 (1.81,11.2)		1.74 (0.7,5.04)	0.2427
	il8	34.90	9/18	11.2 (5.85, NA)	<b>0.0008</b>		
		high	14/17	2.99 (1.28,8.15)		4.42 (1.79, 11.81)	<b>0.0012</b>
	il10	2.22	18/28	9.46 (5.618,16.7)	<b>0.0039</b>		
		high	5/7	1.31 (0.493, NA)		4.77 (1.5, 13.99)	<b>0.0101</b>
	tnfalpha	19.24	15/24	9.46 (4.5,16.7)	0.1860		
		high	8/11	2.99 (1.08, NA)		1.85 (0.75,4.32)	0.1773

cycle_2							
	gmcsf	2.15	14/17	8.31 (1.81,13.8)	0.3756	1	
		high	6/14	10.64 (2.46, NA)		0.67 (0.24,1.68)	0.3988
	il1beta	1.26	14/24	11.2 (5.618,16.7)	0.0897		
		high	6/7	2.99 (0.657,10.6)		2.38 (0.86,6.01)	0.0913
	il2	1.20	5/11	8.31 (5.62, NA)	0.3447		
		high	15/20	5.85 (1.81,13.8)		1.56 (0.6,4.67)	0.3756
	il4	53.78	17/27	9.46 (4.501,16.7)	0.3303		
		high	3/4	6.01 (0.657, NA)		2.08 (0.54,6.08)	0.2584
	il5	0.33	3/6	16.66 (2.46, NA)	0.3511		
		high	17/25	8.31 (4.01,11.2)		1.59 (0.55,6.16)	0.4156
	il6	2.65	4/9	16.66 (5.62, NA)	<b>0.0082</b>		
		high	16/22	5.85 (2.33,10.6)		4.87 (1.5,24.7)	<b>0.0063</b>
	il8	31.55	8/15	13.9 (5.85, NA)	<b>0.0011</b>		
		high	12/16	3.5 (1.31,8.31)		4.75 (1.79, 13.77)	<b>0.0017</b>
	il10	2.11	11/20	11.2 (5.85, NA)	<b>0.0008</b>		
		high	9/11	2.99 (1.22,8.31)		5.32 (1.87, 16.66)	<b>0.0018</b>
	tnfalpa	24.06	18/28	9.46 (4.5,16.7)	0.3547		
		high	2/3	5.85 (2.33, NA)		2.41 (0.46,8.37)	0.2575
(cycle_2 - cycle_1)/cycle_1							
	gmcsf	0.48	17/27	9.46 (4.01,13.8)	0.8809	1	
		high	3/4	12.4 (2.99, NA)		1.03 (0.26,3)	0.9656
	il1beta	-0.01	10/17	13.8 (4.01, NA)	0.1949		
		high	10/14	8.31 (1.81,11.2)		1.82 (0.73,4.69)	0.1969
	il2	0.36	16/22	8.15 (2.99,13.8)	0.2743		
		high	4/9	9.46 (0.657, NA)		0.59 (0.18,1.59)	0.3067
	il4	0.09	14/23	10.64 (5.848,16.7)	0.1275		
		high	6/8	2.66 (0.657, NA)		2.21 (0.79,5.59)	0.1235
	il5	-0.04	8/11	4.5 (1.31,11.2)	0.1496		
		high	12/20	10.6 (5.62,16.7)		0.5 (0.2,1.29)	0.1474
	il6	1.95	17/27	10.64 (4.008,16.7)	0.3231		

		high	3/4	8.15 (0.821, NA)		2.1 (0.53,6.39)	0.2575
	il8	0.30	12/21	11.2 (8.312, NA)	<b>0.0015</b>		
		high	8/10	2.73 (0.821,8.15)		4.93 (1.72, 14.85)	<b>0.0034</b>
	il10	0.15	4/8	17.64 (1.81, NA)	0.0616		
		high	16/23	8.15 (2.99,13.8)		2.76 (0.95, 10.72)	0.0624
	tnfalpha	0.10	10/15	9.46 (2.46,13.8)	0.8284		
		high	10/16	8.15 (2.33, NA)		1.1 (0.45,2.7)	0.8331

Nel modello di regressione multipla di Cox (tabella 15), livelli più elevati di IL-8 al ciclo 1 (HR=3,43, 95%CI: 1,29–9,61) e una RI di IL-8 (HR=4,37, 95%CI: 1,5–13,37) sono rimasti significativamente associati a una OS peggiore.

