



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA - 03139

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ONCOLOGÍA

TÍTULO DE TESIS DOCTORAL:

**Análisis de datos de vida real y búsqueda de biomarcadores en pacientes
que reciben inhibidores de punto de control inmunológico en el
tratamiento de primera línea del carcinoma no microcítico de pulmón
metastásico**

Doctorando:

Guillermo Suay Montagud

Directores:

Dr. Agustín Lahoz Rodríguez

Dr. José Gómez Codina

Valencia, Febrero de 2025

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Lahoz Rodríguez, Agustín N.I.F. 07566860K, Departamento/Instituto: Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, Centro: Hospital La Fe Valencia

2.- Apellidos y nombre: Gómez Codina, Jose N.I.F. 22631147K, Departamento/Instituto: Departamento de Medicina Centro: Universidad de Valencia

Tutor o tutora

Apellidos y nombre. Gómez Codina, Jose N.I.F. 22631147K, Departamento/Instituto: Departamento de Medicina Centro: Universidad de Valencia

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Análisis de datos de vida real y búsqueda de biomarcadores en pacientes que reciben inhibidores de punto de control inmunológico en el tratamiento de primera línea del carcinoma no microcítico de pulmón metastásico"

de D/Dña. Guillermo Suay Montagud,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable (*favorable/desfavorable*) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 26/02/2025

Fdo.: Lahoz Rodríguez, Agustín

AGUSTIN
GERARDO
LAHOZ
RODRIGUEZ

Director/a

Fdo.: Gómez Codina, Jose

JOSE
GOMEZ
CODINA

Director/a

Fdo.: Gómez Codina, Jose

JOSE
GOMEZ
CODINA

Tutor/a

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Dedicatorias

A mi familia, a mis padres y hermano, por haberme apoyado en toda mi vida a nivel personal y profesional para alcanzar todos los objetivos que me he propuesto conseguir, y por la ayuda en ir a por ello. Gracias por todo lo que me habéis aportado y apoyado, la paciencia en temporadas difíciles o cuando ha sido necesario estar trabajando a horas intempestivas en todos los proyectos.

A mi pareja, por todo el apoyo, comprensión y dedicación en esta etapa tan compleja. Gracias por todas esas horas de apoyo emocional, de debate estadístico y de hincapié en persistir y seguir adelante con todos los proyectos. Si he podido salir delante de la complejidad de este último año ha sido gracias a su apoyo.

A mí, por todo el ímpetu y ganas de conseguir un objetivo complejo. A pesar de haber tenido que cavar una zanja muy compleja, creando una nueva figura investigadora en el hospital, ver los resultados de todo es algo muy gratificante y que me anima a seguir adelante por este complejo camino.

Agradecimientos

El haber llegado al punto de depositar esta tesis no ha sido una tarea fácil. Desde mis inicios en el campo de la investigación traslacional en la etapa universitaria, donde estuve de becario de laboratorio pipeteando a horas intempestivas, siempre he tenido un interés en la investigación porque creo que lo más adecuado es ofrecer lo mejor para el paciente, y en casos donde queda aún tanto por hacer, como es el caso de la oncología, creo que siempre hay que ir más allá. Esta sensación y motivación me llevó a buscar seguir este camino traslacional en la residencia del hospital que considero un diamante en bruto, el Hospital Universitario y Politécnica La Fe de Valencia. En dicho hospital vi todas las complejidades para poder iniciar este camino traslacional, pero viendo todo el potencial que había, quise quedarme. Esto ha supuesto múltiples dificultades en hacer entender cuál es mi papel y mi figura en el servicio de Oncología, o la dificultad de intentar empezar una tesis doctoral durante mi residencia que no acabó con buen pie. Sí que desearía agradecer en toda esa etapa de residencia el apoyo de mi jefe de servicio, Jose Gómez Codina, que siempre estuvo dispuesto a apoyarme en mi camino, y a mis compañeros residentes que estuvieron a mi lado.

En vías de finalizar mi residencia conocí a la figura que considero como uno de mis mentores en poder empezar este camino, Óscar Juan, que desde que vio mi interés en la investigación traslacional solo hizo que apoyarme en el camino, dar la oportunidad de a pesar de mi juventud, de poder expandirme en los ensayos clínicos, y poder montar un contrato de investigación traslacional, con un componente de investigación básica y un componente asistencial. A él le debo también el haberme puesto en contacto con la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, particularmente con Agustín Lahoz, el cual fue capaz de guiarme por todos los aspectos de la vía de investigador “mixto” y ayudarme en integrarme en la parte básica. Agradecer todo su apoyo a nivel del grupo para conseguir el contrato Río Hortega por el Instituto de Salud Carlos III, y todo el apoyo para el desarrollo de la tesis. Me devolvieron una ilusión por trabajar en el campo que a mí me gustaba, la investigación traslacional, y que espero poder seguir recorriendo en el futuro. Estoy recorriendo una senda poco explorada en el servicio de oncología del Hospital La Fe, pero no voy a cejar en mi empeño de sacar adelante y poder ayudar en todo lo posible a que el Hospital La Fe sea un centro de referencia para la investigación traslacional en cáncer. Agradecer aquí de nuevo a Jose Gómez Codina por permitirme recorrer este camino difícil, y por todas las discusiones culturales que hemos tenido, y por transmitirme el aspecto de cuidar a los pacientes de forma adecuada y transmitirles nuestra profesionalidad.

No podía faltar tampoco un agradecimiento fundamental a los pacientes y a sus familias. Sin su apoyo y voluntad de avanzar de forma altruista no sería posible avanzar en este proceso de investigación. Su lucha y capacidad de superación, el planteamiento de relativizar y entender ciertos aspectos de la vida, me han enseñado a mejorar como profesional y en varios puntos de vista de sobre cómo abordar mi vida.

Doy las gracias también a la Unidad de Biomarcadores y Medicina de precisión en global, por todo ese cariño y apoyo en que un médico con interés en investigación

básica estuviera allí con ellos, y por toda la ayuda para poder estar procesando muestras allí, y recuperar el trabajo de investigador mixto que tanto disfruto. Particularmente, de nuevo, a Agustín Lahoz, y a Juan Carlos García por todo ese apoyo en los momentos difíciles, y enseñarme a mejorar en la medida de lo posible en la redacción de proyectos y creación de estos; espero poder pagároslo en el futuro con grandes colaboraciones.

A mis directores de tesis y tutor de la universidad, Agustín Lahoz y Jose Gómez, agradecer todo el apoyo y trabajo en este proyecto. Por haber estado ahí incluso en horas intempestivas para resolver todos los diferentes proyectos. A los compañeros del Hospital Arnau de Vilanova, en particular a José García, por compartir parte de su trabajo y las muestras en poder ayudar a desarrollar este proyecto; y a los compañeros del Hospital General de Castellón por haber participado en el proyecto. Agradecer también a David Hervás de la Universidad Politécnica de Valencia su ayuda en la realización del apartado estadístico.

Dar las gracias también a mis otros compañeros del servicio de oncología. En particular a Quico Aparisi por sus consejos, sus reflexiones y la ayuda en ciertos momentos difíciles; espero que sigamos siendo grandes compañeros en el futuro. Agradecer también al resto de compañeros del servicio, que siempre han mostrado motivación e interés en los proyectos que estoy realizando. También agradecer a los residentes por su predisposición y ganas de apoyar los proyectos en la medida de lo posible. Gracias a los compañeros de enfermería, particularmente a Elena Delgado y Alicia Rodríguez, por haber estado ahí en los momentos más complejos para conseguir muestras o poner en marcha diversos proyectos.

Agradecer también al apoyo brindado por la industria farmacéutica para el desarrollo de ciertos proyectos o conseguir financiación para presentar resultados de estos, en particular a Janssen por la financiación en poder presentar un póster relacionado con la tesis en la *World Conference on Lung Cancer*, el evento más importante del mundo en cáncer de pulmón. Este trabajo tampoco sería posible sin la financiación del instituto Carlos III de Madrid, al apostar con los contratos Río Hortega y Juan Rodés en este papel del investigador traslacional.

Muchas gracias a todos por haber estado ahí en todos estos momentos, y por ayudar a sacar adelante esta tesis doctoral.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	16
1.1	El desarrollo de la inmunoterapia en cáncer de pulmón	17
1.1.1	Cáncer de pulmón e inhibidores de punto de control inmunitario	17
1.1.2	Los inhibidores de punto de control inmunitarios.....	18
1.1.3	IPCI en monoterapia como tratamiento de primera línea del aCPCNP.....	19
1.1.4	IPCI en combinación como tratamiento de primera línea del aCPCNP.....	21
1.2	La vía PD-1/PD-L1	24
1.2.1	Expresión de PD-1 y sus ligandos.....	26
1.2.2	PD-1 en la señalización de linfocitos T	27
1.2.3	Alteración del metabolismo por PD-1.....	29
1.2.4	Implicaciones clínicas de PD-1, PD-L1, PDL-L2 para la terapia antineoplásica.....	31
1.3	Biomarcadores predictores de respuesta a IPCI en CPCNP	33
1.3.1	PD-L1 como biomarcador predictivo	34
1.3.2	TMB, neoantígenos, y firmas genéticas y epigenéticas.....	35
1.3.3	Microambiente tumoral.....	38
1.3.4	Firmas transcriptómicas.....	40
1.3.5	Microbioma.....	41
1.4	Características basales de los pacientes como biomarcadores de respuesta	44
1.5	Recuento celular en biopsia líquida como biomarcador de respuesta a IPCIs.....	45
2	Hipótesis y Objetivos.....	50
2.1	Hipótesis.....	51
2.2	Objetivos.....	51
2.2.1	Objetivos primarios.....	51
2.2.2	Objetivos secundarios.....	52
3	Material y métodos.....	53
3.1	Diseño del estudio	54
3.2	Población del estudio	54
3.2.1	Criterios de inclusión de la cohorte prospectiva de búsqueda de biomarcadores (Cohorte A):.....	55
3.2.2	Criterios de inclusión de la cohorte observacional (Cohorte B):.....	55
3.3	Cálculo de tamaño muestral.....	57
3.4	Plan terapéutico	58
3.4.1	Plan terapéutico de la cohorte A.....	58
3.4.2	Plan terapéutico de la cohorte B.....	59
3.5	Procedimientos clínicos del estudio	59

3.5.1	Procedimientos cohorte A (Tabla 2).....	59
3.5.2	Procedimientos cohorte B (Tabla 3).....	60
3.5.3	Variables clínicas recogidas	60
3.6	Procedimientos de laboratorio del estudio.....	61
3.6.1	Metodología de extracción de las muestras sanguíneas	61
3.6.2	Aislamiento de células mononucleares en sangre periférica.....	62
3.6.3	Procedimiento de citometría de flujo	62
3.7	Análisis estadístico.....	63
3.7.1	Análisis de las variables clínicas	63
3.7.2	Análisis bayesiano para la creación del modelo predictivo	64
3.8	Aspectos éticos y legales	65
3.8.1	Disposiciones generales	65
3.8.2	Formulario de consentimiento informado y hoja de información al paciente	65
3.8.3	Confidencialidad de los datos	65
3.8.4	Aprobación por el comité ético de investigación en medicamentos	66
4	Resultados.....	67
4.1	Búsqueda de biomarcadores no invasivos de respuesta a IPCIs en el tratamiento de aCPCNP	68
4.1.1	Características basales de la cohorte	68
4.1.2	Análisis por citometría de flujo	72
4.1.3	Selección de poblaciones celulares circulantes con capacidad predictora	73
4.1.4	Uso de puntos de corte para monocitos clásicos, células NK y linfocitos T CD4+....	75
4.1.5	Creación del modelo de respuesta a IPCIs	79
4.1.6	Desarrollo de herramientas que faciliten el uso clínico del ICIRS	83
4.2	Análisis de datos de vida real de pacientes con aCPCNP tratados en primera línea con IPCIs	86
4.2.1	Características basales	86
4.2.2	Datos globales de eficacia	89
4.2.3	Comparativa de las variables basales.....	90
4.2.4	Eficacia por tipo de tratamiento recibido.....	90
4.2.5	Eficacia por histología	91
4.2.6	Eficacia por uso de pemetrexed	93
4.2.7	Eficacia en función del ECOG	94
4.2.8	Eficacia por edad avanzada	96
4.2.9	Eficacia por sexo	97
4.2.10	Eficacia en función del número de comorbilidades.....	98

4.2.11	Eficacia en función de polifarmacia	100
4.2.12	Eficacia en función de metástasis cerebrales	101
4.2.13	Eficacia en función de la presencia de mutaciones sin tratamiento dirigido aprobado	103
4.2.14	Eficacia en pacientes que presentaron una toxicidad por IPCIs severa	104
4.2.15	Eficacia en función del nivel de expresión de PD-L1.....	106
5	Discusión	108
5.1	Búsqueda de biomarcadores de respuesta a IPCIs en el tratamiento de primera línea del aCPCNP.....	109
5.2	La necesidad de datos de vida real para optimizar el tratamiento del aCPCNP con IPCIs	114
6	Conclusiones	129
6.1	Búsqueda de biomarcadores no invasivos de repuesta a IPCIs en el tratamiento de aCPCNP	130
6.2	Análisis de datos de vida real en el escenario de aCPCNP tratados en primera línea con IPCIs	130
7	Bibliografía	132
8	Anexos.....	154
8.1	Anexo 1. Hoja de información al paciente y consentimiento informado	154
8.2	Anexo 2. Informe del comité de ética en investigación médica Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia	161
9	Actividades científicas relacionadas	163
9.1	Concesión beca GIDO proyectos Investigación 2022	163
9.2	Póster en congreso nacional.....	164
9.3	Poster en congreso internacional	166
9.4	Publicaciones relacionadas en revistas científicas	167

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS

- **aCPCNP**: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas avanzado.
- **AJCC**: Comité americano unificado en cancer (del inglés *American Joint Committee on Cancer*).
- **ALK**: Quinasa de linfoma anaplásico (del inglés *Anaplastic Lymphoma Kinase*).
- **APCs**: Células presentadoras de antígenos (del inglés *Antigen-Presenting Cells*).
- **B2M**: β 2-microglobulina (del inglés *Beta-2 Microglobulin*).
- **BATF**: Factor de transcripción cremallera de leucina básica (del inglés *Basic Leucine Zipper Transcription Factor ATF-Like*).
- **BIM**: Mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2 (del inglés *Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death*).
- **BRAF**: Homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-RAF (del inglés *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*).
- **BTLA**: Atenuador de linfocitos B y T (del inglés *B and T Lymphocyte Attenuator*).
- **bTMB**: Carga mutacional tumoral en sangre (del inglés *Blood Tumor Mutational Burden*).
- **C-Index**: Índice de concordancia de Harrell (del inglés *Harrell Concordance Index*).
- **CCL**: Ligando del motivo C-C de la quimioquina (del inglés *C-C Motif Chemokine Ligand*).
- **CEIm**: Comité ético de investigación en medicamentos (del inglés *Comité Ético de Investigación en Medicamentos*).
- **CK2**: Caseína-quinasa 2 (del inglés *Casein Kinase 2*).
- **CPCNP**: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas.
- **ctDNA**: DNA tumoral libre en sangre (del inglés *Circulating Tumor DNA*).
- **CXCL**: Ligando del motivo C-X-C de la quimioquina (del inglés *C-X-C Motif Chemokine Ligand*).
- **DDR**: Respuesta al daño en el DNA (del inglés *DNA Damage Response*).
- **dNLR**: Índice neutrófilo/leucocito derivado (del inglés *derived Neutrophil/Leukocyte ratio*).
- **DUT**: Deoxiuridina trifosfatasa (del inglés *Deoxyuridine Triphosphatase*).
- **ECOG**: Grupo cooperativo de oncología del este (del inglés *Eastern Cooperative Oncology Group*).
- **EGFR**: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*).
- **EMA**: Agencia europea del medicamento (del inglés *European Medicines Agency*).
- **EOMES**: Eomesodermina.
- **ERK**: Quinasa regulada por señales extracelulares (del inglés *Extracellular Signal-Regulated Kinase*).

- **FDA:** Administración de alimentos y fármacos (del inglés *Food and Drug Administration*).
- **FGL1:** Proteína homóloga al fibrinógeno 1 (del inglés *Fibrinogen-Like Protein 1*).
- **GRIm:** Índice inmunológico Gutave Roussy (del inglés *Gustave Roussy Immune score*).
- **HIF1:** Factor 1 inducible por hipoxia (del inglés *Hypoxia-Inducible Factor 1*).
- **HR:** Cociente de riesgo (del inglés *Hazard Ratio*).
- **IASLC:** Asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón (del inglés *International Association for the Study of Lung Cancer*).
- **IC:** Intervalo de confianza.
- **ICIRS:** Índice de respuesta a inhibidores del punto de control inmunológicos (del inglés *Immune Checkpoint Inhibitor Response Score*).
- **IDO1:** Indoleamina 2,3-dioxigenasa-1 (del inglés *Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1*).
- **INOS:** Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*).
- **KEAP1:** Proteína 1 asociada a ECH homóloga a Kelch (del inglés *Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*).
- **KRAS:** Oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata Kirsten (del inglés *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene*).
- **LAG-3:** Gen de activación de linfocitos 3 (del inglés *Lymphocyte Activation Gene-3*).
- **LIPI:** Índice pronóstico inmune del pulmón (del inglés *Lung Immune Prognostic Index*).
- **MAT:** Microambiente tumoral.
- **MDSCs:** Células mieloides supresoras (del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*).
- **MEK:** Proteína quinasa de activación mitogénica (del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*).
- **MGMT:** O-6-metilguanina-DNA metiltransferasa (del inglés *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*).
- **mIF:** Inmunofluorescencia múltiple (del inglés *Multiplex Immunofluorescence*).
- **mRNA:** RNA mensajero (del inglés *Messenger RNA*).
- **mSG:** Mediana de supervivencia global.
- **mSLP:** Mediana de supervivencia libre de progresión.
- **NFAT:** Factor nuclear de células T activadas (del inglés *Nuclear Factor of Activated T Cells*).
- **NK:** Células asesinas naturales (del inglés *Natural Killer Cells*).
- **NKT:** Células asesinas naturales T (del inglés *Natural Killer T Cells*).
- **NLR:** Índice neutrófilo/linfocito (del inglés *Neutrophil-to-lymphocyte ratio*).
- **PD-1:** Muerte programada 1 (del inglés *Programmed Death-1*).
- **PD-L1:** Ligando de muerte programada 1 (del inglés *Programmed Death-Ligand 1*).

- **PD-L2:** Ligando de muerte programada 2 (del inglés *Programmed Death-Ligand 2*).
- **PET:** Tomografía por emisión de positrones (del inglés *Positron Emission Tomography*).
- **PI3K:** Fosfatidilinositol-3 quinasa (del inglés *Phosphatidylinositol-3 Kinase*).
- **PL:** Predictor lineal.
- **PLCG1:** Fosfoinosítido fosfolipasa C gamma 1 (del inglés *Phospholipase C Gamma 1*).
- **PSMB9:** Subunidad beta tipo 9 del proteasoma (del inglés *Proteasome Subunit Beta Type-9*).
- **PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (del inglés *Phosphatase and Tensin Homolog*).
- **ROS1:** ROS proto-oncogén 1.
- **SHP-2:** Fosfatasa de proteína-tirosina Src homóloga-2 (del inglés *Src Homology Region 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2*).
- **STAT3:** Transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*).
- **STK11:** Serina/treonina quinasa 11 (del inglés *Serine/Threonine Kinase 11*).
- **TGF- β 1:** Factor de crecimiento transformante beta 1 (del inglés *Transforming Growth Factor Beta 1*).
- **TIGIT:** Inmunoreceptor de células T y dominio ITIM (del inglés *T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*).
- **TILS:** Linfocitos infiltrantes de tumor (del inglés *Tumor infiltrating lymphocytes*).
- **TMB:** Carga mutacional tumoral (del inglés *Tumor Mutational Burden*).
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral α (del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*).
- **TP53:** Proteína tumoral p53 (del inglés *Tumor Protein p53*).
- **TYMS:** Timidilato sintetasa (del inglés *Thymidylate Synthase*).
- **YWHAG:** Tirosina 3-monooxigenasa/proteína de activación gamma triptófano 5-monooxigenasa (del inglés *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Gamma*).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Línea temporal donde se pueden observar los diferentes IPCIs que han mostrado resultados positivos en el contexto global del desarrollo de los IPCIs en el CPCNP.	18
Figura 2. Moléculas coestimuladoras de la familia B7-CD28-CTLA-4, y estructura de PD-1.....	25
Figura 3. Efectos de PD-1 en las principales vías de señalización de las células T.	28
Figura 4. Alteraciones del metabolismo por la vía PD-1.	30
Figura 5. Resumen de biomarcadores predictores de respuesta a IPCIs en CPCNP.	34
Figura 6. Resumen del potencial como biomarcador del microbioma en la respuesta a IPCI en CPCNP.	42
Figura 7. Resumen de las principales diferencias entre hombres y mujeres en el sistema inmunológico y la respuesta a células de CPCNP.	44
Figura 8. Beneficios potenciales del recuento celular en sangre periférica como biomarcador de respuesta a IPCIs en CPCNP.	45
Figura 9. Definición de las poblaciones celulares.	63
Figura 10. Representación gráfica de la SLP.	68
Figura 11. Representación gráfica de la SG.	69
Figura 12. Representación gráfica de la SLP estratificada por pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente a aquellos que han recibido IPCIs combinados con quimioterapia.	70
Figura 13. Representación gráfica de la SG estratificada por pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente a aquellos que han recibido IPCIs combinados con quimioterapia..	71
Figura 14. Porcentaje de los diferentes tipos de poblaciones celulares en pacientes tratados con IPCIs en monoterapia, y con IPCIs combinados con quimioterapia.	72
Figura 15. Representación gráfica de la SLP en la comparativa de los pacientes del grupo 1 y grupo 2.....	76
Figura 16. Representación gráfica de la SG en la comparativa de los pacientes del grupo 1 y grupo 2.....	77
Figura 17. Representación gráfica de la SLP en la comparativa de los pacientes del grupo 3 y grupo 4.....	78
Figura 18. Representación gráfica de la SG en la comparativa de los pacientes del grupo 3 y grupo 4.....	78
Figura 19. Valores de la distribución normal estándar acumulada.	80
Figura 20. Nomograma para SLP e IPCIs en monoterapia.....	83
Figura 21. Nomograma para SG e IPCIs en monoterapia.....	83
Figura 22. Nomograma para SLP e IPCIs combinados con quimioterapia.....	83
Figura 23. Nomograma para SG e IPCIs combinados con quimioterapia.	84
Figura 24. Pantallas de rellenado de datos (imagen superior) y de resultados (imagen inferior) de la aplicación web del ICIRS.	85
Figura 25. Representación gráfica de la SLP.....	89
Figura 26. Representación gráfica de la SG.	89
Figura 27. Representación gráfica de la SLP al comparar pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente aquellos que han recibido IPCIs en combinación con otros fármacos.....	90
Figura 28. Representación gráfica de la SG al comparar pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente aquellos que han recibido IPCIs en combinación con otros fármacos.....	91
Figura 29. Representación gráfica de la SLP estratificada por pacientes con histología escamosa y no-escamosa.....	92
Figura 30. Representación gráfica de la SG estratificada por pacientes con histología escamosa y no-escamosa.....	92

Figura 31. Representación gráfica de la SLP en pacientes que han llevado quimioterapia basada en pemetrexed, frente aquellos que han llevado otros esquemas de tratamiento.	93
Figura 32. Representación gráfica de la SG en pacientes que han llevado quimioterapia basada en pemetrexed, frente aquellos que han llevado otros esquemas de tratamiento.	94
Figura 33. Representación gráfica de la SLP en función del ECOG basal del paciente.	95
Figura 34. Representación gráfica de la SG en función del ECOG basal del paciente.	95
Figura 35. Representación gráfica de la SLP estratificado por edad superior o inferior a 70.	96
Figura 36. Representación gráfica de la SG estratificada por edad superior o inferior a 70 años.	97
Figura 37. Representación gráfica de la SLP estratificada por sexo.	98
Figura 38. Representación gráfica de la SG estratificada por sexo.	98
Figura 39. Representación gráfica de la SLP estratificada por la presencia o ausencia de ≥ 3 comorbilidades.	99
Figura 40. Representación gráfica de la SG estratificada por la presencia o ausencia de ≥ 3 comorbilidades.	99
Figura 41. Representación gráfica de la SLP en función de la presencia o ausencia de polifarmacia en los pacientes.	100
Figura 42. Representación gráfica de la SG en función de la presencia o ausencia de polifarmacia en los pacientes.	101
Figura 43. Representación gráfica de la SLP estratificado por la presencia o ausencia de metástasis cerebrales en los pacientes.	102
Figura 44. Representación gráfica de la SG estratificado por la presencia o ausencia de metástasis cerebrales en los pacientes.	102
Figura 45. Representación gráfica de la SLP en función de la presencia o ausencia de mutaciones dirigidas sin tratamiento aprobado en primera línea.	103
Figura 46. Representación gráfica de la SG en función de la presencia o ausencia de mutaciones dirigidas sin tratamiento aprobado en primera línea.	104
Figura 47. Representación gráfica de la SLP estratificada por aquellos pacientes que presentaron o no una toxicidad grave por inmunoterapia.	105
Figura 48. Representación gráfica de la SG estratificada por aquellos pacientes que presentaron o no una toxicidad grave por inmunoterapia.	105
Figura 49. Representación gráfica de la SLP estratificado por la expresión tumoral de PD-L1 de los pacientes.	106
Figura 50. Representación gráfica de la SG estratificado por la expresión tumoral de PD-L1 de los pacientes.	107
Figura 51. Aumento en el número de genes expresados de forma diferencial tras el uso de diferentes esquemas de quimioterapia en conjunto con IPCIs.	119
Figura 52. Probabilidad de respuesta a IPCIs en función de diferentes alteraciones genómicas presentadas por el CPCNP.	123
Figura 53. Principales mecanismos por los que los IPCIs pueden generar respuesta a nivel de sistema nervioso central.	126

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Capacidad de predicción del tamaño del efecto	57
Tabla 2. Procedimientos del estudio en cohorte A	59
Tabla 3. Procedimientos del estudio en cohorte B.....	60
Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizados para caracterizar subpoblaciones de células T	62
Tabla 5. Características basales de la cohorte B.....	71
Tabla 6. Resumen del análisis de las poblaciones celulares circulantes por citometría de flujo	73
Tabla 7. Resultados de la selección de variables para el modelo de SLP en pacientes tratados con IPCI en monoterapia.....	74
Tabla 8. Resultados de la selección de variables para el modelo de SG en pacientes tratados con IPCI en monoterapia.....	74
Tabla 9. Resultados de la selección de variables para crear el modelo de SLP en el grupo de IPCIs y quimioterapia	75
Tabla 10. Resultados de la selección de variables para crear el modelo de SG en el grupo de IPCIs y quimioterapia	75
Tabla 11. Valores en los análisis de citometría de dos pacientes aleatorios.....	81
Tabla 12. Predictores lineales y escala de los modelos ICIRS.....	81
Tabla 13. Características basales de los pacientes de la cohorte A (n = 247)	87

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Hoja de información al paciente y consentimiento informado.....	154
Anexo 2. Informe del comité de ética en investigación médica Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.....	161

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El desarrollo de la inmunoterapia en cáncer de pulmón

1.1.1 Cáncer de pulmón e inhibidores de punto de control inmunitario

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte a nivel global (18-20%) y el segundo tumor más frecuente en hombres y mujeres [1,2]. Según los últimos datos, en 2022 se diagnosticaron 2,5 millones de nuevos casos, y provocó 1,8 millones de muertes. **Este tumor representa 1 de cada 5 muertes (18,7%) por cáncer** [3]. El carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es el más frecuente, englobando el 80-85% de diagnósticos. Dentro de este grupo existen dos principales histologías, el subtipo escamoso y el subtipo adenocarcinoma, siendo este último el más frecuente [4]. Aproximadamente un 45% de pacientes se diagnostican en estadio IV y presentan un pronóstico pobre [1,2]. Los **inhibidores de punto de control inmunológico (IPCI)** han cambiado radicalmente el tratamiento del **CPCNP avanzado (aCPCNP)** sin mutaciones accionables, mientras que en el caso de pacientes con mutaciones accionables, se dispone de tratamiento dirigidos con inhibidores de tirosina -quinasa o anticuerpos que buscan abordar dicha mutación [5,6]. Actualmente existen en primera línea de tratamiento múltiples esquemas que incluyen IPCI en monoterapia, en combinación con otros IPCI, y en combinación con quimioterapia [7–15].

A pesar de la mejoría en mediana de supervivencia global (mSG) y de la mediana de supervivencia libre de progresión (mSLP), aún se desconoce cuál es el perfil de pacientes que responden en mayor medida al tratamiento, o que pueden alcanzar supervivencias más prolongadas. En los últimos años se han propuesto múltiples biomarcadores como predictores para seleccionar poblaciones más sensibles a los IPCIs, siendo actualmente la **expresión tumoral del ligando de muerte programada 1 (PD-L1, del inglés *Programmed Death Ligand 1*; CD274)** el único que se usa en la **práctica clínica**, con la limitación de la variabilidad intratumoral que presenta [16,17]. No obstante, la expresión del PD-L1 no determina la respuesta del paciente al tratamiento con IPCIs [18,19]. De hecho, existe un subgrupo de pacientes en los que se usa IPCIs en monoterapia que, a pesar de presentar expresión tumoral en biopsia de PD-L1 del 100% y otros parámetros asociados a una mejor respuesta a estos tratamientos, presentan progresión de la enfermedad de forma rápida y precoz, llegando a producirse casos de hiperprogresiones tumorales [20]. Tampoco se debe olvidar el hecho de que los IPCIs presentan riesgo de provocar efectos secundarios inmunomediados que pueden ser graves, causar múltiples comorbilidades, e incluso la muerte del paciente [21]. Por tanto, es necesario **buscar nuevos biomarcadores** con los que poder seleccionar: 1) Aquellos pacientes que más beneficio a nivel pronóstico pueden recibir del tratamiento con IPCIs; 2) El esquema más adecuado de IPCIs, ya sea en monoterapia o en combinación con quimioterapia, con el fin de evitar fenómenos de hiperprogresión o toxicidad desmesurada en ausencia de beneficio terapéutico.

1.1.2 Los inhibidores de punto de control inmunitarios

El primer IPCI aprobado por la administración de alimentos y fármacos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) fue **ipilimumab** en el año 2010 para pacientes con melanoma metastásico, un fármaco cuya diana es **el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; CD152)** [22]. Desde entonces, múltiples ensayos clínicos se han llevado a cabo con diferentes IPCIs en cáncer de pulmón (**Figura 1**). Los primeros fármacos que se desarrollaron en este escenario fueron aquellos dirigidos contra la proteína de **muerte programada 1 (PD-1, del inglés *Programmed Death-1*; CD279)** y su ligando, **PD-L1**. Fármacos anti-PD-1 como **nivolumab** [23] y **pembrolizumab** [24], y fármacos anti-PD-L1 como **atezolizumab** [25], fueron aprobados por la FDA como **terapia de segunda línea** en pacientes con CPCNP metastásico entre 2015 y 2017. Estos resultados se trasladaron posteriormente a la **primera línea**, llevando a la FDA a aprobar la monoterapia con **pembrolizumab** [8], **atezolizumab** [9], y **cemiplimab** [7] entre 2016 y 2021. De forma posterior, se aprobarían **combinaciones con quimioterapia y fármacos inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)** [10–13]. De acuerdo con análisis preclínicos, la combinación de IPCIs con quimioterapia, lejos de ser deletérea, podría ser sinérgica debido a la renovación de linfocitos exhaustos, exposición a neoantígenos tumorales, y a la reprogramación metabólica [26]. Los esquemas aprobados incluyen combinaciones en tres tipos de protocolos: 1) Combinaciones de quimioterapia basada en platino con fármacos anti-PD-1; 2) Combinación de quimioterapia basada en platino con anti-PD(L)1 y anti-CTLA-4; 3) Combinación de quimioterapia con anti-PD-L1 y anti-VEGF. Estos protocolos no se han comparado directamente, y no existe una preferencia entre estos en las guías clínicas [27,28].

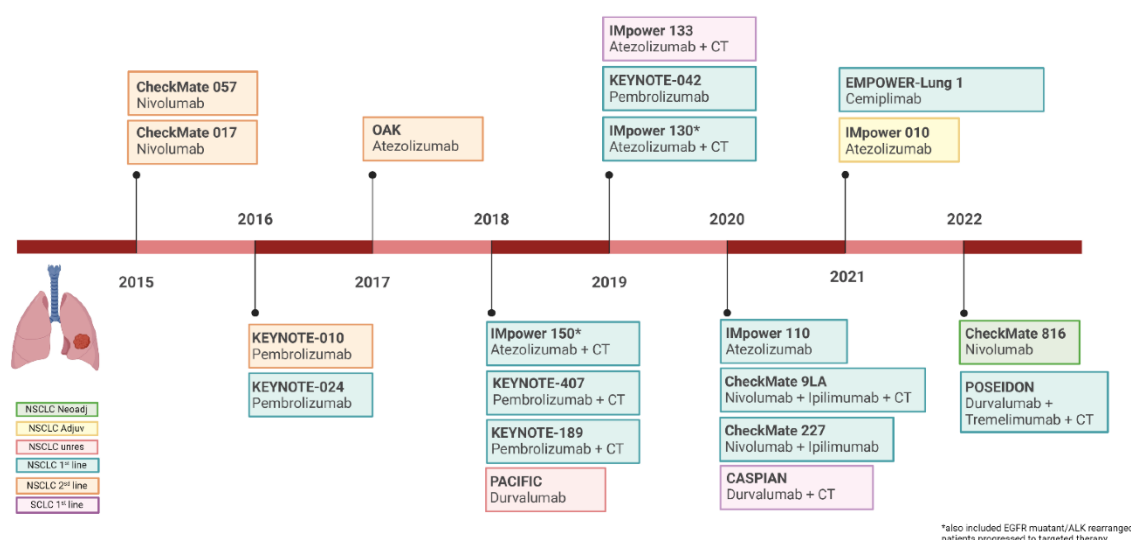


Figura 1. Línea temporal donde se pueden observar los diferentes IPCIs que han mostrado resultados positivos en el contexto global del desarrollo de los IPCIs en el CPCNP. Adaptada de Catalano *et al. Cancers* [29].

Actualmente, existen muchas vías de investigación enfocadas en la inhibición de otros puntos de control inmunológicos, destacando el inmunoreceptor de células T y dominio ITIM (TIGIT, del inglés *T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*), el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3, del inglés *Lymphocyte Activation Gene-3*), y el dominio de mucina-3 (TIM3), aunque aún no se ha demostrado en ensayos fase III aprobatorios que alguno de estos abordajes ayude a mejorar el control de la enfermedad en pacientes con CPCNP [30–32]. Un abordaje prometedor, y que ha demostrado superioridad a IPCI anti-PD-1 en monoterapia en pacientes con melanoma metastásico es la combinación de relatlimab (anti-LAG3) con nivolumab [33], aunque aún no se disponen datos en pacientes con CPCNP. Durante los siguientes apartados revisaremos los ensayos aprobatorios de los principales fármacos usados en primera línea de tratamiento, subdividiendo en aquellos que usan IPCIs en monoterapia y aquellos que usan combinaciones de IPCIs con otros fármacos.

1.1.3 IPCIs en monoterapia como tratamiento de primera línea del aCPCNP

Tras el éxito logrado en la segunda línea de tratamiento en monoterapia, varios de los fármacos anti-PD(L)1 se han probado en un escenario de primera línea de tratamiento en pacientes con aCPCNP con éxito: pembrolizumab, atezolizumab y cemiplimab. Sin embargo a nivel europeo, han quedado relegados a que su uso sea de forma exclusiva en pacientes con una alta expresión de PD-L1 a nivel tumoral ($\geq 50\%$) [27], mientras que en Estados Unidos también se plantea su uso en pacientes no aptos para recibir quimioterapia basada en platino y PD-L1 positivo ($\geq 1\%$) [28].

Pembrolizumab en monoterapia se aprobó en base al ensayo **KEYNOTE-024** [8]; fue un ensayo fase III aleatorizado en el que pacientes con aCPCNP con expresión de PD-L1 en al menos un 50% de células tumorales se asignaron a recibir en una ratio 1:1 200 mg de pembrolizumab cada 3 semanas durante 35 ciclos frente a 4-6 ciclos de quimioterapia basada en platino (dependiendo de la histología escamosa o no escamosa, combinado con pemetrexed, gemcitabina o paclitaxel). Los tumores con mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) y en la quinasa de linfoma anaplásico (ALK, del inglés *Anaplastic Lymphoma Kinase*) fueron excluidos. Se reclutaron un total de 305 pacientes de los que 154 se asignaron al grupo pembrolizumab mientras que 151 pacientes se asignaron al grupo de quimioterapia basada en platino. Tras 5 años de seguimiento la mSLP fue de 7,7 meses en el grupo pembrolizumab y de 5,5 meses en el grupo de quimioterapia basada en platino. La mSG fue de 26,3 meses frente a 5,5 meses respectivamente. A 5 años, un 12,8% de los pacientes aún no han progresado y el 31,9% de los pacientes estaban vivos [34]. El perfil de seguridad de estos tratamientos fue aceptable.

De forma posterior a este ensayo, otros dos fármacos han conseguido la aprobación en monoterapia para pacientes con expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$, **atezolizumab** [9] y **cemiplimab** [7]. El ensayo **IMpower110** [9] fue un ensayo abierto, fase

III, en el que pacientes con CPCNP metastásico con una expresión tumoral de PD-L1 $\geq 1\%$ recibieron de forma aleatoria en una ratio 1:1 atezolizumab 1200 mg cada 3 semanas hasta progresión o toxicidad inaceptable, o quimioterapia basada en un doblete de platino (con diferentes combinaciones en función de si la histología era escamosa o no escamosa). Aunque inicialmente el protocolo permitía el tratamiento de pacientes con mutaciones en EGFR o ALK tras progresar a tratamiento dirigido, se realizó una enmienda en el protocolo para excluirlos dados los datos de seguridad que sugerían que estos pacientes no se beneficiaban de inmunoterapia en monoterapia [23,24,35]. El objetivo primario del estudio, la mSG, se analizó de forma jerárquica de acuerdo con la expresión tumoral de PD-L1 en pacientes sin alteraciones en EGFR o ALK. Los pacientes se estratificaron por expresión de PD-L1 ($< 1\%$ de células tumorales frente a $\geq 1\%$), histología (escamosa o no escamosa), sexo, y situación funcional (Grupo cooperativo de oncología del este [ECOG, del inglés *Eastern Cooperative Oncology Group*] 0 frente a 1). El análisis jerárquico se planteó con un primer nivel para pacientes con alta expresión tumoral de PD-L1 ($\geq 50\%$), un segundo nivel con pacientes intermedios y altos expresores de PD-L1 ($\geq 5\%$), y un tercer nivel con cualquier expresión de PD-L1 ($\geq 1\%$). Si los resultados de los tres niveles jerárquicos resultaran positivos, se pasaría a comparar la mPFS entre atezolizumab y grupo control. Se reclutaron un total de 572 pacientes, recibiendo 285 pacientes atezolizumab y 287 pacientes quimioterapia; excluyendo los pacientes EGFR y ALK positivos quedaron 277 pacientes por grupo (554 en total). En el punto de corte que se realizó, la mSG en pacientes altos expresores de PD-L1 fue de 20,2 meses frente a 13,1 meses en el grupo control, con una HR de 0.59. Sin embargo, al analizar la mSG en pacientes intermedios y altos expresores de PD-L1 fue de 18,2 meses frente a 14,9 meses en el grupo control, con una HR de 0.72. Dado que este grupo no cruzó el nivel establecido de significancia en el análisis jerárquico, el estudio fue negativo para este grupo, y el resto de los puntos establecidos en el protocolo. Por tanto, atezolizumab solo se ha aprobado en pacientes con una alta expresión tumoral de PD-L1 ($\geq 50\%$).

El último ensayo aprobatorio es el **EMPOWER-Lung1** [7,36]: un ensayo fase III, aleatorizado, abierto, en el que se incluyeron pacientes con CPCNP en estadio IV, que no habían recibido tratamiento previo, y con expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente en una proporción 1:1 para recibir monoterapia con cemiplimab (350 mg) o quimioterapia basada en un doblete de platino (con diferentes combinaciones en función de la histología). Se excluyeron los tumores con mutaciones sensibilizadoras en EGFR, translocaciones de ALK o fusiones de ROS proto-oncogén 1 (ROS1). Se reclutaron un total de 710 pacientes: 356 en el grupo de cemiplimab y 354 en el grupo de quimioterapia. Sin embargo, las biopsias tumorales enviadas a un laboratorio central no fueron analizadas según las instrucciones de uso del ensayo y se vieron afectadas por fallos en los instrumentos de prueba. Este error redujo la población de los grupos a 283 pacientes en el grupo de cemiplimab y 280 pacientes en el grupo de quimioterapia. En el momento del corte de datos, la mSLP global fue de 8,2 meses en el grupo de cemiplimab frente a 5,7 meses en el grupo de quimioterapia. La mSG global fue

de 26,1 meses en el grupo de cemiplimab, en comparación con 13,3 meses en el grupo de quimioterapia (HR 0,57). El perfil de seguridad fue similar al de otros ensayos con IPCI.

1.1.4 IPCI en combinación como tratamiento de primera línea del aCPCNP

Tras los buenos resultados derivados del uso de IPCIs en monoterapia en pacientes con alta expresión de PD-L1 ($\geq 50\%$), con la preocupación de que a pesar de presentar una alta expresión de PD-L1, hay pacientes que no responden e incluso presentan una supervivencia inferior a la quimioterapia basada en platino [15], se planteó trasladar el uso de los IPCI en pacientes con una expresión inferior o negativa de PD-L1 a nivel tumoral.. Con este fin, se plantearon **ensayos de combinación de IPCIs con quimioterapia, otros IPCIs, o fármacos anti-VEGF**, abriéndose un amplio abanico de opciones en este escenario.

El ensayo **KEYNOTE-189** [10] fue un ensayo fase III aleatorizado, doble ciego, en el que pacientes con CPCNP no escamoso metastásico, que no habían recibido tratamiento previo, se aleatorizaron a recibir en una ratio 2:1 pembrolizumab 200 mg o placebo cada 3 semanas hasta 35 ciclos. Todos los pacientes recibieron 4 ciclos cada 3 semanas de platino (cisplatino 75 mg/m² o carboplatino área bajo la curva 5 mg/m²) seguido de pemetrexed (500 mg/m²). Los pacientes se estratificaron en función de la expresión tumoral de PD-L1 (positiva o negativa), y se excluyeron pacientes con mutaciones en EGFR o ALK. Se reclutaron un total de 616 pacientes; 410 fueron asignados al grupo de combinación con pembrolizumab, mientras que 206 fueron asignados al grupo de combinación con placebo. La expresión tumoral de PD-L1 estaba bien balanceada entre el grupo tratamiento y el grupo control. Tras 5 años de seguimiento [37], la mSLP fue de 9 meses en el grupo de pembrolizumab frente a 4,9 meses en el grupo de placebo. La mSG fue de 19,4 meses frente a 11,3 meses, respectivamente (HR 0,56). A los 5 años, el 29,6% de los pacientes seguían vivos en el grupo de pembrolizumab frente al 21,4% en el grupo de placebo, y el 7,5% de los pacientes no habían progresado frente al 0,6%. El perfil de seguridad fue aceptable, y los efectos secundarios fueron similares a los de la quimioterapia y los IPCI por separado.

El ensayo **KEYNOTE-407** [11,38] fue un estudio fase III, aleatorizado y doble ciego, en el que se asignaron pacientes con CPCNP escamoso de forma aleatoria, en una ratio 1:1, para recibir 200 mg de pembrolizumab o un placebo salino cada 3 semanas, durante un máximo de 35 ciclos. Todos los pacientes recibieron cuatro ciclos de carboplatino (área bajo la curva de concentración-tiempo de 6 mg/min) y paclitaxel (200 mg/m² de superficie corporal el día 1) o paclitaxel unido a albúmina (100 mg/m² los días 1, 8 y 15) cada 3 semanas. Los pacientes fueron estratificados según la expresión tumoral de PD-L1 (negativa o positiva). Un total de 559 pacientes fueron aleatorizados: 278 al grupo de combinación con pembrolizumab y 281 al grupo de combinación con placebo. Entre las características basales, 20 pacientes (7,2%) presentaban metástasis cerebrales en el grupo con pembrolizumab, frente a 24 pacientes (8,5%) en el grupo con placebo. La expresión

tumoral de PD-L1 estaba bien balanceada entre el grupo tratamiento y el grupo control. Tras 5 años de seguimiento, la mSLP fue de 8 meses en el grupo de pembrolizumab frente a 5,1 meses en el grupo de placebo. La mSG fue de 17,2 meses frente a 11,6 meses, respectivamente (HR 0,71). A los 5 años, el 18,4% de los pacientes seguían vivos en el grupo de pembrolizumab frente al 9,7% en el grupo de placebo, y el 10,8% de los pacientes no habían progresado frente al 3,5%. El perfil de seguridad fue aceptable, y los efectos secundarios fueron similares a los de la quimioterapia y los IPCI por separado.

El primer ensayo que buscó valorar la combinación de anti-PD-1 con anti-CTLA-4 fue el **CheckMate-227** [15,39]. Este fue un ensayo abierto, fase III, en el que pacientes con aquí CPCNP estadio IV se asignaron de forma aleatoria en una ratio 1:1:1 recibir nivolumab-ipilimumab (3 mg por kg de peso corporal cada 2 semanas y 1 mg por kg de peso cada 6 semanas respectivamente), frente a nivolumab en monoterapia (dosis fija de 240 mg cada 2 semanas) en pacientes PD-L1 positivo o nivolumab en combinación con quimioterapia basada en un doblete de platino (cada 3 semanas hasta 4 ciclos) en pacientes PD-L1 negativos, frente a un doblete de quimioterapia basado en platino (cada 3 semanas hasta 4 ciclos). Los pacientes se estratificaron por histología (escamosa y no-escamosa) y PD-L1 (negativo frente a positivo). Se asumió un modelo de riesgos proporcionales para este ensayo. Se reclutaron un total de 550 pacientes con expresión tumoral de PD-L1 negativa: 187 fueron asignados a recibir nivolumab más ipilimumab, 177 a recibir nivolumab junto con quimioterapia basada en platino, y 186 a recibir únicamente quimioterapia basada en platino. En la cohorte con PD-L1 positivo, se incluyeron un total de 1189 pacientes: 396 fueron asignados a nivolumab más ipilimumab, 396 a monoterapia con nivolumab y 397 a quimioterapia basada en platino. El objetivo principal analizado en este estudio fue la mSG en pacientes con PD-L1 positivo, comparando únicamente el grupo de nivolumab más ipilimumab frente al grupo de quimioterapia. Aunque la combinación de nivolumab más ipilimumab mostró un beneficio de 17,1 meses frente a 14,9 meses en el grupo de quimioterapia, el cociente de riesgo (HR, del inglés *Hazard Ratio*) fue de 0,70 y no se cumplió el supuesto de riesgos proporcionales, por lo que el ensayo fue negativo, y estos resultados, así como los objetivos secundarios analizados posteriormente, son únicamente descriptivos. Además, se observó un beneficio inicial transitorio en supervivencia con la quimioterapia, seguido de un beneficio a largo plazo con nivolumab más ipilimumab. El perfil de seguridad fue aceptable, siendo los efectos adversos lo esperado para la combinación de estos dos fármacos. Estos resultados controvertidos llevaron a la aprobación del esquema por la FDA en pacientes con expresión tumoral de PD-L1 positiva [40], y su integración en las guías americanas [28], pero no ha sido aprobado por la agencia europea del medicamento (EMA, del inglés *European Medicines Agency*) y no dispone de financiación en múltiples países europeos como España [27].