TABELLA 15 REGRESSIONE MULTIPLA DI COX PER DETERMINARE LA PROBABILITÀ DI SOPRAVVIVENZA GLOBALE

c-index=0.75		HR (95%CI)	p-value
<b>cycle_1</b>			
	il8	low 1	
		high 3.43 (1.29,9.61)	<b>0.0132</b>
<b>(cycle_2 –cycle_1) /cycle_1</b>			
	il8	low 1	
		high 4.37 (1.5, 13.37)	<b>0.0072</b>

I grafici sottostanti mostrano le curve di sopravvivenza Kaplan Meier di sopravvivenza globale, per i pazienti con valori alti/bassi di IL8 e con una alta/bassa variazione relativa di IL8.

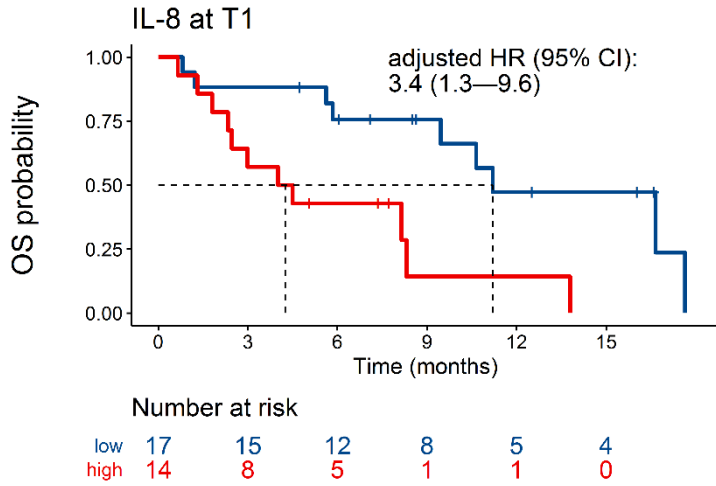


FIGURA 8 CURVA DI SOPRAVVIVENZA OS PER PAZIENTI CON ALTI/BASSI VALORI DI IL8

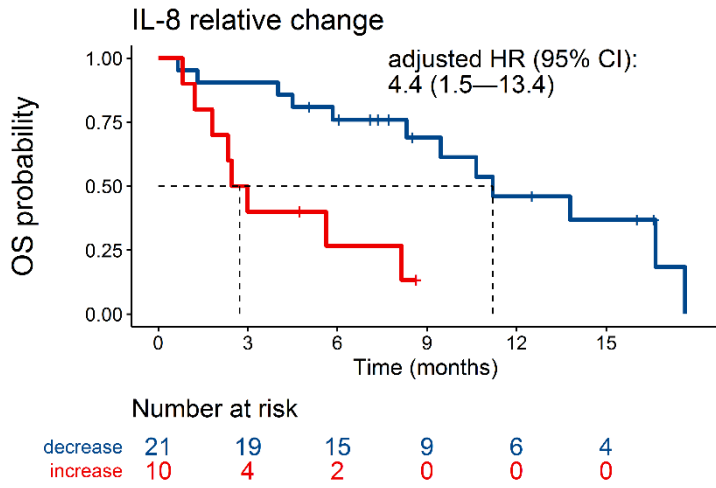


FIGURA 9 CURVA DI SOPRAVVIVENZA OS PER PAZIENTI CON ALTA/BASSA VARIAZIONE RELATIVA DI IL8



## DISCUSSIONE

L'attività antitumorale mediata dagli ICIs si è dimostrata rivoluzionaria nel trattamento di molte neoplasie, tra cui il NSCLC. Nel NSCLC, diversi studi hanno dimostrato un miglioramento in termini di PFS e di OS con l'immunoterapia, sia da sola che in combinazione con altri farmaci. Gli ICIs, però, ottengono un tasso di risposta (RR) che varia dal 15% al 60% e fino al 15% dei pazienti vanno incontro a pseudoprogressione. Inoltre, l'immunoterapia si associa ad alcuni effetti collaterali legati alla risposta infiammatoria, in circa il 20-80% dei casi.

L'obiettivo primario della presente tesi è stato quello di valutare l'efficacia della terapia e il profilo di tossicità del trattamento nella popolazione arruolata nello studio osservazionale MAGnEtIC

Il follow up mediano registrato nello studio è stato di 5,6 mesi. La PFS mediana registrata nello studio è risultata di 5,72 mesi (IC 95%: 2,42-8,02), l'OS mediana è risultata pari a 9,7 mesi (IC 95%: 7,54-11,86). La RR è pari al 21%, la DCR è risultata pari al 63%. I dati relativi alla PFS e OS mediane dello studio sono comparabili a quelle ottenute dagli studi registrativi dei farmaci: lo studio KEYNOTE-010 (88) per l'approvazione di Pembrolizumab ha ottenuto mPFS e mOS rispettivamente di 5 mesi e 10,4 mesi e RR del 18%, lo studio Checkmate-017 (93) e Checkmate-057 (91), per l'approvazione di nivolumab rispettivamente nell'adenocarcinoma e nello squamoso, hanno ottenuto PFS rispettivamente di 3,5 mesi e 2,5 mesi e OS mediane rispettivamente pari a 9,2 mesi e 12,2 mesi, con un RR pari al 20% e 19%. Lo studio POPLAR (96) per l'approvazione di Atezolizumab ha ottenuto una mOS di 12,6 mesi e un RR del 15%.

Il profilo di tossicità alla terapia nello studio MAGnEtIC ha evidenziato l'insorgenza di almeno un evento avverso correlato all'immunoterapia nel 54% dei pazienti, principalmente di grado G1-G2 (87%) e nessun paziente è deceduto a causa della terapia. Gli IRAE più frequentemente riscontrati sono stati diarrea (30%), rialzo delle

transaminasi (20%) e reazioni cutanee (13%). La percentuale di eventi avversi è analoga a quella registrata nello studio Checkmate-017 (58%), mentre negli studi KEYNOTE-010 e POPLAR la percentuale di eventi avversi immunorelati è inferiore (16% e 40% rispettivamente). Le tossicità immunocorrelate più frequentemente riscontrate negli studi registrativi dei farmaci sono state ipotiroidismo e ipertiroidismo per lo studio KEYNOTE-010 e Checkmate-017, e diarrea e aumento delle transaminasi riscontrati tra i più frequenti anche nello studio POPLAR.

La ricerca di nuovi biomarcatori predittivi della risposta alla terapia con inibitori dei *checkpoint* immunitari aiuterebbe a selezionare precocemente i pazienti che trarrebbero maggior beneficio dalla terapia, risparmiando in termini economici ed evitando le tossicità immunocorrelate ai pazienti non *responder*.

Attualmente, il livello di espressione di PDL-1 è l'unico marcatore predittivo utilizzato in pazienti con NSCLC trattati con ICIs, nonostante i suoi limiti di efficacia.

Negli ultimi anni, molti studi si sono rivolti alla ricerca di nuovi marcatori, specialmente nel sangue periferico o nel microambiente tumorale per sfruttare metodi meno invasivi rispetto alla biopsia, ma nonostante si siano evidenziate delle correlazioni, ad esempio con il rapporto NLR (*neutrophil to lymphocyte ratio*), la conta assoluta dei linfociti o ancora i livelli di LDH, non sono ancora sufficientemente forti da essere utilizzate nella pratica clinica (103).