El ensayo **CheckMate 9LA** [13,41] logró la primera aprobación de un anti-CTLA-4 en este escenario con la combinación de nivolumab-ipilimumab con quimioterapia; este

ensayo fue fase III, abierto y aleatorizado, en el que se asignaron pacientes con CPCNP en estadio IV en una proporción 1:1 para recibir nivolumab (360 mg cada 3 semanas) más ipilimumab (1 mg/kg cada 6 semanas) combinado con quimioterapia basada en un doblete de platino según la histología (cada 3 semanas durante 2 ciclos), frente a quimioterapia basada en un doblete de platino según la histología (cada 3 semanas durante 4 ciclos). Los pacientes fueron estratificados según la histología tumoral, el sexo y la expresión de PD-L1. Entre los criterios de exclusión se incluyeron mutaciones de EGFR y ALK sensibles a terapias dirigidas. Un total de 719 pacientes fueron incluidos: 361 en el grupo experimental de combinación de IPCIs más quimioterapia, y 358 en el grupo de quimioterapia basada en platino. Entre las características basales, las poblaciones fueron equilibradas, con una distribución homogénea en la expresión de PD-L1: la población con PD-L1 negativo representaba alrededor del 40% en ambos grupos, mientras que la población con PD-L1 positivo era aproximadamente del 60% (con expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$ en el 22% y el 29% de los pacientes en los grupos experimental y de control, respectivamente). La histología predominante fue no escamosa, presente en el 69% de los pacientes de ambos grupos, mientras que el 31% tenía histología escamosa. Con la actualización de los datos a 5 años, la mSG fue de 15,8 meses en el grupo experimental frente a 11 meses en el grupo de control (HR 0,73). De este ensayo, hay que destacar respecto a los previos que la adición de ipilimumab a la quimioterapia y el fármaco anti-PD-1 mostró una leve tendencia a un mayor beneficio en población PD-L1 negativa que la PD-L1 positiva (HR de 0,63 frente a 0,73), y un beneficio remarcable en pacientes con metástasis cerebrales (mSG no alcanzada en el grupo de IPCI con quimioterapia frente a 7,9 meses en el grupo de quimioterapia a solas). El perfil de seguridad fue aceptable y acorde con el mecanismo de acción de cada medicamento.

El ensayo **EMPOWER-Lung 3** [14,42] fue un estudio fase III, doble ciego y controlado con placebo, en el que pacientes con CPCNP avanzado fueron aleatorizados en una proporción 2:1 para recibir cemiplimab (350 mg cada 3 semanas) o placebo durante un máximo de 108 semanas, en combinación con 4 ciclos de quimioterapia doble basada en platino (seguida de mantenimiento con pemetrexed si estaba indicado). Los pacientes fueron estratificados según la histología tumoral y la expresión de PD-L1. Entre los criterios de exclusión se incluyeron mutaciones en EGFR, ALK y ROS1. Un total de 466 pacientes fueron reclutados: 312 en el grupo de cemiplimab más quimioterapia y 154 en el grupo de placebo más quimioterapia. Entre las características basales, alrededor del 57% de los pacientes presentaban histología no escamosa, mientras que el 43% tenían histología escamosa en ambos grupos. Los grupos de PD-L1 fueron homogéneos: aproximadamente el 30% de los pacientes tenían PD-L1 negativo, el 38% PD-L1 entre 1-49% y el 32% PD-L1 $\geq 50\%$. Tras 2 años de seguimiento la mSG fue de 21,1 meses en el grupo de cemiplimab más quimioterapia, en comparación con 12,9 meses en el grupo de quimioterapia sola (HR 0,65). La mSLP fue de 8,2 meses frente a 5 meses, respectivamente. El perfil de seguridad fue aceptable y similar al de otros ensayos de combinación de IPCI más quimioterapia.

El ensayo **POSEIDON** [43] es el segundo y último ensayo en conseguir la aprobación de una combinación anti-CTLA-4 con un fármaco anti-PDL1. Este ensayo fue un estudio fase III, abierto, en el que pacientes con CPCNP metastásicos fueron aleatorizados en una ratio 1:1:1 a recibir tremelimumab 75 mg junto a durvalumab 1500 mg, y 4 ciclos de quimioterapia basada en platino cada 21 días, seguido de un único ciclo de tremelimumab y durvalumab cada 4 semanas hasta progresión; frente a durvalumab 1500 mg y 4 ciclos de quimioterapia, seguido de durvalumab cada 4 semanas hasta progresión; frente a 4 ciclos de quimioterapia cada 21 días (con pemetrexed de mantenimiento posterior en caso de tumores no-escamosos). Se excluyeron los pacientes con mutaciones en EGFR y ALK. Los objetivos primarios fueron la mSLP y la mSG para la comparación del grupo durvalumab-quimioterapia frente a quimioterapia; como objetivo secundario se estableció la mSLP y mSG para la comparación de durvalumab-tremelimumab-quimioterapia frente a quimioterapia. Se reclutaron un total de 1013 pacientes entre los tres brazos de tratamiento: El objetivo primario fue positivo para la mSLP en la comparación durvalumab-quimioterapia frente a quimioterapia con 5,5 meses frente a 4,8 meses; sin embargo, la mSG no alcanzó diferencias estadísticamente significativas (13,3 meses frente a 11,7 meses). El objetivo secundario fue positivo con una mejoría de la mSLP en la comparación durvalumab-tremelimumab-quimioterapia frente a quimioterapia con 6,2 meses frente a 4,8 meses; la mSG fue de 14 meses frente a 11,7 meses (HR 0,77). El perfil de seguridad fue aceptable y similar al de otras combinaciones anti-PD-(L)1 y anti-CTLA-4. Este ensayo llevó a la aprobación de esta combinación por la EMA.

Todos estos esquemas no se han comparado de forma directa (p. ej. la combinación de quimioterapia con anti-PD-(L)1 y anti-CTLA-4 frente a la combinación de quimioterapia con anti-PD-(L)1) y no existe una preferencia para recomendar uno sobre otro en pacientes que presentan alta expresión tumoral de PD-L1 ($\geq 50\%$) [27,28] puesto que todos los ensayos de combinación de quimioterapia con IPCI incluyen este subgrupo de pacientes, mostrando de hecho, el mayor beneficio en mSG. Dada la situación particular de España y de la Comunidad Valenciana, hasta hace menos de 1 año era obligatorio administrar IPCIs en monoterapia a pacientes con una alta expresión de PD-L1, pero con la aprobación del esquema de cemiplimab con quimioterapia independientemente de la expresión de PD-L1, no existe ningún factor para decidir qué esquema administrar a un paciente cuyo tumor tenga estas características [44]. Se han buscado diversos biomarcadores, además de la expresión de PD-L1 tumoral para buscar optimizar estos esquemas, pero como veremos en los apartados sucesivos, hasta el momento ninguno de ellos ha logrado imponerse en la práctica clínica.

1.2 La vía PD-1/PD-L1

El desarrollo de anticuerpos que bloquean los puntos de control inmunológico como terapia contra el cáncer está basado en el rol natural de estas moléculas-punto de control como **receptores coinhibitorios de la activación de las células T**. Nuestro conocimiento

sobre receptores coestimuladores y coinhibitorios ha evolucionado desde el modelo de “2 señales” para la activación de células T vírgenes [45,46]. De acuerdo con este modelo, la activación óptima de linfocitos específicos para antígenos requiere un reconocimiento específico del antígeno por los linfocitos (“señal 1”), así como una señal adicional (“señal 2”, o señal coestimuladora). Posteriormente, se ha entendido que la señal coestimuladora negativa también existe. Los receptores que portan una señal coinhibitoria funcionan como inhibidores del punto de control, y tienen un rol clave en el mantenimiento de la tolerancia periférica y la prevención de los procesos de autoinmunidad [47–50]. La vía que afecta a B7-1 o B7-2 junto a CD28 o CTLA-4 es la mejor caracterizada, y es crucial en la activación del linfocito T y en fenómenos de tolerancia (**Figura 2**). La identificación del receptor inhibitorio PD-1 y sus ligandos como miembros adicionales de la familia B7-CD28-CTLA-4 [51,52] demostró que el sistema inmune ha desarrollado múltiples vías coinhibitorias para proteger el mantenimiento de la tolerancia de las células T por medio de esta familia.

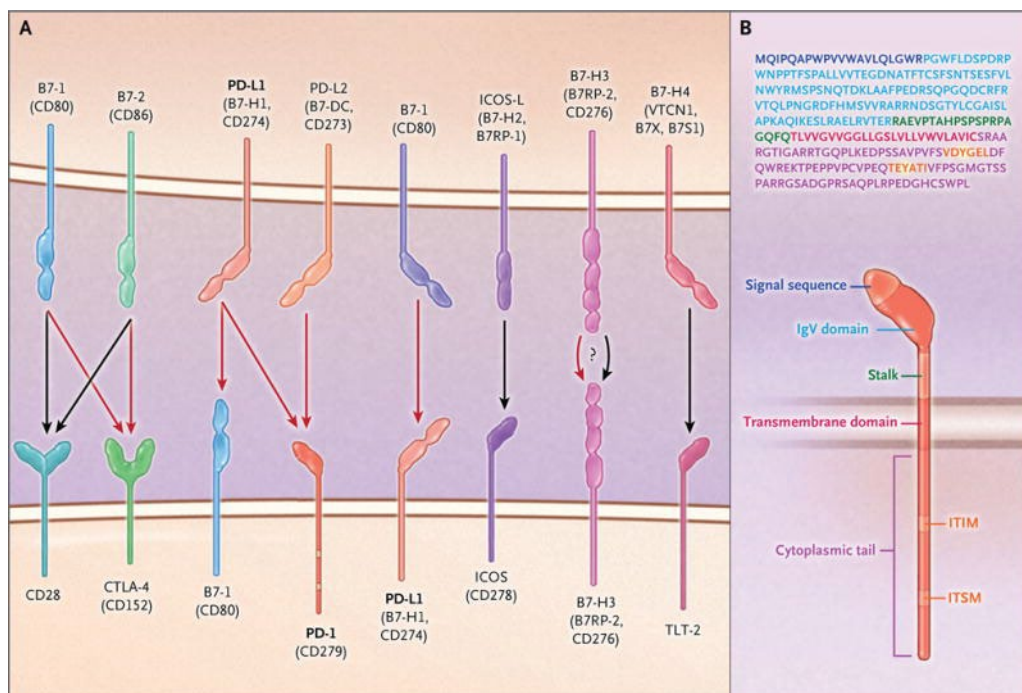


Figura 2. Moléculas coestimuladoras de la familia B7-CD28-CTLA-4, y estructura de PD-1. Adaptado de Boussiotis *et al. NEJM*. [46].

Desde su descubrimiento, se ha considerado que el aumento de **señales coestimuladoras** podría mejorar las respuestas inmunes antitumorales [53]. Sin embargo, el descubrimiento de que CTLA-4, que funciona como un potente regulador negativo de las respuestas inmunes, llevó a un cambio radical en el desarrollo de la inmunoterapia en el cáncer, basado en el concepto de que la aproximación preferida no sería la activación del sistema inmune para atacar al cáncer sino en eliminar las señales coinhibitorias que bloquean las respuestas antitumorales mediadas por los linfocitos T [54]. En efecto, el

bloqueo de CTLA-4 llevó a conseguir el uso con éxito de un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 (ipilimumab) como tratamiento contra el cáncer en pacientes [55]. A continuación, basándose en el mismo concepto, se abordó de forma terapéutica la vía PD-1/PD-L1, resultando en todo el desarrollo subsecuente y su integración en múltiples tipos de tumores [56].

1.2.1 Expresión de PD-1 y sus ligandos

PD-1 es una proteína conformada por 288 aminoácidos que se induce en las células T por la activación del receptor de antígenos de dichas células y por medio de receptores de citoquinas [57]. PD-1 se identificó inicialmente en células apoptóticas, donde se expresaba de forma preferente, pero posteriormente se entendió que su papel fisiológico no está relacionado con la muerte celular [58]. Además de estar expresado en células T maduras activadas, PD-1 se expresa a niveles menores en células T doble-negativo (CD4-CD8-) en el timo, células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killer*) activadas, células B, monocitos, y células de Langerhans inmaduras [57]. Las propiedades funcionales y bioquímicas de PD-1 se han estudiado principalmente en células T. La transcripción de PD-1 en células T requiere la translocación nuclear del factor nuclear de células T activadas (NFAT, del inglés *Nuclear Factor of Activated T Cells*) y la unión de NFATc1 (NFAT 2) al promotor de la proteína asociada a la muerte celular programada (PDCD1) [59]. Por tanto, la inducción y la represión de PD-1 están bajo control de mecanismos activos, lo que indica que PD-1 media sus efectos en células T activadas durante una ventana de tiempo finita. Estas cinéticas de expresión indican que **la sobrerregulación de PD-1 es una consecuencia natural de la activación de las células T** y es necesaria para la finalización de la respuesta inmune. Por tanto, la expresión de PD-1 no es un equivalente a un estado “exhausto”, una condición que ocurre cuando las células T se exponen de forma prolongada a un antígeno. En las células exhaustas los niveles de expresión de múltiples receptores inhibitorios (no solo PD-1) están elevados de forma persistente, lo que lleva al detrimento en la capacidad de las células T de responder a señales de activación [60].

Los ligandos de PD-1, PD-L1 y ligando de muerte programada 2 (PD-L2, del inglés *Programmed Death-Ligand 2*), tienen diferentes patrones de expresión [57,61]. **PD-L1 está expresado de forma constitutiva** a niveles bajos en las células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés *Antigen-Presenting Cells*), incluyendo: 1) APC profesionales; aquellas que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II, y moléculas coestimuladoras que pueden activar células T CD4+ vírgenes. 2) APC no profesionales; aquellas que usan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I para interactuar con los linfocitos T CD8+, pero que no expresan de forma habitual el complejo mayor de histocompatibilidad clase II y por tanto no son capaces de activar las células T CD4+ de forma eficiente, así como una amplia variedad de tipos celulares no-hematopoyéticos, incluyendo células endoteliales vasculares, células de islotes pancreáticos, y sitios inmunoprivilegiados como la placenta, los testículos, y los ojos. La expresión de PD-L1 también se induce por citoquinas proinflamatorias, incluyendo

interferones tipo I y tipo II, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*), y VEGF. **PD-L2 se expresa** en células dendríticas y macrófagos tras su activación y se regula principalmente por las mismas citoquinas que PD-L1. Las cinéticas de la expresión de PD-1 en las células T activadas, la expresión constitutiva de PD-L1 en tejidos, y la inducción de ligandos de PD-1 por señales proinflamatorias, destacan el papel de la vía PD-1 en la supresión de la actividad de células T efectoras, mientras que mantiene la tolerancia propia y promueve la resolución de la inflamación durante las respuestas inmunes. Además de interactuar con PD-1, PD-L1 también interacciona con el B7-1 expresado en las células T y media una señal inhibitoria [62], mientras que el PD-L2 expresado en células dendríticas pulmonares interacciona con la molécula de guía repulsiva B (RGMB), un correceptor para proteínas morfogenéticas óseas que se expresan en macrófagos alveolares, macrófagos intersticiales, y células epiteliales alveolares. La interacción entre PD-L2 y RGMB juega un rol en la tolerancia pulmonar [63].

El rol de PD-1 en la tolerancia periférica se observó por primera vez cuando se desarrollaron glomerulonefritis y artritis similares a las inducidas por el lupus en ratones con deficiencia de PD-1 [50]. Esta deficiencia generó miocardiopatías [48], y otros fenómenos autoinmunitarios en otros órganos en función del subtipo de alteración [64,65]. PD-L1, y en menor medida PD-L2, se expresan en múltiples tipos de cáncer [66], un hallazgo que llevó a la explotación de la vía PD-1-PD-L1 en la inmunoterapia frente al cáncer. En contraposición a sus efectos beneficiosos en el mantenimiento de la tolerancia periférica, la supresión de la respuesta antitumoral por PD-1 tiene efectos deletéreos en la protección del sistema inmune contra los tumores [67].

1.2.2 PD-1 en la señalización de linfocitos T

Los mecanismos por los que PD-1 antagoniza la señalización del receptor de los linfocitos T están actualmente en investigación (**Figura 3**) [46]. Al reclutar a la fosfatasa de proteína-tirosina Src homóloga-2 (SHP-2, del inglés *Src Homology Region 2-Containing Protein Tyrosine Phosphatase-2*) en la proximidad del receptor de la célula T, la unión de PD-1 inhibe la activación de las quinasas proximales al receptor de dichas células T, provocando una atenuación de la fosforilación mediada por Lck de ZAP-70, iniciándose así una cascada de eventos [68]. Una **vía de señalización clave de la inhibición mediada por PD-1 es la vía de la fosfatidilinositol-3 quinasa** (PI3K, del inglés *Phosphatidylinositol-3 Kinase*)/Akt que, aunque también está involucrada en la vía de CTLA-4, aquí tendría un mecanismo distinto [69,70]. PD-1 puede bloquear la activación de PI3K al reclutar a SHP-2, mientras que CTLA-4 inhibe directamente la activación de Akt, pero no de PI3K, posiblemente por asociación con la proteína-fosfatasa 2A [70]. Un mecanismo por el que PD-1 inhibe la activación de PI3K/Akt afecta a la fosforilación de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN, del inglés *Phosphatase and Tensin Homolog*), que a su vez estaría mediada por la caseína-quinasa 2 (CK2, del inglés *Casein Kinase 2*). PTEN es una fosfatasa serina-treonina que impide la activación de PI3K y suprime las señales derivadas de la vía PI3K/Akt. CK2 media la fosforilación del grupo C-terminal serina-treonina de PTEN

S380-T382-T383, lo que promueve la estabilidad de PTEN a la vez que reduce la actividad de la actividad de la fosfatasa lipídica de PTEN [71,72]. Durante la activación de la célula T, PTEN es fosforilado por CK2 en el grupo S380-T382-T383 en el dominio regulatorio C-terminal [73]. Esta fosforilación estabiliza a PTEN, resultando en un aumento en la cantidad de la proteína debido a la resistencia a la degradación dependiente de ubiquitina, pero a la vez suprimiendo la actividad de la PTEN fosfatasa. PD-1 inhibe la estabilización de la fosforilación del grupo S380-T383-T383 en el dominio C-terminal de PTEN, resultando en una disminución en la abundancia de PTEN, pero generando un aumento de la actividad de la PTEN fosfatasa.

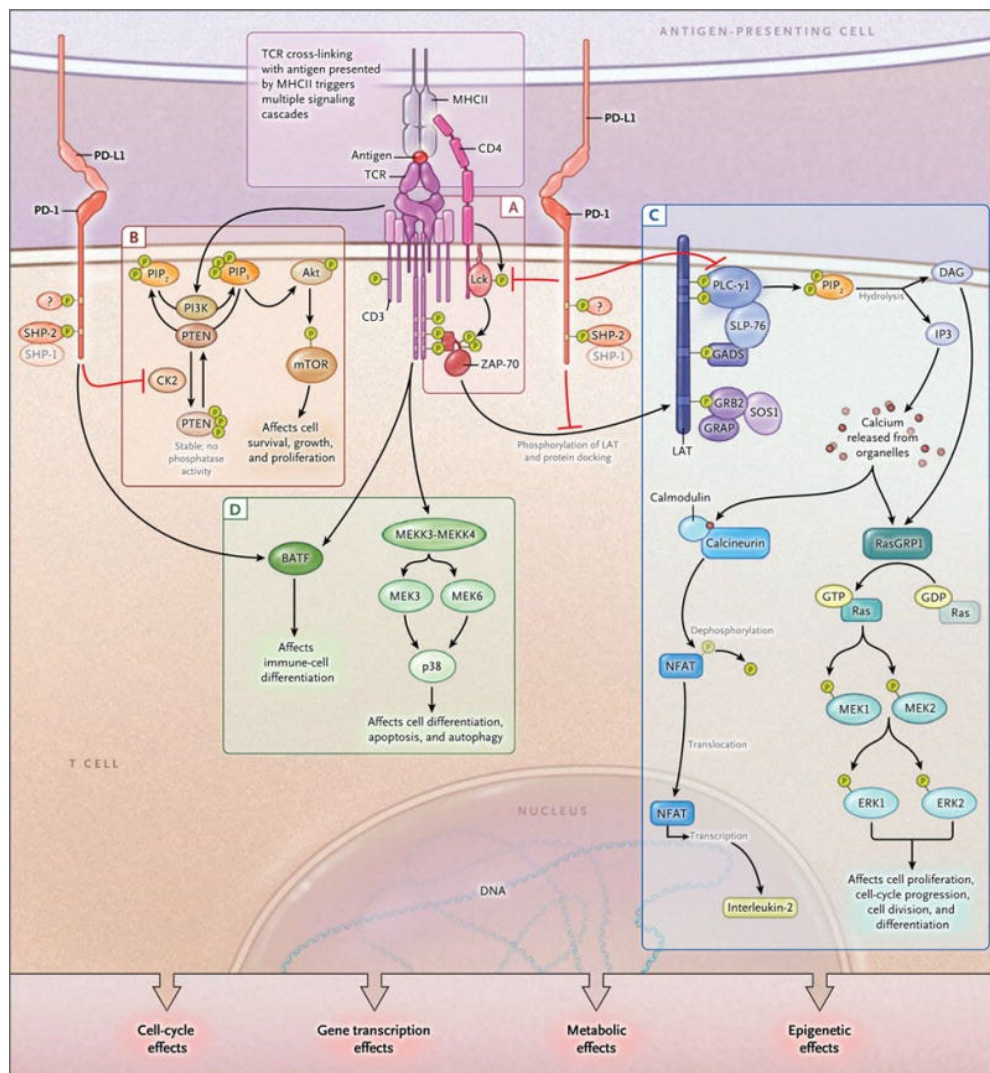


Figura 3. Efectos de PD-1 en las principales vías de señalización de las células T. Adaptado de Boussiotis *et al. NEJM*. [46].

El segundo mecanismo principal involucrado en la inhibición de PD-1 es la **vía Ras-proteína quinasa de activación mitogénica (MEK, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*)** regulada por señales extracelulares (ERK, del inglés *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) [68,69]. Este mecanismo está mediado por la proteína de liberación Ras guanil 1 (RASGRP1), la cual es activada por calcio y diacilglicerol (situados de forma

posterior a la fosfoinosítido fosfolipasa C gamma 1 [PLC- G1, del inglés *Phospholipase C Gamma 1*] [74]. PD-1 bloquea la activación de la vía MEK-ERK quinasa al inhibir la activación de PLC- γ 1 y Ras. Al alterar la activación de Ras-MEK-ERK, PD-1 provoca una plétora de cambios bioquímicos regulados por esta vía, aunque debe tenerse en cuenta que PD-1 no causa una inhibición global de la señal. Por ejemplo, PD-1 no inhibe la activación de la quinasa p38, e induce la expresión de ciertos factores de transcripción, incluyendo el factor de transcripción cremallera de leucina básica (BTLA, del inglés *Basic Leucine Zipper Transcription Factor ATF-Like*) [69,75]. Las funciones del linfocito T son sensibles a PD-1, lo que es consistente con un efecto diferencial de PD-1 en las vías de señal-transducción. Se requiere niveles altos de expresión de PD-1 y ligación para inhibir la producción de Mib-1b, niveles más bajos son suficientes para bloquear la citotoxicidad y la producción de interferón- γ , y niveles muy bajos son suficientes para inhibir la producción de TNF- α , interleuquina-2, y generar la inhibición de la expansión de las células T [76].

La alteración de los linfocitos T por medio de eventos de señalización ligados al receptor, los cuales son inducidos por PD-1, están correlacionados con dinámicas alteradas en la interacción entre las células T y las células dendríticas portadoras de antígenos. Durante el proceso de activación de las células T *in vivo*, la duración de los contactos entre célula T-célula dendrítica es muy variable, encontrándonos un rango de minutos a horas, y puede dividirse en múltiples fases [77]. Diversos estudios han mostrado que PD-1 previene la formación de contactos estables entre células T y células dendríticas, generando un cese de la función efectora [78,79].

1.2.3 Alteración del metabolismo por PD-1

La reprogramación metabólica tiene un efecto importante en la diferenciación de la célula T y su función (**Figura 4**) [80]. Las células T vírgenes tienen un fenotipo quiescente y generan energía por medio de glucosa, ácidos grasos, y aminoácidos para favorecer la fosforilación oxidativa, un proceso que requiere consumo de oxígeno. Una vez activadas, las células T sufren una reprogramación metabólica, y aunque la fosforilación oxidativa persiste y aumenta, la glucólisis aeróbica se convierte en el programa metabólico dominante. El consumo de glutamina y el catabolismo está aumentado y es requerido para que las células T efectoras se mantengan activas, así como para el desarrollo de los linfocitos T de memoria. **PD-1 suprime el consumo de oxígeno y bloquea la capacidad para que las células T activadas inicien el proceso de glicólisis y glutaminólisis**, pero promueve la β -oxidación de ácidos grasos [81]. También, cuando las células T son estimuladas por la ligación de PD-1, se produce un acúmulo sustancial de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son reconocidos por supresores de la inmunidad de los linfocitos T [82]. Por tanto, PD-1 podría alterar la diferenciación de las células T por medio de un bloqueo de la remodelación del metabolismo de forma adecuada por las células T. Como consecuencia de estas alteraciones metabólicas, las células T activadas que reciben señales de PD-1 parecen tener un entorno más oxidativo, algo que concuerda con la observación de una

reducción importante en los niveles del glutatión reducido, un antioxidante clave [81,83]. Por tanto, los efectos de PD-1 en el metabolismo de las células T podría tener implicaciones terapéuticas. Estos cambios metabólicos podrían tener también un rol activo en la disfunción de linfocitos T mediada por PD-1 durante infecciones crónicas y cáncer.

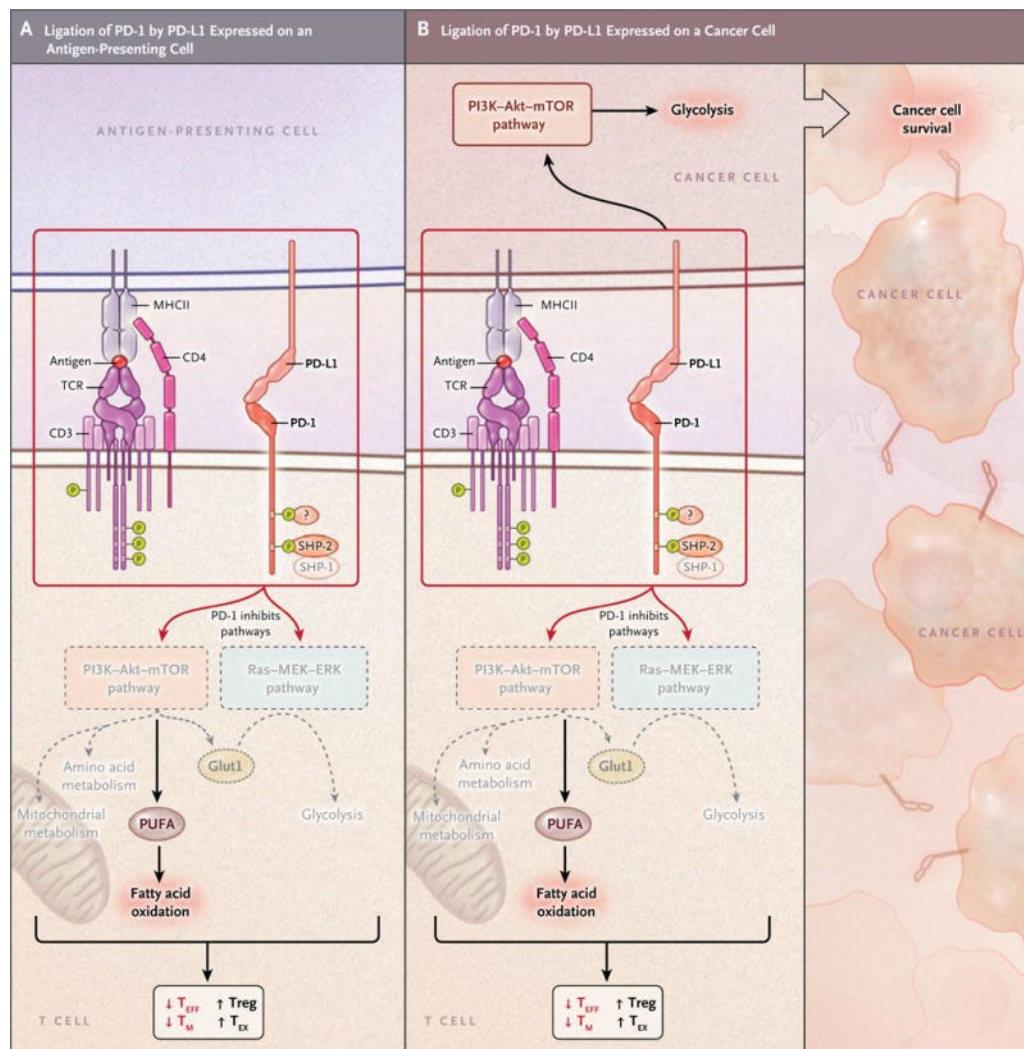


Figura 4. Alteraciones del metabolismo por la vía PD-1. Adaptado de Boussiotis *et al. NEJM*. [46].

Por último, aunque parece que todos estos mecanismos se activan en células T, en un modelo de sarcoma se ha reportado que la expresión de PD-L1 en las células cancerígenas está asociado con un aumento de los genes de glicólisis y un metabolismo glicolítico aumentado [84]. Actualmente no queda claro si PD-L1 puede activar señales reversas hacia las células tumorales dado que PD-L1 solo tiene una cola citoplásmica corta sin claros motivos de señalización. Sin embargo, PD-L1 funciona como un receptor inhibitorio para transmitir señales antiapoptóticas a las células cancerígenas y para prevenir la alteración mediada por el sistema inmune de dichas células cancerígenas causando una muerte celular mediada por Fas [85]. Dado que las células cancerígenas tienen un importante metabolismo glicolítico, esto podría generar niveles elevados de

activación de PI3K-Akt, así como una ratio elevada de glicólisis intrínseca al tumor como consecuencia de un aumento de la supervivencia.

1.2.4 Implicaciones clínicas de PD-1, PD-L1, PDL-L2 para la terapia antineoplásica

Un mecanismo clave por el que **las células cancerígenas limitan la respuesta inmune del paciente es por la sobreexpresión de ligandos de PD-1 en el microambiente tumoral (MAT)** y su ligación a PD-1 en células T específicas del tumor CD8+. La expresión de ligandos PD-1 en células tumorales puede estar mediada por varios mecanismos. Existen aberraciones en las vías de señalización inducidas por eventos oncogénicos, como la activación de las vías EGFR, MAPK, o PI3K/Akt [86], así como una expresión elevada de los factores de transcripción transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) y el factor 1 inducible por hipoxia (HIF1, del inglés *Hypoxia-Inducible Factor 1*) [87,88]. Estos cambios moleculares pueden inducir la expresión de PD-L1 en varios tipos de cáncer por mecanismos transcripcionales o post-transcripcionales. La amplificación de 9p24.1 aumenta la dosis génica de PD-L1 y PD-L2 junto a JAK2 en el linfoma de Hodgkin variante esclerosis nodular, y en el linfoma primario mediastínico de células grandes B [89]. Los tumores nasofaríngeos y gástricos positivos para el virus de Epstein-Barr sin amplificación de 9p24.1 expresan PD-L1, lo que sugiere que dicho virus promueve la expresión de PD-L1 [90,91]. Los niveles de expresión de PD-L1 en células tumorales también están regulados por mecanismos epigenéticos por medio de microRNAs y tienen una correlación inversa con los microRNAs miR-34a, miR-200, miR-513, y miR-570 [92].

En el MAT, PD-L1 y PD-L2 también pueden ser inducidos por citoquinas inflamatorias, entre las cuales el interferón- γ es la más potente. Estos mediadores inflamatorios pueden inducir expresión de PD-L1 y PD-L2 en células cancerígenas, pero también en otras células del MAT, incluyendo macrófagos, células dendríticas, y células estromales [93]. Las células T infiltrantes de tumor (TILs, del inglés *Tumor infiltrating lymphocytes*) que son capaces de reconocer antígenos tumorales son las productoras de interferón- γ , lo que sugiere que las respuestas inmunes mediadas por el tumor inician una vía que genera supresión inmunitaria por medio de la expresión de PD-L1 y PD-L2. Este mecanismo, denominado “resistencia inmune adaptativa”, es un proceso por el que las células cancerígenas se protegen de un ataque por el sistema inmunitario. Dado que PD-1 se expresa en las células T tras la activación, el mecanismo PD-1, PD-L1, PD-L2 inhibitorio se pone en marcha después de que las células T hayan reconocido los antígenos tumorales y que estos hayan activado respuestas específicas tumorales, llevando a la supresión selectiva de linfocitos T específicos tumorales. En estas condiciones, el bloqueo terapéutico de la vía PD-1 genera una expresión de poblaciones oligoclonales de células T CD8+ infiltrantes en el tumor, estas tendrían la capacidad de reconocer los neoantígenos tumorales generados por mutaciones somáticas no-sinónimas en el tumor [94].

Una clave del mecanismo de PD-1 que tiene implicaciones clínicas directas afecta a los factores que regulan las respuestas antitumorales a inmunoterapias basadas en PD-1. En biopsias de pacientes con melanoma metastásico que tuvieron una respuesta al tratamiento con un bloqueo anti-PD-1, se identificaron células T PD-1+CD8+ en el margen invasivo del tumor antes del tratamiento, y de forma posterior aumentaron en número durante el tratamiento, estando este aumento correlacionado con una reducción en tamaño tumoral. Estas células PD-1+CD8+ tienen un repertorio de receptores oligoclonales y un aumento de la señalización mediada por interferón- γ , según se ve por la medición de la expresión de pSTAT1 [95]. Estos hallazgos son consistentes con la conclusión de que **las células T PD-1+CD8+ específicas del tumor son bloqueadas por una inhibición mediada por PD-1, y son liberadas por el bloqueo de PD-1**. El tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 aumenta de forma selectiva el número de células T CD8+ de memoria en el MAT, un hallazgo que también es consistente con esta conclusión [96]. Llama la atención que la respuesta a un bloqueo terapéutico de PD-1 requiera la presencia de ambas células T PD-1+CD8+, y células que expresen PD-L1 a nivel del MAT. En una biopsia secuencial de pacientes con diversos tipos de tumores tratados con anticuerpos anti-PD-L1, se correlacionó una firma génica de un linfocito T efector activado con la respuesta terapéutica, mientras que la ausencia de una firma de linfocito T activado, la ausencia de células infiltrantes tumorales, y una expresión mínima o ausencia de expresión de PD-L1 en el infiltrado inmune intratumoral se correlacionaron con fallo del tratamiento y progresión de enfermedad [97]. Estos hallazgos indicaron que **la inmunosupresión mediada por PD-1, PD-L1 es un mecanismo de inmunosupresión local** y que, aunque el bloqueo anti-PD-1 se administra de forma sistémica, su acción es inducida de forma local en tejidos tumorales.

Dado que la vía del punto de control PD-1 tiene un rol importante en el mantenimiento de la tolerancia propia, el bloqueo de esta vía puede llevar a alteraciones en la tolerancia inmunológica que acaben generando respuestas inmunitarias no deseadas. Dichas respuestas pueden manifestarse clínicamente como enfermedades autoinmunes o efectos secundarios inflamatorios denominados “eventos adversos asociados a la inmunoterapia”, y que pueden causar daño a los tejidos y órganos que normalmente son protegidos de cambios autoinmunes. Estos efectos adversos inmunorelacionados pueden generar toxicidad mucocutánea, pulmonar, endocrina, renal, e incluso daño en órganos inmunoprivilegiados como el ojo [98]. El conocimiento de estos efectos secundarios asociados al bloqueo de la vía PD-1-PD-L1/L2 son vitales, y se han creado guías de manejo para detectarlos y tratarlos de la forma más precoz y adecuada posible [99,100].

1.3 Biomarcadores predictores de respuesta a IPCI en CPCNP

Dentro del diagnóstico del CPCNP las guías clínicas [5,6,27,28] han estandarizado el uso de paneles de secuenciación masiva a nivel tumoral para el diagnóstico de mutaciones que pueden tener un tratamiento diana, o suponer un factor clave a nivel pronóstico, facilitando la elección del tratamiento y suponiendo un ahorro económico respecto a la búsqueda de mutaciones de forma individual o con respecto a los costes que genera en un sistema de salud el deterioro clínico cuando no se plantea el tratamiento más óptimo [101,102].

Sin embargo, en la gran mayoría de **pacientes que no presentan ninguna alteración diana existe controversia respecto a la selección de biomarcadores que sean capaces de predecir la respuesta a los IPCI**, ya sea en monoterapia o en combinación [18,103]. Como se ha mencionado previamente, **PD-L1** es uno de los primeros biomarcadores (y el único usado en práctica clínica) establecidos en base a datos de ensayos clínicos, llevando a la Asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón (IASLC, del inglés *International Association for the Study of Lung Cancer*) a realizar un documento de consenso sobre este marcador [104]. Otro biomarcador emergente en los últimos años es la **carga mutacional tumoral (TMB, del inglés *Tumor Mutational Burden*)**. Sin embargo, aunque se ha usado en ensayos clínicos como el CheckMate-227, presenta dificultades técnicas en su estandarización y discordancias con PD-L1 [15]. No obstante, la IASLC también publicó un consenso con respecto a dicho marcador en el que se definen estos claroscuros [105], llegando al consenso de que no puede estandarizarse en la práctica clínica habitual debido a la ausencia de validación en ensayos fase III, y que ningún punto de corte de TMB ha demostrado predecir una mejoría en la SLP y la mSG. De forma más reciente, y con la aparición de otros biomarcadores (sea a nivel tumoral o en sangre periférica), la IASLC ha generado recientemente un documento de análisis y perspectiva con todos estos elementos [18]. A lo largo de los siguientes apartados analizaremos los biomarcadores de respuesta a IPCI que se han planteado a lo largo de estos años (**Figura 5**) [106].

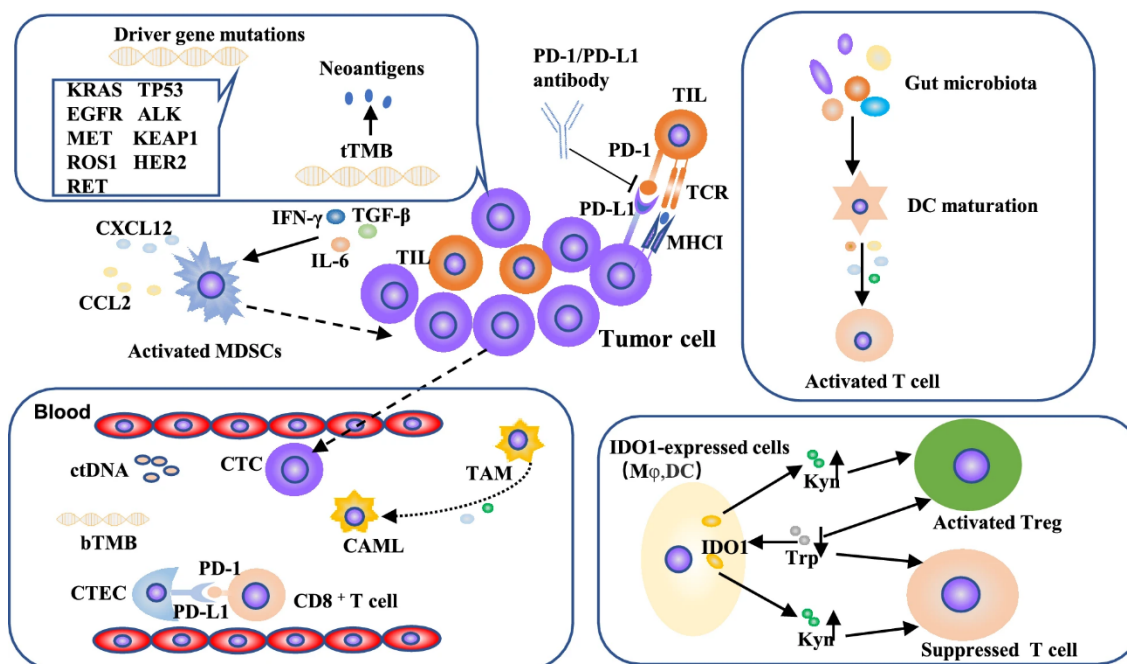


Figura 5. Resumen de biomarcadores predictores de respuesta a IPIs en CPCNP. Adaptado de Niu et al. *Exp Hematol Oncol.* [106].

1.3.1 PD-L1 como biomarcador predictivo

La **expresión proteica de PD-L1 en tejido es uno de los marcadores más útiles para tomar decisiones con respecto al tratamiento con IPIs** [107]. Varios estudios han conseguido aprobaciones en base a la expresión de PD-L1 (Pembrolizumab con el KEYNOTE-024 [8], Atezolizumab con el IMpower110 [9], Cemiplimab con el EMPOWER-Lung1 [7]). Aunque inicialmente había dudas sobre la comparabilidad que tendrían diferentes test de PD-L1 usados en ensayos clínicos, varios estudios, a destacar el programa “*PD-L1 Blueprint Project*” de la IASLC, han comparado los diferentes test objetivando que 22C3 (Dako), 28-8 (Dako), y SP 263 (Ventana) presentan un patrón de expresión muy similar y tienen buena reproducibilidad entre diferentes observadores [108,109]. Desde entonces, estos tres test se han utilizado de forma intercambiable con interpretaciones clínicas similares de respuestas a tratamientos, a pesar de cierta variabilidad preanalítica y analítica [110].

Aunque la comparación prospectiva entre IPIs con quimioterapia frente a IPIs en monoterapia se está estudiando en el ensayo INSIGNA (NCT 03793179) [111], múltiples guías clínicas apuntan como preferible un tratamiento que evite la quimioterapia en poblaciones con alta expresión de PD-L1 (aproximadamente el 30% de pacientes con CPCNP) [27,28]. De hecho, comparaciones indirectas en análisis retrospectivos han demostrado que una expresión muy alta de PD-L1 ($\geq 90\%$) debería tener un mejor resultado con IPIs en monoterapia [112], aunque este hecho debería confirmarse de forma prospectiva. No obstante, se debe tener en cuenta que se ha demostrado biológicamente que la combinación de quimioterapia (más acentuado en esquemas basados en pemetrexed) ejercería un efecto sinérgico con los IPIs y mejoraría la eficiencia

de la inmunoterapia al aumentar la activación del sistema inmunológico, y provocar cambios metabólicos y de renovación del pool celular exhausto que mejorarían la respuesta antitumoral [113]. De forma contraria, de acuerdo a los datos de los estudios CheckMate 227 y 9LA, la expresión negativa o baja de PD-L1 mostró un perfil más favorable en pacientes en los que se usa (con o sin quimioterapia asociada) un bloqueo doble anti-PD-L1 y anti-CTLA-4 [39,41]. Curiosamente, al analizar si existe una diferencia en el valor predictivo en base a estudios por histología, un análisis retrospectivo de un gran número de pacientes indica que no hay un valor predictivo de expresión de PD-L1 en la población con carcinoma escamoso en comparación a adenocarcinoma. La **expresión de PD-L1 y la histología escamosa no mostró una asociación significativa con la mSG** ($p=0,283$). Sin embargo, las diferencias incrementales asociadas al PD-L1 en la mSG entre pacientes con histología escamosa y no escamosa fueron significativamente diferentes ($p=0,034$) [114].

Aunque el paradigma de la expresión tumoral de PD-L1 parezca relativamente simple, existen aún múltiples debilidades en su uso. Primero, la **expresión de PD-L1 es heterogénea en el tiempo y en el espacio**, y puede variar entre múltiples localizaciones tumorales (tumor primario frente a metástasis) [17,115]. Segundo, la **expresión tumoral de PD-L1 es una variable de distribución continua**, por lo que es difícil plantear un punto de corte binario que sea fiable [18]. Por último, se debe buscar la **combinación de PD-L1 con otros biomarcadores** como la TMB, la expresión génica (firmas transcriptómicas), y estudios del MAT, ya que en conjunto podrían tener un poder predictivo superior a la expresión tumoral de PD-L1 de forma individual [116,117]. Por ejemplo, una alta expresión tumoral de PD-L1 y la TMB podrían tener una mejor capacidad de predicción que un biomarcador de forma individual [118].

1.3.2 TMB, neoantígenos, y firmas genéticas y epigenéticas

De acuerdo al consenso de la IASLC publicado en 2020, la **TMB se definió como un biomarcador prometedor** en el uso de IPCIs, aunque **presentaba las siguientes limitaciones**: 1) Se requería identificar terapias cuya respuesta tuviera una mejor correlación con los valores de la TMB; 2) Se requería definir un punto de corte robusto y predictivo; 3) Se requería estandarizar un panel de secuenciación (diseño y tamaño); 4) Se requería un hardware y software robusto para generar medidas precisas y adecuadas de TMB entre diferentes laboratorios [105]. Independientemente de este hecho, la FDA otorgó la aprobación acelerada a pembrolizumab para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos con tumores metastásicos irresecables con una alta TMB en tejido (tTMB; definida por ≥ 10 mutaciones/megabase) determinado por el test *FoundationOne CDx assay* (Foundation Medicine, Inc.), tras progresión a tratamientos previos, y sin otras alternativas factibles [119]. La FDA se basó en los resultados del ensayo KEYNOTE-158, un ensayo fase 2 multicohorte, abierto, no aleatorizado en el que 10 tipos de tumores avanzados e incurables recibieron pembrolizumab [120]. Entre 790 pacientes con una tTMB valorable, 102 (13%) presentaron una alta tTMB; la tasa de respuestas fue del 29%

frente al 6% en aquellos pacientes con una tTMB inferior. El 57% y el 50% de pacientes que respondieron presentaron una duración de respuesta superior o igual a 12 meses y 24 meses respectivamente. Se incluyeron pacientes con carcinoma microcítico de pulmón (n= 76), de los cuales 34 (45%) presentaron una tTMB alta. La tasa de respuestas en estos pacientes fue del 29% y del 9,5% respectivamente para tTMB alta y tTMB no alta respectivamente. Sin embargo, al evaluar la TMB en el ensayo IMpower133, en el que se usaba atezolizumab en primera línea en pacientes con carcinoma microcítico de pulmón avanzado, esta no fue predictiva (en el punto de corte de 10 o 16 mutaciones/megabase), demostrando de nuevo la complejidad y la dificultad para valorar este biomarcador [121].