Le citochine partecipano direttamente alla risposta immunitaria ma anche alla struttura del microambiente tumorale, per questo sono state di recente oggetto di studi per valutare il loro valore predittivo nell'immunoterapia, specialmente IL6, IL10 e IL8 (111,112). Proprio in questo contesto è nato lo studio MAGnEtIC, volto a valutare nella reale pratica clinica, oltre ai profili di tossicità e gli esiti del trattamento, l'esistenza di marcatori circolanti predittivi tra le citochine del sangue periferico e a trovare la relazione tra l'andamento ematico del

marcatore e l'andamento clinico dei pazienti, in una popolazione di soggetti con diagnosi di NSCLC (o Melanoma) avanzato-metastatico.

La valutazione della correlazione tra i livelli ematici di citochine e l'andamento clinico della malattia ha dimostrato come i livelli di IL8 e IL6 registrino un aumento statisticamente significativo con il progredire della malattia PD (p value  $\ll 0,05$ ) e una riduzione in caso di DC.

L'analisi logistica multivariata ha confermato che IL8 al ciclo 1 e la sua variazione relativa sono fattori indipendenti che predicano la probabilità di DC, con un'accuratezza complessiva dell'83,9%.

La mediana del follow up è stata di 10,6 mesi, mentre i tempi mediani di PFS e OS sono stati rispettivamente 5,8 mesi e 8,3 mesi.

Nella regressione multipla di Cox, elevati livelli di IL6 e IL8 al ciclo 1 sono rimasti significativamente associati con una PFS più breve, e lo stesso avviene con alti livelli di IL8 al ciclo 1 per l'OS.

Uno studio del 2017 (112) aveva già studiato l'associazione tra i livelli sierici di IL8 e la *performance* clinica di pazienti affetti da melanoma o NSCLC avanzati-metastatici, durante il trattamento con ICIs.

Nello studio sovraccitato sono stati coinvolti 15 pazienti con melanoma avanzato trattati con nivolumab o con nivolumab + ipilimumab e 19 pazienti con NSCLC avanzato trattati con nivolumab. Nello studio MAGnEtIC sono stati inclusi 80 pazienti con melanoma e 80 con NSCLC trattati con Nivolumab, Pembrolizumab o Atezolizumab.

Il tasso di controllo della malattia è stato del 63%, come nel nostro studio. Si è visto che le variazioni dei livelli ematici di IL8 riflettevano la risposta tumorale alla terapia con ICIs sia nel melanoma che nel NSCLC. In particolare, nello NSCLC nei pazienti *responder* i livelli di IL8 erano diminuiti significativamente al momento della miglior risposta (basale 20,8 pg/ml, Q1-Q3: 15,1-29 versus BR 6,5 pg/ml Q1-Q3: 0-19; P= 0,005). Nello studio MAGnEtIC, analogamente, nei pazienti con DC al ciclo 2, i livelli di IL8 diminuiscono

significativamente rispetto al basale (basale 27,03 pg/ml, Q1-Q3:16,06-41,38 versus DC 24,74, Q1-Q3:20,62-40,19; P= 0,008)

Nei non *responder* i livelli sierici mediani di IL8 sono aumentati significativamente al momento della progressione rispetto ai livelli basali (basale PD 12 pg/ml (Q1-Q3: 0-42) versus PD 51 pg/mL, Q1-Q3: 22-77; P=0,016) e lo stesso avviene nel nostro studio: (basale PD 57,75 pg/ml, Q1-Q3: 33,16-75,98 versus PD 58,11, Q1-Q3:33,92-112,03 pg/ml; P= =,008).

Si è inoltre visto come le variazioni dei livelli sierici di IL8 correlassero con la sopravvivenza globale in questi pazienti. La sopravvivenza globale è risultata significativamente più lunga nei pazienti con NSCLC trattati con ICIs che presentavano una diminuzione dei livelli sierici di IL8 rispetto ai pazienti che mostravano un aumento precoce, (OS mediana 8 mesi, 95% CI:0-19,7). Nello studio MAGnEtIC si è evidenziato un aumento dell'OS nello stesso modo, con una mediana di OS di 8,3 mesi (95%CI:4,0-13,8).

Un altro studio del 2017 (111) ha, invece, evidenziato risultati contrastanti con quelli dello studio MAGnEtIC per quanto riguarda la relazione tra l'andamento clinico della malattia e i livelli di IL6 e IL10. Nello studio di fase II sono stati arruolati pazienti con melanoma in stadio avanzato e trattati con nivolumab e si è osservato che i livelli sierici pretrattamento di IL6 e IL10 (e di IFN) erano significativamente più alti nei pazienti con risposta tumorale obiettiva, *responders*, rispetto a quelli con progressione di malattia, *non responders* (P < 0,0001, P = 0,0007 e P < 0,0001 rispettivamente).

Nello studio MAGnEtIC, invece, i livelli elevati di IL6, sia al ciclo 1 che al ciclo 2, correlano con una minor probabilità di DC (ciclo 1 OR=0,19 95% CI=0,03-0,82, ciclo 2 OR=0,02, 95% CI=0,0-0,01). Lo stesso è stato evidenziato per elevati valori di IL10 al ciclo 2 (OR= 0,21, 95% CI= 0,04-0,93).

Lo studio potrà essere ulteriormente sviluppato in futuro, analizzando le differenze nella risposta alla terapia, nella tossicità e nell'andamento dei marcatori, per identificare eventuali diversità nei due sessi.

## 1. Conclusioni

Lo studio prospettico *real world* MAGnEtIC ha ricercato dei nuovi marcatori predittivi per la risposta agli inibitori dei *checkpoint* immunitari nel sangue periferico in soggetti affetti da NSCLC avanzato.

L'obiettivo primario del presente lavoro di tesi è l'analisi descrittiva delle caratteristiche cliniche dei 76 pazienti con NSCLC arruolati in tale studio, il profilo di tossicità e la risposta alla terapia in termini di RR, DCR, PFS e OS.

Dalle analisi delle citochine circolanti in un sottogruppo di 35 pazienti è emerso come i valori di IL6 e IL8 siano dei fattori predittivi dell'andamento della patologia: valori elevati, infatti, si correlano a PD e a una minor probabilità di DC. Inoltre, elevati livelli di IL-6 e IL-8 al T1 sono associati a una PFS minore, mentre una ridotta OS si associa solo a valori elevati di IL8.

Il limite principale dello studio è dato dal campione limitato di pazienti considerati.

Per una migliore comprensione del ruolo e della modalità di monitoraggio di queste citochine come marcatori predittivi dovrebbero essere condotti altri studi prospettici con una numerosità campionaria più ampia e su un maggior numero di neoplasie trattabili con immunoterapia. Inoltre, per meglio caratterizzare l'efficacia di questi biomarcatori nel predire l'andamento della malattia sarebbe opportuno estendere il loro monitoraggio anche in altre neoplasie trattabili con immunoterapia. Questi risultati potranno aiutare i clinici nella selezione dei pazienti che potrebbero trarre maggior beneficio dal trattamento con ICIs e valutare una precoce sospensione della terapia, sulla base del monitoraggio di questi marcatori nel sangue del paziente.

## BIBLIOGRAFIA

1. IARC. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide GLOBOCAN 2012.  
Available from: <http://gco.iarc.fr>
2. AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2021.
3. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol*. 2016 May;27(5):926–33.
4. Jemal A, Thun MJ, Ries LAG, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2005, Featuring Trends in Lung Cancer, Tobacco Use, and Tobacco Control. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2008 Dec;100(23):1672–94.
5. Higginson J, DeVita VT. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. *Am Ind Hyg Assoc J*. 1980 May;41(5):A26, A28, A30 passim.
6. Maghfoor I, Perry MC. Lung Cancer. *Ann Saudi Med*. 2005 Jan;25(1):1–12.
7. DOLL R. SMOKING AND CARCINOMA OF THE LUNG - BRITISH MEDICAL JOURNAL. 1950;
8. Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habits; a preliminary report. *Br Med J*. 1954 Jun 26;1(4877):1451–5.
9. HARRISON. PRINCIPI DI MEDICINA INTERNA. 20th ed. CEA; 2021.
10. Crispo A, Brennan P, Jöckel KH, Schaffrath-Rosario A, Wichmann HE, Nyberg F, et al. The cumulative risk of lung cancer among current, ex- and never-smokers in European men. *Br J Cancer*. 2004 Oct;91(7):1280–6.

11. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2004;83:1–1438.
12. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010 Aug 1;19(8):1893–907.
13. Hackshaw AK. Lung cancer and passive smoking. *Stat Methods Med Res.* 1998 Apr;7(2):119–36.
14. Taylor R, Najafi F, Dobson A. Meta-analysis of studies of passive smoking and lung cancer: effects of study type and continent. *Int J Epidemiol.* 2007 Oct 1;36(5):1048–59.
15. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ.* 1997 Oct 18;315(7114):980–8.
16. Boffetta P. Involuntary smoking and lung cancer. *Scand J Work Environ Health.* 2002;28 Suppl 2:30–40.
17. Klebe S, Leigh J, Henderson DW, Nurminen M. Asbestos, Smoking and Lung Cancer: An Update. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Dec 30;17(1):E258.
18. El Zoghbi M, Salameh P, Stücker I, Brochard P, Delva F, Lacourt A. Absence of multiplicative interactions between occupational lung carcinogens and tobacco smoking: a systematic review involving asbestos, crystalline silica and diesel engine exhaust emissions. *BMC Public Health.* 2017 Feb 2;17(1):156.
19. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J.* 2016 Sep;48(3):889–902.

20. Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2007 Mar;18(3):431–46.
21. Schubauer-Berigan MK, Daniels RD, Pinkerton LE. Radon exposure and mortality among white and American Indian uranium miners: an update of the Colorado Plateau cohort. *Am J Epidemiol*. 2009 Mar 15;169(6):718–30.
22. Lubin JH, Boice JD, Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, et al. Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Jun 7;87(11):817–27.
23. Liu P, He K, Li Y, Wu Q, Yang P, Wang D. Exposure to mercury causes formation of male-specific structural deficits by inducing oxidative damage in nematodes. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012 May;79:90–100.
24. Hayes RB. The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes Control CCC*. 1997 May;8(3):371–85.
25. Jose CC, Jagannathan L, Tanwar VS, Zhang X, Zang C, Cuddapah S. Nickel exposure induces persistent mesenchymal phenotype in human lung epithelial cells through epigenetic activation of ZEB1. *Mol Carcinog*. 2018 Jun;57(6):794–806.
26. Loomis D, Huang W, Chen G. The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin J Cancer*. 2014 Apr;33(4):189–96.
27. Christiani DC. Ambient Air Pollution and Lung Cancer: Nature and Nurture. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021 Oct 1;204(7):752–3.
28. Tseng CH, Tsuang BJ, Chiang CJ, Ku KC, Tseng JS, Yang TY, et al. The Relationship Between Air Pollution and Lung Cancer in Nonsmokers in Taiwan. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2019 May;14(5):784–92.



29. Lam TK, Gallicchio L, Lindsley K, Shiels M, Hammond E, Tao X (Grant), et al. Cruciferous Vegetable Consumption and Lung Cancer Risk: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Jan 1;18(1):184–95.
30. Sinha R, Kulldorff M, Swanson CA, Curtin J, Brownson RC, Alavanja MC. Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among Missouri women. *Cancer Res.* 2000 Jul 15;60(14):3753–6.
31. Brenner DR, McLaughlin JR, Hung RJ. Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011 Mar 31;6(3):e17479.
32. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol Poznan Pol.* 2021;25(1):45–52.
33. Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet.* 2008 May;40(5):616–22.
34. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and Other Neoplasms. *Science.* 1990 Nov 30;250(4985):1233–8.
35. Dutkowska AE, Antczak A. Comorbidities in lung cancer. *Pneumonol Alergol Pol.* 2016;84(3):186–92.
36. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017 Jul;28:iv1–21.
37. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 12;22(16):8661.