Hasta la actualidad, la valoración de la TMB como biomarcador predictivo en el tratamiento con IPCIs en ensayos de CPCNP ha sido retrospectivo y exploratorio, con excepción del ensayo CheckMate-227 [15,122]. Globalmente, los datos sugieren que una tTMB elevada estaba asociada de forma consistente con un mayor beneficio de supervivencia al usar anti-PD-(L)1 en monoterapia frente a un doblete de quimioterapia, mientras que dicho beneficio no era objetivable en pacientes con una baja tTMB. Sin embargo, esta diferencia no era objetivable cuando los IPCIs se combinaban con quimioterapia, o al usar un doble bloqueo de IPCIs en comparación a un IPCI en monoterapia (ensayo MYSTIC) [123]. Además, a pesar de los datos iniciales “optimistas” del ensayo CheckMate 227 que demostraron que una tTMB alta podía ser predictiva para la terapia de combinación con nivolumab-ipilimumab, los datos de mSG publicados de forma posterior sugirieron que la tTMB era pronóstica más que predictiva [15,122], llevando a que la aprobación de la FDA de esta combinación de IPCIs se basara de forma exclusiva en el valor de la expresión tumoral de PD-L1 [40]. Por otra parte, existen muy pocos datos en relación con el papel de la TMB medida en plasma o sangre (bTMB, del inglés *Blood Tumor Mutational Burden*) como biomarcador predictivo para los IPCIs. En el ensayo MYSTIC, aunque una alta bTMB (≥ 20 mutaciones/megabase) se asoció con una mejoría en la supervivencia para durvalumab-tremelimumab frente a quimioterapia, este efecto no se observó en pacientes con menos de 20 mutaciones/megabase; aunque el análisis fue retrospectivo y exploratorio [123]. Cuando este punto de corte fue testado en el ensayo BR.34, en el que se comparaba la eficacia de durvalumab-tremelimumab con quimioterapia frente a dichos IPCIs en combinación sin quimioterapia, no se objetivó que la bTMB tuviera algún efecto diferencial para la mSG [124]. Cuando los IPCIs con quimioterapia se han comparado con quimioterapia a solas, existen datos conflictivos con respecto a si una bTMB alta puede predecir efectos diferenciales del tratamiento sobre la mSG [125,126].

Los paneles que buscan genes diana se usan de forma rutinaria en la identificación clínica de mutaciones diana usando tecnología de NGS en múltiples países, pero estos paneles varían de forma importante en el número y composición de genes que cubren. Múltiples estudios sobre diferentes paneles han demostrado una fuerte correlación de la TMB estimada usando estos paneles en comparación a una secuenciación completa del

exoma; se sugiere paneles de más de 1,1 o 1,5 megabases como los más adecuados para medir la TMB [127–131].

Con el fin de desarrollar unas guías para homogeneizar la TMB entre diferentes plataformas diagnósticas clínicas, los “*Friends of Cancer Research TMB Harmonization Consortium*”, han completado y reportado los resultados de sus estudios fase I (valoración *in silico* de la variación) y fase II (análisis de muestras tumorales y de líneas celulares), en los que se incluyeron 11 y 16 laboratorios respectivamente. Los resultados del estudio fase I llevaron al consorcio a recomendar una serie de “prácticas de calidad” para aquellos que desarrollaran un panel en base a tres elementos: 1) Reportar la TMB en mutaciones/megabase para asegurar homogeneidad; 2) Estandarización de los estudios de validación analítica para la estimación de la TMB, de forma que incluyan una valoración de la exactitud, la precisión, y la sensibilidad; 3) Asegurar la consistencia entre paneles al alinear los valores del panel de TMB a los estándares de referencia universales derivados de la secuenciación completa del exoma [132]. El estudio fase II concluyó que el tamaño del panel, el contenido de genes, y las herramientas bioinformáticas podrían contribuir a la variabilidad empírica observada en la estimación de la TMB entre diferentes paneles, desarrollando así una herramienta de software pública para promover la reproducibilidad y comparabilidad entre ensayos [132].

Dadas las **limitaciones de la TMB como un marcador predictivo de forma individual, se ha reavivado el interés en el estudio de neoantígenos**; es decir, los péptidos mutados que se originan de las mutaciones somáticas, y que generan las respuestas antitumorales mediadas por células T cuando son presentados por proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad [133]. Primero, porque la cantidad y la calidad de la respuesta neoantigénica podría mejorar la predicción de los tratamientos IPCIs [94,134–137], mientras que una pérdida de neoantígenos sería un mecanismo de escape inmunitario y una causa de resistencia a IPCIs, particularmente en el caso del carcinoma escamoso de pulmón [138,139]. Segundo, porque hay en desarrollo vacunas y terapias celulares adoptivas T basadas en neoantígenos [133]. Dado que no hay un método estandarizado para la identificación de neoantígenos, los métodos actuales se basan en desarrollos bioinformáticos (tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad, interferencia de neopéptidos, predicción de unión al complejo mayor de histocompatibilidad, y selección de neoantígenos candidatos) [133,140]. En el CPCNP, el número medio de neoantígenos por tumor estaría comprendido entre 63 y 214 [133]. En los casos con un mayor número de neoantígenos, se ha observado una asociación con mayor expresión de PD-L1 y firmas genómicas asociadas al tabaco [137,141].

Aproximadamente **la mitad de pacientes con CPCNP presentan mutaciones diana** en las que se puede plantear un tratamiento dirigido en algún momento de la enfermedad [5,6,27,28], y entre estos, se ha objetivado una respuesta negativa a IPCIs en pacientes con mutaciones en ALK y EGFR [142]. Sin embargo, mutaciones como transición mesénquima-epitelial (MET) salto del exón 14 o el oncogén viral asociado a las ratas

Kirsten (KRAS, del inglés *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene*) presentan sensibilidad a los IPCIs [143]. De hecho, los tumores que presentan una mutación en KRAS y la proteína tumoral p53 (TP53, del inglés *Tumor Protein p53*) se asocian con un MAT enriquecido en TILs. Sin embargo, mutaciones concurrentes de serina/treonina quinasa 11 (STK11, del inglés *Serine/Threonine Kinase 11*) y/o la proteína 1 asociada a ECH homóloga a Kelch (KEAP1, del inglés *Kelch-Like ECH-Associated Protein 1*) presentan un MAT caracterizado por una exclusión de células T, con ausencia o baja expresión tumoral de PD-L1, baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II para adenocarcinomas mutados en KRAS y STK11, y de reguladores positivos del interferón tipo I y otras citoquinas [144,145]. Ambas mutaciones están asociadas con un peor pronóstico y resistencia a IPCIs en pacientes con tumores que presentan mutaciones en KRAS. Entre otras anormalidades genéticas, las mutaciones truncantes y la pérdida de heterocigosidad de β 2-microglobulina (B2M, del inglés *Beta-2 Microglobulin*) se asocian con una resistencia adquirida a terapias anti-PD-1 [146]. Los mecanismos epigenéticos pueden afectar las respuestas a los IPCIs por medio de metilación del promotor de genes que codifican puntos de control inmunitario o antígenos tumorales, así como por el bloqueo de la presentación de antígenos, migración de células T, y de la secreción de citoquinas. Una firma de metilación del DNA denominada EPIMMUNE se ha asociado con la respuesta a IPCIs y una mejor supervivencia en pacientes con CPCNP [147].

1.3.3 Microambiente tumoral

La **interacción entre cáncer e inmunidad presenta una dinámica espaciotemporal** en la que intervienen múltiples factores estimulantes e inhibitorios que actúan en diferentes puntos de un ciclo [148]. Los IPCIs, el principal eje de las inmunoterapias actuales, buscan optimizar la muerte de las células cancerígenas por medio de la reactivación de células T efectoras suprimidas en el MAT. Desde esta perspectiva, **el MAT puede clasificarse en “inflamatorio por células T” o “inflamatorio por células no-T”**; el primero se subclasifica en base al estado de la activación de los linfocitos T. La infiltración de linfocitos T activados en el MAT se suele acompañar de un fenotipo de resistencia inmunitaria adaptativa guiada por interferón- γ , que se caracteriza por una sobreexpresión de vías inmunoregulatorias que incluirían receptores inmunes inhibitorios como PD-1, LAG-3, TIM3, TIGIT, y supresor del dominio V de la inmunoglobulina durante la activación de las células T (VISTA);, otras moléculas inhibitorias como indoleamina 2,3-dioxigenasa-1 (IDO1, del inglés *Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1*), el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1, del inglés *Transforming Growth Factor Beta 1*), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*); y/o la expansión de poblaciones inhibitorias del sistema inmune como las células T reguladoras (Tregs) y células mieloides supresoras (MDSCs, del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) [148–150].

La presencia de **infiltración por células T CD8+ citotóxicas** ha sido uno de los biomarcadores más estudiados, con múltiples estudios basados en inmunohistoquímica,

inmunofluorescencia múltiple (mIF, del inglés *Multiplex Immunofluorescence*), o firmas de RNA mensajero (mRNA, del inglés *Messenger RNA*) [19,151–153]. Desafortunadamente, cada estudio aplica un método de puntuación propio y diferentes puntos de corte para clasificar los linfocitos T CD8+ en altos o bajos, y las poblaciones de pacientes fueron heterogéneas en tamaño y características. También se ha propuesto la evaluación del estado de activación de las células citotóxicas como un marcador adicional. Por ejemplo, la coexpresión de CD39, un marcador de activación en base a antígenos tumorales en células infiltrantes T CD8+ se ha asociado con una sobrerregulación de: marcadores de proliferación y disfunción de células T, y de respuesta aumentada al bloqueo del eje PD-1 [154]. Una expresión alta de PD-1, otro marcador basado en activación de antígenos y disfunción en células T CD8+ infiltrantes, se ha asociado con predicción de la respuesta y supervivencia en CPCNP tratado con IPCIs anti-PD-1 [155]. Dado que el bloqueo del eje PD-1 no solo induce la recuperación de células T disfuncionales PD-1+ CD8+, sino que también aumenta la inmunosupresión de células Treg PD-1+, podría ser necesaria una reactivación profunda de las células T efectoras PD-1+ CD8+ en vez de las células Treg PD-1+ para inducir la regresión tumoral [156]. La valoración de la disfunción de células T también podría incluir la evaluación de varios tipos de marcadores entre los que se incluirían aquellos basados en la activación por antígenos (PD-1, CD28, CD39, CD103, CD137), regulación (puntos de control: TIM3, LAG3, PD-1), diferenciación (CD45RO, caja T expresada en células T [TBET], eomesodermina [EOMES]), proliferación (Ki-67), y apoptosis (CD95 y el mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2 [BIM, del inglés *Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death*]) [157–159]. Algunos de estos marcadores evaluados por mIF estarían asociados con la supervivencia tras tratamiento con anti-PD-(L)1 en pacientes con CPCNP [137,157].

Entre las múltiples moléculas y vías, algunas pueden ser predominantes en un punto concreto en el tiempo, y ser consideradas como “guías” para la evasión inmunológica [160,161]. Por ejemplo, una expresión elevada de LAG3 se asoció con una mSLP más baja o más alta en función del resultado en el tiempo [151,157]. Los determinantes para esta aparente contradicción no están claros, pero podría haber múltiples factores que involucrados, como el uso de cohortes heterogéneas, las plataformas de análisis de tejido utilizadas, y los puntos de corte de los biomarcadores. Además, la fuerte asociación de la expresión de PD-L1 y LAG3 observada en uno de los estudios, sugiere que la vía PD-1/PD-L1 fue la “guía” predominante en este proceso de inmunorregulación. El posible papel del ligando de LAG3 conocido como proteína homóloga al fibrinógeno 1 (FGL1, del inglés *Fibrinogen-Like Protein 1*), y que se sabe está expresada en una parte de los CPCNP, podría ser fundamental para estas respuestas [162].

La expansión local de poblaciones inmunosupresoras en el MAT, como Treg, MDSC, y macrófagos M2, así como la asociación con citoquinas inmunosupresoras como interleuquina-6, interleuquina-8, y TGF- β 1, serían otro mecanismo para generar un fenotipo de resistencia inmune adaptativa [149]. De estos, las MDSCs, una población

inmadura heterogénea de células mieloides, contribuye a la resistencia a IPCIs al dirigirse frente a células T efectoras, provocando la disfunción de las células T, activación de la angiogénesis tumoral, y favoreciendo una red inmunosupresora con una polarización M2 de los macrófagos y expansión de Tregs [163].

Otra posible clave para obtener una imagen indirecta del MAT, y de la situación inmunológica del paciente, podría ser la sangre periférica. Estudios recientes han mostrado que células mononucleares en sangre periférica determinadas por citometría de flujo pueden predecir la eficacia de los IPCIs anti-PD-1, dado que estos inducirían cambios en los porcentajes de varios tipos celulares como células T CD4+, células T CD8+, MDSCs, Tregs, y células T PD-1 positivas [164–166]. El uso de las células en sangre periférica como biomarcador se desarrolla con mayor detalle en un apartado subsecuente. De forma adicional, ciertas proteínas solubles asociadas a los IPCIs en sangre están asociadas con invasión y progresión en el CPCNP [167], y presentan un valor predictivo en pacientes tratados con IPCIs [168–170].

1.3.4 Firmas transcriptómicas

Se han publicado múltiples **firmas transcriptómicas que predicen la respuesta o resistencia a IPCIs**. Estas firmas están basadas en datos de mRNA obtenidos por secuenciación de dianas concretas, o del transcriptoma completo del RNA a partir de fuentes públicas o estudios específicos [18]. Se han validado en diferentes cohortes y conjuntos de datos con diferentes algoritmos, incluyendo un análisis de enriquecimiento de un grupo de genes, con el fin de discernir la función de los genes o determinar si un grupo de genes predefinido podría ser estadísticamente significativo. Estas firmas transcriptómicas predictivas consideran grupos de genes involucrados en la antigenicidad tumoral y en la activación de las células T por interacción con células dendríticas activadas, tráfico e infiltración de las células T en los tumores (genes del ligando del motivo C-X-C de la quimioquina [CXCL, del inglés *C-X-C Motif Chemokine Ligand*] 9, CXCL10, ligando del motivo C-C de la quimioquina [CCL, del inglés *C-C Motif Chemokine Ligand*] 5, entre otros), reconocimiento de células cancerígenas por las células T, infiltración de las células inhibitorias (como MDSCs y Tregs) o moléculas, y genes codificantes de receptores o ligandos de puntos de control inmunitario [18]. Muchas firmas predictivas enfatizan el rol de la inflamación y la disfunción de las células T, incluyendo genes relacionados con el interferón- γ y actividades citolíticas inmunes asociadas a linfocitos T efectores. *Ayers et al.* propusieron en un estudio de cohortes de pacientes tratados con pembrolizumab en 9 tipos tumorales diferentes, un perfil de expresión de genes asociados a un fenotipo de células T inflamadas, y que consistía en 18 genes que están involucrados en el MAT de células T activadas, señalización del interferón- γ , presentación de antígenos, quimioquinas, actividad citotóxica por células T, e inmunidad adaptativa [171]. Esta firma se ha validado como un biomarcador predictivo independiente de monoterapia con pembrolizumab en un ensayo pan-tumor llevado a cabo con 20 tipos tumorales diferentes, incluyendo el carcinoma microcítico de pulmón (KEYNOTE-028) [172,173]. También se ha

asociado una expresión génica alta de linfocitos T efectores asociados a interferón- γ con mejores resultados al utilizar atezolizumab y durvalumab [174,175]. *Damotte et al.* también reportaron una firma inflamatoria tumoral en la que el tratamiento con monoterapia anti-PD-1 mostró beneficios. Esta firma estaba basada en 5 genes relacionados con la señalización del interferón- γ y procesamiento de antígenos (CXCL9, CXCL10, CXCL11, el transportador asociado con procesamiento de antígenos [TAP1], y subunidad beta tipo 9 del proteasoma [PSMB9, del inglés *Proteasome Subunit Beta Type-9*]), y su expresión fue significativamente mayor en pacientes que respondieron a inhibidores de PD-1 [176]. De forma similar, firmas de macrófagos M1, linfocitos T periféricos, y alta expresión de niveles de mRNA de CD137 y PSMB9 fueron más predictivos de la respuesta a monoterapia anti-PD-1 que la expresión tumoral de PD-L1, TMB, o los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) [177]. También se ha estudiado la capacidad predictiva de la expresión de perfiles génicos en la respuesta al daño en el DNA (DDR, del inglés *DNA Damage Response*) junto a marcadores de disfunción y exclusión inmunitaria [178]. Al usar una firma basada en 7 genes de 8 vías DDR, los adenocarcinomas de pulmón con una baja expresión de genes DDR como deoxiuridina trifosfatasa (DUT, del inglés *Deoxyuridine Triphosphatase*), timidilato sintasa (TYMS, del inglés *Thymidylate Synthase*), y tirosina 3-monooxigenasa/proteína de activación gamma triptófano 5-monooxigenasa (YWHAG, del inglés *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Gamma*), y alta expresión de O-6-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT, del inglés *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*), DNA polimerasa eta (POLH), DNA asociado a un sitio de restricción (RAD) 1, y RAD17 presentaron una mayor supervivencia. *Jang et al.* han propuesto una firma de 59 genes del panel “*Nanostring nCounter PanCancer Immune Profiling*”, incluyendo 770 tipos de mRNA. Se caracterizó a aquellos tumores con una pobre respuesta a IPCIs como poseedores de un “MAT malo”, y estaban caracterizados por expresiones bajas de diferentes moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, un número disminuido de células dendríticas asociadas al tumor, células T CD8+, un número aumentado de Tregs, y una ratio baja de macrófagos M1/M2 [179]. En cambio, aquellos tumores con un “buen MAT”, asociados con una buena respuesta a tratamientos anti-PD-1, presentaron una sobrerregulación de PD-L1, PD-L2, CD8A, PD-1, CTLA-4, atenuador de linfocitos B y T (BTLA, del inglés *B and T Lymphocyte Attenuator*), CD40, CD40L, LAG3, TIGIT, TIM3, y VISTA. Este “MAT bueno” también presentó una actividad citológica alta y un aumento de la expresión de la vía de señalización del interferón- γ . Las células B de memoria fueron también abundantes, al contrario que los Tregs.

1.3.5 Microbioma

El **microbioma** es una colección dinámica de organismos comensales que colonizan determinadas localizaciones del cuerpo humano, y que tienen un **impacto en la inmunidad frente al cáncer y la respuesta a los IPCIs (Figura 6)** [180,181]. Las bacterias comensales otorgan protección frente a organismos patogénicos, y regulan la inmunidad

del individuo por medio de una “comunicación” entre las células inmunes y la mucosa a través de receptores de reconocimiento de patrones. El sistema inmune innato es estimulado por el microbioma del sujeto que regula la inflamación local y ayuda a estimular la respuesta inmune adaptativa, aunque el mecanismo exacto por el que un microbioma alterado afecta a la respuesta a los IPCIs no está claro [182].

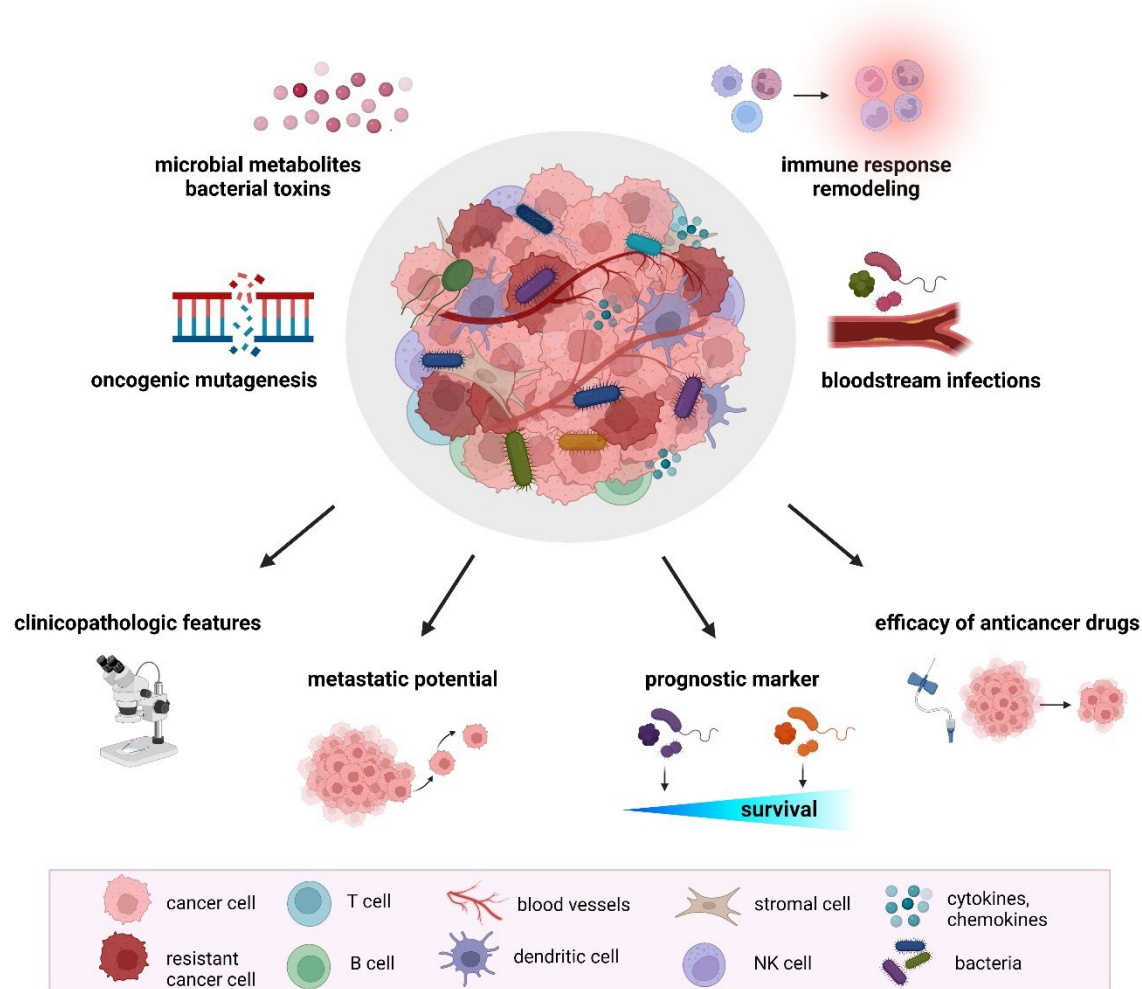


Figura 6. Resumen del potencial como biomarcador del microbioma en la respuesta a IPCI en CPCNP. Adaptado de *Ciernikova et al. Front. Oncol.* [181].

Varios estudios preclínicos en ratones sugieren que el microbioma intestinal juega un papel en la respuesta a IPCIs en tumores sólidos [183,184]. Una diversidad microbiana mayor y valores altos de bacterias “buenas” (eubiosis) están asociados con una mejor respuesta al tratamiento en pacientes con melanoma tratados con inhibidores de PD-1 [185,186]. *Routy et al.* publicaron un estudio clave en 2018 en el que se demostró que pacientes con CPCNP con una mayor diversidad en el microbioma intestinal tenían una respuesta mejorada a tratamientos con IPCIs. *Enterococcus hirae* y *Akkermansia muciniphila* estaban enriquecidos en los respondedores, así como las respuestas de los linfocitos T de memoria frente a *A. muciniphila* o *E. hirae* [187]. Los pacientes con CPCNP tratados con antibióticos conocidos por alterar el microbioma intestinal (disbiosis

intestinal) presentaban una supervivencia reducida tras 3 meses de bloqueo de PD-1. Los resultados de estudios *in vivo* de seguimiento mostraron que un trasplante de microbiota fecal y suplementación oral con *A. muciniphila* superó la resistencia inducida por antibióticos al bloqueo de PD-1 en ratones [187]. Se han realizado pequeños ensayos fase I en pacientes con melanoma donde se ha objetivado que existe cierto beneficio al realizar trasplante de microbioma fecal con el fin de superar la resistencia a IPCIs [188,189]; este abordaje está iniciándose también en CPCNP [190]. Otros estudios han demostrado diferencias en el microbioma intestinal entre respondedores a IPCIs y no-respondedores en CPCNP, asociando la presencia de *Firmicutes* y una diversidad microbiana mayor con mejores resultados en el tratamiento con IPCIs [191]. En 37 pacientes chinos con CPCNP avanzado tratados con nivolumab como parte de los estudios CheckMate-078 y CheckMate-870, se objetivó una mSLP más larga en pacientes con una mayor diversidad en el microbioma intestinal. También hubo diferencias en la composición del microbioma intestinal entre pacientes respondedores y no-respondedores. En este estudio, un tratamiento antibiótico previo no afectó al resultado, pero la cohorte fue de pequeño tamaño. También se asoció una elevada diversidad en el microbioma con un aumento en firmas de células T CD8+ de memoria y NK al medir sangre periférica por citometría de flujo [191].

La mayoría de estudios sobre el microbioma en cáncer de pulmón se han centrado en el microbioma intestinal; sin embargo, modelos preclínicos con ratones han demostrado que el microbioma del tracto respiratorio inferior también afecta a la inmunidad local y podría ser más predictivo que el microbioma intestinal en pacientes tratados con IPCIs en cáncer de pulmón [192–194]. Curiosamente, la modulación del microbioma por antibióticos por vía inhalada podría mejorar la inmunidad frente a metástasis pulmonares en pacientes con melanoma [195]. Varios estudios se han enfocado en la diversidad y abundancia del microbioma bacteriano usando secuenciación de escopeta metagenómica, secuenciación de genes de RNA ribosomal 16S, y reacciones en cadena de la polimerasa para seleccionar bacterias en las deposiciones o en las muestras del tracto respiratorio [185,187]. Sin embargo, aún no se ha determinado el método óptimo para evaluar el microbioma intestinal (o respiratorio), y el impacto potencial de factores intrínsecos y extrínsecos como el tabaquismo, la dieta, la raza, los antibióticos, u otras exposiciones ambientales es poco conocido. Además, aparte de las bacterias, existen hongos comensales, virus, y protozoos que son componentes claves del microbioma humano, y que juegan un rol importante en la inmunovigilancia tumoral [196,197].

Dado que una mayor diversidad del microbioma afecta la respuesta inmune antitumoral, estando asociado con una respuesta favorable a IPCIs [185–187], el microbioma intestinal y pulmonar podrían ser biomarcadores potenciales de respuesta a IPCIs, y su modulación podría mejorar la respuesta a los IPCIs. Se requieren más estudios para aumentar nuestro conocimiento de la compleja interacción entre el cáncer, el

microbioma, y la inmunidad, así como del juego que existe entre la ecología microbiana y la inmunidad del sujeto para determinar si el microbioma puede ser un biomarcador útil.

1.4 Características basales de los pacientes como biomarcadores de respuesta

Independientemente de los biomarcadores tumorales, de forma reciente se ha visto que existen **factores biológicos intrínsecos a la persona que podrían influir en la respuesta a los IPCIs** [198–201]. Dos de los principales factores mencionados serían el **sexo**, dadas las diferencias intrínsecas en el sistema inmunológico de hombres y mujeres (**Figura 7**), y la **edad avanzada** por el fenómeno de inmunosenescencia.

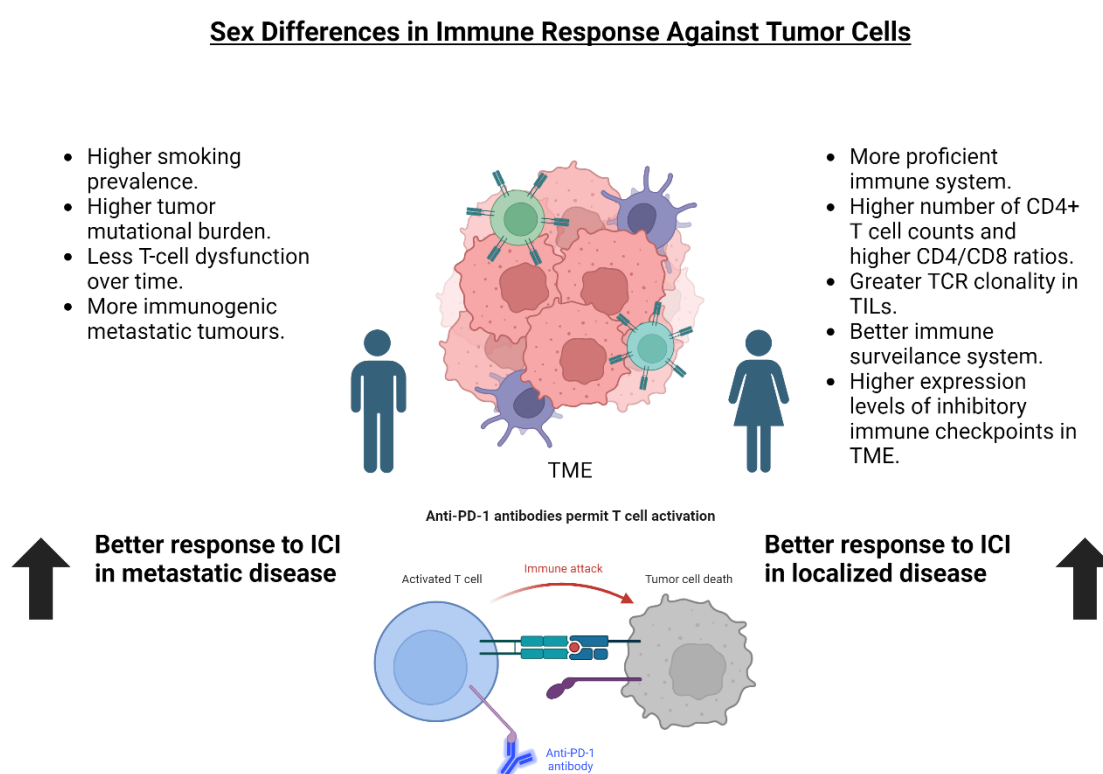


Figura 7. Resumen de las principales diferencias entre hombres y mujeres en el sistema inmunológico y la respuesta a células de CPCNP. Imagen propia (Suay G *et al.* 2023 [201]).

Con respecto al **sexo**, se ha observado una tendencia en enfermedad metastásica a que los hombres respondan mejor a IPCIs en monoterapia que las mujeres. Esto podría ser consecuencia de que los hombres tienen una mayor prevalencia de consumo de tabaco y que consecuentemente presenten una TMB mayor, una menor disfunción de linfocitos T a lo largo del tiempo, y los tumores metastásicos sean más inmunogénicos. Por otro lado, las mujeres presentan un sistema inmunológico más eficiente, un mayor número de linfocitos T CD4+ y ratios mayores de linfocitos CD4/CD8, mayor clonalidad en los TILs, un mejor sistema de vigilancia inmunológica, y mayores niveles de expresión de puntos de control inmunitarios en el MAT [198,201]. Estos factores han llevado a plantear

que en enfermedad localizada los IPCIs puedan funcionar mejor en mujeres que en hombres, y que en enfermedad metastásica los IPCIs puedan funcionar mejor en hombres que en mujeres.

En cuanto a los **cambios del sistema inmunitario inducidos por la edad**, se ha constatado que pacientes de edad avanzada presenta una mayor proporción de linfocitos T exhaustos, una menor actividad de las células NK, e inflamación crónica, lo que contribuye a una peor respuesta teórica en pacientes de edad avanzada [200,202,203]. Sin embargo, en los últimos años el concepto de edad avanzada a nivel cronológico se está sustituyendo por el concepto de edad avanzada biológica [203], puesto que hay pacientes con una edad cronológica avanzada que a nivel biológico mantendrían un edad muy inferior, y viceversa. En este contexto, existe controversia con respecto a si puede ser un factor deletéreo o no, y donde marcar el punto de corte para indicar qué pacientes presentan una edad avanzada. En los ensayos clínicos aprobatorios los datos son conflictivos, esta población está infrarrepresentada, y hay dudas acerca de que abordaje sería el óptimo [9,35–38,41,42]. Por todo ello, sería necesario hacer estudios prospectivos que incluyan o se centren en esta población de pacientes con el fin de conocer el mejor abordaje.

1.5 Recuento celular en biopsia líquida como biomarcador de respuesta a IPCIs

Como se ha comentado anteriormente, uno de los biomarcadores que más se está estudiando con el fin de mejorar la capacidad de predicción de la respuesta a IPCIs en CPCNP es el **recuento celular en biopsias líquidas de sangre periférica**. En los últimos años se han publicado múltiples estudios que han buscado explorar esta vía con ciertas limitaciones (**Figura 8**) [204–213].

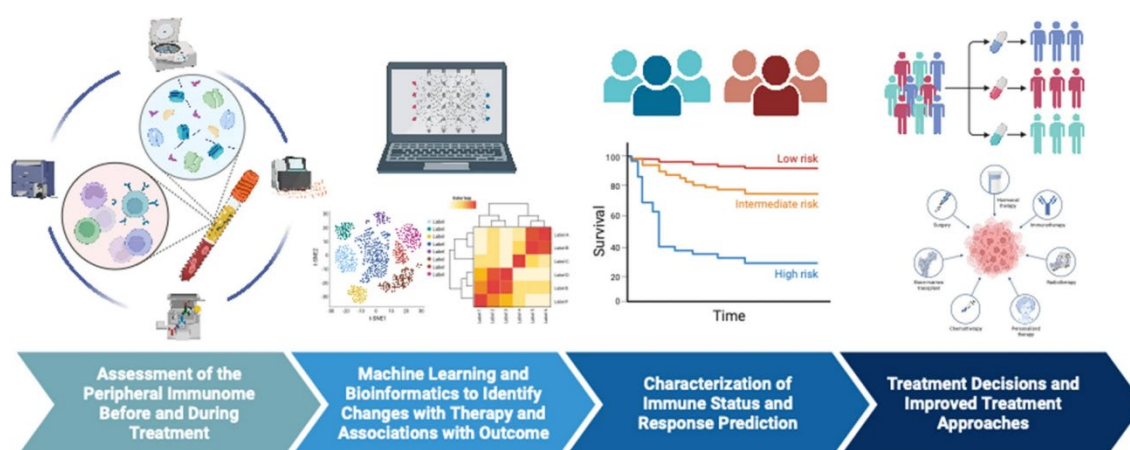


Figura 8. Beneficios potenciales del recuento celular en sangre periférica como biomarcador de respuesta a IPCIs en CPCNP. Adaptado de Tsai et al. *J Exp Clin Cancer Res.* [211].

Mezquita et al. proponen el uso del índice pronóstico inmune del pulmón (LIPI, del inglés *Lung Immune Prognostic Index*), basado en el índice neutrófilos/leucocitos derivado (dNLR, del inglés *derived Neutrophil/Leukocyte ratio*), y los niveles de lactato deshidrogenasa [212]. Este índice fue capaz de distinguir en una cohorte de pacientes si se beneficiarían o no del uso de IPCIs en monoterapia o quimioterapia en el escenario de primera línea de aCPCNP. *Lenci et al.* proponen el uso del índice inmunológico Gustave Roussy (GRIm, del inglés *Gustave Roussy Immune Score*), basado en el índice neutrófilo/linfocito (NLR, del inglés *Neutrophil-to-lymphocyte ratio*), la concentración de albúmina en suero, y lactato deshidrogenasa [213]. Este modelo demostró ser capaz de predecir aquellos pacientes que se beneficiaban más de recibir IPCIs en monoterapia, y aquellos que se beneficiarían más del uso de quimioterapia convencional.

Mazzaschi et al. recogieron muestras de sangre periférica de 31 pacientes con aCPCNP tratados con nivolumab [207]. Un 71% de los pacientes se trataron en 2ª línea, un 19% en 3ª línea, y 10% en un número de línea mayor. En este estudio se observó que un 54% de los pacientes presentaba mutaciones en KRAS, y un 55% de los pacientes presentaba histología escamosa. Se recogió una muestra de sangre periférica antes de la primera semana de tratamiento, a la tercera semana de tratamiento, y tras la quinta semana de tratamiento. Se observó que aquellos pacientes con mutaciones en KRAS, con tabaquismo activo, y con tratamiento de corticoides presentaban una distribución de fenotipos circulantes diferentes. De base, el grupo que obtuvo beneficio clínico (61,3% de los pacientes) mostró un número más alto de células NK fenotípicamente activas PD-1+CD8+ ($p<0,01$) comparado con los no-respondedores (definido como aquellos pacientes que progresan en un periodo inferior a 6 meses tras el inicio del tratamiento). A nivel de tejido, una baja expresión de PD-1 en TILs CD8+ fue una característica de pronóstico favorable ($p<0,01$). La combinación de las células circulantes CD8+PD-1+ y NK, junto con una ratio disminuida PD-1/CD8+ en los TILs definió un subgrupo de pacientes que presentaron una mSLP significativamente prolongada (2 meses frente a no alcanzado; HR: 9.931 $p<0,01$). A pesar de los resultados favorables, plantearon que como limitación del estudio el bajo número de pacientes y la ausencia de cohorte de validación.

Cho et al. analizaron el potencial de las células NK para predecir la eficacia de IPCIs usados en pacientes con aCPCNP [204]. El objetivo primario del estudio fue descubrir biomarcadores relacionados con una respuesta temprana a los IPCIs analizando por citometría de flujo poblaciones inmunes en sangre periférica, incluyendo células NK, CD8+, CD4+, Tregs, células B, monocitos, células dendríticas, y granulocitos. Se reclutaron un total de 18 pacientes, de los que solo 9 completaron los procedimientos del estudio, entre octubre de 2018 y mayo de 2019. 5 pacientes presentaron histología escamosa, 6 pacientes recibieron pembrolizumab mientras que 3 recibieron nivolumab; 5 pacientes no respondieron al tratamiento (55,5%), mientras que 4 pacientes presentaron enfermedad estable o respuesta parcial (44,5%). La expresión tumoral de PD-L1 no fue estadísticamente significativa con respecto a la respuesta tumoral, y el resto de las

características basales fueron similares entre el grupo de respondedores y no respondedores. Al analizar las poblaciones celulares, solo las NK dentro del porcentaje del global de las células mononucleares de sangre periférica (PBMcs) se mostraron más elevadas en el grupo respondedor (33,46%) frente al no respondedor (11,23%) de forma estadísticamente significativa. El resto de las poblaciones celulares no mostraron diferencias. Como principal limitación del estudio indicaron el pequeño tamaño muestral.

El grupo de *Choi et al.* también analizaron el papel de las células NK para predecir la eficacia de los IPCIs en aCPCNP [209]. En este estudio, de forma prospectiva, se obtuvo una muestra de sangre previo al inicio de los IPCIs y 6 semanas después. Se buscó analizar con el cálculo de la concentración de interferón- γ como marcador subrogado de las células NK, la actividad de dichas células a nivel basal y asociarlo con la respuesta clínica a los IPCIs. Se reclutó un total de 34 pacientes, de los que el 38,2% presentaban histología escamosa, un 32,4% no había fumado nunca, y la expresión tumoral de PD-L1 estaba balanceada. Un 61,8% de los pacientes había recibido una línea previa, el 17,6% dos líneas previas, y un 20,6% de pacientes recibió tres o más líneas previo a la entrada en el estudio; un 20,6% de pacientes presentaba una mutación en EGFR, y en el 32,4% de pacientes dicha mutación no se determinó. La actividad basal de los NK estaba aumentada de forma significativa en el grupo de pacientes que su mejor respuesta no fue progresión de enfermedad ($p=0,002$). Con un punto de corte de interferón- γ de 1200 pg/mL, la sensibilidad y la especificidad para predecir la respuesta a los IPCIs fue del 80% y el 68,4% respectivamente ($AUC=0,8$; $p<0,003$). La mSLP fue estadísticamente superior en pacientes con NK altos ($p=0,003$), y se confirmó la correlación entre la actividad basal de NK y la SLP ($r=0,517$; $p=0,002$). Como limitaciones al estudio plantean el pequeño tamaño muestral, y la ausencia de datos de mSG.

Miao et al. plantearon un estudio para analizar subgrupos de linfocitos en sangre periférica que pudieran predecir la eficacia de los IPCIs en aCPCNP [206]. Para ello, analizaron de forma retrospectiva la asociación entre los niveles de linfocitos en sangre periférica y la supervivencia en 136 pacientes tratados con IPCIs. Un 44,9% de pacientes presentaron un tumor escamoso, un 38,2% de los pacientes eran no fumadores, y el 52% llevaron el IPCI en una primera línea de tratamiento, mientras que el 34,6% en segunda línea y el 13,2% en tercera línea o posteriores. Para explorar la relación entre niveles de linfocitos basales y la eficacia de IPCIs, los pacientes se dividieron en 2 grupos basados en el beneficio de supervivencia; un primer grupo en el que la SLP es de <6 meses frente a un segundo grupo en el que la SLP es ≥ 6 meses. Los dos factores que tuvieron el mayor impacto en el pronóstico fueron las células T CD4+CD45RA- ($HR=0,644$, $p=0,047$), y el porcentaje de linfocitos T CD8+/linfocitos totales ($HR=1,806$, $p=0,015$). Las células T CD4+CD45RA- mostraron una excelente eficacia predictora ($AUC=0,854$) para IPCIs en monoterapia, con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 91,7% usando el punto de corte de células T CD4+CD45RA- $>311,3 \times 10^6/L$. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos T CD8+/porcentaje de linfocitos totales se asoció con el pronóstico, pero no se observó un

papel predictivo para valorar la eficacia de los IPCIs. Como principales limitaciones al estudio refieren que este se realizó de forma retrospectiva, la información básica de los pacientes no fue cotejada de forma adecuada, que se observó una relación entre subgrupos de linfocitos T y el número de líneas de tratamiento (por lo que podría existir una influencia de la heterogeneidad del número de líneas), que el subgrupo de IPCIs en monoterapia solo tenía 32 pacientes, y la ausencia de datos de SG (solo pudieron usarse de SLP).

Yamaguchi et al. publicaron un estudio en el que buscaron validar en pacientes con aCPCNP que iban a recibir pembrolizumab en monoterapia una fórmula de predicción de respuesta a IPCIs basada en porcentajes de células T CD4+ CD62low y Tregs [210]. Esta fórmula se describió en un artículo propio del mismo grupo [214]. Con este fin, se reclutaron 59 pacientes de forma consecutiva en Japón de los cuales se excluyeron 8 pacientes porque su SLP no fue evaluable. Los pacientes recibieron una dosis de pembrolizumab cada 3 semanas, y se les calculó un índice denominado “*K-index*”, en el que se realizó el logaritmo de las células CD62 low al cuadrado dividido entre las células CD25+FOXP3+ en la población total de células T CD4+. De los 59 pacientes reclutados de forma original, todos mostraron expresión positiva de PD-L1 en tumor, y 57 pacientes presentaban una expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$. Un 27,1% de los pacientes presentó histología escamosa, y un 11,9% de pacientes era nunca fumador. La mSLP global de la cohorte fue de 206 días, con una SLP a 12 meses del 37,1%. Al tener en cuenta el “*K-index*”, aquellos pacientes con un resultado ≥ 192 (HR=0,417; p=0,0069) presentaron una mSLP de 363 días, frente a una mSLP de 122,5 días en el grupo con valores inferiores. La mSG también fue mejor de forma significativa en aquellos pacientes con una puntuación ≥ 192 (no alcanzada frente a 324 días; HR=0,42; p=0,0187). Como principal sesgo reportan el hecho de que en la descripción original de la fórmula se basan en porcentajes de PBMCs, mientras que en el “*K-index*” se basa en una tinción con 4 tipos de anticuerpos diferentes; aunque la correlación es buena (coeficiente de variación <10%), se requiere de una validación.

En relación con las células NK, el grupo de *Gascón-Ruiz et al.* analizaron el papel de estas células para tratar de identificar pacientes que muestren una buena respuesta a IPCIs [208]. Con este fin, realizaron un estudio prospectivo en el que se obtuvieron muestras basales de sangre periférica de pacientes con CPCNP localmente avanzado o metastásico que iban a recibir un tratamiento basado en IPCIs. Se reclutaron un total de 55 pacientes, de los que el 40% presentaron histología escamosa, un 3,60% fueron nunca fumadores, y la expresión tumoral de PD-L1 estaba balanceada. Un 25,50% de pacientes recibieron IPCIs en estadio localmente avanzado (pero tratado con fin radical), un 32,70% en primera línea de enfermedad avanzada, y un 41,80% en segunda línea o sucesivas. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en las células NK CD56+CD3-CD16- y una mayor mSG (p=0,047). Como principales limitaciones del estudio plantean el bajo tamaño muestral, ya que otras poblaciones de NK quedaron

al límite del umbral para ser consideradas estadísticamente significativas; y la heterogeneidad de la cohorte, particularmente el hecho de que se incluyeron pacientes que recibieron IPCIs en el contexto de un tratamiento radical.

Otro abordaje que plantearon *Arasanz et al.* fue la búsqueda de pacientes con hiperprogresión, definida como una aceleración del crecimiento tumoral tras el uso de IPCIs, en pacientes con aCPCNP por medio de la monitorización de las dinámicas en las células T [205]. Se reclutaron un total de 70 pacientes, de los que solo el 27,1% presentaron un tumor de histología escamosa; atezolizumab fue el tratamiento más usado (47,1%), seguido de nivolumab (40%), y pembrolizumab (12,9%). La mayoría de los pacientes habían recibido al menos una línea de tratamiento para enfermedad avanzada (71,4%), un 22,9% recibieron el IPCI en tercera línea, y un 5,7% en cuarta línea. Se aislaron PBMCs, de las que se cuantificó los linfocitos CD4+ por medio de citometría de flujo. La incidencia de hiperprogresión en la cohorte fue del 17.9%; entre el primer y segundo ciclo se observó una fuerte expansión de linfocitos T CD4+ CD28- en los pacientes hiperprogresores al compararlos con los respondedores (proporción media de 1,52 comparando pre y post-tratamiento; $p=0,0007$). Como principales limitaciones refieren que el estudio presenta un bajo número de pacientes, y es de naturaleza exploratoria, requiriendo una validación futura.

En global, todos estos estudios muestran el papel que puede tener la **sangre periférica como muestra mínimamente invasiva con el que conseguir información acerca de la eficacia de los IPCIs en pacientes con aCPCNP**. Sin embargo, los estudios llevados a cabo hasta el momento presentan algunas debilidades como: baja replicabilidad de los métodos, heterogeneidad de las poblaciones (estando en la mayoría de los estudios poblaciones en distintas líneas de tratamiento; incluso con tumores susceptibles de tratamiento radical), complejidad de las técnicas a realizar (no aplicables a la práctica clínica habitual), y bajo tamaño muestral utilizado. Por tanto, es necesario el desarrollo de estudios homogéneos con un mayor tamaño muestral, y con técnicas que sean aplicables en el entorno clínico, con el fin de establecer un biomarcador óptimo.

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La hipótesis de este estudio se basa en las siguientes premisas:

1. A pesar de que los IPCIs han revolucionado el tratamiento del CPCNP, especialmente en aquellos pacientes sin mutaciones accionables, **no existen biomarcadores** que ayuden a definir qué pacientes pueden beneficiarse en mayor o menor medida de estos tratamientos.
2. Actualmente la **expresión tumoral de PD-L1 constituye el biomarcador más ampliamente utilizado** en clínica, aunque presenta importantes limitaciones.
3. Existe por tanto la **necesidad de disponer de nuevos biomarcadores** que ayuden a definir de forma óptima qué pacientes mostrarán beneficio clínico mediante el uso de IPCIs tanto en monoterapia como en combinación con quimioterapia.
4. Las **poblaciones celulares circulantes son un reflejo del estado inmunológico** del paciente y por tanto podrían ser marcadores de respuesta al tratamiento con IPCIs en monoterapia o combinados con quimioterapia. Además, su determinación consistiría en un procedimiento mínimamente invasivo y totalmente adaptable a la rutina clínica.