38. Panunzio A, Sartori P. Lung Cancer and Radiological Imaging. *Curr Radiopharm.* 2020;13(3):238–42.
39. De Wever W, Coolen J, Verschakelen J. Imaging techniques in lung cancer. *Breathe.* 2011 Jun 1;7(4):338–46.
40. Passiglia F, Bertolaccini L, Del Re M, Facchinetti F, Ferrara R, Franchina T, et al. Diagnosis and treatment of early and locally advanced non-small-cell lung cancer: The 2019 AIOM (Italian Association of Medical Oncology) clinical practice guidelines. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020 Apr;148:102862.
41. Associazione Italiana di Oncologia Medica. Linee guida NEOPLASIE DEL POLMONE. 2020.
42. Patriarca S. Elementi di stadiazione dei tumori e sistema TNM. 2010.
43. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016 Jul;25(3):447–68.
44. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018 Oct;52:103–9.
45. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2022 Mar;17(3):362–87.
46. Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In: Reckamp KL, editor. *Lung Cancer* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2022 Aug 18]. p. 25–46. (Cancer Treatment and Research; vol. 170). Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40389-2\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40389-2_2)

47. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
48. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
49. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1997 Dec;8(12):1197–206.
50. Reckamp. Lung cancer treatment and research. Vol. 170. Springer; 2016. 324 p.
51. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020 Apr;61:167–79.
52. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar;116(6):855–67.
53. Fang M, Xu C, Wu J, Zhang Y, He C. A comparison of consistency of detecting BRAF gene mutations in peripheral blood and tumor tissue of nonsmall-cell lung cancer patients. *J Cancer Res Ther*. 2014 Nov;10 Suppl:C150-154.
54. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring *BRAF* Mutations. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):2046–51.
55. Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):863–70.
56. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012 Feb 12;18(3):378–81.

57. Shaw AT, Ou SHI, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1963–71.
58. Roskoski R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol Res*. 2013 Feb;68(1):68–94.
59. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1693–703.
60. Wong DWS, Leung ELH, So KKT, Tam IYS, Sihoe ADL, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*. 2009 Apr 15;115(8):1723–33.
61. Sossin WS. Tracing the Evolution and Function of the Trk Superfamily of Receptor Tyrosine Kinases. *Brain Behav Evol*. 2006;68(3):145–56.
62. Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccatto E, Pierotti MA. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. *J Cell Physiol*. 2003 May;195(2):168–86.
63. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1469–72.
64. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *Herbst R, editor. PLoS Med*. 2005 Jan 25;2(1):e17.
65. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Dec;11(12):834–48.

66. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12–21.32. *Genomics*. 1989 Apr;4(3):362–6.
67. Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, et al. Intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature*. 2004 Sep;431(7008):525–6.
68. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjær S, Scott RP, Hanrahan S, Santoro M, et al. Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain. *J Biol Chem*. 2006 Nov;281(44):33577–87.
69. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, et al. *RET* Fusions Define a Unique Molecular and Clinicopathologic Subtype of Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 10;30(35):4352–9.
70. AIOM. Linee guida neoplasie del polmone. 2021st ed. :607.
71. Steven A, Fisher SA, Robinson BW. Immunotherapy for lung cancer: Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*. 2016 Jul;21(5):821–33.
72. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012 Sep;23:viii6–9.
73. Brahmer JR. Harnessing the Immune System for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1021–8.
74. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Apr;54(4):307–14.
75. Zhang Y, Zhang Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell Mol Immunol*. 2020 Aug;17(8):807–21.