En base a estas premisas, **nuestra hipótesis sostiene** que la expresión de PD-L1 como biomarcador en la práctica clínica habitual es insuficiente, y que **los niveles de ciertas poblaciones celulares circulantes** especialmente aquellas relacionadas con la respuesta inmunológica, **podrían estar relacionadas con la respuesta al tratamiento con IPCIs** en monoterapia o en combinación con quimioterapia. Para ello planteamos los siguientes objetivos:

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos primarios

1. **Evaluar la asociación entre los niveles basales de determinadas poblaciones celulares** (CD4+, CD8+, Tregs, NK y monocitos) determinados en sangre periférica **y variables clínicas** como la SLP y la SG en el tratamiento en 1ª línea de pacientes con aCPCNP (irreseccable o no abordable por radioterapia radical) con IPCIs en monoterapia o en combinación.
2. Desarrollar un **modelo matemático** que en base a las poblaciones seleccionadas en el objetivo 1 permita **la evaluación personalizada y continua** de la respuesta a IPCIs en el en el tratamiento de 1ª línea de pacientes con aCPCNP
3. **Desarrollar nomogramas y una aplicación web** que permitan el uso ágil y sencillo del modelo desarrollado y por tanto facilite su implantación clínica.
4. **Analizar en pacientes con aCPCNP, que han recibido un IPCI en 1ª línea de tratamiento en un centro de referencia**, la relación entre expresión tumoral de PD-L1 y mSG y mSLP.

2.2.2 Objetivos secundarios

1. **Analizar variables basales secundarias de datos de vida real** (situación funcional, edad, presencia de metástasis cerebrales...), y su posible asociación con la mSLP y mSG de los pacientes con aCPCNP tratados con IPCIs en 1ª línea de tratamiento, con el fin de **sugerir nuevas hipótesis y posibles estudios futuros**.
2. **Analizar y comparar la mSLP y mSG** de las cohortes de los **ensayos clínicos aprobatorios** de IPCIs en 1ª línea de tratamiento de aCPCNP **con datos de vida real** de un centro de referencia.

3 Material y métodos

3.1 Diseño del estudio

En este trabajo se han utilizado dos cohortes de pacientes:

1. **Cohorte A:** Se realizó un **estudio observacional prospectivo multicéntrico** sobre **162 pacientes con aCPCNP candidatos a recibir en 1ª línea de tratamiento un IPCI** en monoterapia (Cohorte A1; n = 86), o en combinación con quimioterapia (Cohorte A2; n = 76). Esta división de la cohorte en pacientes con IPCI en monoterapia y pacientes que han recibido IPCIs en combinación con quimioterapia se basa en el precepto de que esperamos cambios a nivel celular influidos por el efecto citotóxico de la quimioterapia. También cabría esperar posibles efectos sinérgicos a nivel de los IPCIs con la quimioterapia dada la posibilidad de cambios metabólicos en los linfocitos T y de renovación del pool celular, sumado a la posible generación de neoantígenos [113]. Se trata de un estudio de carácter traslacional en el que se ha obtenido una muestra de sangre periférica basal, así como datos anonimizados de variables basales. Este parte del estudio se ha desarrollado en los servicios de Oncología Médica de dos hospitales públicos de la Comunidad Valenciana con la colaboración del Grupo de Investigación y Divulgación en Oncología (GIDO): Hospital Arnau de Vilanova de Valencia y Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. El análisis de las muestras se ha llevado a cabo en los laboratorios de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión (UBMP) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.
2. **Cohorte B:** Se obtuvieron **datos anonimizados de forma retrospectiva en una cohorte de 247 pacientes con aCPCNP candidatos a recibir una 1ª línea de tratamiento con un IPCI** (ya sea en monoterapia o en combinación con otros fármacos). Todos los pacientes fueron reclutados del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia entre octubre de 2021 y diciembre de 2023, incluyendo pacientes que recibieron dicho IPCI desde enero de 2018 a diciembre de 2023 (dado que los datos estaban completamente anonimizados, la resolución del comité de ética permitió que aquellos pacientes que hubieran fallecido se recogiera la información de la historia clínica sin necesidad de firmar el consentimiento informado). No se realizó ningún procedimiento asistencial, ni implicó ningún cambio para la práctica clínica habitual de los pacientes.

3.2 Población del estudio

La población incluida en este estudio está conformada por pacientes que presentan el **diagnóstico de aCPCNP, definido como aquel que no es abordable de forma radical por cirugía o por la combinación de quimioterapia y radioterapia radical**. Este grupo comprende generalmente pacientes con estadio III no abordable de forma radical o estadio IV de acuerdo con la clasificación TNM 8ª edición del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, del inglés *American Joint Committee on Cancer*) [215], aunque se pueden incluir pacientes con estadio III que han fracasado al tratamiento previo de cirugía y/o

quimioterapia con radioterapia radical. Todos los pacientes incluidos han recibido IPCIs, ya sea en monoterapia o en combinación con otros IPCIs, quimioterapia, o anti-VEGF.

1. En la cohorte observacional de datos de vida real si incluyeron todos los pacientes con aCPCNP que habían recibido en 1ª línea de tratamiento IPCIs. En este caso los procedimientos se realizaron de forma retrospectiva, de forma anonimizada y sin impactar en los pacientes.
2. En la cohorte prospectiva de análisis de biomarcadores en sangre periférica se incluyeron los pacientes con aCPCNP que eran candidatos a recibir un IPCI en 1ª línea de tratamiento.

3.2.1 Criterios de inclusión de la cohorte prospectiva de búsqueda de biomarcadores (Cohorte A):

1. Firma de consentimiento informado por escrito con el fin de participar en el estudio, previo a la inclusión en el mismo y con el que se autoriza a la extracción de las muestras de sangre periférica.
2. Edad ≥ 18 años.
3. Situación funcional adecuada para el tratamiento con IPCIs: ECOG 0-2.
4. Diagnóstico de aCPCNP irresecable, y no candidato a tratamiento con quimioterapia y radioterapia radical, documentado histológica o citológicamente.
5. Pacientes candidatos a recibir un IPCI en primera línea de tratamiento, sea en monoterapia (fármacos anti-PD-(L)-1 como nivolumab, pembrolizumab, o atezolizumab), o en combinación con quimioterapia (doblete de platino), con otros IPCIs (fármacos anti-CTLA-4), o con anti-VEGF.
6. Pacientes que no hayan recibido un tratamiento oncológico previo:
 - a. Se admite haber recibido tratamiento adyuvante con IPCIs si hace >6 meses desde finalización de dicho tratamiento.
 - b. Se admite haber recibido tratamiento con IPCIs tras quimioterapia con radioterapia radical (esquema PACIFIC [216]) en caso de progresión >6 meses desde finalización de dicho tratamiento.
7. Pacientes en los que se pueda obtener muestras de sangre periférica sin inconvenientes técnicos o que supongan un trastorno para el paciente.
8. Ninguna contraindicación para recibir IPCIs (por ejemplo, la detección de mutaciones accionables con tratamiento de elección financiado en 1ª línea de tratamiento como EGFR, ALK, o ROS1).

3.2.2 Criterios de inclusión de la cohorte observacional (Cohorte B):

1. Firma de consentimiento informado por escrito, el cual debía obtenerse previo a la recolección de los datos de la historia clínica.
2. Edad ≥ 18 años.
3. Diagnóstico de aCPCNP irresecable, y no candidato a tratamiento con quimioterapia y radioterapia radical, documentado histológica o citológicamente.

4. Pacientes que han recibido entre enero de 2018 y diciembre de 2023 un IPCI en primera línea de tratamiento, sea en monoterapia (fármacos anti-PD-(L)-1 como nivolumab, pembrolizumab, o atezolizumab), o en combinación con quimioterapia (doblete de platino), con otros IPCIs (fármacos anti-CTLA-4), o con anti-VEGF.
5. Ninguna contraindicación para recibir IPCIs (por ejemplo, la detección de mutaciones accionables con tratamiento de elección financiado en 1ª línea de tratamiento como EGFR, ALK, o ROS1).

3.3 Cálculo de tamaño muestral

Se ha estimado (Tabla 1) un tamaño muestral de 75 pacientes para las cohortes de IPCIs en monoterapia e IPCIs en combinación. El cálculo se ha realizado por medio de RStudio 2023.12.1 con el paquete “pwr” y el método de “arcsine transformation”.

Para las cohortes de IPCIs en monoterapia tomamos de referencia el estudio IMpower110 (aCPCNP con múltiples expresiones de PD-L1 a nivel tumoral tratado con atezolizumab en monoterapia). En este estudio el HR para SLP fue de 0,61 (Intervalo de confianza [IC] 95% 0,46-0,82) en pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$ medido por el anticuerpo 22C3, mientras que el HR fue de 1 (IC 95%: 0,69 a 1,46) para SLP en aquellos pacientes con una expresión tumoral entre 1 y 49% medido por el anticuerpo 22C3. Asumiendo el tamaño del efecto calculado, aceptando una tasa de error alfa del 10%, y buscando una potencia del 80%, un total de 35 pacientes por grupo serían capaces de predecir un tamaño del efecto de 0,67; esto sería congruente con que el nuevo biomarcador detectado fuera superior a la expresión tumoral de PD-L1.

Para la cohorte de IPCIs en combinación con quimioterapia tomamos de referencia el estudio KEYNOTE-189; aquellos pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 medida por anticuerpo 22C3 $\geq 50\%$ presentaron un HR de 0,35 (IC 95%: 0,25 a 0,49), mientras que aquellos pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 medida por anticuerpo 22C3 negativa (<1%) presentaron un HR de 0,67 (IC 95%: 0,49 a 0,92). Asumiendo el tamaño del efecto calculado, aceptando una tasa de error alfa del 10%, y buscando una potencia del 80%, un total de 35 pacientes serían capaces de predecir un tamaño del efecto de 0,67; esto sería congruente con que el nuevo biomarcador detectado fuera superior a la expresión tumoral de PD-L1.

Tabla 1. Capacidad de predicción del tamaño del efecto.

Biomarcador presente	Biomarcador ausente	Capacidad de predicción del tamaño del efecto (1)
N = 20	N = 50	0,74
N = 35	N = 35	0,67

(1) Cálculo de la capacidad de predicción del tamaño del efecto en función de diferentes tamaños muestrales estimados de cohortes, buscando una potencia del 80%.

3.4 Plan terapéutico

3.4.1 Plan terapéutico de la cohorte A

Los pacientes se trataron con IPCIs aprobados en el sistema nacional de salud de España: anti-PD-(L)1 en monoterapia; anti-PD-1 combinado con quimioterapia; anti-PD-(L)1 combinado con anti-CTLA-4 y quimioterapia; anti-PD-L1 combinado con quimioterapia y anti-VEGF. No se incluyeron pacientes tratados con cemiplimab dado que el fármaco no estaba aún comercializado en España para CPCNP. Todo ello se realizó de acuerdo con la ficha técnica:

- IPCIs en monoterapia (histología escamosa/no escamosa):
 - Atezolizumab 1200 mg iv D1 en ciclos de 21 días hasta toxicidad inaceptable o progresión.
 - Pembrolizumab a dosis de 200 mg iv D1 en ciclos de 21 días hasta toxicidad inaceptable, progresión, o 35 ciclos.
- IPCIs en combinación (histología no escamosa):
 - Cisplatino 75 mg/m² o Carboplatino AUC 5 mg/ml/min, pemetrexed 500 mg/m², y pembrolizumab 200 mg D1 en ciclos de 21 días hasta 4 ciclos. Posteriormente mantenimiento con pemetrexed 500 mg/m² y pembrolizumab 200 mg D1 en ciclos de 21 días hasta progresión, toxicidad inaceptable, o 35 ciclos.
 - Cisplatino 75 mg/m² o Carboplatino AUC 5 mg/ml/min, pemetrexed 500 mg/m², nivolumab 360 mg D1 en ciclos de 21 días 2 ciclos; se añade ipilimumab 1 mg/kg D1 en ciclos de 42 días. Posteriormente mantenimiento con nivolumab 360 mg D1 en ciclos de 21 días, e ipilimumab 1 mg/kg D1 en ciclos de 42 días; se mantendrá hasta progresión, toxicidad inaceptable, o 2 años de tratamiento.
 - Carboplatino AUC de 6 mg/ml/min, paclitaxel 200 mg/m², bevacizumab 15 mg/kg, atezolizumab 1200 mg D1 en ciclos de 21 días hasta 4 ciclos. Posteriormente mantenimiento con paclitaxel 200 mg/m², bevacizumab 15 mg/kg D1 en ciclos de 21 días hasta progresión o toxicidad inaceptable.
- IPCIs en combinación (histología escamosa):
 - Carboplatino AUC 6 mg/ml/min, paclitaxel 200 mg/m², pembrolizumab 200 mg D1 en ciclos de 21 días hasta 4 ciclos. Posteriormente mantenimiento con pembrolizumab 200 mg D1 en ciclos de 21 días hasta progresión, toxicidad inaceptable, o 35 ciclos.
 - Carboplatino AUC 6 mg/ml/min, paclitaxel 200 mg/m², nivolumab 360 mg D1 en ciclos de 21 días 2 ciclos; se añade ipilimumab 1 mg/kg D1 en ciclos de 42 días. Posteriormente mantenimiento con nivolumab 360 mg D1 en ciclos de 21 días, e ipilimumab 1 mg/kg D1 en ciclos de 42 días; se mantendrá hasta progresión, toxicidad inaceptable, o 2 años de tratamiento.

Las modificaciones de dosis, la administración del fármaco, el retraso del tratamiento, y el manejo de las toxicidades asociadas inmunorrelacionadas y no inmunorrelacionadas se realizaron de acuerdo a las especificaciones de la ficha técnica del producto y práctica clínica habitual.

3.4.2 Plan terapéutico de la cohorte B

Los pacientes siguieron procedimientos asistenciales de acuerdo con práctica clínica habitual, y sin realizar ninguna modificación consecuencia de este estudio.

3.5 Procedimientos clínicos del estudio

3.5.1 Procedimientos cohorte A (Tabla 2)

Tabla 2. Procedimientos del estudio en cohorte A.

Día	Basal	Visitas de tratamiento	Discontinuación tratamiento	Seguimiento
Consentimiento informado	X			
Criterios de selección	X			
Datos demográficos e historia clínica	X			X
ECOG	X		X	
Variables de laboratorio	X			
Dosis anti-PD-1/PD-L1		X		
Dosis de fármacos en combinación		X		
Muestra de sangre periférica	X			
Evaluación de respuesta (1)	X		X	
Supervivencia				X

(2) La evaluación de respuesta se valora en las evaluaciones por práctica clínica cada 8-12 semanas, obteniendo datos de la mejor respuesta alcanzada.

3.5.2 Procedimientos cohorte B (Tabla 3)

Tabla 3. Procedimientos del estudio en cohorte B.

Día	Basal	Visitas de tratamiento	Discontinuación tratamiento	Seguimiento
Consentimiento informado				X
Criterios de selección				X
Datos demográficos e historia clínica				X
Dosis anti-PD-1/PD-L1		X		X
Dosis de fármacos en combinación		X		X
Evaluación de respuesta (1)	X		X	
Supervivencia				X

- (1) La evaluación de respuesta se valora en las evaluaciones por práctica clínica cada 8-12 semanas, obteniendo datos de la mejor respuesta alcanzada.

3.5.3 Variables clínicas recogidas

Se recogieron las siguientes variables a partir de la historia clínica electrónica de los pacientes de forma basal:

- Variables demográficas y clínicas del paciente: Sexo, edad en el inicio del tratamiento, hábito tabáquico, ECOG, número de comorbilidades asociadas (obtenidas a partir del índice de comorbilidad de Charlson [217,218]), medicación concomitante.
- Variables oncológicas del paciente: Histología tumoral, expresión tumoral de PD-L1, fecha de diagnóstico, presencia de metástasis cerebrales, estadio, mutaciones asociadas, quimioterapia basada en pemetrexed en esquemas de combinación, mejor respuesta al tratamiento con IPCIs.
- Análisis de sangre (solo cohorte A): Recuento de leucocitos totales, monocitos, linfocitos Treg, CD4, CD8, NK, y plaquetas.
- Pruebas radiológicas: Realización de una tomografía axial computerizada (TAC) que incluyera tórax y abdomen. Como alternativa, la tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés *Positron Emission Tomography*) era apta.

Se recogieron las siguientes variables a partir de la historia clínica electrónica de los pacientes tras el inicio/finalización del tratamiento:

- Número de ciclos recibidos, fecha de inicio, y fecha de finalización.

- Línea de tratamiento sucesiva administradas tras progresión/toxicidad por IPCIs.
- Toxicidad inmunorrelacionada asociada al tratamiento.

Todos los pacientes se sometieron a evaluaciones de respuesta al tratamiento con TAC o PET-TAC 8-12 semanas tras el inicio del tratamiento con IPCIs. Se recogieron las siguientes variables:

- Mejor respuesta alcanzada por *Response evaluation criteria in solid tumors* (RECIST) 1.1 [219], estableciéndose como “Respuesta completa” (RC), “Respuesta parcial” (RP), “Enfermedad estable” (EE), o “Progresión de enfermedad” (PE). En el caso de un rápido deterioro sin una causa externa adicional al tumor que lo justificara, se consideró que el paciente se encontraba en progresión de enfermedad.
- Fecha de la progresión de enfermedad de acuerdo con criterios RECIST 1.1, o de interrupción del tratamiento.

El seguimiento se realizó en varios puntos en el tiempo con el fin de actualizar la supervivencia de cada paciente. La última actualización se ha realizado a fecha de 19 de diciembre de 2024. Se recogieron como variables:

- Situación del paciente: Vivo o fallecido.
- En caso de estar vivo se anota la fecha de última actualización de datos (19 de diciembre de 2024).
- En caso de fallecimiento, se anota la fecha de la muerte, y causa de la misma.

3.6 Procedimientos de laboratorio del estudio

3.6.1 Metodología de extracción de las muestras sanguíneas

Se obtuvieron aproximadamente 10 ml de sangre venosa mediante venopunción de pacientes con diagnóstico confirmado de carcinoma no microcítico de pulmón avanzado, previo al inicio del tratamiento con IPCIs. La sangre extraída fue inmediatamente heparinizada con el propósito de facilitar la obtención de PBMCs.

Las muestras fueron enviadas al laboratorio de referencia a través de un circuito logístico previamente diseñado y validado, con el objetivo de garantizar que el tiempo transcurrido desde la extracción hasta su procesamiento no superase las 6 horas. Este procedimiento se implementó para asegurar la preservación óptima del material celular a analizar, específicamente las células mononucleares destinadas a la citometría de flujo. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, institución dotada con un equipamiento analítico de última generación, especializado en citometría de flujo multicolor y técnicas avanzadas de análisis celular.

3.6.2 Aislamiento de células mononucleares en sangre periférica

El aislamiento de las PBMCs se realizó mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque PLUS. Inicialmente, las muestras sanguíneas se diluyeron en una proporción 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con un 2% de suero bovino fetal (SBF). Esta dilución se realizó para minimizar la agregación celular y facilitar la separación celular.

Posteriormente, la muestra diluida fue cuidadosamente estratificada sobre el medio de densidad Ficoll-Paque PLUS, seguida de un proceso de centrifugación a 1200 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente sin freno. Tras la centrifugación, las PBMC se recolectaron meticulosamente de la interfase entre el plasma y el Ficoll, asegurando la mínima contaminación con eritrocitos y granulocitos. Las células recuperadas fueron lavadas en dos ciclos consecutivos utilizando 15 ml de PBS-2% SBF, con el fin de eliminar residuos de Ficoll y otros contaminantes. Finalmente, las células se resuspendieron en un buffer adecuado para su análisis inmunofenotípico mediante citometría de flujo.

3.6.3 Procedimiento de citometría de flujo

Se utilizó una combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos (**Tabla 4**) para caracterizar los diferentes subconjuntos de células sanguíneas periféricas mediante citometría de flujo multicolor en un FACSCanto-II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA): CD3-PerCPCy5.5, CD4-FITC, CD8-PECy7, CD14-PerCP-Vio700, CD16-Pacific Blue, CD25-APC, CD45-Pacific Blue, CD56-APCCy7, CD127-PE y HLADR-PE-Vio770. Las subpoblaciones leucocitarias fueron identificadas tras la selección de singletes y células CD45+ (marcador panleucocitario) enfocándose en células T, células T reguladoras (Treg), células NK y células asesinas naturales T (NKT, del inglés *Natural Killer T Cells*). Las subpoblaciones linfoides fueron detectadas según su inmunofenotipo de la siguiente manera: Treg (CD3+ CD4+ CD25+ CD127+low/neg), células T-helper (CD45+ CD3+ CD4+), células T citotóxicas (CD45+ CD3+ CD8+), células NK (CD3- CD56+) y células NKT (NKT) (CD3+ CD56+), mientras que los monocitos clásicos se identificaron como (CD14+ HLA-DR+ CD16-). Cada medición incluyó al menos 100000 células y los porcentajes de cada población se calcularon sobre la población de singletes. Los análisis se realizaron utilizando el software InfinicytTM (Cytognos, Salamanca, España) (**Figura 9**).

Tabla 4. Panel de anticuerpos utilizados para caracterizar subpoblaciones de células T.

Fenotipo	CD3	CD8	CD56	Treg detection kit
Fluoróforo	PerCp	PE-Vio770	APC-Vio770	CD45-VioBlue CD4-FITC CD25-APC CD127-PE

Milteny	130-113-131	130-110-680	130-114-548	130-096-082
(ref)				

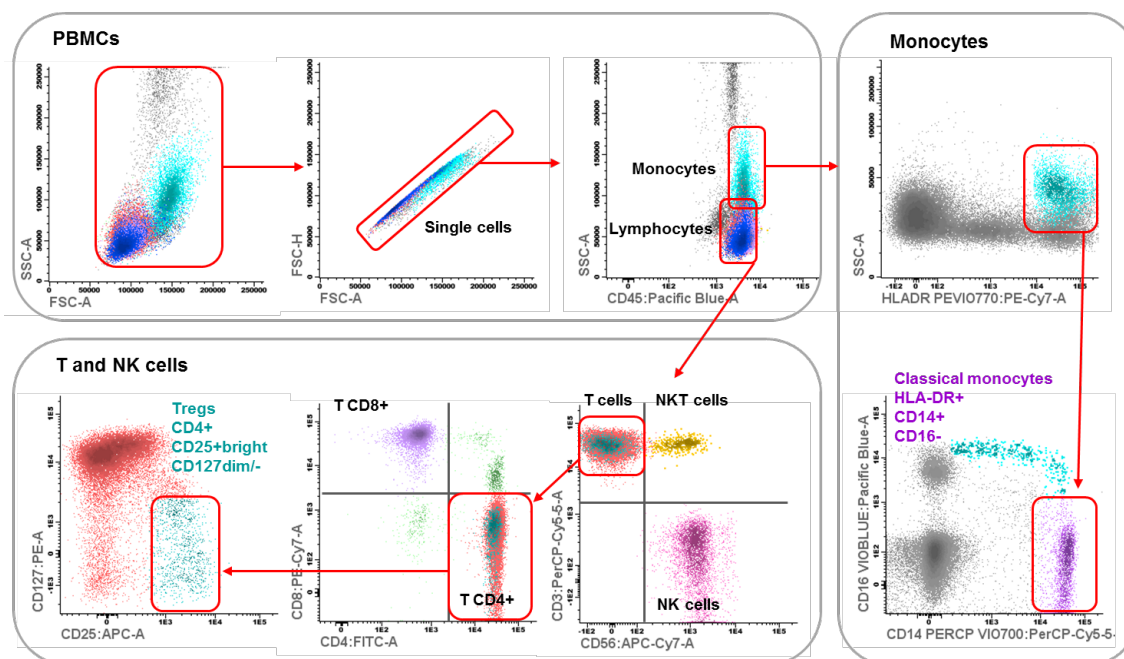


Figura 9. Definición de las poblaciones celulares. Después de identificar la población monocítica, los monocitos clásicos fueron definidos como HLA-DR+ CD14+ CD16+. Las diferentes poblaciones linfoides fueron definidas como: T-helper (CD3+ CD4+ CD56-), T citotóxicas (CD3+ CD8+ CD56-), células NK (CD3- CD56+), células NKT (CD3+ CD56+) y células T reguladoras (CD3+ CD4+ CD25+bright CD127dim/-).

3.7 Análisis estadístico

3.7.1 Análisis de las variables clínicas

Se recogieron las variables especificadas en un cuaderno de recogida de datos específico para la cohorte A y la cohorte B. Se incluyeron variables demográficas, variables clínicas, variables oncológicas, pruebas radiológicas, y resultados de la analítica de sangre en la cohorte A. Las variables cualitativas se han especificado por cálculo de frecuencias absolutas y relativas, expresando porcentajes. Respecto a las variables cuantitativas se han calculado medidas de tipo central (mediana) y dispersión (rango y cuartiles). Las frecuencias y porcentajes de las poblaciones celulares analizadas en la cohorte A se especifican con medianas que incluyen rango y cuartiles con respecto al porcentaje total de PBMCs. Se ha analizado la normalidad de los datos mediante el test de Kolmogórov-Smirnov, y la correlación entre las variables se ha analizado mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

La respuesta del tumor al tratamiento se ha llevado a cabo mediante los criterios RECIST 1.1, clasificándose como RC, RP, EE, y PE. La mSLP se ha calculado partiendo de la fecha en la que se recibió el primer ciclo de tratamiento con IPCIs hasta la progresión o

muerte por cualquier causa (evento) o la última fecha de seguimiento (censurado; por ejemplo, en el caso de pacientes que no hayan progresado). La mSG se ha calculado partiendo de la fecha en la que se recibió el primer ciclo de tratamiento con IPCIs hasta la muerte (evento) o la última fecha de seguimiento (censurado). La mSLP y mSG se han calculado con el método de Kaplan-Meier, utilizando el log-rank para estudiar las diferencias. La regresión de COX se ha utilizado para valorar el riesgo de determinados eventos. Todos los análisis se han realizado por medio de RStudio 2023.12.1 o SPSS v26.0.

3.7.2 Análisis bayesiano para la creación del modelo predictivo

El análisis bayesiano se realizó en colaboración con David Hervás, bioestadístico de la Universidad Politécnica de Valencia. Las variables para predecir la SLP y la SG fueron seleccionadas utilizando **modelos bayesianos paramétricos de supervivencia penalizados con el método *horseshoe*** [220,221]. Estos modelos son capaces de identificar las variables más relevantes entre múltiples posibles predictores mediante la aplicación de una distribución previa *horseshoe* en sus coeficientes, proporcionando además una estimación de la probabilidad de efecto basada en la distribución posterior de sus estimaciones. El modelo jerárquico aplicado consta de tres niveles. En el primer nivel, se especifica un modelo de riesgos proporcionales de Cox donde los coeficientes de regresión son potencialmente variables a lo largo del espacio geográfico. Los coeficientes se modelan mediante una distribución normal multivariada, con una matriz de correlación espacial que refleja la dependencia geográfica entre los efectos de las covariables. En el segundo nivel, se aplica un prior *horseshoe* multivariante diseñada para identificar efectos significativos y controlar la dispersión. Este prior combina un parámetro global de regularización (τ) con parámetros locales específicos para cada coeficiente (λ_k), modelando la variabilidad espacial mediante una matriz de correlación espacial H_k definida como:

$$H_{kl} = \exp(-\gamma_k \cdot d(s_k, s_l)),$$

$d(s_k, s_l)$ representa la distancia geográfica entre los sitios s_k y s_l . La distribución del parámetro γ_k sigue una mezcla entre un punto masa en cero y una distribución Gamma, permitiendo distinguir coeficientes espaciales constantes de los espacialmente variables. El tercer nivel del modelo jerárquico define un prior Gamma (a_0, b_0) sobre los hiperparámetros de la distribución de la variabilidad espacial, ajustado para equilibrar la sensibilidad y especificidad en la selección de variables.

El proceso de inferencia Bayesiana se realizó mediante un procedimiento computacional en dos etapas. En la primera, se estimaron los coeficientes de máxima verosimilitud parcial (PMLE) de forma independiente para cada variable utilizando la función de verosimilitud parcial del modelo de Cox. En la segunda etapa, estos estimadores se utilizaron como entrada para un modelo jerárquico Bayesiano, aplicando un algoritmo de muestreo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) para la estimación simultánea de los coeficientes y la selección de variables significativas. Este enfoque

permitió la estimación robusta de los efectos de las covariables, distinguiendo entre aquellas con influencia significativa y no significativa, y diferenciando los coeficientes constantes a nivel espacial de los espacialmente variables. La selección de hiperparámetros del prior Gamma ($a_0 = 25$, $b_0 = 50$) se realizó considerando un equilibrio entre la detección de efectos reales y el control del error de inclusión de variables irrelevantes. Para estos modelos, el parámetro de contracción local de la distribución previa *horseshoe* se estableció con 3 grados de libertad y la edad fue incluida como covariable en los modelos de SG. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R (versión 4.4.1) y los paquetes R “*brms*” (versión 2.21.0) y *bayestestR* (versión 0.13.2).

3.8 Aspectos éticos y legales

3.8.1 Disposiciones generales

El presente estudio ha sido llevado a cabo conforme a las normativas de buena práctica clínica (Directiva 2005/28/CE) y la Declaración de Helsinki, incluidas sus actualizaciones. La recopilación y gestión de los datos se ha efectuado siguiendo lo establecido en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales), garantizando en todo momento el principio de confidencialidad. Todos los datos fueron almacenados y analizados tras su anonimización, mediante la asignación de un identificador único para el estudio. Antes del inicio del estudio, se obtuvo la aprobación favorable de los comités de ética e investigación de los centros participantes.

3.8.2 Formulario de consentimiento informado y hoja de información al paciente

A cada individuo al que se le ha planteado la posibilidad de participar en el estudio se le ha facilitado un documento escrito denominado “Hoja de Información al Paciente”, en el cual se detalla de manera clara y completa toda la información relevante y necesaria para su adecuada comprensión. Los investigadores involucrados en el estudio han informado personalmente a los sujetos, aclarado sus dudas y, conforme a la normativa vigente, han obtenido su consentimiento o, en caso necesario, el de su representante legal (**Anexo 1**). Los participantes han tenido la oportunidad de revocar en cualquier momento su consentimiento para el uso de sus datos en los análisis, sin necesidad de justificar su decisión y sin que ello implicara responsabilidad o perjuicio alguno para ellos.

3.8.3 Confidencialidad de los datos

El contenido del cuaderno de recogida de datos, así como la base de datos en la que se ha registrado la información, se encuentran anonimizados y protegidos frente a accesos no autorizados por personas ajenas al equipo investigador, siendo considerados estrictamente confidenciales. Los datos del investigador y las muestras utilizadas en el estudio han sido incorporados y gestionados en un fichero propiedad de la UBMP, tratado

de conformidad con lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, así como el Reglamento (UE) 2016/679, relativo a la protección de datos personales, empleándose exclusivamente para el desarrollo y correcta ejecución del estudio. En todo momento se ha cumplido con la normativa española vigente respecto a la obtención, almacenamiento y conservación de las muestras sanguíneas, así como en la gestión de los datos derivados (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica).

3.8.4 Aprobación por el comité ético de investigación en medicamentos

El proyecto recibió una evaluación favorable por parte del comité ético de investigación en medicamentos (CEIm, del inglés *Comité Ético de Investigación en Medicamentos*) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia el 28 de octubre de 2021 (**Anexo 2**). El siguiente proyecto no contraviene las disposiciones establecidas en el artículo 24 del RD 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, sobre farmacovigilancia de medicamentos de uso humano, ni el artículo 8 de la Resolución de 16 de junio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, relativa a la regulación de los procedimientos, documentación y plazos para la presentación y modificación de ensayos clínicos y estudios postautorización observacionales de medicamentos en la Comunitat Valenciana.

4 Resultados

4.1 Búsqueda de biomarcadores no invasivos de respuesta a IPCIs en el tratamiento de aCPCNP

4.1.1 Características basales de la cohorte

De 2021 a 2023, se reclutaron **162 pacientes diagnosticados con aCPCNP** no aptos para cirugía curativa ni tratamiento con quimiorradioterapia en tres hospitales españoles. De estos, 86 pacientes presentaron una expresión de PD-L1 $\geq 50\%$ y recibieron como tratamiento de primera línea IPCIs con tratamiento anti-PD-(L)1. Los otros 76 pacientes, con una expresión de PD-L1 $< 50\%$, recibieron anti-PD-(L)1, o una combinación de anti-PD1 y anti-CTLA-4 junto con quimioterapia. La **mSLP para todos los pacientes reclutados (n=162) fue de 6,23 meses** (IC 95%: 5 a 8), mientras que la **mSG fue de 14 meses** (IC 95%: 10 a 19) (**Figuras 10 y 11**).

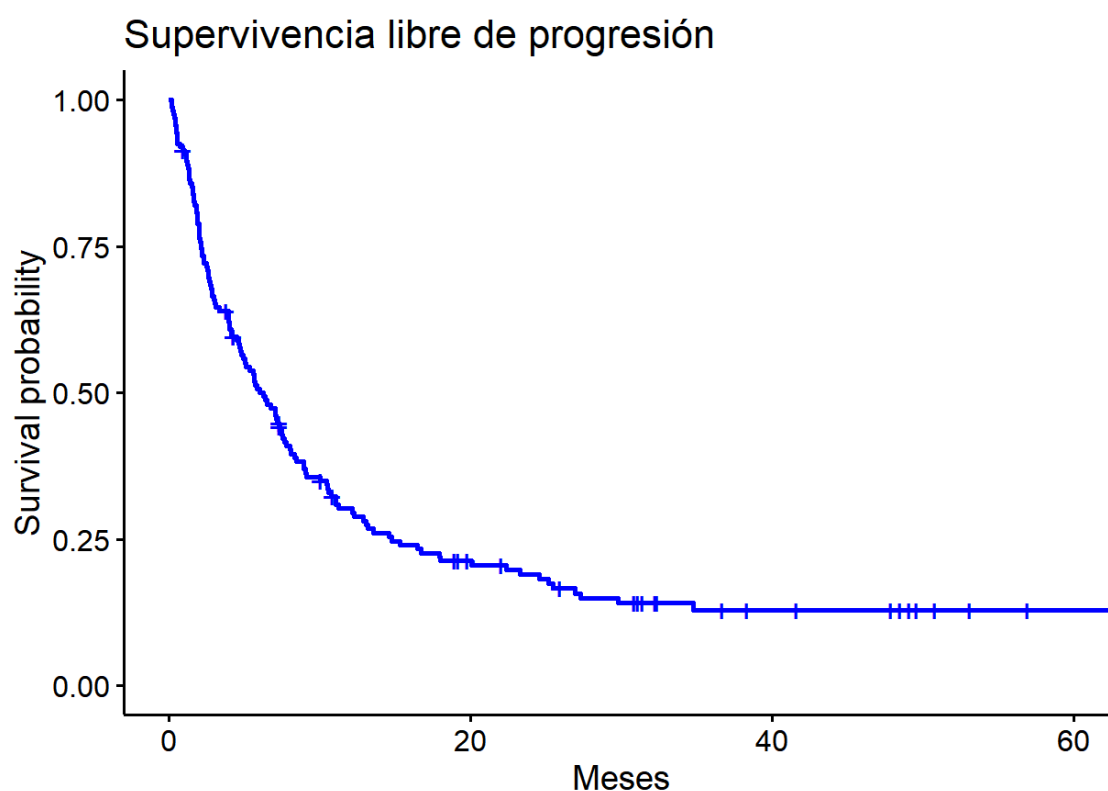


Figura 10. Representación gráfica de la SLP. Muestra una mSLP de 6,23 meses (IC 95% 5 a 8 meses).

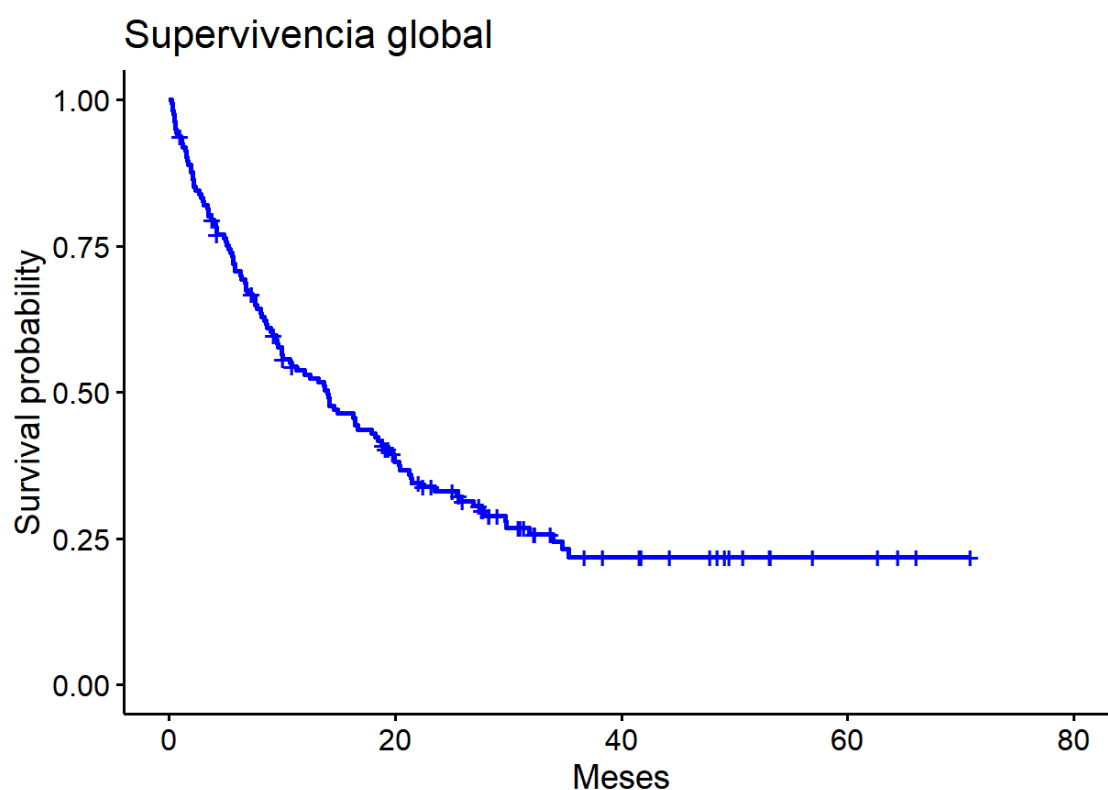


Figura 11. Representación gráfica de la SG. La mSG se situó en 14 meses (IC 95% 10 a 19 meses).

Para investigar si ambos tratamientos eran comparables en términos de SLP y SG, se realizó un análisis de Kaplan-Meier. La mSLP fue de 6,4 meses (IC 95%: 4,5 a 10 meses) en el grupo de monoterapia con ICI y de 5,7 meses (IC 95%: 4,13 a 8,1 meses) en la cohorte de ICI más quimioterapia (**Figura 12**). **No se encontraron diferencias significativas** (HR=0,99; p=0,97). La mSG fue de 15 meses (IC 95%: 10 a 22 meses) y 14 meses (IC 95%: 9 a 18 meses), respectivamente (**Figura 13**), **sin observarse diferencias estadísticamente significativas** (HR=0,83; p=0,33).

Supervivencia libre de progresión

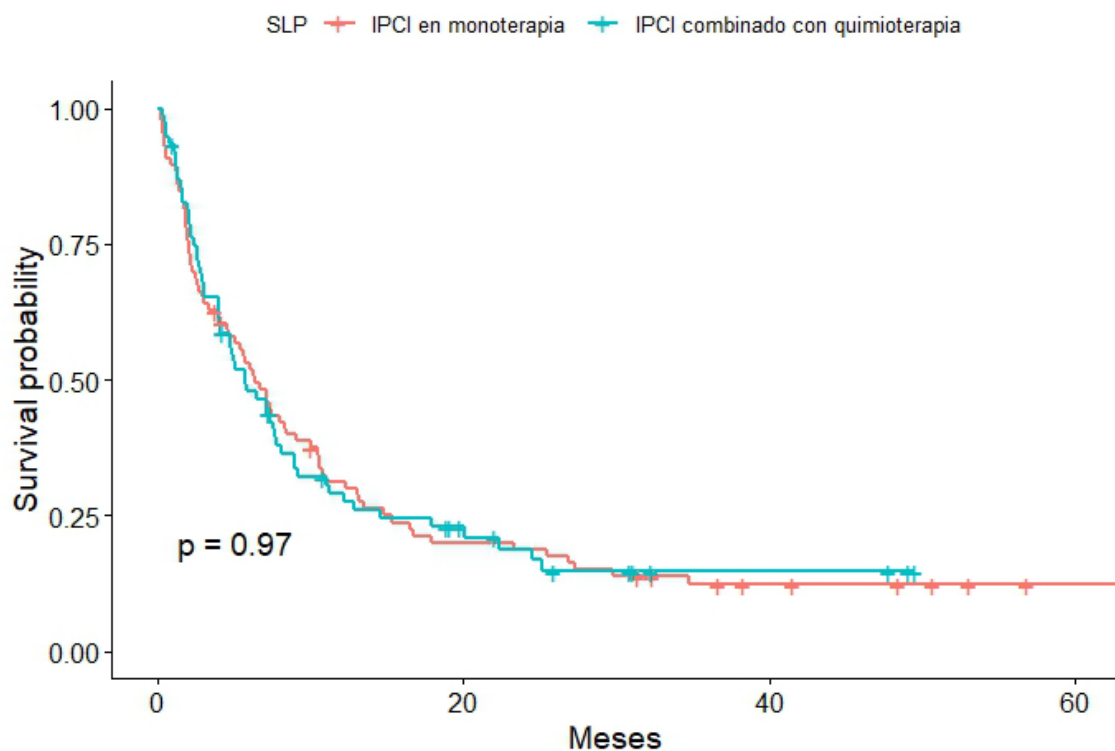


Figura 12. Representación gráfica de la SLP estratificada por pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente a aquellos que han recibido IPCIs combinados con quimioterapia. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,97$).

Para descartar posibles sesgos en las características basales entre las dos cohortes se compararon otras variables clínicas, que se resumen en la **Tabla 5**. **Aparte de la expresión de PD-L1, no se encontraron diferencias significativas que pudieran impactar en la SLP y SG.**

Supervivencia global

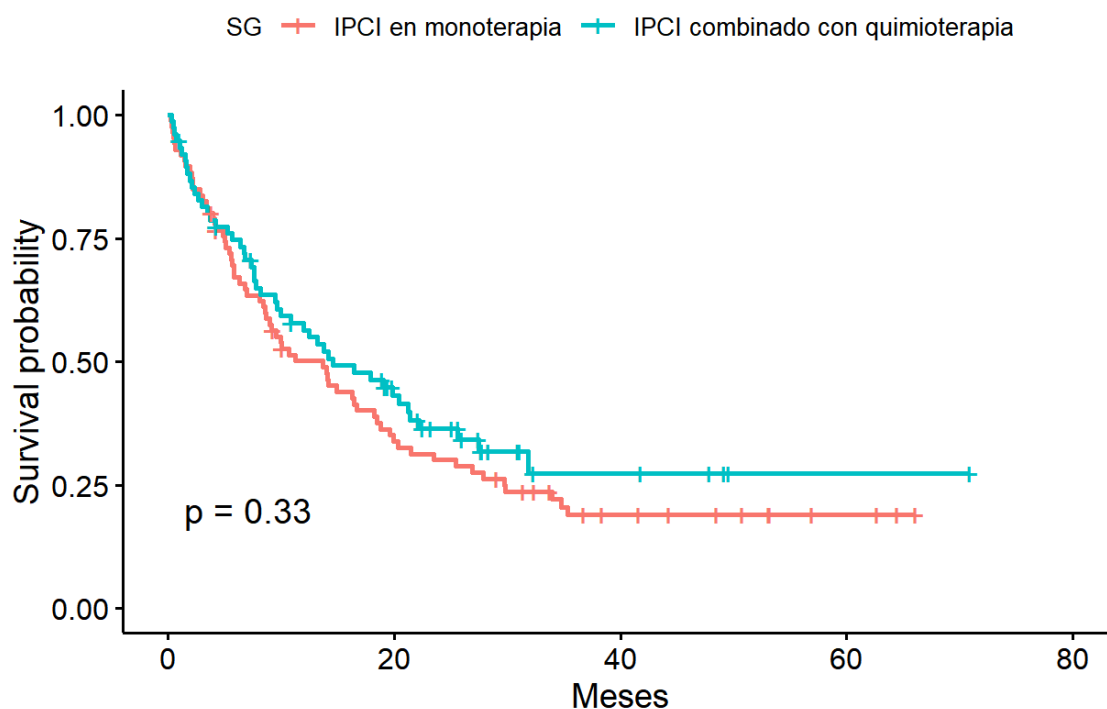


Figura 13. Representación gráfica de la SG estratificada por pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente a aquellos que han recibido IPCIs combinados con quimioterapia. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,33$).

Tabla 5. Características basales de los pacientes.

Descriptiva de los pacientes n = %	IPCI+QT	IPCI n = %
Edad, años (mediana, rango)	64 (28-85)	67 (42-87)
Género		
Varones	53 (69,7%)	65 (76,5%)
Mujeres	23 (30,3%)	20 (23,5%)
Hábito tabáquico		
Fumadores activos	30 (42,9%)	40 (47,6%)
Exfumadores	29 (41,4%)	41 (48,8%)
Nunca fumadores	11 (15,7%)	3 (3,6%)
Antibióticos antes del tratamiento		
Sí	11 (14,7%)	15 (17,6%)
No	64 (85,3%)	70 (82,4%)
Corticoides antes del tratamiento		
Sí	20 (26,3%)	23 (27,1%)
No	56 (73,7%)	62 (72,9%)
Histología		
No-escamosa	60 (78,9%)	63 (73,3%)
Escamosa	38 (21,1%)	23 (26,7%)
ECOG		

0	27 (35,5%)	18 (20,9%)
1	41 (53,9%)	57 (66,3%)
2	8 (10,5%)	11 (12,8%)
Expresión PD-L1 (célula tumoral)		
< 1%	38 (54,3%)	1 (1,1%)
1-49%	31 (44,3%)	2 (2,4%)
≥50%	1 (1,4%)	65 (77,4%)
Estadio		
I-II	5 (6,7%)	6 (7,1%)
III	3 (4%)	13 (15,5%)
IV	67 (89,3%)	65 (77,4%)

La expresión tumoral de PD-L1 mostró asociación con el esquema de IPCI dado que los IPCI en monoterapia estaban restringidos para pacientes con expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$, mientras que los IPCIs combinados con quimioterapia estaban restringidos a pacientes con expresión tumoral de PD-L1 $< 50\%$.

4.1.2 Análisis por citometría de flujo

Las PBMCs aisladas de las muestras de sangre pretratamiento de los 162 pacientes reclutados fueron analizadas posteriormente mediante citometría de flujo siguiendo el procedimiento descrito en la **Figura 9**. El porcentaje y el análisis estadístico de las poblaciones celulares analizadas, que incluyen Treg, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NK, células NKT y monocitos clásicos se resumen en la **Figura 14**.

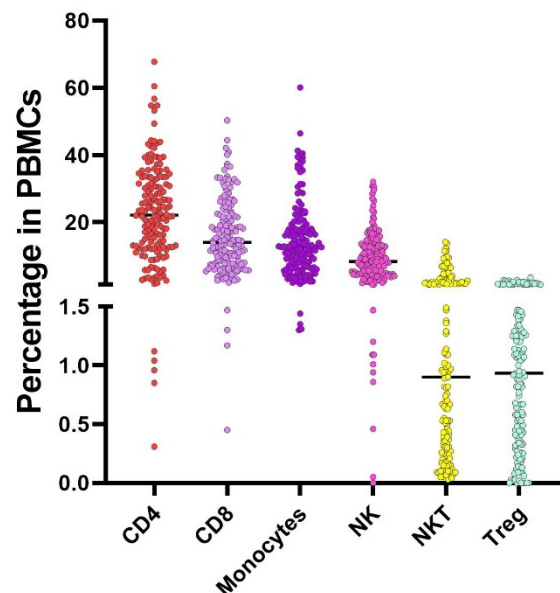


Figura 14. Porcentaje de los diferentes tipos de poblaciones celulares en pacientes tratados con IPCIs en monoterapia, y con IPCIs combinados con quimioterapia.

El análisis por citometría de flujo demostró ser una herramienta adecuada para la inmunofenotipado de las células circulantes en pacientes con CPCNP. No se encontraron

diferencias significativas entre las poblaciones basales de células inmunes de donantes sanos y los pacientes con CPCNP, independientemente del tratamiento eventual, excepto en los niveles de linfocitos T CD8+ entre los donantes sanos y los pacientes que recibirían IPCIs combinados con quimioterapia (**Tabla 6**). En general, las poblaciones de células inmunes circulantes pretratamiento fueron comparables entre ambas cohortes.

Tabla 6. Resumen del análisis de las poblaciones celulares circulantes por citometría de flujo.

	Cohortes	Mediana	Media	DEVET	ESM	Min	Max
T CD4	DS	31.23	32.49	7.788	2.348	20.8	43.3
	IPCI	23.91	23.52	12.82	1.382	1.77	67.7
	IPCI+QT	20.74	22.59	14.65	1.681	0.31	60.44
CD8	DS	25.32	23.37	7.693	2.319	11.7	35.64
	IPCI	16.14	17.69	10.4	1.122	1.3	50.31
	IPCI+QT	11.33	14.36	10.15	1.171	0.45	44.43
Monocitos	DS	8.55	9.405	5.272	1.462	2.39	20.2
	IPCI	12.57	13.93	8.898	0.9595	1.3	40.48
	IPCI+QT	13.06	16.14	12.48	1.431	1.31	60.09
NK	DS	9.86	11.55	7.892	2.38	3.34	29.05
	IPCI	8.435	9.227	5.928	0.6393	0.86	30.71
	IPCI+QT	8.37	10.4	7.62	0.8799	0.05	32.07
NKT	DS	0.76	1.564	1.708	0.5148	0.24	6.11
	IPCI	0.975	1.869	2.398	0.2788	0.03	12.28
	IPCI+QT	0.69	2.212	3.528	0.4247	0.04	14.13
Treg	DS	0.79	0.9391	0.2986	0.09003	0.48	1.44
	IPCI	1.11	1.139	0.708	0.07771	0.02	2.87
	IPCI+QT	0.855	0.9432	0.7069	0.08331	0.02	3.61

Donante sano (DS), Inhibidor de punto de control inmunológico (IPCI), Quimioterapia (QT), Desviación estándar (DEVET), Error estándar de la media (ESM).

4.1.3 Selección de poblaciones celulares circulantes con capacidad predictora

Con el objetivo de seleccionar aquellas poblaciones celulares asociadas con la SLP y la SG se utilizaron análisis multivariable de supervivencia bayesianos paramétricos con penalización de *horseshoe*. Los enfoques bayesianos son comparables a los modelos de supervivencia convencionales, pero requieren menos ajuste de hiperparámetros, evitan el uso de predictores redundantes y son menos propensos al sobreajuste. Además, estos modelos proporcionan una medida de incertidumbre en la inferencia estadística, especialmente en las predicciones.

Los resultados del análisis de la cohorte que recibió **monoterapia con IPCIs** mostraron una **asociación entre los niveles basales de monocitos clásicos con la SLP** (probabilidad de efecto del 99,15%) **y la SG** (probabilidad de efecto del 98,72%). Dado que las demás poblaciones celulares analizadas mostraron estimaciones de probabilidad bajas (< 90% de probabilidad de efecto), fueron descartadas como predictores. Las **Tablas 7 y 8** resumen las estimaciones, la probabilidad de efecto y el intervalo creíble del 95% para todas las poblaciones celulares analizadas (variables).

Tabla 7. Resultados de la selección de variables para el modelo de SLP en pacientes tratados con IPCI en monoterapia

Variables	Estimación	Error Est.	IC 95%	Prob. efecto
Intercept	2.92	0.78	[1.49. 4.57]	-
Monocitos	-0.06	0.03	[-0.11. -0.004]	99.15%
Treg	0.0001	0.09	[-0.19. 0.19]	50.12%
CD4+	-0.004	0.01	[-0.03. 0.02]	63.62%
CD8+	-0.01	0.02	[-0.05. 0.01]	76.90%
NK	0.01	0.02	[-0.03. 0.06]	65.65%

Tabla 8. Resultados de la selección de variables para el modelo de SG en pacientes tratados con IPCI en monoterapia.

Variables	Estimación	Error Est.	IC 95%	Prob. Efecto
Intercept	3.03	1.06	[0.94. 5.19]	-
Monocitos	-0.06	0.02	[-0.10. -0.003]	98.72%
Treg	0.003	0.07	[-0.14. 0.14]	52.18%
CD4+	0.005	0.01	[-0.02. 0.03]	65.70%
CD8+	0.0001	0.01	[-0.03. 0.03]	50.68%
NK	-0.003	0.02	[-0.05. 0.04]	54.30%

Las **Tablas 9 y 10** resumen los resultados del análisis de la cohorte que recibió **IPCI combinados con quimioterapia**. Los resultados revelaron **una fuerte asociación entre las células NK y los linfocitos T CD4+ con la SLP** (probabilidades de efecto del 99,95% y 90%, respectivamente), **y con la SG**, con probabilidades de efecto del 99,70% y 97,00%, respectivamente.

Tabla 9. Resultados de la selección de variables para crear el modelo de SLP en el grupo de IPCIs y quimioterapia.

Variables	Estimación	Error Est.	IC 95%	Prob. efecto
Intercept	0.48	0.59	[-0.75. 1.62]	-
Monocitos	-0.003	0.01	[-0.03. 0.02]	59.90%
Treg	0.05	0.13	[-0.12. 0.45]	61.38%
CD4+	0.02	0.01	[-0.004. 0.04]	92.22%
CD8+	0.01	0.01	[-0.01. 0.04]	82.40%
NK	0.08	0.02	[0.04. 0.13]	>99.99%

Tabla 10. Resultados de la selección de variables para crear el modelo de SG en el grupo de IPCIs y quimioterapia.

Variables	Estimación	Error Est.	IC 95%	Prob. efecto
Intercept	1.02	1.15	[-1.33. 3.26]	-
Monocitos	-0.01	0.02	[-0.05. 0.01]	80.25%
Treg	0.02	0.11	[-0.17. 0.35]	56.50%
CD4+	0.04	0.02	[0.004. 0.07]	99.08%
CD8+	0.01	0.02	[-0.01. 0.05]	78.97%
NK	0.07	0.03	[0.01. 0.12]	99.38%

Nuestro objetivo fue construir un modelo simple, no invasivo y clínicamente accesible basado en biopsias líquidas analizadas mediante citometría de flujo para predecir el resultado clínico de los pacientes con aCPCNP tratados con IPCIs. Por lo tanto, a pesar del conocido impacto de otras variables en la SLP y la SG, no se consideraron dichas variables para el modelado, excepto el **uso de corticosteroides** (> 10 mg de prednisona o equivalente), dado que es sabido que **su uso tiene un impacto significativo en los niveles de células inmunes circulantes periféricas**. Además, esta variable fácilmente accesible mejoró el rendimiento del modelo.

4.1.4 Uso de puntos de corte para monocitos clásicos, células NK y linfocitos T CD4+

Para ilustrar la capacidad predictiva de las variables seleccionadas (poblaciones celulares) y cómo estas se pueden utilizarse también con puntos de corte y no solo de modo continuo, se programó un código en bucle con análisis de Kaplan-Meier y regresión

de Cox en RStudio para seleccionar un punto de corte óptimo con el mejor HR, asegurando significación estadística en ambas cohortes. Siguiendo este procedimiento, se estableció **un punto de corte del 15% para los monocitos clásicos** en la estratificación de pacientes que recibieron **IPCI en monoterapia**, mientras que se seleccionaron **puntos de corte del 15% y 12% para los linfocitos T CD4+ y las células NK**, respectivamente, en la cohorte que recibió **IPCI combinados con quimioterapia**. También se consideró el **uso de corticosteroides**, como se mencionó anteriormente.

Por lo tanto, los pacientes que recibieron monoterapia con IPCI se subdividieron en aquellos que no recibieron corticosteroides (< 10 mg de prednisona) y presentaron un porcentaje de monocitos clásicos < 15% (Grupo 1), y aquellos que no cumplieron con estos criterios (Grupo 2). El análisis de supervivencia por Kaplan-Meier para la SLP mostró una separación entre los grupos propuestos (**Figura 15**), donde la mSLP fue de 11 meses (IC 95%: 8 a 18 meses) para el Grupo 1 y de 3 meses para el Grupo 2, con IC 95%: 2 a 7 meses y HR=0,34 ($p<0,0001$). El análisis de SG arrojó una mSG de 21 meses (IC 95%: 16 a 35 meses) para el Grupo 1 y de 7 meses para el Grupo 2 (**Figura 16**) (IC 95%: 5 a 10 meses). **Estas diferencias fueron estadística y clínicamente significativas** (HR=0,37, $p=0,00019$).

Supervivencia libre de progresión

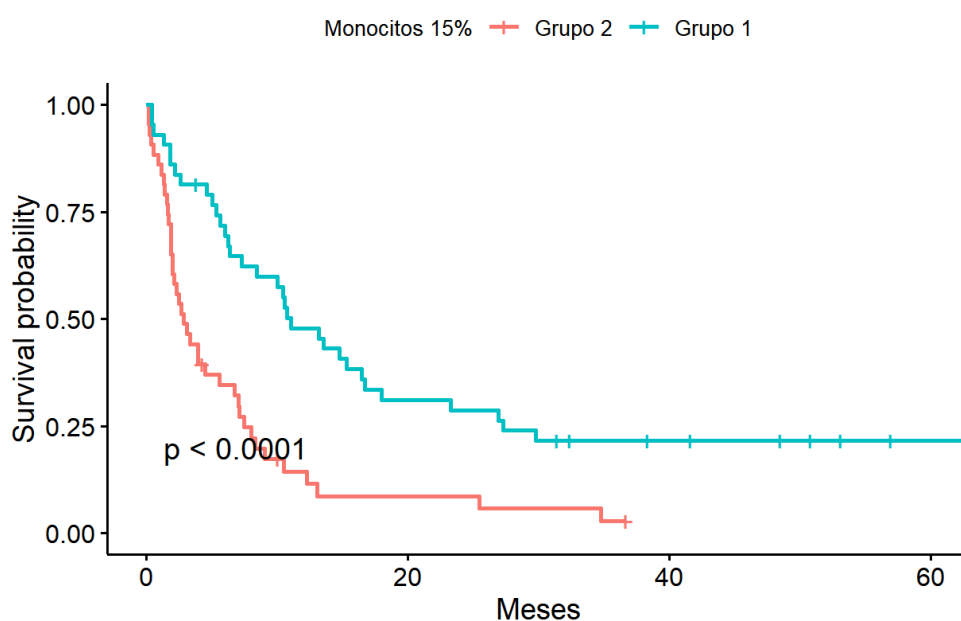


Figura 15. Representación gráfica de la SLP en la comparativa de los pacientes del grupo 1 y grupo 2. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$).

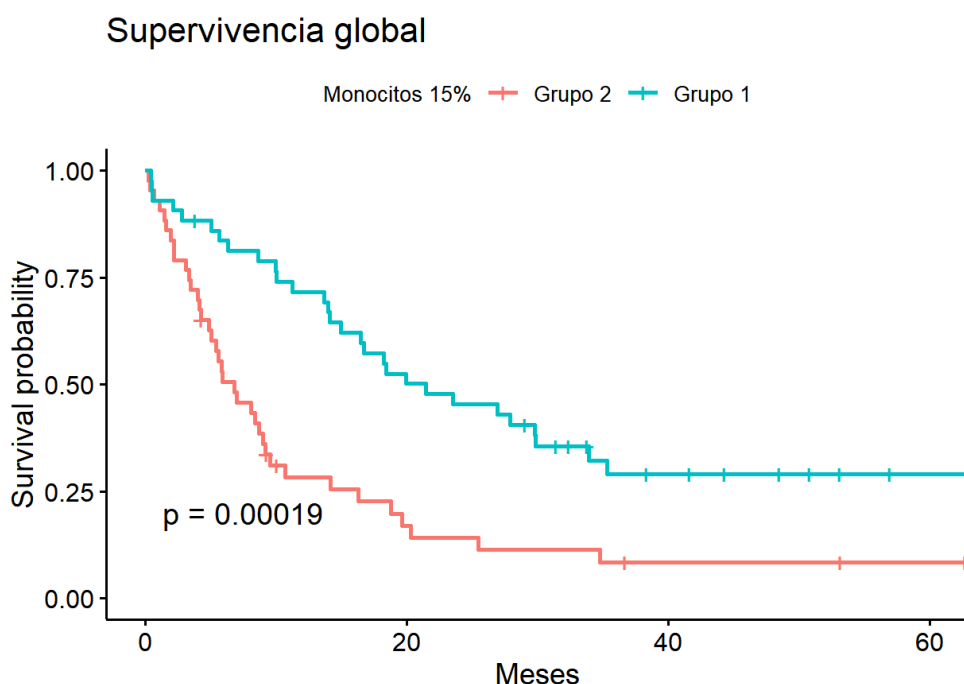


Figura 16. Representación gráfica de la SG en la comparativa de los pacientes del grupo 1 y grupo 2. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,00019$).

La cohorte de pacientes con CPCNP que recibieron IPCIs combinados con quimioterapia se dividió en aquellos que no recibieron corticosteroides (< 10 mg de prednisona) y mostraron valores $> 12\%$ para linfocitos T CD4+ y $> 15\%$ para células NK (Grupo 3), y aquellos que no cumplieron con estos criterios (Grupo 4). El análisis de Kaplan-Meier para la SLP indicó una separación entre los grupos propuestos (**Figura 17**), con una mSLP de 20 meses (IC 95%: 11 a no alcanzada) en el Grupo 3 y de 4 meses en el Grupo 4, con IC 95%: 3 a 6 y $HR=0,26$ ($p < 0,0001$). El análisis de SG mostró que la mSG no se alcanzó (IC 95%: no alcanzada a no alcanzada) en el Grupo 3, pero fue de 9,5 meses en el Grupo 4, (IC 95%: 7 a 15). **Estas diferencias fueron clínica y estadísticamente significativas** ($HR=0,09$, $p=0,00006$) (**Figura 18**).

Estos resultados demuestran que se podrían implementar clínicamente puntos de corte específicos, aunque a costa de perder el poder predictivo de las variables continuas.

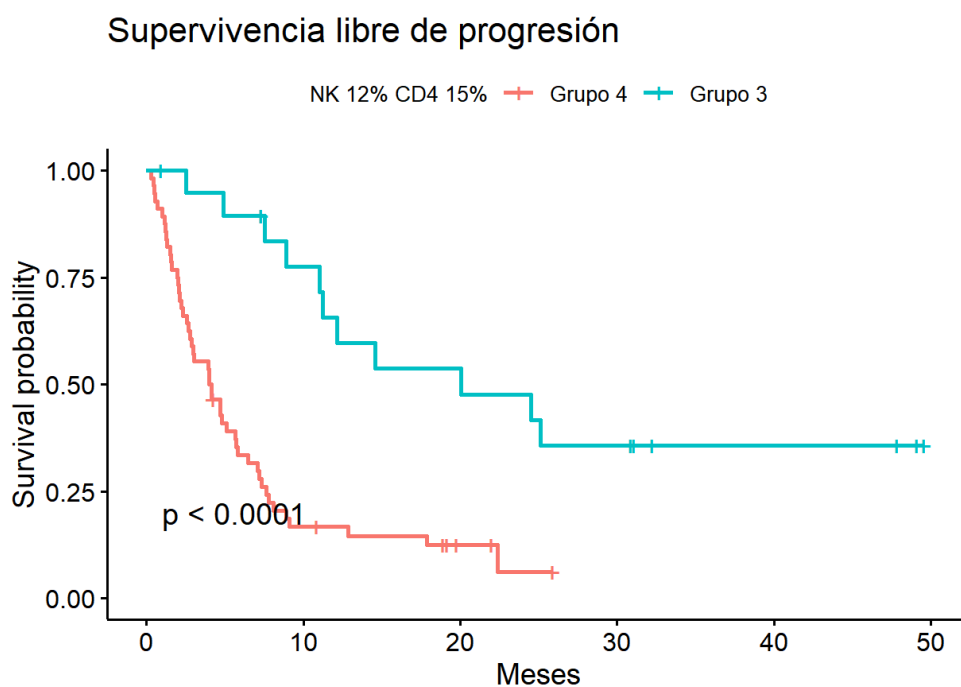


Figura 17. Representación gráfica de la SLP en la comparativa de los pacientes del grupo 3 y grupo 4. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

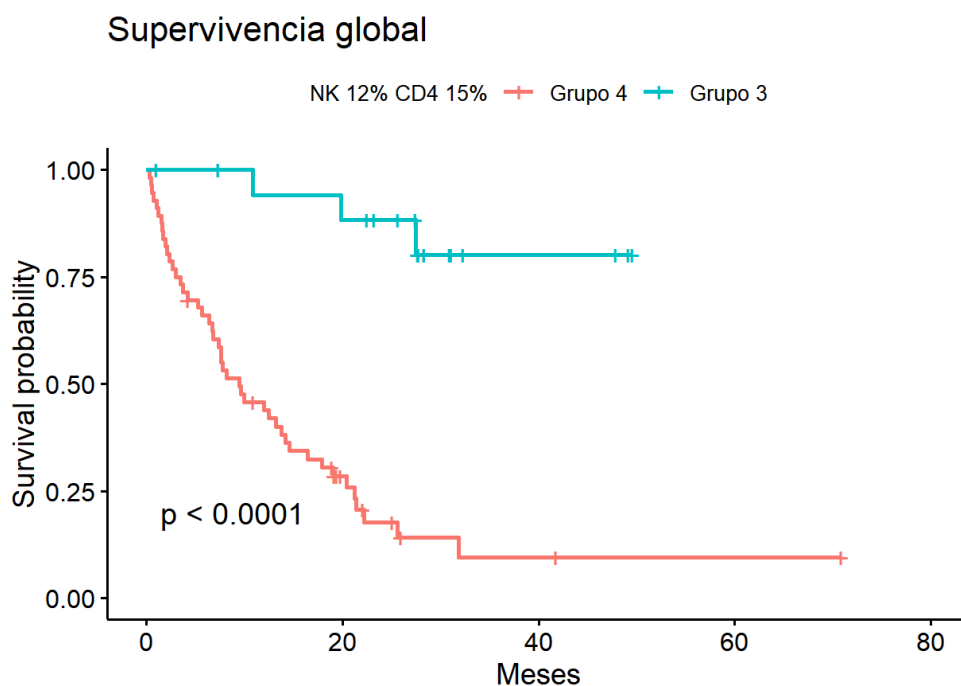


Figura 18. Representación gráfica de la SG en la comparativa de los pacientes del grupo 3 y grupo 4. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

4.1.5 Creación del modelo de respuesta a IPCIs

Tras la selección de variables, se aplicaron enfoques bayesianos para desarrollar diferentes modelos predictivos en ambas cohortes de pacientes. Los modelos desarrollados se integraron en un sistema de puntuación que hemos **denominado Índice de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico (ICIRS, del inglés *Immune Checkpoint Inhibitor Response Score*)**. El uso de enfoques paramétricos para ajustar los modelos permite formular ecuaciones que son más fáciles de interpretar e inferir en comparación con enfoques convencionales no paramétricos o semiparamétricos, como los modelos de regresión de Cox.

El desarrollo de los modelos se basó en las variables previamente seleccionadas: los monocitos clásicos para los IPCIs en monoterapia, y en los linfocitos T CD4+ y las células NK para los IPCIs combinados con quimioterapia. Como se mencionó anteriormente, también se incluyó el uso de corticosteroides en el modelo. Todos los modelos mostraron un rendimiento adecuado, con valores del índice de concordancia de Harrell (C-Index, del inglés *Harrell Concordance Index*) de 0,64 y 0,65 para la SLP y la SG en la monoterapia con IPCIs, respectivamente, y de 0,74 y 0,75 para la SLP y la SG en el modelo de IPCIs combinados con quimioterapia, respectivamente.

Los valores del C-Index reflejan que los modelos desarrollados para la monoterapia con IPCIs tienen un menor poder predictivo, aunque siguen siendo aceptables. La **Tabla 12** resume los predictores lineales (LP) y las escalas para los cuatro modelos desarrollados. Usando estos parámetros, se pueden formular y aplicar diferentes ecuaciones de cálculo de probabilidades. Esta ecuación permite calcular la probabilidad de progresión de la enfermedad o supervivencia en un momento específico de evaluación:

Ecuación 1:

$$\phi\left(-\frac{\log(eval_{time}) - LP}{scale}\right)$$

donde ϕ es la función de distribución acumulativa de la distribución normal estándar (ver **Figura 19**).

Z	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0	0.50000	0.50399	0.50798	0.51197	0.51595	0.51994	0.52392	0.52790	0.53188	0.53586
0.1	0.53983	0.54380	0.54776	0.55172	0.55567	0.55962	0.56356	0.56749	0.57142	0.57535
0.2	0.57926	0.58317	0.58706	0.59095	0.59483	0.59871	0.60257	0.60642	0.61026	0.61409
0.3	0.61791	0.62172	0.62552	0.62930	0.63307	0.63683	0.64058	0.64431	0.64803	0.65173
0.4	0.65542	0.65910	0.66276	0.66640	0.67003	0.67364	0.67724	0.68082	0.68439	0.68793
0.5	0.69146	0.69497	0.69847	0.70194	0.70540	0.70884	0.71226	0.71566	0.71904	0.72240
0.6	0.72575	0.72907	0.73237	0.73565	0.73891	0.74215	0.74537	0.74857	0.75175	0.75490
0.7	0.75804	0.76115	0.76424	0.76730	0.77035	0.77337	0.77637	0.77935	0.78230	0.78524
0.8	0.78814	0.79103	0.79389	0.79673	0.79955	0.80234	0.80511	0.80785	0.81057	0.81327
0.9	0.81594	0.81859	0.82121	0.82381	0.82639	0.82894	0.83147	0.83398	0.83646	0.83891
1	0.84134	0.84375	0.84614	0.84849	0.85083	0.85314	0.85543	0.85769	0.85993	0.86214
1.1	0.86433	0.86650	0.86864	0.87076	0.87286	0.87493	0.87698	0.87900	0.88100	0.88298
1.2	0.88493	0.88686	0.88877	0.89065	0.89251	0.89435	0.89617	0.89796	0.89973	0.90147
1.3	0.90320	0.90490	0.90658	0.90824	0.90988	0.91149	0.91309	0.91466	0.91621	0.91774
1.4	0.91924	0.92073	0.92220	0.92364	0.92507	0.92647	0.92785	0.92922	0.93056	0.93189
1.5	0.93319	0.93448	0.93574	0.93699	0.93822	0.93943	0.94062	0.94179	0.94295	0.94408
1.6	0.94520	0.94630	0.94738	0.94845	0.94950	0.95053	0.95154	0.95254	0.95352	0.95449
1.7	0.95543	0.95637	0.95728	0.95818	0.95907	0.95994	0.96080	0.96164	0.96246	0.96327
1.8	0.96407	0.96485	0.96562	0.96638	0.96712	0.96784	0.96856	0.96926	0.96995	0.97062
1.9	0.97128	0.97193	0.97257	0.97320	0.97381	0.97441	0.97500	0.97558	0.97615	0.97670
2	0.97725	0.97778	0.97831	0.97882	0.97932	0.97982	0.98030	0.98077	0.98124	0.98169
2.1	0.98214	0.98257	0.98300	0.98341	0.98382	0.98422	0.98461	0.98500	0.98537	0.98574
2.2	0.98610	0.98645	0.98679	0.98713	0.98745	0.98778	0.98809	0.98840	0.98870	0.98899
2.3	0.98928	0.98956	0.98983	0.99010	0.99036	0.99061	0.99086	0.99111	0.99134	0.99158
2.4	0.99180	0.99202	0.99224	0.99245	0.99266	0.99286	0.99305	0.99324	0.99343	0.99361
2.5	0.99379	0.99396	0.99413	0.99430	0.99446	0.99461	0.99477	0.99492	0.99506	0.99520
2.6	0.99534	0.99547	0.99560	0.99573	0.99585	0.99598	0.99609	0.99621	0.99632	0.99643
2.7	0.99653	0.99664	0.99674	0.99683	0.99693	0.99702	0.99711	0.99720	0.99728	0.99736
2.8	0.99744	0.99752	0.99760	0.99767	0.99774	0.99781	0.99788	0.99795	0.99801	0.99807
2.9	0.99813	0.99819	0.99825	0.99831	0.99836	0.99841	0.99846	0.99851	0.99856	0.99861
3	0.99865	0.99869	0.99874	0.99878	0.99882	0.99886	0.99889	0.99893	0.99896	0.99900
3.1	0.99903	0.99906	0.99910	0.99913	0.99916	0.99918	0.99921	0.99924	0.99926	0.99929
3.2	0.99931	0.99934	0.99936	0.99938	0.99940	0.99942	0.99944	0.99946	0.99948	0.99950

Figura 19. Valores de la distribución normal estándar acumulada.

La ecuación 2 se aplica para estimar percentiles (es decir, cuantiles) de progresión de la enfermedad o supervivencia:

Ecuación 2

$$e^{LP+scale*\Phi^{-1}(q)}$$

donde Φ^{-1} es la función cuantil de la distribución normal estándar y q es el cuantil deseado.

Para ejemplificar el uso del modelo ICIRS, se escogieron de forma aleatoria dos pacientes que recibieron IPCIs en monoterapia (paciente 45) e IPCIs en combinación con quimioterapia (paciente 80). La **Tabla 11** muestra los porcentajes de NK, CD4+ y monocitos, y si se utilizaron corticoides (ausencia de corticoides=0, lo que quita peso en el modelo ICIRS; uso de corticoides=1).

Tabla 11. Valores en los análisis de citometría de dos pacientes aleatorios.

Paciente	Tratamiento	Supervivencia	Monocitos (%)	NK (%)	CD4+ (%)	Corticoides
45	IPCIs	PFS	5,83	30,58	33,51	0
80	IPCIs + quimio	OS	38,2	4,04	12,68	1

El primer paso para usar manualmente la ecuación ICIRS es calcular el predictor lineal (PL) usando la fórmula adecuada para cada opción de tratamiento (IPCIs o IPCIs combinados con quimioterapia) y para la estimación deseada (SLP o SG), de acuerdo a lo especificado en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Predictores lineales y escala de los modelos ICIRS.

	Predictor lineal	Escala
IPCI monoterapia – PFS	$2,8813 - 0,0626 * \text{Monocitos} - 0,6957 * \text{corticoides}$	1,4407
IPCI monoterapia – OS	$3.5499 - 0,0695 * \text{Monocitos} - 0,3828 * \text{corticoides}$	1,4479
IPCI + quimioterapia – SLP	$0,6792 + 0,0776 * \text{NK} + 0,0236 * \text{CD4+} - 0,6067 * \text{corticoides}$	1,1098
IPCI + quimioterapia – SG	$1,1743 + 0,0672 * \text{NK} + 0,0483 * \text{CD4+} - 0,8493 * \text{corticoides}$	1,2933

En el caso del **paciente 45**, para calcular la probabilidad de estimar la PFS a 12 meses, se deben seguir los siguientes pasos:

- Cálculo del valor del PL $\rightarrow \text{PL} = 2.8813 - 0.0626 * 5.83 - 0.6957 * 0 = 2.5163$.
- Estimación de la probabilidad de SLP $\rightarrow$ Sustraer el valor del PL del logaritmo, dividirlo por la escala en la ecuación 1, y multiplicar el valor por -1.

$$\text{Prob}(\text{SLP}@12\text{meses}) = (\log(12) - 2.5163) / 1.4407 = (2.4849 - 2.5163) / 1.4407 = -0.0218 = \phi(0.0218)$$

Esto significa que la probabilidad de presentar SLP a 12 meses se da por el valor de la función de la distribución acumulativa de la distribución normal estándar a $x=0,0218$. Al observar este valor en una tabla de distribución normal estándar o en una calculadora/software estadístico. El resultado es:

$$\text{Prob}(\text{SLP}@12\text{meses}) = 0.5087 \text{ de progresión a 12 meses.}$$

Para la estimación de la mSLP, se debe sustituir el PL en la ecuación 2 y establecer $q=0,5$, lo que resulta en:

Estimación de mSLP= $e^{(2.5163+1.4407*0)}=12,38$ meses

En el caso del **paciente 80**, se deben seguir los siguientes pasos para el cálculo de la probabilidad de mSG a 12 meses:

- i) El PL se calcula al escoger la fórmula apropiada de la **Tabla 12**, e introduciendo el valor de NK, CD4+ y valores de corticoides para obtener los siguientes resultados:

$$LP = 1,1743 + 0,0483*12,68 + 0,0672*4,04 - 0,8493*1 = 1,2089$$

- ii) Estimación de la probabilidad de SG → Sustraer el valor de PL del logaritmo y dividirlo por la escala en la ecuación 1 y multiplicar el valor por -1.

$$\text{Prob}(\text{SG}@12\text{meses}) = (\log(12)-1,2089)/1,2933 = (2,4849 - 1,2089)/1,2933 = 0,9866 = \phi(-0,9866)=0,1619$$

- iii) Para la estimación de la mSG, se debe usar la ecuación 2 estableciendo $q=0,5$, planteando la siguiente expresión:

$$mSG = e^{(1,2089+1,2933*\phi^{-1}(0,5))}$$

En esta expresión, de acuerdo con lo mencionado previamente, $\phi^{-1}(0,5)=0$. Por tanto, la estimación final sería:

$$\text{Estimación mSG} = e^{1.2089}=3,35 \text{ meses}$$

Al comparar los resultados del modelo con la SLP y la SG real de los pacientes 45 y 80 respectivamente observamos que **la predicción ha sido bastante acertada**. En el caso del paciente 45 encontramos que la SLP real es de 20 meses, por lo que la estimación de una probabilidad SLP a 12 meses del 51% es acertada, e indicaría que la respuesta a IPCIs es prolongada. En el caso del paciente 80 encontramos que la SG real es de 1,63 meses, por lo que la estimación de una probabilidad de SG a 12 meses sea del 16,19% y que la mSG estimada sea de 3,35 meses es acertada, e indicaría que la respuesta a IPCIs combinados con quimioterapia es nula. En resumen, el modelo es **capaz de dar una estimación acertada y puede utilizarse para predecir la respuesta al esquema de IPCI utilizado**. Como inconveniente, podemos encontrar que **el modelo no tiene una precisión exacta**, y presentaría dificultades para predecir casos extremos (por ejemplo, que el paciente 45 se hubiera encontrado en el 16,19% de pacientes con dichos valores celulares que presentan una SG >12 meses).

4.1.6 Desarrollo de herramientas que faciliten el uso clínico del ICIRS

Como se ha mostrado en el apartado anterior el uso manual del ICIRS es sencillo y relativamente fácil de interpretar. Sin embargo, uno de los objetivos de esta tesis era facilitar al máximo el uso del sistema desarrollado. Con este objetivo en mente se decidió desarrollar, por un lado, nomogramas para cada uno de los modelos (**Figuras 20-23**). Estos nomogramas permiten el cálculo sencillo y rápido a pie de cama del ICIRS.

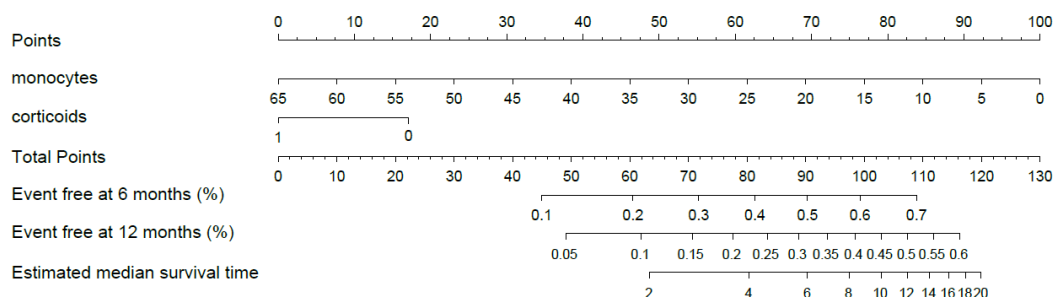


Figura 20. Nomograma para SLP e IPCIs en monoterapia. Para su uso conectar los valores del paciente con los cálculos deseados.

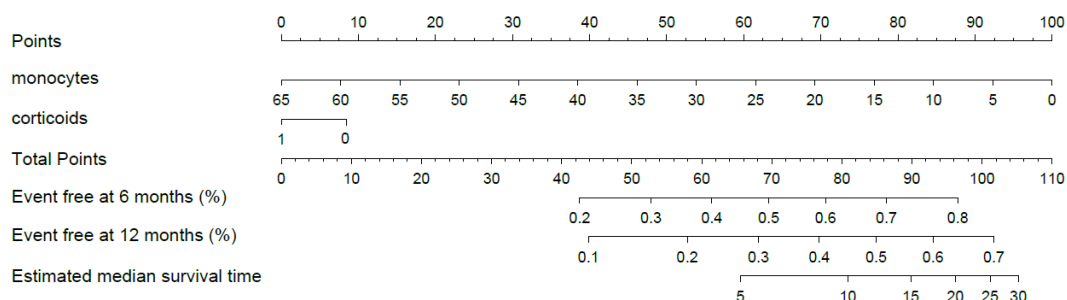


Figura 21. Nomograma para SG e IPCIs en monoterapia. Para su uso conectar los valores del paciente con los cálculos deseados.

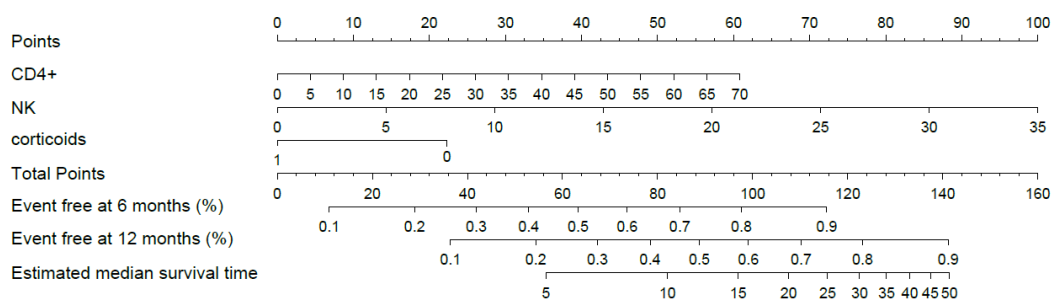


Figura 22. Nomograma para SLP e IPCIs combinados con quimioterapia. Para su uso conectar los valores del paciente con los cálculos deseados.

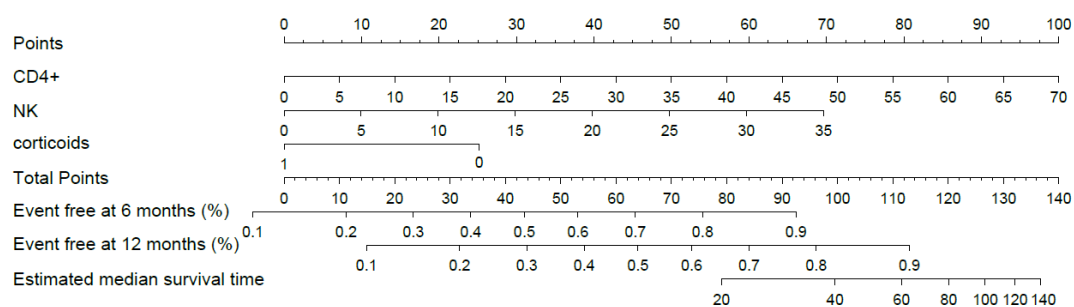


Figura 23. Nomograma para SG e IPCIs combinados con quimioterapia. Para su uso conectar los valores del paciente con los cálculos deseados.

Y por otro, una calculadora web (https://remote.iislafe.san.gva.es/sample-apps/icirs_score/). Esta aplicación web libre y de fácil acceso permite el cálculo del ICIRS de un modo amigable y sencillo (**Figura 24**). Para realizar una estimación personalizada, se debe de introducir el valor de NK, linfocitos T CD4+, monocitos, y el uso de corticoides en el paciente. A continuación, se da la opción de estimación de cálculos en el número de meses deseado, por defecto la calculadora reportará la predicción de SLP a 6 y 12 meses, y la predicción de SG a 12 y 24 meses.

Data input:

ICIRS calculator:

NK (%):	10
CD4+ (%):	20
Monocytes (%):	15
Corticoids:	No
Extra timepoint to evaluate survival (months):	7

Results output:

PFS prediction at 6 and 12 months:

	6 months - PFS	CI 95%	12 months - PFS	CI 95%	mPFS	CI 95%
ICIs	54.16%	43.82% - 64.23%	35.32%	26.22% - 45.36%	6.97 months	4.8 months - 10.15 months
ICIs + CHT	54.88%	43.55% - 65.83%	30.79%	21.57% - 41.42%	6.88 months	5.01 months - 9.44 months

OS prediction at 12 and 24 months:

	12 months - OS	CI 95%	24 months - OS	CI 95%	mOS	CI 95%
ICIs	50.61%	40.15% - 61.04%	32.16%	23.32% - 42.13%	12.27 months	8.36 months - 18.01 months
ICIs + CHT	59.97%	47.7% - 71.32%	38.85%	27.64% - 51.07%	16.64 months	11.14 months - 24.85 months

PFS and OS prediction at 7 months:

	PFS	CI 95%	OS	CI 95%	mPFS	CI 95%	mOS	CI 95%
ICIs	49.9%	39.64% - 60.16%	65.09%	54.89% - 74.3%	6.97 months	4.8 months - 10.15 months	12.27 months	8.36 months - 18.01 months
ICIs + CHT	49.39%	38.16% - 60.6%	74.84%	64.02% - 83.63%	6.88 months	5.01 months - 9.44 months	16.64 months	11.14 months - 24.85 months

Figura 24. Pantallas de rellenado de datos (imagen superior) y de resultados (imagen inferior) de la aplicación web del ICIRS.

4.2 Análisis de datos de vida real de pacientes con aCPCNP tratados en primera línea con IPCIs

4.2.1 Características basales

Para este estudio **entre octubre de 2021 y diciembre de 2023** se reclutaron un total de **247 pacientes diagnosticados con aCPCNP**. Los pacientes **habían recibido un IPCI** (en monoterapia o en combinación con quimioterapia). Los datos a estudiar se obtuvieron de la historia clínica electrónica de forma retrospectiva. La **Tabla 13** muestra un resumen de los datos recogidos. La **mediana de edad** de nuestra cohorte fue de 65 años (rango 39-85), y el 30% de los pacientes eran mujeres. Un 6,1% de la cohorte ha sido **nunca fumadora**, un 59,1% **había fumado en el pasado**, pero dejó el consumo tabáquico hace ≥ 1 año de tiempo con respecto al diagnóstico. Respecto a **comorbilidades**, la mediana de la cohorte fue de 3 (rango 0-13), y la **mediana de número de fármacos concomitantes** previo al inicio del tratamiento fue de 5 (rango 0-21). El 68,8% de los pacientes presentó una **histología** de adenocarcinoma, el 23,9% de carcinoma escamoso, y el 7,3% presentó otras histologías (por ejemplo, carcinoma de célula grande, indiferenciado, con diferenciación neuroendocrina...). El **estadio inicial** al diagnóstico fue de I/II en el 6,9% de pacientes de la cohorte, mientras que el **estadio inicial** fue III en 15,8% de pacientes, y IV en el 77,3%. La **expresión tumoral de PD-L1** fue negativa en el 34,8% de los pacientes, positiva (1-49%) en el 27,5% de pacientes, y alta ($\geq 50\%$) en el 34,8% de los pacientes; un 7,8% de pacientes no disponían de muestra para determinación de PD-L1 (agotada en el diagnóstico inicial). Respecto a **mutaciones concomitantes** no incluidas en los criterios de exclusión, estas se objetivaron en el 16,2% de pacientes, encontrando 22 pacientes (8,9%) de pacientes con una alteración en KRAS, alteración en *MET skipping exon 14* en 4 pacientes (8,9%), TP53 en 3 pacientes (1,6%), y en el homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-RAF (BRAF, del inglés *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*) V600E en 2 pacientes (0,8%). Otras mutaciones fueron detectadas en 9 pacientes (3,6%), y se han reflejado en el pie de tabla; destacar la presencia de 1 paciente con una mutación clásica de EGFR dado que la NGS se realizó de forma posterior al inicio del tratamiento.

El **estado general** de los pacientes se midió por la escala ECOG, objetivando que un 22,3% de pacientes presentaron un ECOG 0, un 66,8% de pacientes ECOG 1, un 9,3% de pacientes ECOG 2, y un 1,6% de pacientes se trataron con un ECOG 3-4. Un 26,3% de pacientes debutaron con metástasis cerebrales, incluyéndose pacientes con lesiones activas y que no habían recibido tratamiento previo. Respecto a los **tratamientos recibidos**, un 34,8% de pacientes recibieron un IPCI en monoterapia, frente al 65,2% que recibieron una combinación de IPCIs con quimioterapia, otros IPCIs, y/o fármacos anti-VEGF. Dentro de los esquemas de IPCIs en monoterapia, un 31,6% de los pacientes recibieron un fármaco anti-PD-1 (30% pembrolizumab y 1,6% cemiplimab), mientras que un 2,8% llevaron atezolizumab (fármaco anti-PD-L1). Respecto a los esquemas de combinación lo más frecuente fue la administración de un doblete de platino con

pemetrexed y anti-PD-1 (pembrolizumab o cemiplimab) ya que fue administrado a un 37,6% de pacientes (21,4% con carboplatino y 16,2% con cisplatino). El segundo esquema farmacológico más utilizado, con un 17,4%, fue el doblete de platino con paclitaxel y pembrolizumab en histología escamosa. Los esquemas que combinaron anti-PD-1 con anti-CTLA-4 y doblete de platino se administraron en el 8,6% de pacientes, mientras que el esquema de combinación de doblete de platino basado en paclitaxel con anti-PD-L1 (atezolizumab) y anti-VEGF (bevacizumab) se usó en un 2% de los pacientes.

En general, la **mediana de ciclos de tratamiento** fue de 7 (rango 1-63), y la **mejor respuesta de los pacientes** fue de respuesta completa en el 6,9% de los pacientes, respuesta parcial en el 41,3% de los pacientes, enfermedad estable en el 13,8% de los pacientes, y progresión de enfermedad en el 38,1%. Un total de 17,8% de pacientes tuvieron que suspender los IPCIs por una **toxicidad inmunorelacionada severa** (grado ≥ 3). De aquellos pacientes que progresaron en el tiempo, un 28,83% llevaron un **tratamiento sucesivo de segunda línea**: un 15% de pacientes se enrolaron en un ensayo clínico con un fármaco en investigación, un 8,9% de pacientes llevaron quimioterapia basada en docetaxel, y un 8,1% de pacientes un doblete de platino (en casos que en primera línea recibieron solo un IPCI en monoterapia).

Tabla 13. Características basales de los pacientes.

Descriptiva de los pacientes	n = %
Edad, años (mediana, rango)	65 (39-85)
Género	
Varones	173 (70%)
Mujeres	74 (30%)
Hábito tabáquico	
Fumadores activos	86 (34,8%)
Exfumadores	146 (59,1%)
Nunca fumadores	15 (6,1%)
Número de comorbilidades (mediana, rango)	3 (0-13)
Número de Fármacos (mediana, rango)	5 (0-21)
Histología	
Adenocarcinoma	170 (68,8%)
Escamoso	59 (23,9%)
Otros	18 (7,3%)
Estadio inicial	
I-II	17 (6,9%)
III	39 (15,8%)
IV	191 (77,3%)
Expresión PD-L1 (célula tumoral)	
< 1%	88 (34,8%)
1-49%	71 (27,5%)
$\geq 50\%$	88 (34,8%)
Mutaciones	40 (16,2%)

KRAS	22 (8,9%)
<i>MET skipping exon 14</i>	4 (1,6%)
TP53	3 (1,2%)
BRAF V600E	2 (0,8%)
Otras mutaciones (1)	9 (3,6%)
ECOG	
0	55 (22,3%)
1	165 (66,8%)
2	23 (9,3%)
3-4	4 (1,6%)
Metástasis cerebrales al diagnóstico	65 (26,3%)
Tipo de tratamiento IPCI	
Inmunoterapia en monoterapia	86 (34,8%)
Inmunoterapia en combinación con otros fármacos	161 (65,2%)
Tipo de esquema de quimioterapia (n = 161)	
Doblete de platino que incluye pemetrexed	112 (69,6%)
Doblete de platino en combinación con taxano +- anti-VEGF	49 (30,4%)
Esquema administrado	
Pembrolizumab	74 (30%)
Atezolizumab	7 (2,8%)
Cemiplimab	4 (1,6%)
Carboplatino-Pemetrexed-Pembrolizumab	51 (20,6%)
Carboplatino-Paclitaxel-Pembrolizumab	43 (17,4%)
Cisplatino-Pemetrexed-Pembrolizumab	40 (16,2%)
Carboplatino-Pemetrexed-Nivolumab-Ipilimumab	12 (4,9%)
Cisplatino-Pemetrexed-Nivolumab-Ipilimumab	8 (3,2%)
Carboplatino-Paclitaxel-Bevacizumab-Atezolizumab	5 (2%)
Carboplatino-Pemetrexed-Cemiplimab	2 (0,8%)
Carboplatino-Paclitaxel-Nivolumab-Ipilimumab	1 (0,4%)
Nº ciclos (mediana, rango)	7 (1-63)
Mejor respuesta	
Respuesta completa	17 (6,9%)
Respuesta parcial	102 (41,3%)
Enfermedad estable	34 (13,8%)
Progresión de enfermedad	94 (38,1%)
Toxicidad inmunológica severa (Grado ≥3)	44 (17,8%)
Tratamiento sucesivo	79 (28,83%)
Ensayo clínico	37 (15%)
Docetaxel	22 (8,9%)
Doblete de platino	20 (8,1%)

(1) En otras mutaciones se incluye: 1 caso de amplificación de CDK4, 1 caso de amplificación de EGFR, 1 caso de mutación de EGFR clásica (en este caso, la mutación se detectó de forma posterior al inicio del tratamiento), 1 caso de mutación en inserción del exón 20 de EGFR, 1 caso de mutación en HER2, 1 caso de mutación en FGFR1, 1 caso de mutación en NRAS, y 1 caso de mutación en NUTM1, y 1 caso de mutación en IDH2.

4.2.2 Datos globales de eficacia

La **cohorte de estudio** presentó una **mSLP de 7 meses** (IC 95%: 6 a 9 meses [Figura 25]), mientras que la **mSG fue de 15 meses** (IC 95%: 12 a 18 meses [Figura 26]).

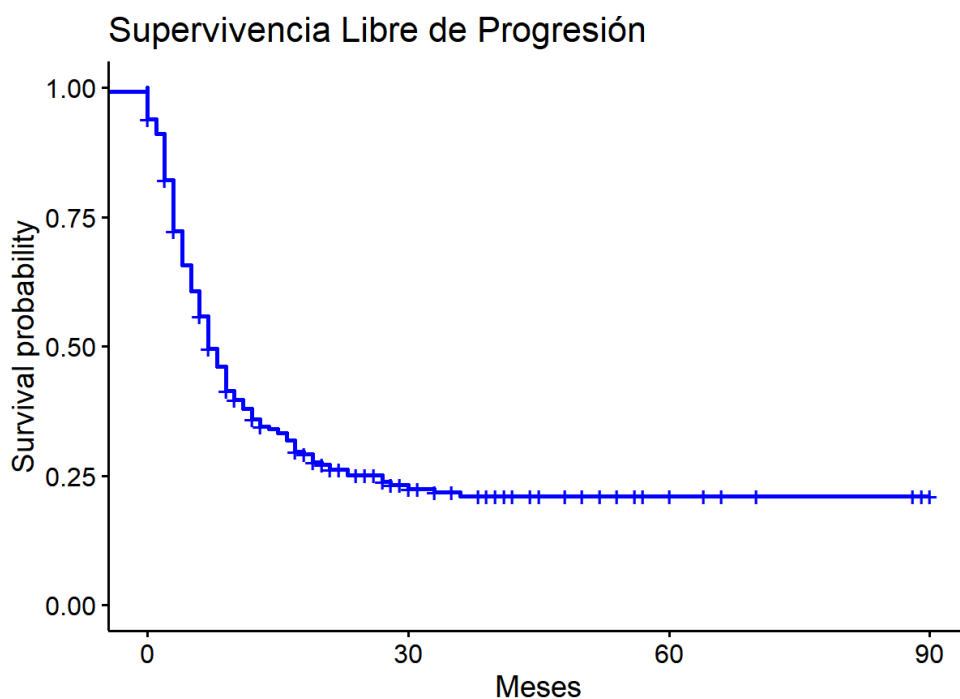


Figura 25. Representación gráfica de la SLP. Muestra una mSLP de 7 meses (IC 95% 6 a 9 meses).

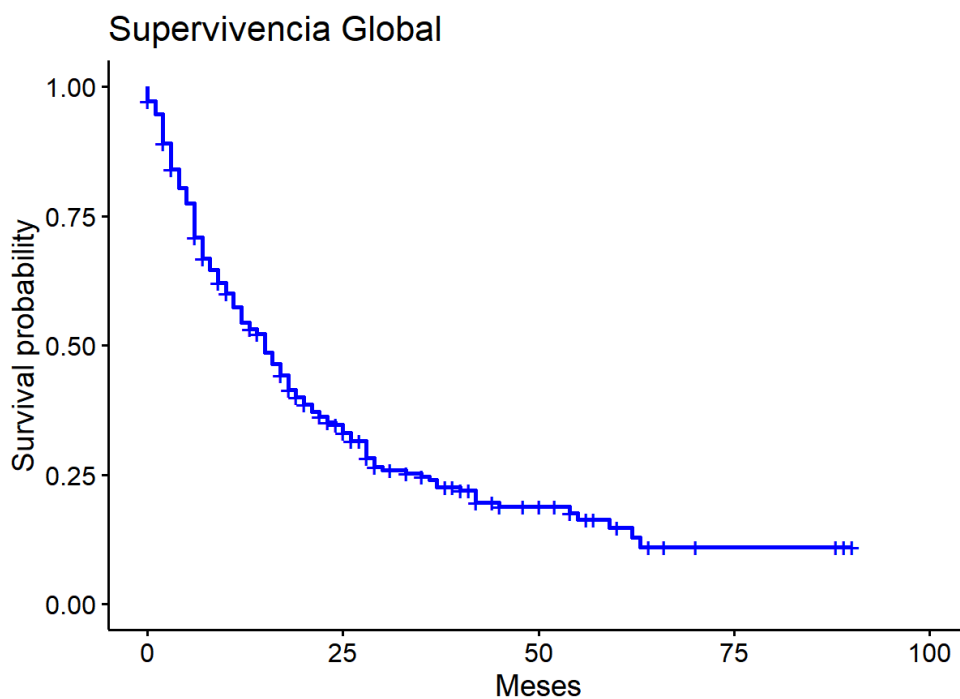


Figura 26. Representación gráfica de la SG. Muestra una mSG de 15 meses (IC 95% 12 a 18 meses).

4.2.3 Comparativa de las variables basales

Para comprobar si existían diferencias entre las variables recogidas en la **Tabla 13** en los subgrupos a estudiar, se analizó la normalidad de las variables cuantitativas resultando todas normales ($p > 0,05$ en el test de Kolmogórov-Smirnov), y se compararon todos los subgrupos de estas por medio del coeficiente de correlación de Pearson, objetivándose que ninguna de las correlaciones fue relevante ya que ninguna de los valores de “r” en las comparaciones fue superior a 0,7. Se observó una relación entre presentar una edad mayor a 70 años, la presencia de 3 o más comorbilidades ($r = 0,358$; $p = 0,001$), y la polifarmacia ($r = 0,179$; $p = 0,005$); sin embargo, dado el valor de “r” ninguna de estas relaciones fueron lo suficientemente fuertes como para que el papel de una de ellas influyera de forma íntegra en el comportamiento independiente de la otra variable.

4.2.4 Eficacia por tipo de tratamiento recibido

A continuación, se analizó la influencia de las diferentes variables recogidas en la SLP y SG, incluyendo varias comparaciones que no estaban presentes en los ensayos clínicos aprobatorios, pero que por práctica clínica de vida real sí que han sido estudiadas. En las **Figuras 27 y 28** se representa la SLP y la SG de la población en función de si se utilizó inmunoterapia en monoterapia ($n = 86$) o en combinación con otros fármacos ($n = 161$; quimioterapia, anti-CTLA-4, y/o anti-VEGF).

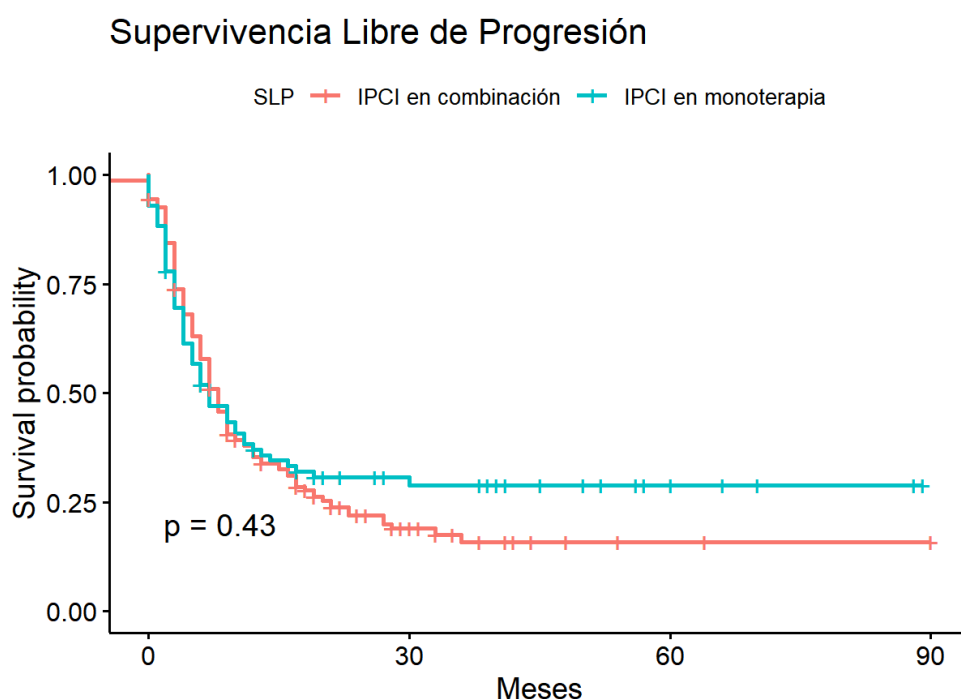


Figura 27. Representación gráfica de la SLP al comparar pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente aquellos que han recibido IPCIs en combinación con otros fármacos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,43$).

Supervivencia Global

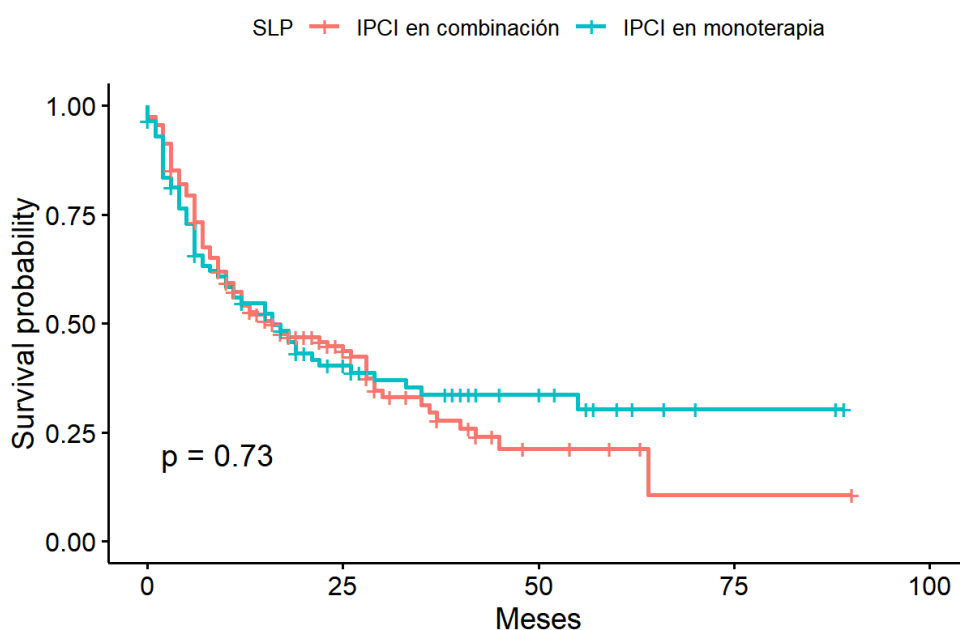


Figura 28. Representación gráfica de la SG al comparar pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia frente aquellos que han recibido IPCIs en combinación con otros fármacos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,73$).

En aquellos pacientes que recibieron IPCIs en monoterapia la mSLP fue de 7 meses (IC 95%: 5 a 12 meses), mientras que aquellos pacientes que recibieron el IPCI en combinación fue de 8 meses (IC 95%: 7 a 9 meses). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estas ramas (HR=0,89; $p=0,43$). Respecto a la mSG, esta se situó en 16 meses en el grupo de IPCIs en monoterapia (IC 95%: 10 a 29 meses) mientras que fue de 16 meses en el grupo de combinación (IC 95%: 12 a 28 meses). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estas ramas de tratamiento (HR=0,94; $p=0,73$).

4.2.5 Eficacia por histología

Como se ha comentado en la introducción, dada la existencia de indicios de que la histología escamosa tiene una peor supervivencia con los IPCIs, llegando al punto de que se plantee que PD-L1 no sea predictivo de supervivencia, se compararon los pacientes con histología escamosa ($n=59$) y no-escamosa ($n=188$). Las **Figuras 29 y 30** muestran los datos de SLP y SG.

Supervivencia Libre de Progresión

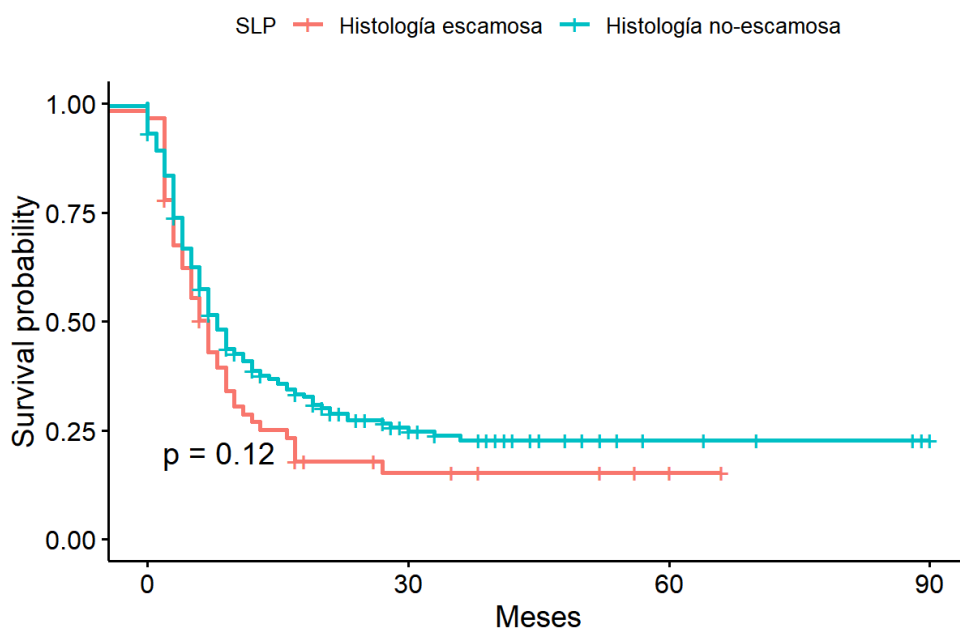


Figura 29. Representación gráfica de la SLP estratificada por pacientes con histología escamosa y no-escamosa. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,12$).

Supervivencia Global

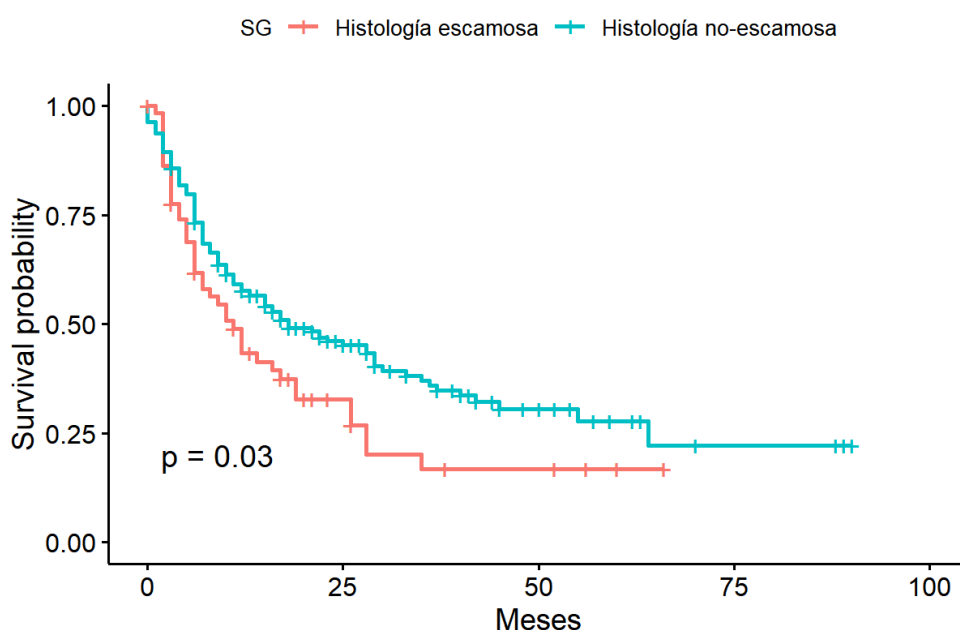


Figura 30. Representación gráfica de la SG estratificada por pacientes con histología escamosa y no-escamosa. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,03$).

Los pacientes con histología no-escamosa presentaron una **mSLP** de 8 meses (IC 95%: 7 a 11 meses), mientras que aquellos con una histología escamosa presentaron una **mSLP** de 7 meses (IC 95%: 5 a 9 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($HR=0,76$; $p=0,11$). **La mSG** fue de 18 meses (IC 95%: 13 a 29 meses) y 11

meses (IC 95%: 7 a 19 meses) respectivamente. **Estas diferencias fueron estadísticamente significativas** (HR=0,67; p=0,03).

4.2.6 Eficacia por uso de pemetrexed

Dados los datos preclínicos mencionados en la introducción que indican que pemetrexed podría tener mayor capacidad de sinergia con los IPCIs, se comparó la SLP y la SG estratificado por presencia (n=112) o ausencia de pemetrexed (n=135) en el tratamiento de los pacientes. Las **Figuras 31 y 32** muestran las curvas de supervivencia.

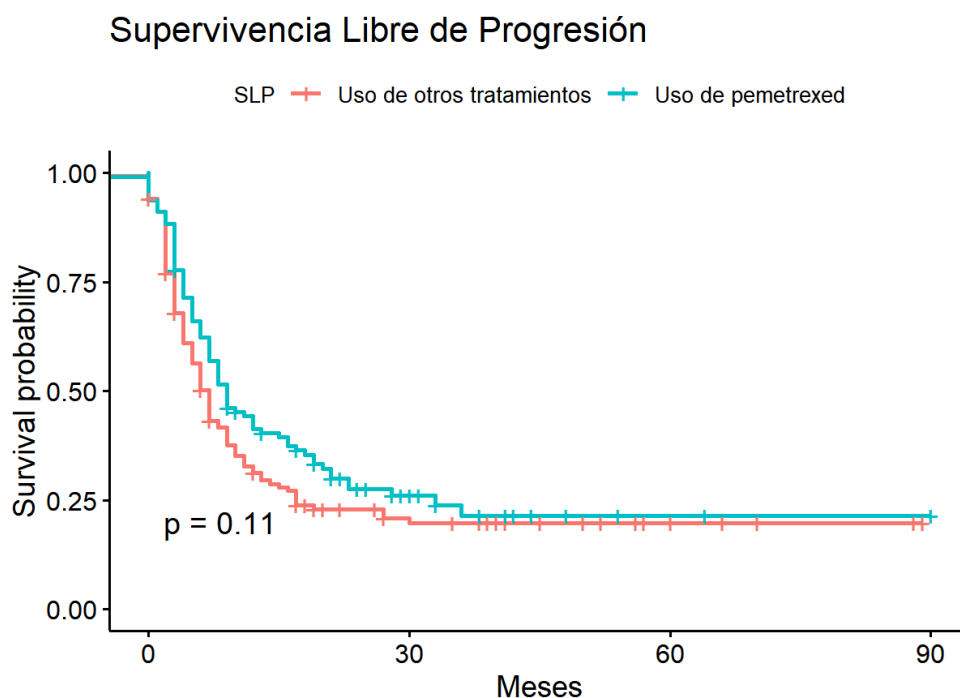


Figura 31. Representación gráfica de la SLP en pacientes que han llevado quimioterapia basada en pemetrexed, frente aquellos que han llevado otros esquemas de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p=0,11).

Supervivencia Global

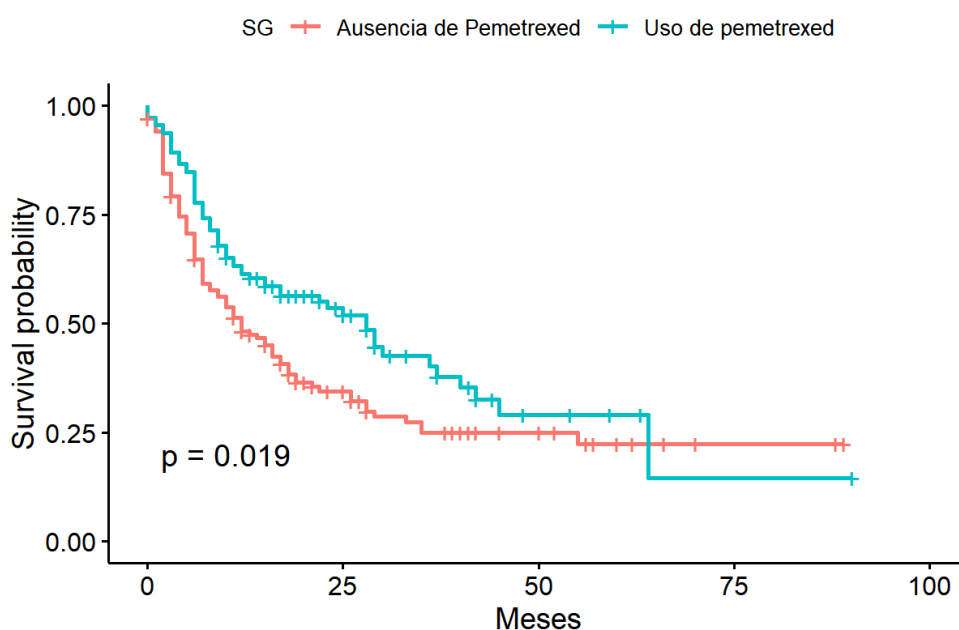


Figura 32. Representación gráfica de la SG en pacientes que han llevado quimioterapia basada en pemetrexed, frente aquellos que han llevado otros esquemas de tratamiento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,019$).

La **mSLP** en aquellos pacientes que recibieron pemetrexed fue de 9 meses (IC 95%: 7 a 15 meses), frente a 7 meses (IC 95%: 5 a 9 meses) en aquellos pacientes que recibieron esquemas que no incluyeron dicho agente quimioterápico. A pesar de esta tendencia, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes ($HR=0,79$; $p=0,11$). Por otra parte, la **mSG** fue respectivamente de 28 meses (IC 95%: 15 a 40 meses), frente a 12 meses (IC 95%: 8 a 18 meses). **Estas diferencias fueron estadísticamente significativas** ($HR=0,68$; $p=0,019$).

4.2.7 Eficacia en función del ECOG

Dado que en los principales ensayos aprobatorios se incluyeron pacientes de ECOG 0 o 1 exclusivamente, se decidió comparar en un contexto de vida real si había diferencias entre dichas clasificaciones, e incluso con pacientes que pudieran haber sido tratados con ECOG 2/3/4. Por tanto, se clasificó la cohorte en pacientes con ECOG 0 ($n=55$), ECOG 1 ($n=165$), y ECOG 2 ($n=27$). Las **Figuras 33 y 34** muestran los datos de mSLP y mSG.

Supervivencia Libre de Progresión

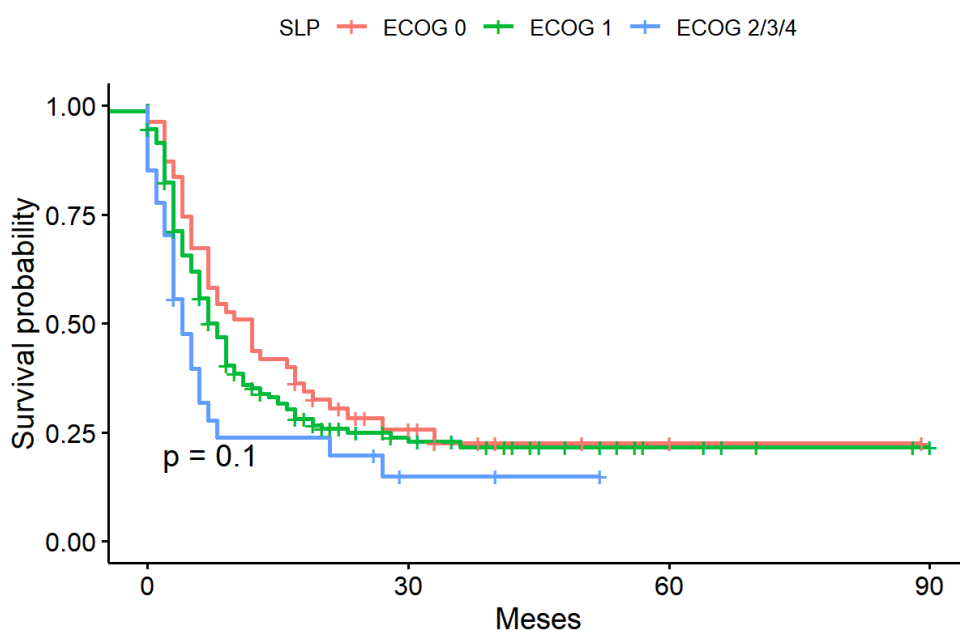


Figura 33. Representación gráfica de la SLP en función del ECOG basal del paciente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,1$).

Supervivencia Global

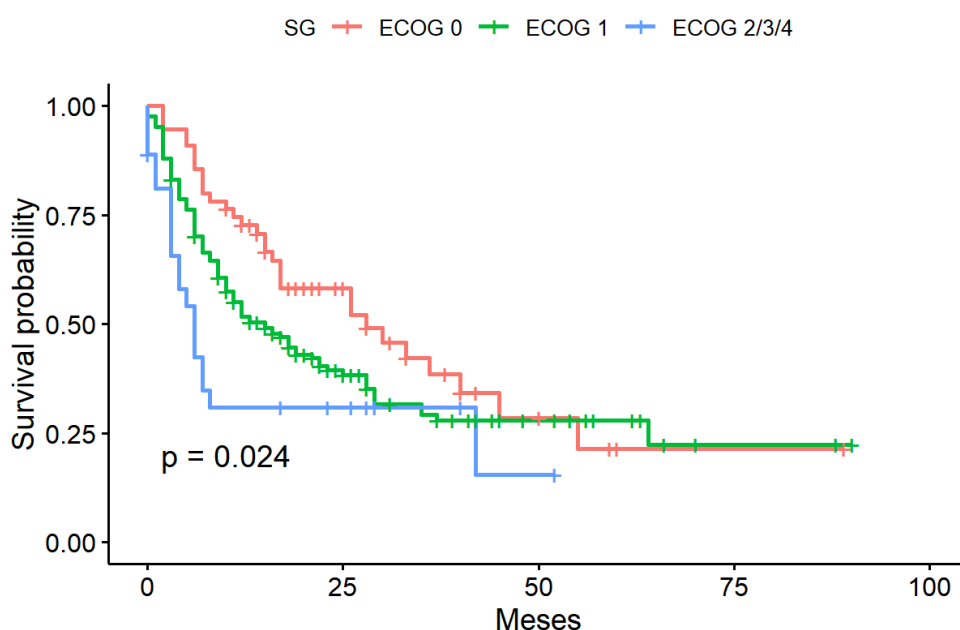


Figura 34. Representación gráfica de la SG en función del ECOG basal del paciente. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,024$).

Aquellos pacientes que presentaron al diagnóstico un **ECOG de 0** presentaron una mSLP de 12 meses (IC 95%: 7 a 18 meses), mientras que aquellos con un ECOG de 1 la mSLP fue de 8 meses (IC 95%: 6-9 meses), y en aquellos con un **ECOG 2/3/4** la mSLP fue de 4 meses (IC 95%: 3 a 8 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente

significativas entre los subgrupos ($p=0,1$). Respecto a la **mSG**, esta fue de 28 meses (IC 95%: 17-55 meses), 15 meses (IC 95%: 11 a 22 meses), y 6 meses (IC 95%: 3 meses a no alcanzada). **Las diferencias entre estos subgrupos fueron estadísticamente significativas** ($p=0,024$).

4.2.8 Eficacia por edad avanzada

Dado que la edad avanzada se ha relacionado con efectos de inmunosenescencia se decidió estudiar el efecto de edad avanzada en la eficacia del tratamiento. Para ello, se tomó el punto de corte de 70 años ($n=157$ en < 70 años; $n=90$ en ≥ 70 años) a pesa de la discrepancia entre estudios aprobatorios que han estratificado por 65 o 75 años. Las **Figuras 35 y 36** muestran los datos de SLP y SG.

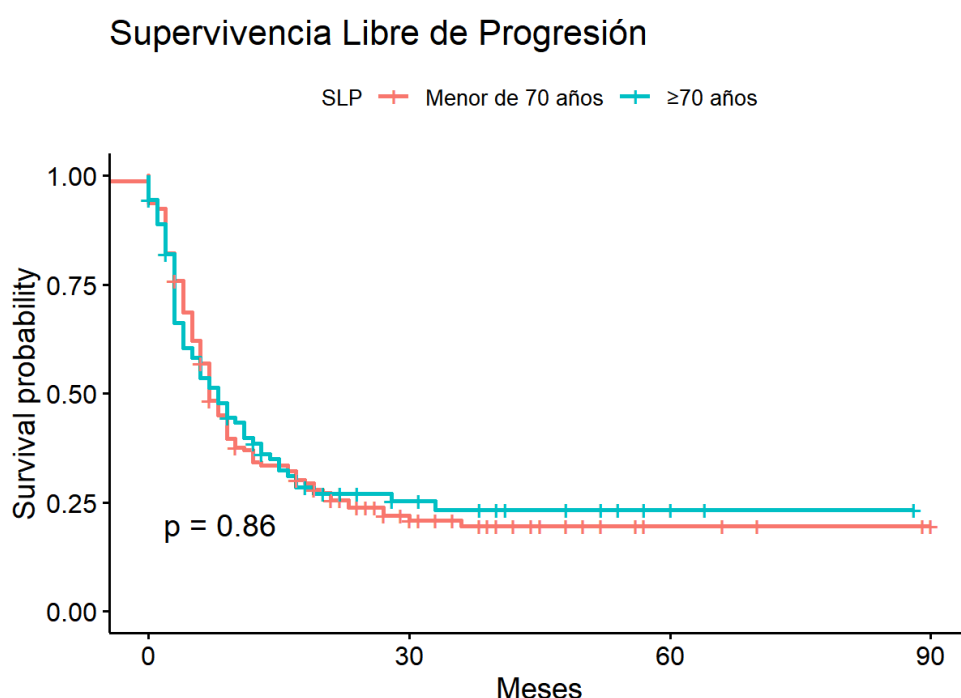


Figura 35. Representación gráfica de la SLP estratificado por edad superior o inferior a 70 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,86$).

En el grupo de pacientes con < 70 años la mSLP fue de 7 meses (IC 95%: 6 a 9 meses), mientras que el grupo de ≥ 70 años de edad fue de 8 meses (IC 95%: 5 a 13 meses). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($HR=1,03$; $p=0,86$). Respecto a la mSG, esta fue de 17 meses (IC 95%: 12 a 29 meses) y 15 meses (IC 95%: 10 a 25 meses) respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($HR=0,85$; $p=0,33$). **Por tanto, no se encontraron diferencias significativas ni en la SLP ni en la SG.**

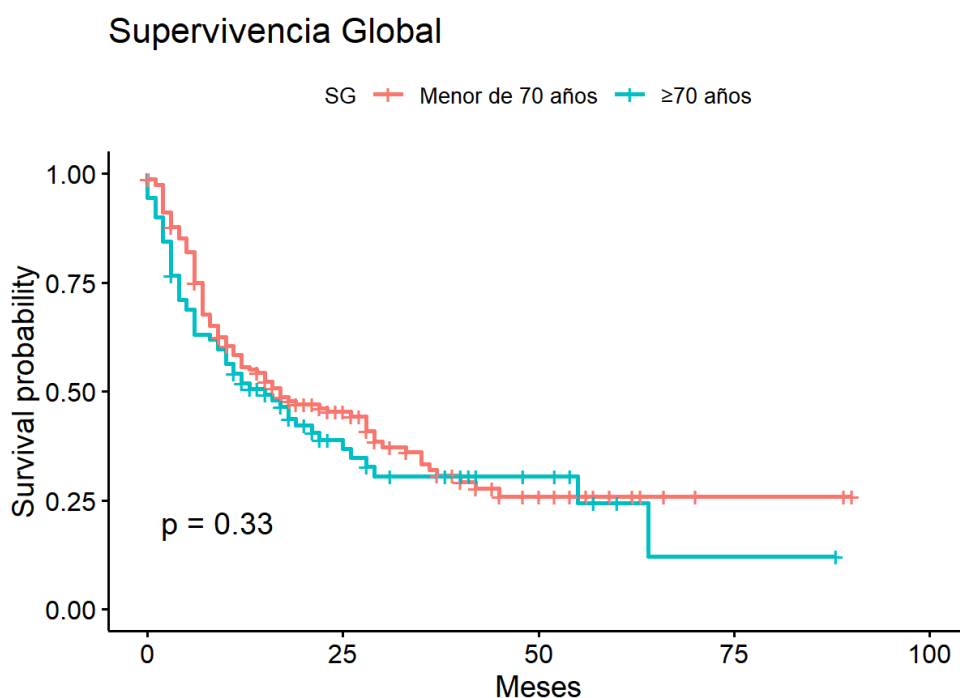


Figura 36. Representación gráfica de la SG estratificada por edad superior o inferior a 70 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,33$).

4.2.9 Eficacia por sexo

Dada la posible influencia de las diferencias en el sistema inmunológico en función del sexo se decidió estudiar el efecto en función de este parámetro. Las **figuras 37 y 38** muestran los datos de SLP y SG.

En el grupo de pacientes con sexo biológico femenino la mSLP fue de 7 meses (IC 95%: 5 a 12 meses), mientras que en los pacientes con sexo biológico masculino fue de 8 meses (IC 95%: 7 a 10 meses). No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($HR=1,1$; $p=0,58$). Respecto a la mSG, esta fue de 23 meses (IC 95%: 10 a 37 meses) y 15 meses (IC 95%: 11 a 21 meses) respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($HR=0,86$; $p=0,42$). **Por tanto, no se encontraron diferencias significativas ni en la SLP ni en la SG.**

Supervivencia Libre de Progresión

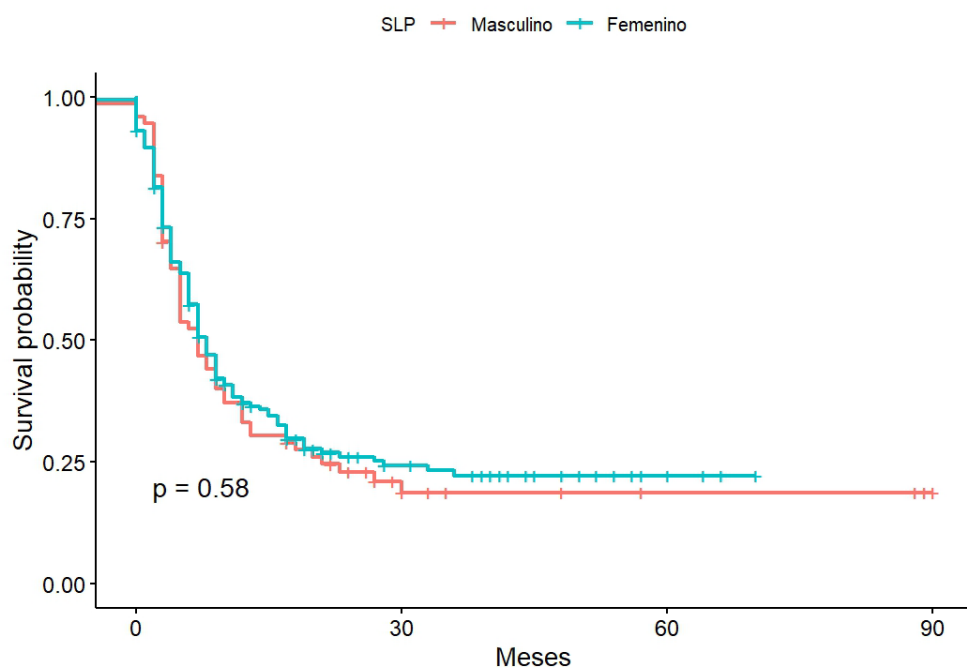


Figura 37. Representación gráfica de la SLP estratificada por sexo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,58$).

Supervivencia Global

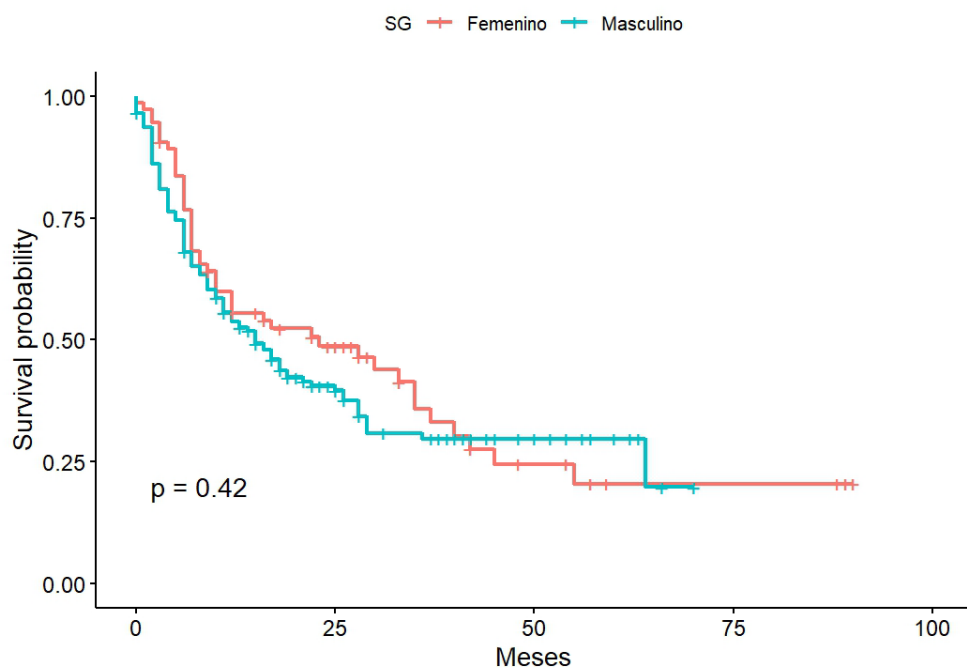


Figura 38. Representación gráfica de la SG estratificada por sexo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,42$).

4.2.10 Eficacia en función del número de comorbilidades

Se seleccionó como marcador subrogado de edad biológica más avanzada aquellos pacientes que presentaron más de 3 comorbilidades crónicas al diagnóstico ($n=158$), y se

comparó con aquellos pacientes que presentaban ≤ 2 comorbilidades (n=89). Las **Figuras 39 y 40** muestran los datos de SLP y SG.

Supervivencia Libre de Progresión

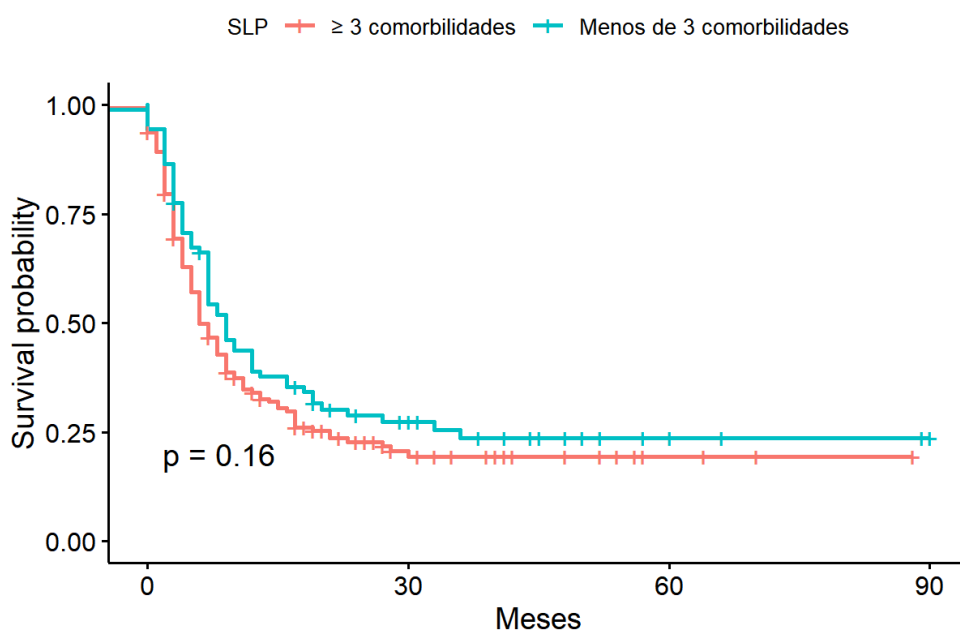


Figura 39. Representación gráfica de la SLP estratificada por la presencia o ausencia de ≥ 3 comorbilidades. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,16$).

Supervivencia Global

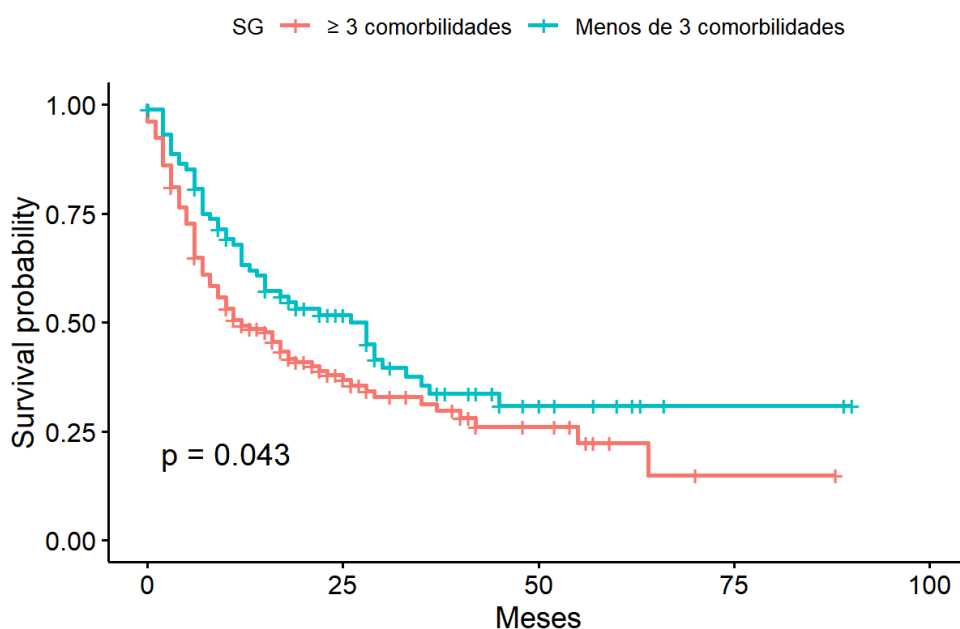


Figura 40. Representación gráfica de la SG estratificada por la presencia o ausencia de ≥ 3 comorbilidades. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,043$).

En el grupo de pacientes con <3 comorbilidades la **mSLP** fue de 9 meses (IC 95%: 7 a 13 meses), mientras que en aquellos pacientes con ≥ 3 comorbilidades fue de 6 meses (IC 95%: 5 a 9 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (HR 0,81; $p = 0,16$). Respecto a la **mSG** esta fue de 28 meses (IC 95%: 15 a 35 meses) y 12 meses (IC 95%: 9 a 19 meses), siendo **estas diferencias estadísticamente significativas** (HR=0,71; $p=0,04$).

4.2.11 Eficacia en función de polifarmacia

Otro de los factores que puede influir sobre la eficacia de los esquemas de tratamiento antineoplásicos y evolución del aCPCNP es la presencia de polifarmacia. Con el objetivo de estudiar su efecto, se clasificó los pacientes en aquellos que tomaban un número de fármacos <4 ($n=136$) y en aquellos que tomaban un número ≥ 5 ($n=111$). Las **Figuras 41 y 42** muestran los resultados de SLP y SG.

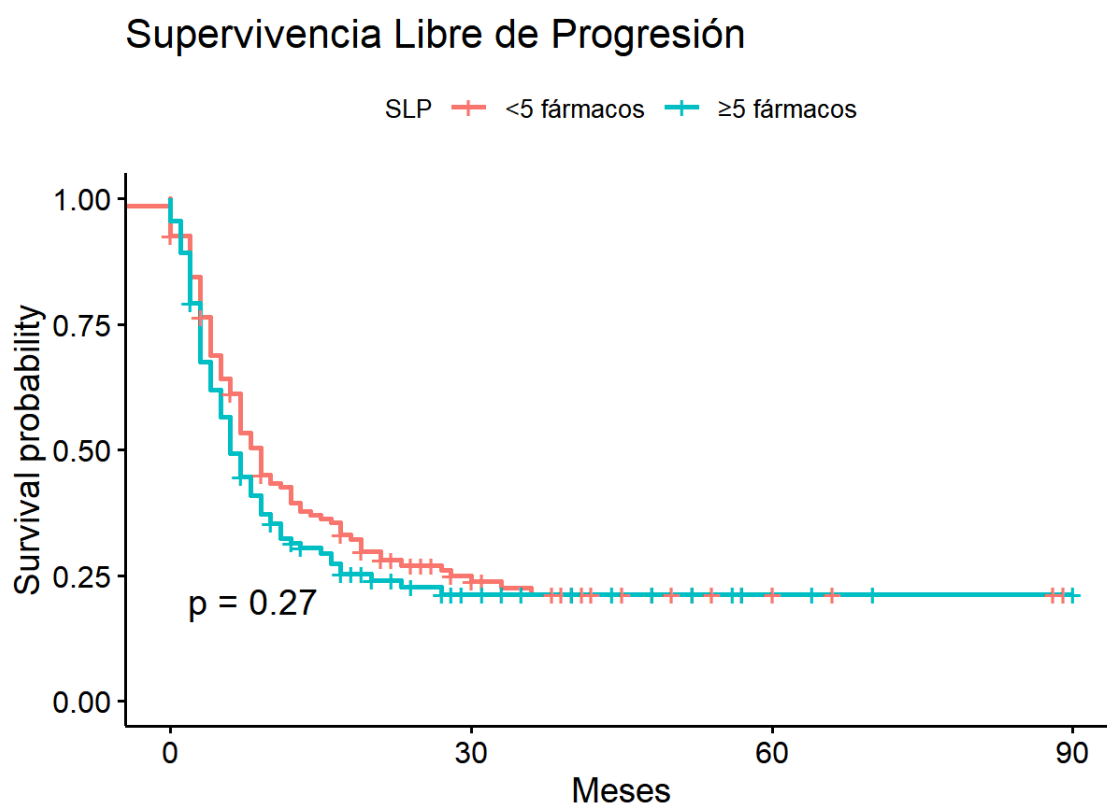


Figura 41. Representación gráfica de la SLP en función de la presencia o ausencia de polifarmacia en los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,27$).

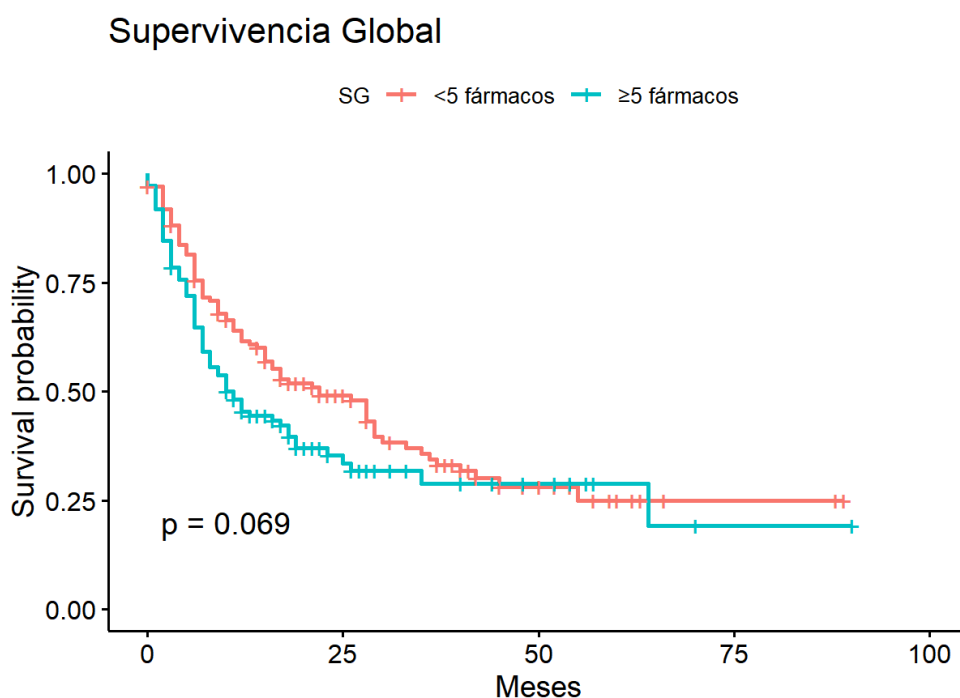


Figura 42. Representación gráfica de la SG en función de la presencia o ausencia de polifarmacia en los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,069$).

En aquellos pacientes con un consumo de menos de 5 fármacos de forma crónica la **mSLP** fue de 9 meses (IC 95%: 7 a 12 meses), mientras que aquellos pacientes con ≥ 5 fármacos la mSLP se situó en 6 meses (IC 95%: 5 a 9 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($HR=0,85$; $p=0,27$). En cuanto a la **mSG**, esta fue de 22 meses (IC 95%: 15 a 29 meses) y 11 meses (IC 95%: 8 a 19 meses) respectivamente. Estas diferencias no alcanzaron tampoco la significación estadística ($HR=0,75$; $p=0,07$). **En resumen, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las supervivencias estudiadas (SLP, SG).**

4.2.12 Eficacia en función de metástasis cerebrales

Dados los pocos datos disponibles de pacientes con metástasis cerebrales activas, se analizaron los datos de vida real que incluyeron pacientes que presentaban lesiones con estas características ($n=65$) y se compararon con aquellos pacientes sin metástasis cerebrales al inicio de la primera línea de tratamiento con IPCIs ($n=182$). Las **Figuras 43 y 44** muestran los datos de SLP y SG.

Supervivencia Libre de Progresión

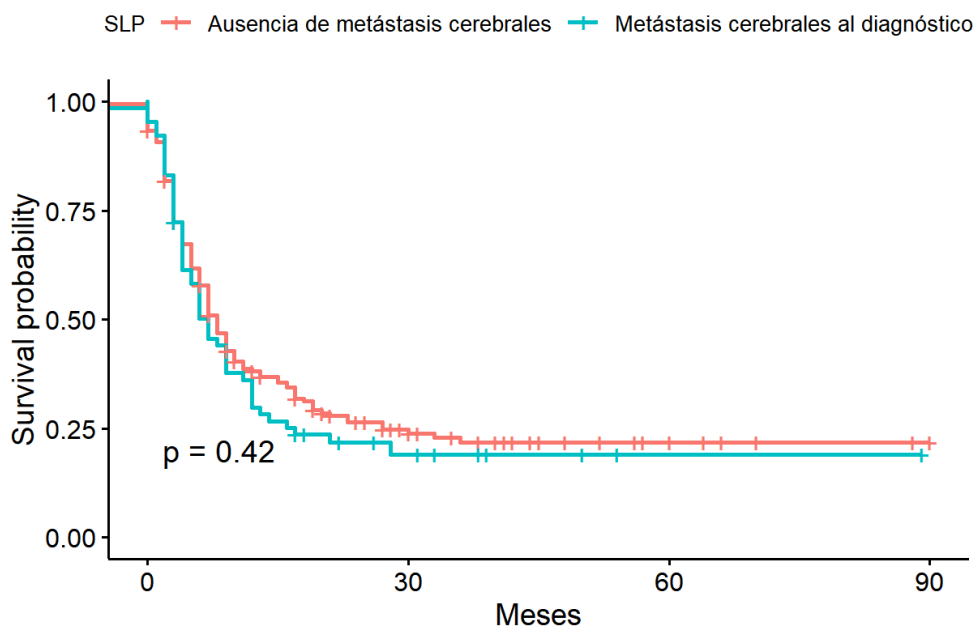


Figura 43. Representación gráfica de la SLP estratificado por la presencia o ausencia de metástasis cerebrales en los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,42$).

Supervivencia Global

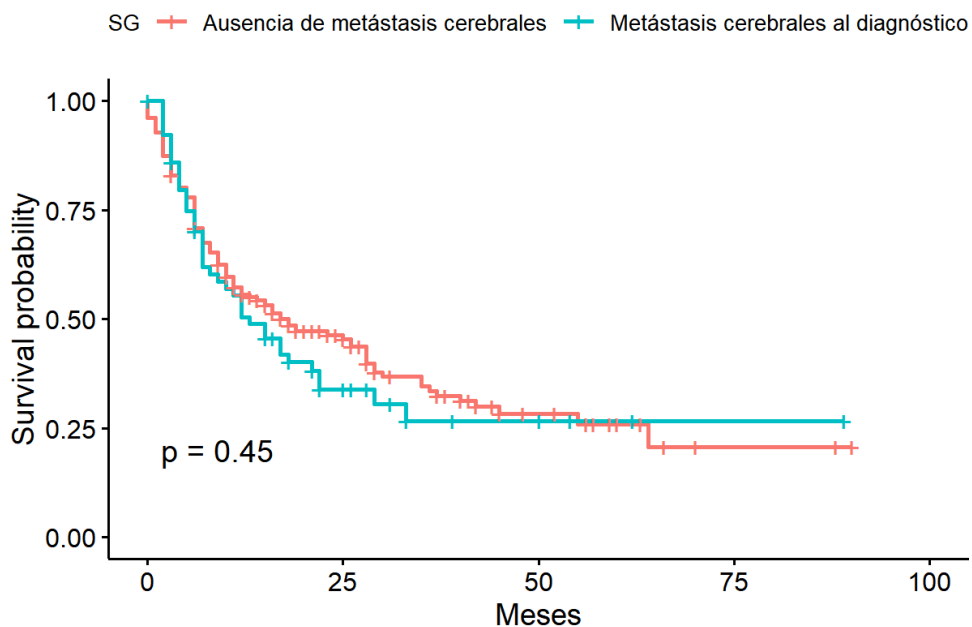


Figura 44. Representación gráfica de la SG estratificado por la presencia o ausencia de metástasis cerebrales en los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,45$).

En el grupo de pacientes sin metástasis cerebrales la **mSLP** fue de 8 meses (IC 95%: 7 a 10 meses) mientras que en aquellos con metástasis cerebrales fue de 7 meses (IC 95%:

5 a 12 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (HR=0,87; p=0,42). En relación con la **mSG**, esta se situó en 17 meses (IC 95%: 12 a 28 meses) y 13 meses (IC 95%: 8 a 22 meses) respectivamente, no siendo estas diferencias estadísticamente significativas (HR = 0,87; p = 0,45). **En resumen, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las supervivencias estudiadas (SLP, SG).**

4.2.13 Eficacia en función de la presencia de mutaciones sin tratamiento dirigido aprobado

Se valoró las diferencias en mSLP y mSG en aquellos pacientes en los que se detectó una mutación (n=40) que no presentaba un tratamiento dirigido aprobado en primera línea (KRAS, BRAF...) frente a aquellos en los que no se detectó (n=207). Las **Figuras 45 y 46** muestran las curvas de SLP y SG.

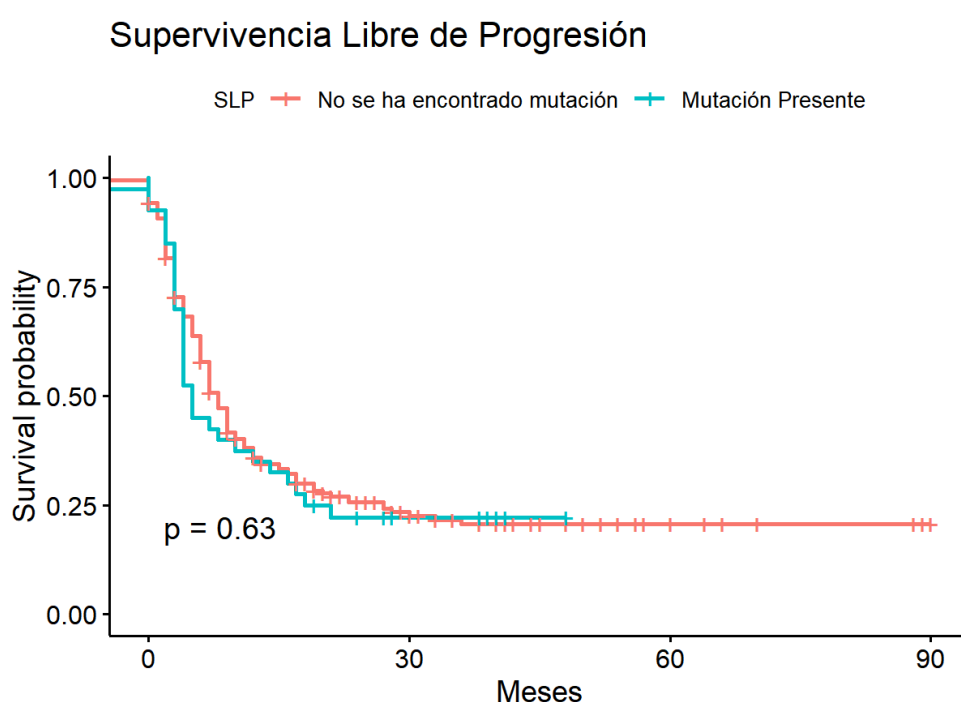


Figura 45. Representación gráfica de la SLP en función de la presencia o ausencia de mutaciones dirigidas sin tratamiento aprobado en primera línea. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p=0,63).

Supervivencia Global

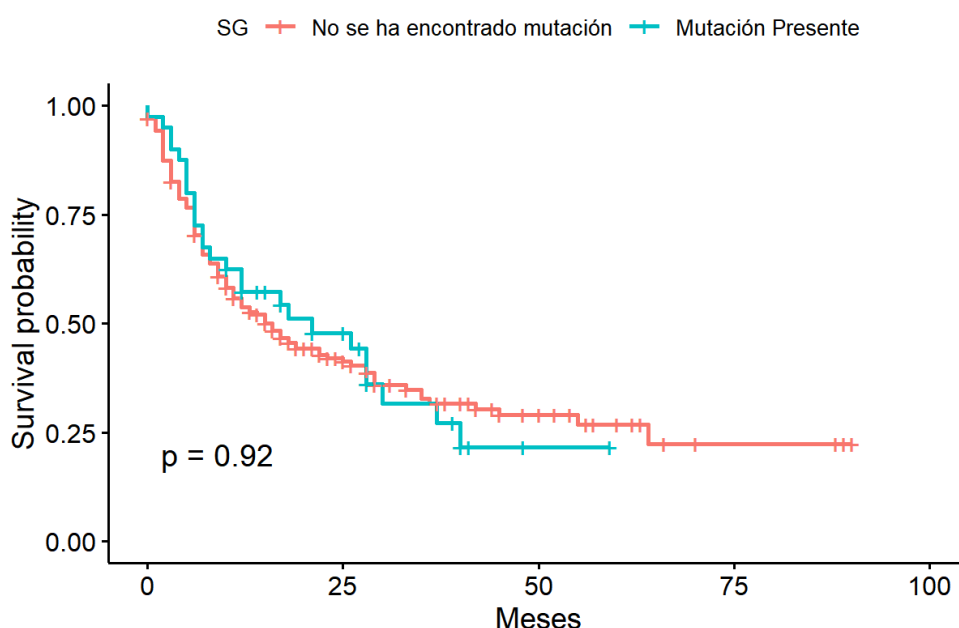


Figura 46. Representación gráfica de la SG en función de la presencia o ausencia de mutaciones dirigidas sin tratamiento aprobado en primera línea. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,92$).

Los pacientes que no presentaron una mutación sin tratamiento dirigido aprobado presentaron una **mSLP** de 8 meses (IC 95%: 7 a 9 meses), mientras que aquellos pacientes con una mutación de estas características presentaron una mSLP de 5 meses (IC 95%: 4 a 16 meses). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($HR=0,91$; $p=0,63$). Respecto a la **mSG**, esta fue de 16 meses (IC 95%: 11 a 23 meses) y de 21 meses (IC 95%: 10 a 40 meses) respectivamente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($HR=1,02$; $p=0,92$). **En resumen, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las supervivencias estudiadas (SLP, SG).**

4.2.14 Eficacia en pacientes que presentaron una toxicidad por IPCIs severa

Se ha planteado la asociación entre toxicidad secundaria a los IPCIs y respuestas prolongadas, por lo que se comparó aquellos pacientes que presentaron una toxicidad autoinmune que obligó a parar el tratamiento por IPCIs ($n=44$) con aquellos que no presentaron esta toxicidad ($n=203$). Las **Figuras 47 y 48** muestran los resultados de mSLP y mSG.

Supervivencia Libre de Progresión

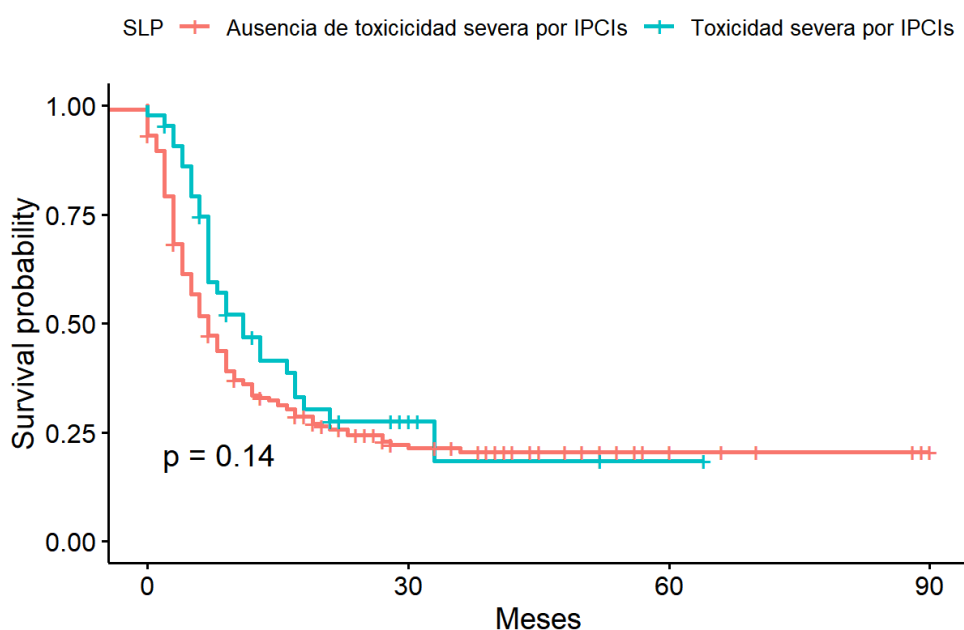


Figura 47. Representación gráfica de la SLP estratificada por aquellos pacientes que presentaron o no una toxicidad grave por inmunoterapia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,14$).

Supervivencia Global

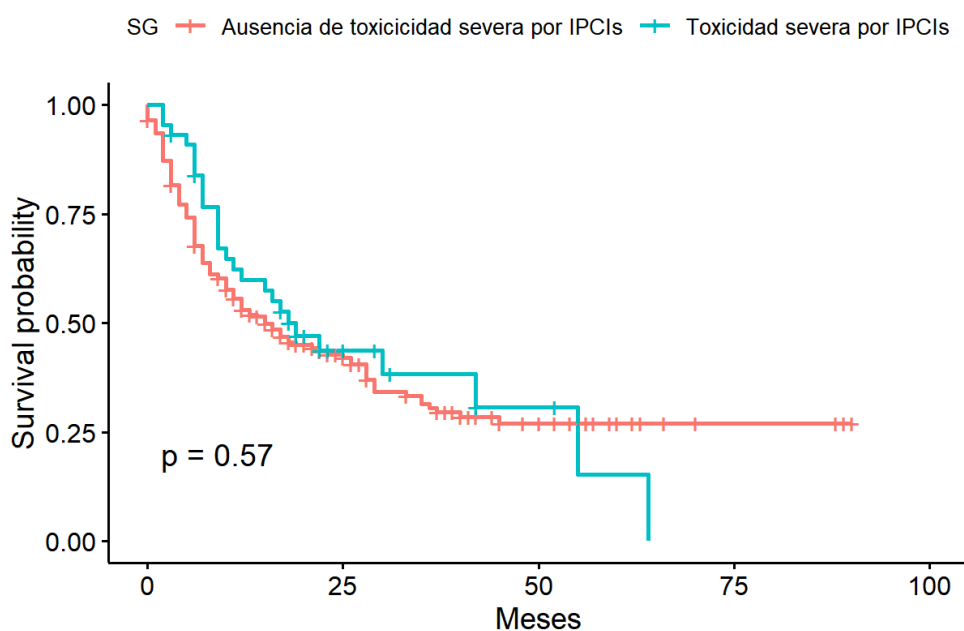


Figura 48. Representación gráfica de la SG estratificada por aquellos pacientes que presentaron o no una toxicidad grave por inmunoterapia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,57$).

Los pacientes que necesitaron discontinuar la inmunoterapia por una toxicidad inmunorrelacionada severa presentaron una mSLP de 11 meses (IC 95%: 7 a 18 meses),

mientras que aquellos que no lo necesitaron por no presentar toxicidad, o una más leve, tuvieron una mSLP de 7 meses (IC 95%: 6 a 9 meses). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (HR=0,75; p=0,14). En relación con la mSG, esta fue de 19 meses (IC 95%: 11 meses a no alcanzada) y 15 meses (IC 95%: 11 a 25 meses), sin que esta diferencia fuera estadísticamente significativa (HR=0,88; p=0,57). **En resumen, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las supervivencias estudiadas (SLP, SG).**

4.2.15 Eficacia en función del nivel de expresión de PD-L1

Para evaluar el único biomarcador utilizado en la práctica clínica en este escenario, la expresión tumoral de PD-L1, se comparó los pacientes en función de la expresión de PD-L1. Con este objetivo se dividió a los pacientes en: PD-L1 negativo (n=88), positivo (1-49%; n=71), y altos expresores ($\geq 50\%$; n=88). Las **Figuras 49 y 50** muestran los datos de mSLP y mSG.

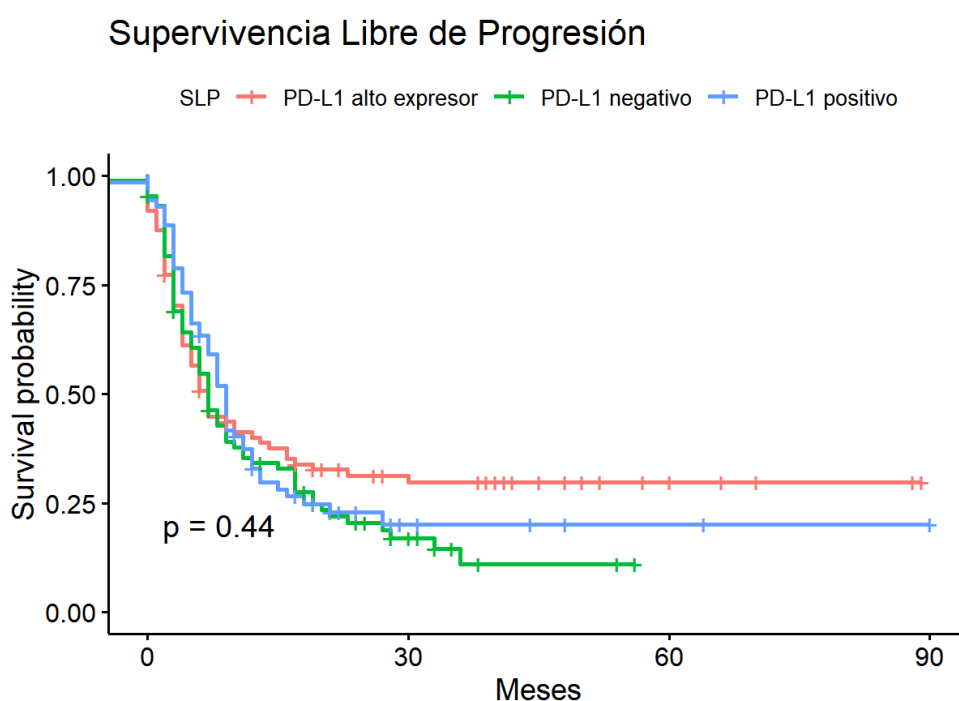


Figura 49. Representación gráfica de la SLP estratificado por la expresión tumoral de PD-L1 de los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p=0,44).

Supervivencia Global

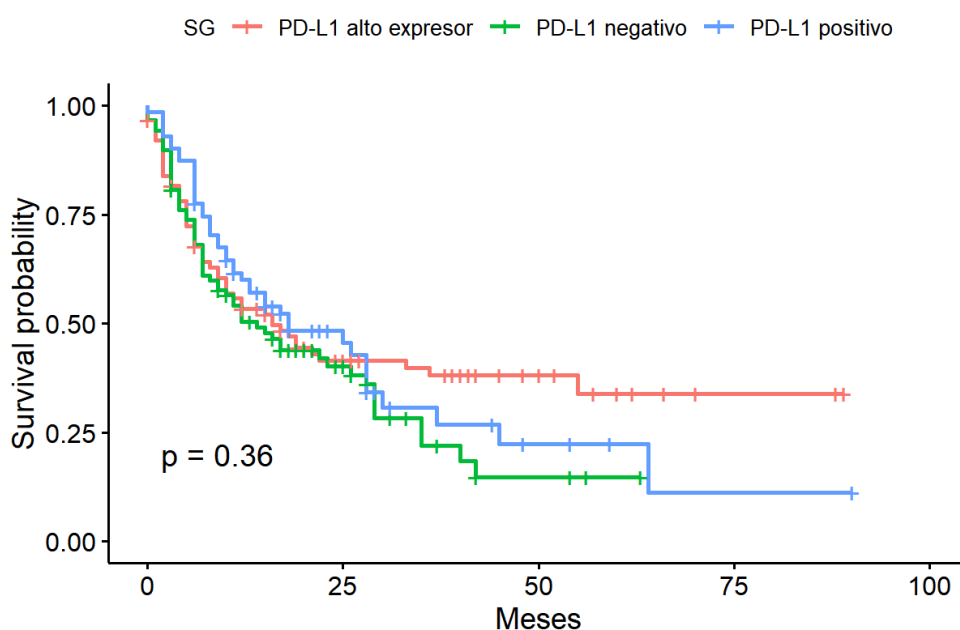


Figura 50. Representación gráfica de la SG estratificado por la expresión tumoral de PD-L1 de los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,36$).

En los pacientes con un PD-L1 negativo la **mSLP** fue de 7 meses (IC 95%: 6 a 10 meses), en aquellos con PD-L1 positivo fue de 9 meses (IC 95%: 7 a 12), y en aquellos con alta expresión de PD-L1 fue de 7 meses (IC 95%: 5 a 14 meses). Estas diferencias entre los subgrupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0,44$). Respecto a la **mSG**, los resultados fueron de 14 meses (IC 95%: 9 a 28 meses), 18 meses (IC 95%: 12 a 30), y de 16 meses (IC 95%: 10 a 55 meses) respectivamente. Estas diferencias entre los subgrupos no fueron estadísticamente significativas ($p=0,36$). **En resumen, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las supervivencias estudiadas (SLP, SG).**

5 Discusión

5.1 Búsqueda de biomarcadores de respuesta a IPCIs en el tratamiento de primera línea del aCPCNP

En los últimos años se han propuesto diferentes marcadores moleculares tumorales y del estroma para anticipar la eficacia de la inmunoterapia en el aCPCNP. Sin embargo, **solo la expresión tumoral de PD-L1 ha llegado a la práctica clínica** [27,28], a pesar de sus limitaciones conocidas [18,107,114]. Por ello, existe la necesidad clínica de encontrar marcadores menos invasivos y rentables para identificar de una forma más segura qué pacientes con CPCNP se beneficiarán de recibir IPCIs en monoterapia o combinados con quimioterapia. Recientemente, como se ha comentado en la introducción, se ha destacado que, además de los linfocitos T, otras células inmunes desempeñan un papel importante, no solo en la vigilancia inmunitaria del cáncer [222–224], sino también en la definición de la eficacia de los IPCIs [223–226]. En el análisis de la cohorte prospectiva examinamos si las principales poblaciones de células inmunes periféricas a partir de una biopsia líquida en sangre basal tienen una relación con la SLP y la SG al emplear IPCIs, combinados o no con quimioterapia, en el tratamiento del CPCNP.

Considerando que, en la mayoría de los países europeos, la selección de IPCIs combinados o no con quimioterapia como tratamiento del aCPCNP en primera línea se basa principalmente en la expresión de PD-L1, decidimos evaluar por separado estas dos cohortes de aCPCNP. Para ello agrupamos los pacientes reclutados en: i) pacientes que recibieron IPCIs en monoterapia (PD-L1 $\geq$ 50%) y ii) aquellos tratados con IPCIs combinados con quimioterapia (PD-L1 < 50%). Nuestras dos cohortes fueron comparables en términos de sus características demográficas y variables clínicas básicas, excepto por la expresión de PD-L1 (**Tabla 5**). Sin embargo, **las dos cohortes seleccionadas presentaron una mSG menor en comparación con los datos de los ensayos clínicos de aprobación de IPCIs** [7–9,12,13,37,38,42]. En nuestra cohorte la mSG fue de 14 meses, frente a los 19–26 meses de dichos ensayos. Una posible explicación a este hecho podría ser que, los pacientes fueron incluidos independientemente de la localización de las metástasis o un peor estado general al diagnóstico, medido por el ECOG o el número de comorbilidades. Además, en nuestro estudio se combinaron los datos de pacientes con histología escamosa y no escamosa. Tal y como comentaremos en los datos de la cohorte de vida real, nuestros criterios de inclusión representan un escenario de datos del mundo real, con **tasas de supervivencia comparables a otras series de datos del mundo real publicadas** [227,228].

Existe, por tanto, la necesidad de disponer de biomarcadores capaces de predecir la respuesta al tratamiento en primera línea de aCPCNP. Nuestro objetivo era comprobar si las poblaciones celulares circulantes obtenidas por biopsia líquida de sangre periférica, un procedimiento poco invasivo, estaban asociadas o no con la SLP y la SG. Con este fin se realizó una citometría de flujo de estas poblaciones celulares, estudiándose si sus niveles basales estaban relacionados con la predicción de la SLP y SG en pacientes que recibieron IPCIs en primera línea de tratamiento.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles basales de las poblaciones celulares circulantes, y se excluyeron los niveles más bajos de linfocitos T CD8+ en la cohorte de IPCIs más quimioterapia, en comparación con los sujetos sanos y la cohorte de monoterapia con IPCIs. Esto descartó cualquier sesgo basal que pudiera desviar los modelos matemáticos para asociar las poblaciones celulares con la SLP y la SG.

Basándonos en una **probabilidad bayesiana de efecto > 90%**, se seleccionaron los **monocitos clásicos** para la cohorte de **monoterapia**, mientras que las **células NK y los linfocitos T CD4+** fueron seleccionados para la cohorte de **IPCIs combinados con quimioterapia**. Como se ha mencionado previamente, otras variables relacionadas con el deterioro funcional, como el estado funcional (ECOG) o la presencia de enfermedad del sistema nervioso central, tienen un impacto significativo en la SLP y la SG [229,230]. Sin embargo, se decidió no incluirlas en nuestro enfoque de creación de un modelo sencillo adaptable a la clínica, ya que el objetivo era centrarse específicamente en el poder predictivo de las células inmunes circulantes y desarrollar una herramienta sencilla de análisis. Como única excepción, se incluyó el uso de corticoides, debido a su conocido impacto en los niveles de células inmunes circulantes [231] y en la posible eficacia de los IPCIs en el tratamiento del CPCNP [232,233]. Además, la inclusión de corticoides mejoró el rendimiento del modelo, aumentando el índice de concordancia (C-Index) entre 0,1 y 0,2 (**Tabla 12**).

En cuanto al uso de **IPCIs en monoterapia**, los monocitos clásicos fueron seleccionados como el principal predictor, confirmando que la adición de quimioterapia modifica el sistema inmunológico periférico, y que diferentes actores pueden intervenir en ambas cohortes. Este hallazgo **podría estar relacionado con la asociación reportada entre los macrófagos M2 inmunosupresores y una peor respuesta a los IPCIs** [234]. Este fenómeno puede no afectar a la cohorte de combinación, ya que los macrófagos M2 podrían ser modulados o eliminados por la quimioterapia. Las células NK y los linfocitos T CD4+ periféricos no predicen la respuesta a los IPCIs en monoterapia, lo que puede estar asociado con la presencia de células NK exhaustas y pocos linfocitos T CD4+ estimulantes [235]. Estas células exhaustas podrían renovarse en la cohorte de combinación debido a los efectos previamente mencionados de la quimioterapia sobre la respuesta inmunitaria [113,236,237].

La diferente selección de las poblaciones celulares según la cohorte de CPCNP analizada, dependiente de la expresión tumoral de PD-L1, puede explicarse parcialmente por el impacto conocido de la quimioterapia en el sistema inmune. Este tratamiento mejora la vigilancia inmunitaria contra las células tumorales [238,239] y se ha sugerido que su combinación con IPCIs puede generar un efecto aditivo o sinérgico al renovar el reservorio de PBMCs, eliminar células inmunes exhaustas, fomentar el crecimiento de nuevas células efectoras y generar nuevos neoantígenos que desencadenen una respuesta inmunitaria [113,236,237].

Las **células NK y los linfocitos T cooperan para restringir el crecimiento tumoral**, subrayando el papel de las células NK en la configuración de respuestas inmunes adaptativas contra el cáncer. De hecho, se ha encontrado una mayor incidencia de neoplasias en pacientes con disfunción de las células NK, y una actividad periférica disminuida de estas células se asocia con un aumento en la incidencia de carcinomas [240]. Aunque el objetivo de este estudio no fue proporcionar información mecanicista, los datos publicados indican que los linfocitos T CD4+ en conjunto con las células NK pueden maximizar el efecto antitumoral, lo que respalda nuestros hallazgos [241].

El siguiente paso una vez seleccionadas las poblaciones celulares que mostraron una asociación con la respuesta fue la **modelización de los datos y el desarrollo de un modelo de fácil interpretación continuo** que prediga la respuesta a los IPCIs de los pacientes con aCPCNP, el **modelo ICIRS**. Se desarrollaron diferentes modelos para ambos esquemas de tratamiento (IPCIs en monoterapia o combinados con quimioterapia). Estos modelos permiten calcular de forma continua y personalizada la probabilidad de SLP y SG a un tiempo dado. En general, los modelos predictivos diseñados para evaluar la respuesta a los IPCIs en monoterapia mostraron un menor poder de predicción, con un C-Index de 0,64 y 0,65 para la SLP y SG, frente al C-Index de 0,74 y 0,75 en pacientes que recibieron IPCIs combinados con quimioterapia. Los modelos desarrollados fueron integrados en el sistema ICIRS, que estima las probabilidades de progresión y supervivencia en un momento dado. Estos modelos están basados en ecuaciones matemáticas fácilmente interpretables y que se pueden inferir de forma manual, permitiendo que el **sistema ICIRS estime las probabilidades de progresión y supervivencia para todos los escenarios de forma unificada**. Además, se desarrolló una **calculadora web de acceso abierto** (https://remote.iislafe.san.gva.es/sample-apps/icirs_score/) para facilitar la implementación clínica del sistema ICIRS. La calculadora ofrece por defecto la SLP a los 6 y 12 meses y la SG a los 12 y 24 meses, aunque también se pueden usar otros intervalos de tiempo.

Como principales ventajas del modelo ICIRS encontramos una valoración continua de múltiples variables de forma integrada, y la posibilidad de plantear ante un paciente determinado las estimaciones con el modelo de IPCIs en monoterapia o el de IPCIs combinados con quimioterapia. Como desventajas, encontramos que el modelo ofrece estimaciones de probabilidades, y a pesar de que la estimación sea acertada, los casos extremos pueden diferir con respecto a dichas estimaciones.

Como se ha mostrado en los resultados el ICIRS también permite el uso de **puntos de corte**, aunque presenta el sesgo de no dar una valoración continua del caso. De hecho, en caso de realizar un código de bucle de Kaplan-Meier y regresión de Cox por RStudio, existirían múltiples fluctuaciones en estos puntos de corte (p. ej. que la HR descienda a 0,30 en un porcentaje determinado, suba a 0,40 en el siguiente, y vuelva a bajar a 0,30 en otro), existiendo la posibilidad de elegir múltiples porcentajes de poblaciones celulares. En el caso de incluir más de dos variables, no puede encontrarse un área bajo la curva

óptima. Aunque hemos demostrado que se pueden aplicar valores de corte preestablecidos para las variables seleccionadas, recomendamos usar el sistema ICIRS, ya que proporciona una evaluación más personalizada, siendo una herramienta para realizar medicina de precisión. Actualmente, los biomarcadores clínicos se basan principalmente en puntos de corte de laboratorio que clasifican a los pacientes en subgrupos, lo que finalmente dicta el tratamiento a aplicar. Por ejemplo, un paciente con aCPCNP con una expresión de PD-L1 del 49% recibiría IPCIs combinados con quimioterapia, mientras que otro con una expresión del 50% recibiría IPCIs en monoterapia. Es razonable admitir que esta diferencia mínima no debería determinar el tratamiento a utilizar. Además, se ha reportado que pacientes con altos valores de expresión de PD-L1 que no responden a los IPCIs en monoterapia podrían beneficiarse de la quimioterapia [7,14,34,242]. Tras su validación, el sistema ICIRS podría ser útil para decidir si el uso de quimioterapia es aconsejable o no. En la mayoría de los hospitales europeos, un paciente con una expresión de PD-L1 > 50% recibiría IPCIs en monoterapia [27,28]. **A modo de ejemplo, un paciente seleccionado** aleatoriamente de nuestra cohorte con una expresión de PD-L1 > 50% recibió IPCIs en monoterapia y presentó una SLP y SG de 6 meses y 18,21 meses, respectivamente. El sistema ICIRS, basado en los porcentajes reales de células NK, células T CD4+ y monocitos (17,9% y 19,48%), proporcionaría una probabilidad de no progresión a los 12 meses del 28,39% (IC 95%: 19,37 a 39,04) para IPCIs en monoterapia, y del 51,11% (IC 95%: 36,3 a 65,78) para IPCIs combinados con quimioterapia. **El análisis de las probabilidades obtenidas sugiere que emplear quimioterapia en combinación con IPCIs podría haber sido una mejor opción para retrasar la progresión del paciente.**

En comparación, estudios previos han evaluado subgrupos de células circulantes en sangre periférica como posibles biomarcadores, pero han mostrado limitaciones críticas que dificultan su traslación a la clínica. Entre estas limitaciones se incluyen: el uso de un número reducido de pacientes [204,205,243]; la heterogeneidad en las características de las cohortes (por ejemplo, inclusión de pacientes independientemente del número de líneas de tratamiento previas recibidas, o la falta de separación entre pacientes que recibieron IPCIs en monoterapia o combinados con quimioterapia) [204–209]; el uso de metodologías difíciles de implementar en la práctica clínica [204,206,210]; o la utilización de IPCIs que no están aprobados por la FDA o la EMA para el tratamiento del CPCNP [244]. Con el objetivo de solventar alguna de estas limitaciones, en nuestro grupo de investigación decidimos plantear un modelo que fuera **fácil de implementar en la práctica clínica, y que no requiriera realizar técnicas complejas de integrar en un sistema sanitario** (p. ej. detección de subgrupos celulares muy concretos). Para ello se buscó realizar un procedimiento poco invasivo y que se pueda realizar de forma homogénea en centros de nivel primario, secundario o terciario. El modelo ICIRS requiere únicamente la realización de una citometría de flujo, procedimiento ya integrado en la mayoría de los hospitales, y el uso del modelo ICIRS para el cálculo de las probabilidades de supervivencias. Una de las principales debilidades de los estudios que han publicado datos de poblaciones celulares en biopsia líquida de sangre periférica es la complejidad

de las técnicas que realizaron, puesto que no se usan en la práctica clínica asistencial [169,204,206,209,210]. A pesar de que su uso no está extendido a nivel de la práctica clínica en la oncología médica, las poblaciones celulares necesarias están implementadas en la citometría de flujo en las unidades de enfermedades infecciosas que llevan el seguimiento de paciente con virus de inmunodeficiencia humano [245,246], y en los servicios de hematología para el seguimiento de pacientes con neoplasias hematológicas [247–249].

En los últimos años se han planteado diversos modelos predictivos basados en parámetros inflamatorios obtenidos a partir de biopsia líquida de sangre periférica [212,213,250], aunque solo unos pocos se han probado en el escenario de primera línea de tratamiento de pacientes tratados con IPCIs. El problema del uso del dNLR o el modelo GRim es que están preparados para valorar si un paciente se beneficiaría más del uso de IPCIs en monoterapia o de quimioterapia, algo que queda obsoleto en el escenario actual, puesto que actualmente la duda radica en si utilizar IPCIs en monoterapia, o combinados con otros fármacos. En cambio, el modelo ICIRS cuenta con poblaciones homogéneas de primera línea de tratamiento, incluyendo pacientes tratados con combinación de IPCIs y quimioterapia, tiene en cuenta las variables de forma continua al haber aplicado estadística bayesiana, evitando los sesgos de los puntos de corte de la estadística frecuentista, y tiene la fortaleza de que puede perfeccionarse con la validación y aplicación del modelo en otras cohortes similares puesto que en la estadística bayesiana se puede mejorar la precisión del modelo con la incorporación de datos sucesivos de cohortes.

En resumen, **nuestro modelo sería el primero que tiene en cuenta la personalización y separación entre IPCIs en monoterapia e IPCIs combinados con otros fármacos** (principalmente quimioterapia), y permitiría diferenciar aquellos pacientes que se beneficiarían de una u otra actuación en mayor medida, respondiendo a la duda que hay planteado en el paradigma actual de la primera línea en el aCPCNP. Además, su implementación clínica es muy sencilla y permitiría su uso generalizado.

Para facilitar su uso, además de dejar los datos de las ecuaciones utilizadas para que se pueda analizar cualquier otra cohorte, se desarrollaron nomogramas (**Figuras 20, 21, 22 y 23**) que simplificaran el cálculo, y una aplicación web (https://remote.iislafe.san.gva.es/sample-apps/icirs_score/).

El sistema ICIRS se basa en un análisis simple de citometría, gestión automática de datos y es fácilmente adaptable a la práctica clínica. Sin embargo, para su implementación clínica, **el ICIRS debe ser validado** de manera más exhaustiva. Es necesario probarlo en otros escenarios clínicos en los que la expresión tumoral de PD-L1 no se utilice para la estratificación de pacientes con CPCNP. Quizás, con la reciente financiación del esquema de carboplatino-pemetrexed/paclitaxel-cemiplimab en todos los pacientes, independientemente de la expresión tumoral de PD-L1, se puede valorar en un contexto sin expresión tumoral de PD-L1.

Además, las predicciones para los IPCIs en monoterapia son menos precisas y deben refinarse mediante la inclusión de un mayor número de pacientes, lo que permitiría recalcular los coeficientes del modelo. A pesar de sus limitaciones, hasta donde sabemos, el ICIRS no solo representa el primer intento de modelar los niveles pretratamiento de poblaciones específicas de células periféricas como biomarcadores personalizados de respuesta a IPCIs, combinados o no con quimioterapia en el tratamiento del aCPCNP, sino también una herramienta futura que podría ayudar a tomar decisiones médicas sobre si utilizar IPCIs en monoterapia o IPCIs combinados con quimioterapia.

5.2 La necesidad de datos de vida real para optimizar el tratamiento del aCPCNP con IPCIs

El aCPCNP ha experimentado una revolución con la entrada de los IPCIs en primera línea de tratamiento, consiguiendo que un 20-30% de pacientes que debutan con una enfermedad avanzada/metastásica puedan encontrarse en una situación en la que la enfermedad está cronificada a largo plazo, e incluso en respuesta completa. Sin embargo, estos ensayos clínicos [9,10,34,35,38] arrojaron múltiples dudas, que se han comentado previamente en la introducción, como la ausencia de biomarcadores fiables [28,104], dudas en el perfil de paciente que se beneficia en mayor medida del uso de IPCIs, o cuál es el esquema más adecuado que se debería utilizar en cada situación. Uno de los puntos en los que más se debería realizar hincapié es en **el perfil de pacientes**, sobre todo aquellos que están **infrarrepresentados en los ensayos clínicos**: pacientes de edad avanzada, pacientes con un gran número de comorbilidades, o pacientes con metástasis cerebrales [200,251]. Otro punto clave pendiente de aclarar es la búsqueda del mejor **fármaco con el que combinar los IPCIs**, sea quimioterapia o nuevos IPCIs. Actualmente están en marcha distintos ensayos clínicos para tratar de responder esta cuestión [252,253], aun así el número de ensayos destinados a encontrar el mejor esquema de combinación de quimioterapia es bajo. Por tanto, los únicos datos disponibles se han extraído por comparación de diferentes ensayos en revisiones sistemáticas y metaanálisis [254,255]: Peng *et al.* plantean en base a un meta-análisis por una red bayesiana analizar cuál es la mejor opción de tratamiento para pacientes con aCPCNP con PD-L1 negativo, a partir de 14 posibles regímenes [254]. Tras analizar todos, se llegó a la conclusión de que el grupo de IPCIs sumados a quimioterapia y anti-VEGF o anti-CTLA-4 presentaron un mayor beneficio (probabilidad del 72,9%). Liu *et al.* realizaron otro metaanálisis por red bayesiana en el que buscaron analizar las estrategias de tratamiento de primera línea de aCPCNP tratados con IPCIs [255]. A partir de 16 estudios y 10 combinaciones de IPCIs se planteó que los pacientes tratados con anti-PD-1 se asociaban con una mayor supervivencia que los fármacos anti-PD-L1, y entre los anti-PD-1, la combinación de quimioterapia con pemetrexed o con anti-CTLA-4 fue superior. Estos estudios pueden servir de guía, pero presentan múltiples sesgos, a destacar el sesgo de comparar múltiples ensayos diferentes. Nuestro análisis de datos de vida real se plantea en un escenario de

práctica clínica habitual, lo que permitirá discernir de una forma óptima el uso de los IPCIs en un hospital de tercer nivel, fuera del contexto restrictivo de un ensayo clínico.

Los ensayos aprobatorios que incluyeron pacientes con IPCIs o IPCIs en combinación con quimioterapia mostraron mSG muy prolongadas en comparación con otros estudios de datos de vida real o nuestra cohorte [227,228,256], del orden de 22-26 meses, con un grupo de pacientes (20-30%) que presentaron supervivencia a más de 5 años [7,8,37,38,42]. Sin embargo, **los datos de vida real con estos tratamientos sugieren que probablemente la mPFS y mSG sean inferiores** a las de los pacientes incluidos en ensayos clínicos aprobatorios [8,9,35,37,38].

En el caso de nuestra cohorte las variables basales estaban bien balanceadas y fueron comparables, a excepción de la expresión de PD-L1 (dadas las aprobaciones de los esquemas de IPCIs en monoterapia y en combinación). Dado que no se estableció ningún filtro/limitación en los criterios, permitiendo la entrada de todos aquellos pacientes tratados con IPCIs (con monoterapia o en combinación con quimioterapia), los datos están más cercanos a aquellos estudios que apuntan a una mSLP y mSG a la baja. **La mSLP y mSG de nuestra cohorte fue inferior** a los datos disponibles de los ensayos clínicos aprobatorios; esto podría deberse a la presencia de factores en los pacientes que podrían afectar la eficacia de los IPCIs, como la presencia de metástasis cerebrales activas, pacientes con un ECOG >1, pacientes con un mayor número de comorbilidades, y, en general, el presentar pacientes que se salgan de los rígidos criterios de un ensayo clínico.

En los últimos años se han reportado otras cohortes de vida real: *Hektoen et al.* [227] publicó los resultados de todos los pacientes de Noruega, incluyendo 1179 pacientes con aCPCNP tratados con IPCIs en monoterapia y 1074 pacientes tratados con IPCIs combinados con quimioterapia, la mSG de la población de primera línea fue inferior a la de los ensayos clínicos aprobatorios, situándose en 13,8 meses en la cohorte de IPCIs en monoterapia, y 12,8 meses en la cohorte de IPCIs combinados con quimioterapia. Al revisar las variables basales de la población, observamos que existen múltiples diferencias con los ensayos clínicos aprobatorios, incluyendo los mismos factores que hemos descrito en nuestra cohorte, como la presencia de metástasis cerebrales activas, y pacientes con un peor estado general medido por ECOG al principio del tratamiento. Otro estudio a nivel nacional en Estados Unidos publicado por *Waterhouse et al.* [256] incluyó 7312 pacientes con aCPCNP, de los que 3041 recibieron IPCIs en monoterapia y 4271 IPCIs combinados con quimioterapia. Entre los pacientes que recibieron IPCIs en monoterapia la mSG fue de 11,3 meses en pacientes con aCPCNP escamoso, y de 14,1 meses en pacientes con tumores no escamosos. Entre los pacientes que recibieron IPCIs en combinación con quimioterapia la mSG fue de 10,6 meses en caso de histología no escamosa, y de 12 meses en histología escamosa. Al valorar las características basales, y salvando las distancias con la diferencia de los sistemas sanitarios entre cada país, observamos de nuevo la presencia de pacientes con unas características basales peores que las de los pacientes de los ensayos clínicos aprobatorios, con metástasis cerebrales activas, edad más avanzada, o

presencia de ECOG >1. Otros estudios, a nivel nacional o de poblaciones concretas, reportan una mSG que varía desde 10 meses a 23 meses [228,257–259]. Sin embargo, al entrar en detalle en las variables basales, aquellos que están más cercanos a los datos de los ensayos aprobatorios, son cohortes reducidas (no realizadas a nivel nacional) que tienen un gran número de pacientes con ECOG 0/1, población más joven, o pacientes con una alta expresión tumoral de PD-L1. Por tanto, planteamos la duda de si estos datos serían datos de vida real, o si también reflejarían una cohorte restringida y sesgada.

Como principales justificaciones para estas diferencias planteamos que los pacientes tratados en **práctica clínica general presentan tumores más agresivos** que impedirían un proceso de *screening* en un ensayo clínico, un peor estado general en varias ocasiones, y elementos clínicos que serían de exclusión para el ensayo clínico. Sin embargo, en los ensayos clínicos encontraríamos pacientes con un estado de salud más conservado, una enfermedad más estable o de crecimiento más lento, y que han recibido un seguimiento más estrecho que en la práctica clínica habitual [260]. Por el contrario, y como sesgo de los datos de vida real, encontraríamos problemas como la ausencia de una práctica clínica unificada y la ausencia de regulación para la recogida de datos más allá de que un comité de ética apruebe la sistemática de dicha recogida, lo que puede llevar a una mayor propensión a errores. El manejo de los pacientes, dentro del sistema sanitario valenciano, tampoco es igual en todos los hospitales: Existen hospitales con una mayor y menor dotación de recursos, siendo el hospital Universitario y Politécnico La Fe un centro de referencia con un mayor acceso a especialidades complejas, acceso a técnicas de análisis como la NGS, o acceso a ensayos clínicos [261].

Al comparar los datos de vida real referidos anteriormente con nuestra cohorte, observamos que los datos de mSG y mSLP quedarían en un punto medio con respecto a la horquilla de los datos de vida real publicados. El hecho de que sea superior a otras publicadas previamente es posible que se haya visto influenciado por la presencia de múltiples ensayos clínicos en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, habiendo administrado a estos pacientes tratamientos que aporten más que el estándar de tratamiento basado en doblete de platino o docetaxel. A pesar de que posteriormente varios de estos ensayos hayan presentado datos negativos o cesado el desarrollo del fármaco, se ha observado que aquellos pacientes que entran en un ensayo clínico presentan una mayor mSG [262]. Otro factor que podría ser relevante es que nuestra cohorte proviene de **un único centro de nivel terciario** de una comunidad autónoma concreta, mientras que los datos de las cohortes nacionales mencionadas anteriormente incluyen pacientes de hospitales de nivel primario a terciario, y de todas las diferentes zonas de los países que describen, por lo que pueden acentuarse las diferencias en la atención de los pacientes. En el caso de España, el acceso a las terapias no es uniforme en todo el territorio, por lo que puede haber diferencias entre regiones autonómicas [44].

En resumen, los **datos de vida real** son necesarios para conocer cómo se comporta un determinado tratamiento en un escenario que se acerque más a la **población general**

que presenta aCPCNP, fuera de la rigidez de los criterios de ensayo. Sin embargo, estos datos están sesgados a nivel de recogida y en función de la zona/criterios que incluya. En el caso de nuestra cohorte de aCPCNP, los datos de vida real muestran mSLP y mSG inferiores a los ensayos clínicos aprobatorios, y estarían dentro del rango de otros estudios, e incluso serían algo superiores, lo que se justificaría en que el análisis está limitado a los pacientes de un único centro terciario con amplia disponibilidad de ensayos y con acceso a más recursos. Por tanto, nuestros datos demostrarían la inequidad que hay entre los sistemas sanitarios existentes y como el acceso a más recursos puede repercutir en la supervivencia de los pacientes, siendo recomendable intentar buscar medidas para evitar estas desigualdades.

A continuación, comentaremos los resultados obtenidos de todas las variables analizadas en la cohorte de vida real. Una de las principales dudas que se plantea en la práctica clínica, dado que no se ha comparado en los ensayos clínicos, es el uso de IPCIs en monoterapia frente al uso de IPCIs combinados con quimioterapia; aunque comparar este escenario sea dudoso en aquellos pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 <50%, no se ha definido un estándar en los casos con una expresión tumoral de PD-L1 ≥50%, y no se han realizado comparaciones directas [263].

En nuestra cohorte observamos una **mSLP y una mSG muy similar en ambos subgrupos, sin diferencias estadísticamente significativas**. Estos datos muestran que el beneficio inicial de ambos esquemas sería similar. Sin embargo, al observar las curvas de supervivencia, destaca que, al menos de forma inicial, la cohorte de pacientes que han recibido IPCIs en monoterapia presenta una caída más pronunciada que en la cohorte de IPCIs combinada con quimioterapia. Si analizamos a largo plazo, por el contrario, vemos el porcentaje de largos supervivientes (a partir de los 25 meses aproximadamente) es superior en el grupo de IPCIs en monoterapia, algo que probablemente esté condicionado por la expresión tumoral de PD-L1 ≥50%.

Entre los principales problemas que tiene el uso de IPCIs en monoterapia es que las curvas de mSLP y mSG caen de forma importante durante los primeros meses, existiendo un número de pacientes que progresan de forma rápida a estos tratamientos, y que es posible que pudieran tener una respuesta más prolongada con la adición de quimioterapia [7–9]. Independientemente de este factor, en el contexto de la Comunidad Valenciana, se acordó por financiación el uso exclusivo de IPCIs en monoterapia para pacientes con expresión tumoral de PD-L1 ≥50%, y la combinación con quimioterapia quedó relegada de forma exclusiva a pacientes con expresión tumoral de PD-L1 <50%. Este hecho no ha cambiado hasta finales de 2023 con la aprobación del esquema carboplatino-pemetrexed/paclitaxel-cemiplimab en cualquier paciente (independientemente de la expresión tumoral de PD-L1) [44]. A pesar de alguna excepción en algún paciente de la cohorte de vida real que ha llevado este esquema aprobado, esta separación rígida aplica a todos los pacientes. Esta separación ofrece fortalezas, como la posibilidad de valorar si la combinación de IPCIs con quimioterapia ofrece una sinergia superior a su uso por

separado (el caso de los pacientes que reciben IPCIs en monoterapia), y si es capaz de “rescatar” aquellos pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 <50%; pero también debilidades como la ausencia de comparación de pacientes con la misma expresión tumoral de PD-L1. Pero, por el contrario, obliga a que un paciente con una expresión tumoral de PD-L1 que esté situada justo en el 50% se vea obligado a llevar IPCIs en monoterapia a pesar del alto riesgo de que el tratamiento fracase y haya “pérdida de la oportunidad” en cuanto a poder frenar el aCPCNP. De hecho, esta separación es evidente en pacientes con expresión de PD-L1 >90% puesto que son los que presentan mayor respuesta y mejores datos de mSLP y mSG [112].

En resumen, nuestros datos plantean que es posible haya un **porcentaje de pacientes con alta expresión de PD-L1 que se beneficiarían de un tratamiento con IPCIs en monoterapia, o IPCIs con quimioterapia**. En este aspecto, el modelo ICIRS establecido en el análisis de la cohorte A podría ser una herramienta fundamental. Sería interesante realizar un futuro ensayo clínico en el que comparar IPCIs en monoterapia frente a IPCIs combinados con quimioterapia en pacientes con alta expresión tumoral de PD-L1, con la implementación del modelo ICIRS, para ver si se podría mejorar los datos de supervivencia con un abordaje en particular.

Otra problemática que encontramos en la práctica clínica es la elección del esquema de quimioterapia óptimo para los pacientes con aCPCNP. Dentro de los fármacos de elección para el tratamiento del aCPCNP, el pemetrexed se valoró, a pesar de no presentar diferencias claras en supervivencia, como el fármaco de elección entre las posibles opciones de doblete de platino en pacientes con histología no escamosa [264,265]. Tras el éxito del desarrollo de los IPCIs en monoterapia, se planteó la combinación de estos con la quimioterapia basada en doblete de platino (con pemetrexed en histología no escamosa, y con paclitaxel en histología escamosa), con el fin de buscar recuperar aquellos pacientes que progresaban de forma rápida, o para compensar aquellos pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 <50% [10,35,38,42].

Decidimos comparar los pacientes que habían recibido pemetrexed frente a los demás. **La mSLP no mostró diferencias estadísticamente significativas**, aunque es probable que aumentando el número de pacientes de las cohortes esta diferencia llegue al grado de significancia estadística. Por el contrario, **la mSG mostró una diferencia muy amplia en los pacientes que recibieron pemetrexed frente al resto de los pacientes** (incluyendo pacientes con tumores de histología no escamosa tratados con otros esquemas). Estas diferencias **fueron estadísticamente significativas y clínicamente relevantes**. Estos datos van a favor de la existencia de una sinergia del pemetrexed con los IPCIs.

Aunque no se deben realizar comparaciones indirectas entre diferentes ensayos, los datos de mSG de los ensayos que incluyeron pemetrexed fueron superiores, incluso comparando con el esquema IMpower150 (uso de paclitaxel en histología no escamosa),

lo que ha llevado a plantear si pemetrexed pudiera tener un efecto sinérgico con los IPCIs. En relación a este fenómeno, Schaer *et al.* [113] publicaron un análisis *in vitro* e *in vivo* comparando diferentes esquemas de quimioterapia y el papel en el cambio de la expresión génica de las células tumorales. Entre todos los fármacos utilizados, se observó que pemetrexed era capaz de aumentar la expresión de genes, y consecuentemente un aumento en el número de neoantígenos susceptibles de ser reconocidos por el sistema inmune (**Figura 49**); la combinación de carboplatino y pemetrexed fue capaz de aumentar los genes expresados de forma diferencial en 73, frente a los 8 que aumentó carboplatino y paclitaxel. Un dato interesante adicional, es que con el uso individual de pemetrexed (sin platino), este aumento podía llegar a 108, y plantea la posibilidad del uso de pemetrexed con IPCIs (sin fármacos adicionales) como esquema que presente una mayor sinergia.

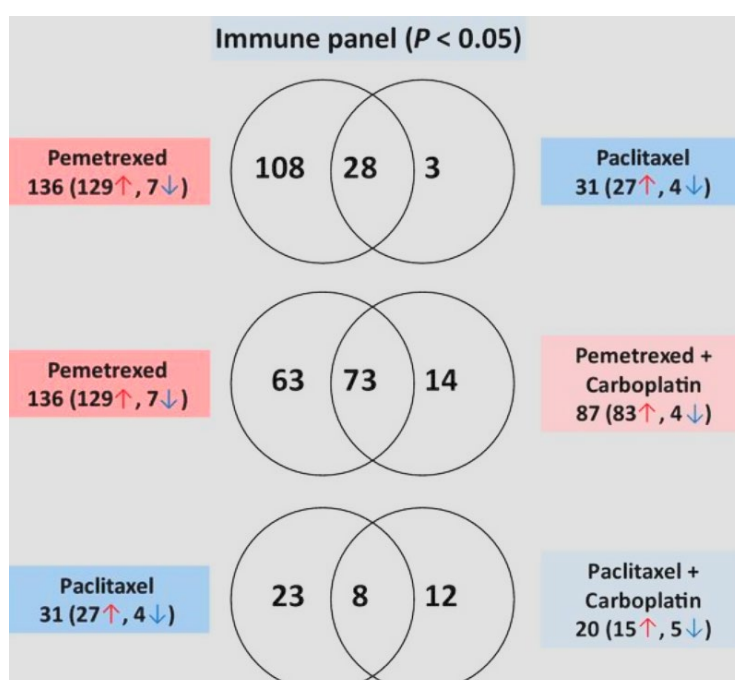


Figura 51. Aumento en el número de genes expresados de forma diferencial tras el uso de diferentes esquemas de quimioterapia en conjunto con IPCIs. Adaptado de Schaer *et al.* Clin Cancer Res. [113].

En base a estos datos, planteamos analizar las diferencias por histología, y a pesar de los sesgos (ya que también estamos comparando histologías diferentes), planteamos comparar la mSLP y mSG en pacientes que habían recibido pemetrexed frente a otra combinación de quimioterapia o IPCIs en monoterapia. Al analizar la mSLP estratificada por histología, no observamos diferencias estadísticamente significativas, aunque en el caso de la mSG estas diferencias son más marcadas (18 meses en histología no escamosa frente a 11 meses en histología escamosa) y sí alcanzaron el grado de significación estadística ($p=0,03$).

Al comparar las curvas de supervivencia estratificadas por uso o ausencia de pemetrexed, se puede observar que a largo plazo los porcentajes de pacientes largos supervivientes son similares, pero en los primeros 50 meses, probablemente por el uso

del pemetrexed, la diferencia a favor del pemetrexed es muy marcada. Estas diferencias, también podrían haber afectado los resultados vistos en pacientes con histología escamosa, así como el peor comportamiento en mSLP y mSG en esta histología en los ensayos aprobatorios de quimioterapia combinada con IPCIs [38,42]. Estos datos, sumado a la evidencia preclínica, deberían plantear la realización ensayos clínicos que comparen el doblete de pemetrexed (o incluso pemetrexed en monoterapia) combinado con IPCIs frente a otros esquemas de quimioterapia combinados con IPCIs. Otra posibilidad que sugerimos en base a estos datos, sería valorar testear el uso de pemetrexed en pacientes con histología escamosa, puesto que dicho fármaco se descartó en la era anterior a los IPCIs [264], y podría aportar beneficios adicionales a la sinergia con dichos fármacos. De hecho, aunque se presupone que la resistencia a pemetrexed viene condicionada por una mayor expresión de timidilato sintasa, no se ha demostrado que dicha relación exista [266]. En relación con la posibilidad de valorar fármacos prohibidos en histología escamosa, se ha publicado de forma reciente un ensayo fase III con un fármaco anti-VEGF (fármaco con contraindicación absoluta en histología escamosa) con resultados marcadamente positivos [267], por lo que sería interesante volver a probar viejos fármacos en la era de los IPCIs.

En resumen, **pemetrexed parece ser la opción de quimioterapia superior en pacientes con aCPCNP no escamoso**, y es posible que dicho papel del pemetrexed influya en las diferencias de supervivencia vistas entre pacientes con histología escamosa y no escamosa. Es necesario realizar un estudio clínico que compare los esquemas con pemetrexed frente aquellos que usan otras alternativas para confirmar estas diferencias.

Uno de los principales problemas en los ensayos clínicos aprobatorios es que los pacientes están muy seleccionados, presentan criterios de inclusión rígidos que no replican la práctica clínica en la que se usarán estos fármacos tras su aprobación, y no presentan las características basales que tiene la mediana de pacientes con aCPCNP (por ejemplo, en los ensayos se incluyen pacientes con edad más joven, mejor estado general...) [251].

Con el fin de buscar aclarar si el tratamiento con IPCIs (fuera combinados con quimioterapia o en monoterapia) tiene beneficio en condiciones de vida real, comparamos las poblaciones que encajarían más en un escenario de ensayo clínico con aquellos que no cumplirían con criterios. Para ello valoramos diferentes variables clínicas: **el ECOG y las comorbilidades han demostrado ser estadísticamente significativas en cuanto a predicción de mSG**, lo que es congruente con los datos de vida real y ensayos mencionados previamente. Por el contrario, **la mSLP no logró ser estadísticamente significativa por escaso margen**, y probablemente alcanzaría dicha significación estadística con un aumento del número de pacientes. **En cuanto a la edad avanzada (>70 años) y la polifarmacia no se ha observado diferencias estadísticamente significativas en mSLP y mSG**. Esta ausencia de diferencias en pacientes con edad >70 años es congruente con la propuesta de que la edad cronológica sea más importante que la biológica. Sin

embargo, en el caso de la polifarmacia, las diferencias en mSG quedaron al borde de la significación estadística, y es probable que con un escaso incremento del número de pacientes se demuestre que hay diferencias. De hecho, estas diferencias de meses son congruentes con las del estudio de datos de vida real mencionado previamente [268].

El ECOG es un factor pronóstico clave para guiar las decisiones en el tratamiento de cualquier paciente con cáncer [269]. Este factor puede tener relación con factores asociados al tumor, aunque también con características basales del paciente como comorbilidades, polifarmacia, etc. En principio, los pacientes con un ECOG ≥ 2 tienen un mayor riesgo de presentar toxicidad con la quimioterapia estándar, y por ese motivo fueron excluidos de ensayos clínicos con IPCIs. Un ensayo fase III que planteó la posibilidad de administrar IPCIs en monoterapia a pacientes con un ECOG de 2 o 3 fue el ensayo IPSOS [270], en el que se aleatorizó a pacientes no aptos para doblete de platino a llevar atezolizumab o quimioterapia en monoterapia (vinorelbina o gemcitabina). Los resultados de este estudio mostraron que el uso de IPCIs aumentó la mSG de 9,2 a 10,3 meses (HR=0,78) con un menor número de efectos secundarios grado 3 o 4 relacionados (16% en el grupo atezolizumab frente al 33% en el grupo de quimioterapia). Dicho estudio, y nuestros datos, han demostrado que la administración de IPCIs es factible en este subgrupo de pacientes. De forma reciente, también se ha publicado otro estudio fase II con durvalumab que apoya este abordaje [271]. Respecto a la combinación con quimioterapia basada en doble de platino, un estudio de datos de vida real que incluyó un 41,9% pacientes que presentaban ECOG de 2 demostró que esta combinación era segura y tasas de eficacia similares a los ensayos aprobatorios, así como un perfil de seguridad aceptable [272].

Otro factor infrarrepresentado en los ensayos clínicos aprobatorios es la edad avanzada. La edad mediana de diagnóstico de pacientes con cáncer de pulmón es 70 años, y un 66% de los pacientes presenta una edad >65 años al diagnóstico [3]. El punto de corte para plantear que un paciente presenta edad avanzada es bastante discutido, aunque un estudio de cohortes prospectivo multicéntrico ha planteado la edad de 70 años [273]. Uno de los factores descritos que podría influenciar la respuesta a los IPCIs es el proceso de inmunosenescencia [202,274–276], por el cual el sistema inmune adaptativo y, por tanto, los linfocitos T sufren un deterioro progresivo en el que se generan procesos que llevan a que estos estén exhaustos o en situación de anergia. En una revisión en la que se agruparon los datos de ensayos clínicos con IPCIs que incluyeron pacientes con una edad >65 años, se observó que estos fármacos eran eficaces en dichos pacientes, aunque se debe tener más precaución en la vigilancia de efectos adversos dado que tienen una mayor probabilidad de aparecer dada la disfuncionalidad parcial del sistema inmune secundario a la inmunosenescencia [277]. Sin embargo, un factor que se debería tener en cuenta, y que cada vez es más relevante, es el concepto de edad biológica frente a la cronológica, dado que puede haber personas con una edad >70 años que presenten una edad biológica muy inferior, y viceversa [278]. Como factor subrogado de envejecimiento

biológico hemos seleccionado la presencia de comorbilidades en las personas, a partir del índice de comorbilidad de Charlson modificado para oncología [217,218], con el fin de comprobar si era mejor predictor a nivel de eficacia que la edad [203], demostrando que hay diferencias.

Respecto al sexo, a pesar de la posible evidencia de que el sistema inmunológico presenta diferencias entre hombres y mujeres, **no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la mSLP y mSG de nuestra cohorte**. Esto podría estar condicionado porque nuestros pacientes recibieron IPCI en monoterapia, pero también en combinación con quimioterapia. En el metaanálisis de Conforti *et al.* se observó que los hombres respondían mejor a los IPCIs que las mujeres, pero solo se incluyeron pacientes con IPCIs en monoterapia con enfermedad avanzada [198]. En el escenario de enfermedad localizada, nuestro metaanálisis también detectó diferencias entre hombres y mujeres que recibieron IPCIs, pero aquellos estudios que más pesaron en el resultado fueron aquellos de IPCIs en monoterapia [201]. Por tanto, es posible que el efecto que ejerce la quimioterapia sobre el sistema inmunológico pueda compensar las diferencias. Este hecho refuerza la necesidad de comparar los IPCIs en monoterapia frente a combinaciones de IPCIs con quimioterapia en diferentes escenarios para optimizar la selección de tratamientos.

Por último, otro elemento que puede influir en la respuesta a IPCIs es la polifarmacia. De acuerdo con un estudio publicado por Hakoziaki *et al.* de datos de vida real, en el que se incluyeron 94 pacientes con aCPCNP tratados con IPCIs que consumían de forma crónica un número de fármacos ≥ 5 , definido como polifarmacia, presentaron una mSG de 9,5 meses frente a 28,1 meses en los pacientes sin polifarmacia [268]. En el análisis multivariante la polifarmacia fue un factor independiente de la edad. Nuestros datos apoyan este hecho como factor independiente, por lo que sería interesante valorar en el futuro realizar estudios que incluyan pacientes con polifarmacia para replicar mejor la práctica clínica habitual.

En resumen, factores como **las comorbilidades (que traducirían una edad biológica más avanzada), el ECOG, o la polifarmacia pueden ser claves en la optimización de los esquemas con IPCIs**. Sería conveniente conocer mejor cómo el envejecimiento del sistema inmune puede influir en los IPCIs, y aumentar en los ensayos clínicos en poblaciones que repliquen mejor la práctica clínica habitual.

Un punto complejo en el tratamiento del aCPCNP son aquellos pacientes con un tumor que presenta mutaciones que no disponen de un tratamiento accionable, o aquellas que tienen tratamientos dirigidos en desarrollo, pero que pueden presentar una buena respuesta a los IPCIs (como KRAS o BRAF no V600E). Cada vez hay más mutaciones que se han convertido en accionables en los últimos años con el desarrollo de diferentes tratamientos diana [5,6]. Además, se ha producido la optimización de técnicas como la NGS, que permiten conocer el estatus de un amplio abanico de mutaciones en un periodo

de tiempo reducido [101,102]. Los pacientes que suelen presentar mutaciones como EGFR, ALK, o ROS1 tienen un perfil diferente, siendo más frecuentes en no fumadores, mujeres, pacientes de edad más joven, y con un comportamiento de la enfermedad diferente [279]. Con la aparición de los IPCIs se realizaron aproximaciones con IPCIs en monoterapia, o combinados con tratamientos dirigidos, presentando resultados negativos en pacientes con EGFR y ALK, siendo deletéreo particularmente en estos últimos [142]. Esto ha llevado a excluir estos pacientes de los ensayos clínicos aprobatorios y de la práctica clínica habitual con IPCIs, pero existen múltiples mutaciones en las que la sensibilidad a los IPCIs es más dudosa, particularmente en el caso de mutaciones de KRAS o BRAF no V600E, ya que estas son más frecuentes en pacientes fumadores y se presupone una mayor carga mutacional en base a las mutaciones generadas por el tabaco, generando así un mayor número de neoantígenos que favorecerían la respuesta por el sistema inmunitario [280].

En una revisión realizada por Mhanna *et al.* [281] en la que se ha analizado la sensibilidad de inmunoterapia de múltiples mutaciones, se da la recomendación de administrar un tratamiento dirigido en aquellos pacientes con alteraciones en ALK, ROS1, EGFR y BRAF V600E al ser las menos sensibles a los IPCIs, mientras que en el resto se puede evaluar la pauta de IPCIs en monoterapia o IPCIs combinados con quimioterapia (**Figura 50**). Por todo ello, las mutaciones de EGFR, ALK y ROS1 se han excluido de nuestro estudio; sin embargo, sí hemos incluido pacientes con mutaciones en BRAF V600E dado que en España el único tratamiento disponible en la fecha de la recogida de los datos, la combinación de dabrafenib-trametinib, presentaba una orden de financiación negativa [44].

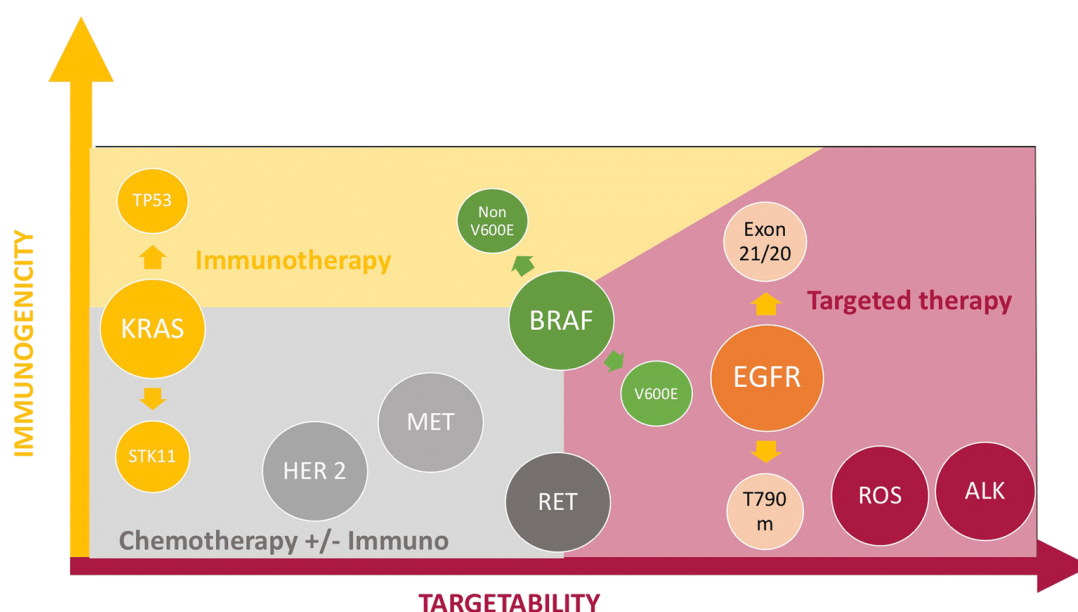


Figura 52. Probabilidad de respuesta a IPCIs en función de diferentes alteraciones genómicas presentadas por el CPCNP. Adaptada de Mhanna *et al.* *Curr Treat Options Oncol.* [281].

En el caso de nuestra cohorte, aunque hubo **ligeras diferencias en la mSLP, estas no fueron estadísticamente significativas**. La diferencia en la **mSG tampoco demostró diferencias estadísticamente significativas**, a pesar de la existencia de alguna opción de tratamiento dirigido en segunda línea de tratamiento. Por ejemplo, en el caso de ciertos pacientes con mutaciones en KRAS G12C, 7 pacientes recibieron un fármaco dirigido en alguna de las líneas sucesivas como sotorasib o adagrasib. Sin embargo, el problema con estos fármacos es que las diferencias en tasa de respuesta y mSLP respecto a docetaxel, el tratamiento estándar en pacientes sin mutaciones accionables, son muy escasas y aportan poco beneficio, con un aumento de la mSLP de 1-2 meses [282,283]. Es probable, por ello, que no haya aportado beneficio en la mejoría de la mSLP y mSG de los pacientes con mutaciones que no presentan tratamiento dirigido aprobado en el escenario de primera línea. Adicionalmente, el comportamiento biológico de las mutaciones en KRAS, que comprenden >50% de los pacientes de los pacientes con mutaciones en nuestra cohorte, suelen presentar una enfermedad con comportamiento similar a los pacientes que no presentan dichas mutaciones al tener el tabaquismo un papel relevante en el origen del tumor.

En resumen, **en aquellos pacientes con mutaciones no accionables los IPCIs continúan siendo la base del tratamiento sistémico** en primera línea de tratamiento. Aunque es posible que se desarrollen nuevas opciones terapéuticas que cambien el pronóstico de estos pacientes, es probable que los IPCIs continúen siendo un elemento que se utilice en las líneas terapéuticas de los pacientes, particularmente en el caso de BRAF no V600E y KRAS.

Entre los elementos más controvertidos del tratamiento de pacientes con aCPCNP encontramos el manejo de la enfermedad en el sistema nervioso central. En el caso de los pacientes con carcinomatosis leptomeningea no existen datos en ensayos clínicos aleatorizados con inmunoterapia dado que es un criterio de exclusión absoluto por el pronóstico ominoso (mSG de 14 semanas) [284]; no obstante, existen varios reportes de casos clínicos en los que se logra control de la enfermedad con IPCIs [285]. Con respecto a lesiones ocupantes de espacio a nivel cerebral, los ensayos clínicos aprobatorios presentan criterios bastante dispares: los ensayos KEYNOTE-189 y KEYNOTE-407 permitieron la inclusión de pacientes con metástasis cerebrales con un tamaño inferior a 1,5 cm siempre que fueran asintomáticas [37,38]; el resto de ensayos aprobatorios requerían tratamiento local y estabilidad de la lesión durante 4 semanas tras tratamiento, lo que presenta el riesgo de que solo se incluyan pacientes con enfermedades indolentes o bajo índice de replicación y pacientes muy seleccionados que no representen la práctica clínica habitual [7–9,12,42].

En el caso de nuestra cohorte, **no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la mSLP entre los pacientes con metástasis cerebrales o sin metástasis cerebrales tratados con IPCIs**. Se puede observar una tendencia a una peor mSG, pero dichas diferencias quedaron lejos de la significación estadística; aunque aumentando el

tamaño muestral se alcanzara dicho límite de significación, las diferencias no son tan marcadas, vendrían condicionadas por el peor pronóstico que acarrea presentar enfermedad en esta localización. Un ensayo clínico interesante, que podría ayudar a acabar de dirimir el mejor manejo de esta población, sería el USZ-Strike (fase III), en el que los pacientes con aCPCNP (o melanoma) con enfermedad cerebral se aleatorizan a llevar IPCIs junto a radioterapia local en las lesiones cerebrales o simplemente IPCIs y vigilancia del sistema nervioso central sin tratamiento local [286].

Solo se han publicado 2 ensayos que se han focalizado en valorar el efecto de los IPCIs en pacientes con afectación del sistema nervioso central: el ensayo fase II publicado por Goldberg *et al*, en el que pacientes con enfermedad de debut cerebral recibieron tratamiento de entrada con pembrolizumab, incluyendo pacientes en los que las metástasis cerebrales no se habían tratado de forma previa [287]; de los 42 pacientes incluidos, 21 (50%) no recibieron tratamiento local previo, y un 33% de estos no había progresado tras 1 año de tratamiento a pesar de no haber recibido dicho tratamiento local. Este ensayo se detuvo a mitad de reclutamiento por los cambios en el paradigma de tratamiento de estos pacientes, pero demostró que los IPCIs podían generar respuesta en enfermedad cerebral. El segundo ensayo es el fase II Atezo-Brain, en el cual se incluyeron 40 pacientes con enfermedad cerebral (incluyendo pacientes con lesiones activas y con necesidad de corticoides) que no recibieron tratamiento local para dichas lesiones [288]; la mSLP fue de 6,9 meses con una tasa de respuestas del 42,7%, y una mSG de 11,8 meses. Estos datos, junto al análisis de los datos de nuestra cohorte, apoyan en casos seleccionados el tratamiento de pacientes con esta enfermedad sin necesidad de tratar lesiones de forma local.

Partiendo de los escasos datos de dichos ensayos, **nuestro grupo de investigación [289] publicó un artículo de revisión con dichos datos, sugiriendo que se podría usar IPCIs de entrada (sin necesidad de tratamiento local cerebral)** en los siguientes casos: 1) Pacientes que no tengan una necesidad inminente de terapia local para el sistema nervioso central, dado que los IPCIs requieren tiempo para activar el sistema inmunitario y pueden ocurrir eventos como la pseudoprogresión; 2) Pacientes en riesgo de toxicidad a largo plazo por radioterapia; 3) Pacientes que no estén recibiendo dosis altas de corticosteroides, aunque este punto es más controvertido; 4) Pacientes con un Estado Funcional (PS) de 0 o 1; 5) Incluir pacientes con lesiones < 2 cm, dado que la evidencia de la mayoría de los ensayos prospectivos limitó el tamaño a < 1,5 cm o < 2 cm, aunque el reciente ensayo Atezo-Brain ha demostrado que las lesiones más grandes pueden tratarse de manera segura (lo que hace que este criterio sea relativo). En la **Figura 47** se muestran los principales mecanismos por los que los IPCIs pueden generar respuesta a nivel de sistema nervioso central, siendo principalmente una rotura de la barrera hematoencefálica por la inflamación de la metástasis cerebral que permita la entrada del IPCI, o una activación indirecta del sistema inmunológico a nivel cerebral tras la activación del sistema inmune por el uso de IPCIs a nivel sistémico.

Main Suggested Mechanisms of Brain Metastases Response to ICIs

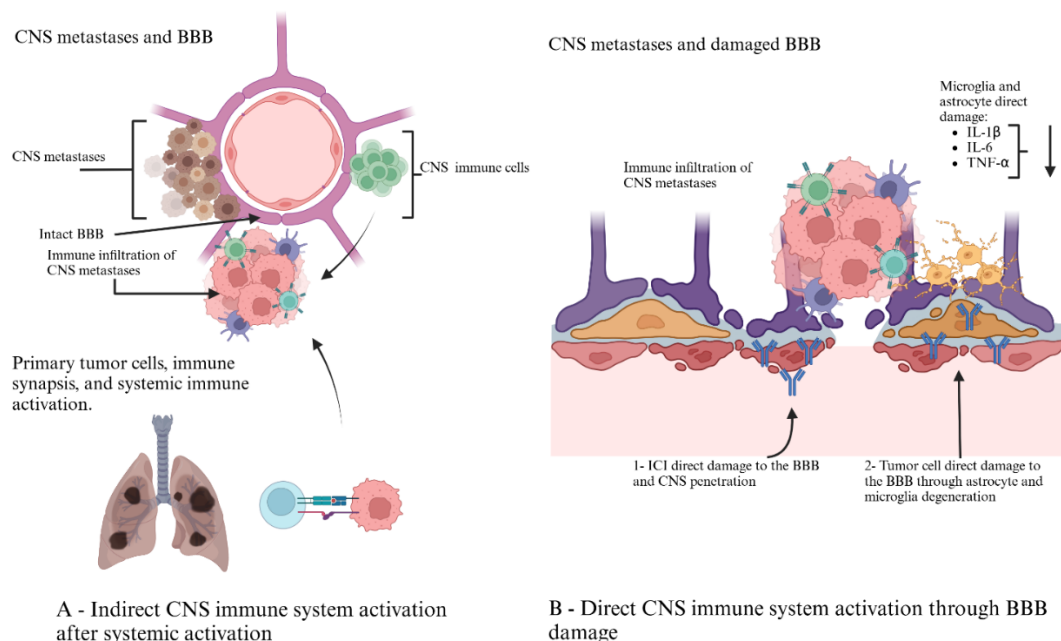


Figura 53. Principales mecanismos por los que los IPCIs pueden generar respuesta a nivel de sistema nervioso central: 1) Un mecanismo de activación indirecta de la inmunidad del sistema nervioso central; 2) Entrada del fármaco en el sistema nervioso central por daño de la barrera hematoencefálica. Imagen propia (publicada en Suay *et al.* [289]).

Un problema de los IPCIs es que pueden generar toxicidad autoinmune derivada de una hiperactivación del sistema inmunológico, por lo que decidimos analizar en nuestra cohorte este factor. A pesar de que los IPCIs presentan un menor riesgo de toxicidad que la quimioterapia tradicional, los pacientes que desarrollan toxicidad autoinmune pueden presentarla de carácter grave. En ciertas ocasiones, esta toxicidad es compleja de manejar y requiere de técnicas/fármacos inmunosupresores que se suelen utilizar en las enfermedades autoinmunes (p. ej. plasmaféresis, corticoides, micofenolato mofetilo, anticuerpos monoclonales frente a componentes activadores del sistema inmune como interleuquinas...) [99,290].

En el caso de nuestra cohorte, **no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre aquellos pacientes que presentaron un evento inmunorrelacionado severo (grado ≥ 3) y aquellos que no**. Sin embargo, se puede observar una tendencia a que puedan aparecer diferencias de mSLP aumentando el tamaño muestral, puesto que la **mSLP del grupo con toxicidad inmunorrelacionada severa fue superior a la del resto de pacientes (11 meses frente a 7 meses)**, pero no se alcanzó la significación estadística por escaso margen ($p=0,14$). Al observar la **mSG, estas diferencias fueron menores (19 meses frente a 15 meses respectivamente; $p=0,57$)**, lo que podría venir condicionado por 2 factores: 1) Estas toxicidades severas, aunque mantengan la respuesta tumoral, tienen riesgo de generar eventos inmunorrelacionados crónicos que pueden llevar al deterioro

clínico e incluso la muerte; 2) estos pacientes requieren medicación inmunosupresora crónica con corticoides y anticuerpos monoclonales que frenen el sistema inmune, además de no poder volver a recibir tratamiento con IPCIs, lo que puede generar toxicidades derivadas de dichos tratamientos o que la enfermedad pueda progresar [290,291].

A pesar de que estas toxicidades pueden suponer un problema de comorbilidad y de necesidad de múltiples fármacos inmunosupresores de forma crónica [21], se ha observado que existe una posible asociación entre la aparición de estos eventos adversos autoinmunes y la respuesta al tratamiento [292,293], probablemente asociándose esta hiperactivación con un mejor abordaje del tumor por el sistema inmune. En un análisis retrospectivo publicado por Toi *et al.*, al analizar 70 pacientes con aCPCNP que recibieron nivolumab en monoterapia en 2ª línea de tratamiento, se observó que aquellos pacientes con toxicidades autoinmunes presentaron una tasa de respuestas del 57%, frente a un 12% en aquellos pacientes que no desarrollaron dicha toxicidad; la mSLP fue de 12 meses y 3,6 meses respectivamente [292]. Estos datos coinciden con el análisis de nuestra cohorte, al mostrar una mayor tendencia a la respuesta y a una mejoría de la mSLP, pero no se reportaron datos de mSG que indicaran si las comorbilidades generadas por estas toxicidades hayan podido ser deletéreas para los pacientes.

En resumen, es posible que, **aunque estos efectos puedan predecir un mayor control tumoral, la comorbilidad y deterioro asociado influya en contra en el global de la mSG**; en el futuro sería conveniente conocer mejor las causas por las que se generan estos efectos en algunos pacientes y optimizar los esquemas de tratamiento.

Por último, abordamos la problemática del único biomarcador que se usa en nuestro contexto para la valoración del tipo de esquema de IPCI a administrar en los pacientes con aCPCNP, la expresión tumoral de PD-L1. Esta se ha debatido ampliamente en los apartados de la introducción como el único biomarcador usado de forma habitual en la práctica clínica, y como el único que se ha usado de forma habitual para estratificar en los ensayos clínicos aprobatorios de 1ª línea de tratamiento en los pacientes con aCPCNP [8,15,18,37,38,107,121].

Al dividir los pacientes de nuestra cohorte por presencia de expresión tumoral negativa de PD-L1, expresión positiva de PD-L1 1-49%, y alta expresión tumoral de PD-L1 ($\geq 50\%$), observamos: **1) La mSLP y la mSG no mostraron diferencias estadísticamente significativas**, aunque llama la atención la tendencia a que los pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 1-49% que recibieron IPCIs combinados con quimioterapia presentaran mayor mSLP y mSG que los pacientes que recibieron IPCIs en monoterapia por presentar una alta expresión tumoral de PD-L1. Esto lleva a plantear que la quimioterapia pueda influir en el tratamiento de IPCIs tal y como se ha especificado en apartados previos, y que pueda compensar el déficit de PD-L1. Otro posible factor a tener en cuenta es que el efecto de la quimioterapia permitiría “recuperar” aquellos pacientes que presentan una

resistencia primaria a los IPCIs a pesar de tener una expresión tumoral de PD-L1 elevada, suavizando la caída de las curvas de supervivencia de IPCIs en monoterapia. Por último, indica que PD-L1 es un biomarcador subóptimo en la capacidad de predecir la respuesta a IPCIs. 2) Al observar las curvas de supervivencia a largo plazo, sí que se observa una estabilización y una separación entre aquellos pacientes con una expresión tumoral de PD-L1 $\geq 50\%$ y el resto de los pacientes, presentando un porcentaje de pacientes que permanecen vivos a 5 años del 30% y 20% respectivamente.

En resumen, nuestros resultados confirman que **la expresión tumoral de PD-L1 es un biomarcador subóptimo**. Sería necesario buscar nuevos biomarcadores o modelos predictivos con el fin de optimizar los tratamientos de forma más eficiente para evitar la prescripción de tratamientos inadecuados a los pacientes. Una posible nueva opción consistiría en el uso del modelo ICIRS desarrollado en esta tesis.

En global, todos estos datos muestran **el valor de analizar la práctica clínica en un escenario de vida real**, al ayudar a resolver dudas que no se han respondido en los ensayos clínicos de aprobación. Aunque la evidencia ofrecida no es definitiva, y presenta como **principal sesgo el hecho de ser datos retrospectivos**, permite generar hipótesis para plantear nuevos ensayos clínicos que validen dichas propuestas. Aunque el pronóstico de los pacientes con aCPCNP ha cambiado de forma radical con la implementación de esquemas de IPCIs, quedan múltiples dudas por resolver en el futuro. Los datos presentados en esta tesis sugieren conclusiones interesantes que pueden integrarse o ayudar a crear futuros ensayos clínicos en estos pacientes.

6 Conclusiones

6.1 Búsqueda de biomarcadores no invasivos de respuesta a IPCIs en el tratamiento de aCPCNP

1. El **análisis de poblaciones inmunes circulantes en sangre periférica constituye un biomarcador poco invasivo y fácilmente adaptable** a la práctica clínica capaz de predecir la respuesta a los IPCIs.
 - a. Los **niveles elevados de monocitos** detectados por citometría de flujo en sangre periférica de forma basal, en conjunto con la toma de corticoides, están asociados con una **peor respuesta a IPCIs en monoterapia**.
 - b. Los **niveles bajos de linfocitos T CD4+ y NK** detectados por citometría de flujo en sangre periférica de forma basal, en conjunto con la toma de corticoides, están asociados con una **peor respuesta a IPCIs en combinación con quimioterapia**.
2. Hemos **desarrollado un modelo matemático que valora la respuesta a IPCIs combinados o no con quimioterapia en el tratamiento en primera línea del aCPCNP**. Este modelo valora la respuesta de forma continua y personalizada, y **por tanto, puede** considerarse como una herramienta de medicina de precisión.
3. Para **facilitar la implementación clínica del modelo ICIRS** hemos desarrollado nomogramas y una **página web donde se ha automatizado su cálculo**. Al introducir los datos, se obtiene una estimación de mSLP a 6 y 12 meses, y de mSG a 12 y 24 meses, aunque la página web permite utilizar otros tiempos.
 - a. Partiendo de los niveles basales de linfocitos T CD4+, NK, monocitos, y la toma o no de corticoides, **el ICIRS permite predecir con un grado de fiabilidad aceptable la probabilidad de SLP o de SG** en un punto temporal concreto. Sin embargo, este modelo debe ser validado antes de su implementación clínica.
 - b. El **modelo ICIRS, previa validación con una nueva cohorte, podría ser de ayuda en la toma de decisiones sobre el uso o no de quimioterapia con independencia del valor de expresión de PD-L1**, siendo una herramienta clave, sobre todo en aquellos pacientes con una expresión de PD-L1 $\geq 50\%$, donde radica la duda de qué esquema utilizar.

6.2 Análisis de datos de vida real en el escenario de aCPCNP tratados en primera línea con IPCIs

1. En una cohorte retrospectiva en un centro de referencia, la **expresión tumoral de PD-L1 es un marcador subóptimo para la elección de un esquema con IPCIs en los pacientes con aCPCNP**. Es necesario buscar nuevos biomarcadores que permitan establecer el mejor esquema para cada escenario clínico. Una vez validado, el modelo ICIRS, desarrollado en la parte inicial de este trabajo, puede ser una herramienta de medicina de precisión en este aspecto.

2. En un escenario de datos retrospectivos de vida real, **los pacientes con aCPCNP tratados en primera línea con IPCIs presentan una mSLP y mSG inferior a la observada en los ensayos clínicos aprobatorios.** Esto es consecuencia de tener una población con un peor estado general, metástasis cerebrales no pretratadas, o tumores menos seleccionados (con un ritmo de crecimiento más rápido que no permitían esperar a realizar las pruebas de valoración de ensayo clínico).
 - a. **La mSG y mSLP de nuestros datos en un único centro de referencia es superior a la de otros datos de vida real a nivel nacional.** Es probable que este hecho esté influenciado por la disponibilidad de ensayos clínicos en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, así como unidades de referencia, y las diferencias que puede haber dentro de un país entre los sistemas sanitarios.
3. En un escenario de datos retrospectivos de vida real, se han observado 2 factores que convendría explorar en futuras líneas de investigación:
 - a. Los pacientes con **histología no escamosa, y aquellos tratados con pemetrexed presentan una mSG significativamente mayor** que el resto de los pacientes. Se debería confirmar estas diferencias en un ensayo clínico, así como entender los mecanismos de sinergia entre la quimioterapia, particularmente pemetrexed, y los IPCIs con el fin de optimizar esquemas de tratamiento.
 - b. La **edad biológica es más importante de forma estadísticamente significativa que la edad cronológica** al valorar el esquema óptimo para pacientes de edad avanzada y la eficacia de este. Se debería realizar más estudios con una edad biológica/cronológica avanzada dado que es una población infrarrepresentada en los ensayos clínicos.

7 Bibliografía

1. Ganti AK, Klein AB, Cotala I, Seal B, Chou E. Update of Incidence, Prevalence, Survival, and Initial Treatment in Patients With Non–Small Cell Lung Cancer in the US. *JAMA Oncol.* 2021;7:1–9.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–49.
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74:229–63.
4. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, et al. European cancer mortality predictions for the year 2017, with focus on lung cancer. *Ann Oncol.* 2017;28:1117–23.
5. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023;34:339–57.
6. Jaiyesimi IA, Leighl NB, Ismaila N, Alluri K, Florez N, Gadgeel S, et al. Therapy for Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO Living Guideline, Version 2023.3. *J Clin Oncol.* 2024;42:e1–22.
7. Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Özgüroğlu M, Gogishvili M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet.* 2021;397:592–604.
8. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2016;375:1823–33.
9. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *New England Journal of Medicine.* 2020;383:1328–39.
10. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2018;378:2078–92.
11. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2018;379:2040–51.
12. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *New England Journal of Medicine.* 2018;378:2288–301.
13. Paz-Ares L, Ciuleanu T-E, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-

small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22:198–211.

14. Gogishvili M, Melkadze T, Makharadze T, Giorgadze D, Dvorkin M, Penkov K, et al. Cemiplimab plus chemotherapy versus chemotherapy alone in non-small cell lung cancer: a randomized, controlled, double-blind phase 3 trial. *Nat Med*. 2022;28:2374–80.

15. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381:2020–31.

16. Mansfield AS, Aubry MC, Moser JC, Harrington SM, Dronca RS, Park SS, et al. Temporal and spatial discordance of programmed cell death-ligand 1 expression and lymphocyte tumor infiltration between paired primary lesions and brain metastases in lung cancer. *Ann Oncol*. 2016;27:1953–8.

17. Haragan A, Field JK, Davies MPA, Escriu C, Gruver A, Gosney JR. Heterogeneity of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Implications for specimen sampling in predicting treatment response. *Lung Cancer*. 2019;134:79–84.

18. Mino-Kenudson M, Schalper K, Cooper W, Dacic S, Hirsch FR, Jain D, et al. Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Lung Cancer: Perspective From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *Journal of Thoracic Oncology*. 2022;17:1335–54.

19. Sholl LM. Biomarkers of response to checkpoint inhibitors beyond PD-L1 in lung cancer. *Mod Pathol*. 2022;35:66–74.

20. Adashek JJ, Subbiah IM, Matos I, Garraalda E, Menta AK, Ganeshan DM, et al. Hyperprogression and Immunotherapy: Fact, Fiction, or Alternative Fact? *Trends Cancer*. 2020;6:181–91.

21. Johnson DB, Nebhan CA, Moslehi JJ, Balko JM. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19:254–67.

22. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17:6958–62.

23. 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. *New England Journal of Medicine*. 2015;373:1627–39.

24. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han J-Y, 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;387:1540–50.

25. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389:255–65.

26. Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Gonzalez-Rodriguez AP, Martínez-Pérez A, Rodrigo JP, García-Pedrero JM, et al. Chemo-Immunotherapy: A New Trend in Cancer Treatment. *Cancers*. 2023;15:2912.

27. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Non-oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2023;34:358–76.
28. Jaiyesimi IA, Leighl NB, Ismaila N, Alluri K, Florez N, Gadgeel S, et al. Therapy for Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer Without Driver Alterations: ASCO Living Guideline, Version 2023.3. *J Clin Oncol*. 2024;42:e23–43.
29. Catalano M, Shabani S, Venturini J, Ottanelli C, Voltolini L, Roviello G. Lung Cancer Immunotherapy: Beyond Common Immune Checkpoints Inhibitors. *Cancers*. 2022;14:6145.
30. Kraehenbuehl L, Weng C-H, Eghbali S, Wolchok JD, Merghoub T. Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19:37–50.
31. Cai L, Li Y, Tan J, Xu L, Li Y. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2023;16:101.
32. Lu C, Tan Y. Promising immunotherapy targets: TIM3, LAG3, and TIGIT joined the party. *Mol Ther Oncol*. 2024;32:200773.
33. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Gutiérrez EC, et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2022;386:24–34.
34. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score $\geq$ 50. *J Clin Oncol*. 2021;39:2339–49.
35. Nishio M, Barlesi F, West H, Ball S, Bordoni R, Cobo M, et al. Atezolizumab Plus Chemotherapy for First-Line Treatment of Nonsquamous NSCLC: Results From the Randomized Phase 3 IMpower132 Trial. *J Thorac Oncol*. 2021;16:653–64.
36. Özgüroğlu M, Kilickap S, Sezer A, Gümüş M, Bondarenko I, Gogishvili M, et al. First-line cemiplimab monotherapy and continued cemiplimab beyond progression plus chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 50% or more (EMPOWER-Lung 1): 35-month follow-up from a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2023;24:989–1001.
37. Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, et al. Updated Analysis From KEYNOTE-189: Pembrolizumab or Placebo Plus Pemetrexed and Platinum for Previously Untreated Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38:1505–17.
38. Novello S, Kowalski DM, Luft A, Gümüş M, Vicente D, Mazières J, et al. Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Update of the Phase III KEYNOTE-407 Study. *J Clin Oncol*. 2023;41:1999–2006.
39