76. Bickels J, Kollender Y, Merinsky O, Meller I. Coley's toxin: historical perspective. *Isr Med Assoc J IMAJ*. 2002 Jun;4(6):471–2.
77. Orange M, Reuter U, Hobohm U. Coley's Lessons Remembered: Augmenting Mistletoe Therapy. *Integr Cancer Ther*. 2016 Dec;15(4):502–11.
78. Fong L, Small EJ. Anti-Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Antibody: The First in an Emerging Class of Immunomodulatory Antibodies for Cancer Treatment. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 10;26(32):5275–83.
79. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr;12(4):252–64.
80. Korman AJ, Garrett-Thomson SC, Lonberg N. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 Jul;21(7):509–28.
81. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Jul 8;100(14):8372–7.
82. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7412–20.
83. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):158–68.
84. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008 Apr 1;26(1):677–704.

85. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011 Sep;28(3):682–8.
86. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002 Aug 1;8(8):793–800.
87. Leighl NB, Hellmann MD, Hui R, Carcereny E, Felip E, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab in patients with advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-001): 3-year results from an open-label, phase 1 study. *Lancet Respir Med*. 2019 Apr;7(4):347–57.
88. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2016 Apr;387(10027):1540–50.
89. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csósz T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1823–33.
90. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2019 May;393(10183):1819–30.
91. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jul 9;373(2):123–35.

92. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Oct 22;373(17):1627–39.
93. Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, Chow LQM, Burgio MA, de Castro Carpeno J, et al. Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2021 Mar 1;39(7):723–33.
94. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*. 2018 Jun 14;378(24):2288–301.
95. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Dec 6;379(23):2220–9.
96. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. 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 Apr;387(10030):1837–46.
97. Das S, Johnson DB. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2019 Dec;7(1):306.
98. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, Chalkias S, Gorham J, Xu Y, et al. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2016 Nov 3;375(18):1749–55.
99. AIOM. [http://media.aiom.it/userfiles/files/doc/op-paz-fond/20160709\\_Immunoncologia.pdf](http://media.aiom.it/userfiles/files/doc/op-paz-fond/20160709_Immunoncologia.pdf).



100. Miranda Poma J, Ostios Garcia L, Villamayor Sanchez J, D'errico G. What do we know about cancer immunotherapy? Long-term survival and immune-related adverse events. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2019 May;47(3):303–8.
101. Darnell EP, Mooradian MJ, Baruch EN, Yilmaz M, Reynolds KL. Immune-Related Adverse Events (irAEs): Diagnosis, Management, and Clinical Pearls. *Curr Oncol Rep*. 2020 Apr;22(4):39.
102. Lee EY, Kulkarni RP. Circulating biomarkers predictive of tumor response to cancer immunotherapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019 Oct 3;19(10):895–904.
103. Friedman CF, Postow MA. Emerging Tissue and Blood-Based Biomarkers that may Predict Response to Immune Checkpoint Inhibition. *Curr Oncol Rep*. 2016 Apr;18(4):21.
104. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015 Apr 1;14(4):847–56.
105. McLean L, Leal JL, Solomon BJ, John T. Immunotherapy in oncogene addicted non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2021 Jun;10(6):2736–51.
106. Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer*. 2018 Dec;17(1):129.
107. Quandt D, Zucht HD, Amann A, Wulf-Goldenberg A, Borrebaeck C, Cannarile M, et al. Implementing liquid biopsies into clinical decision making for cancer immunotherapy. *Oncotarget*. 2017 Jul 18;8(29):48507–20.
108. Music M, Prassas I, Diamandis EP. Optimizing cancer immunotherapy: Is it time for personalized predictive biomarkers? *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018 Oct 3;55(7):466–79.

109. Abolfathi H, Sheikhpour M, Shahraeini SS, Khatami S, Nojoumi SA. Studies in lung cancer cytokine proteomics: a review. *Expert Rev Proteomics*. 2021 Jan 2;18(1):49–64.
110. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):e218–28.
111. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, Iizuka H, Uehara J, Otsuka F, et al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer Sci*. 2017 May;108(5):1022–31.
112. Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2017 Aug;28(8):1988–95.
113. O’Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol*. 2017 Jul;18(7):849–51.
114. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982 Dec;5(6):649–55.
115. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_en.pdf).
116. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228–47.

117.

[https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf).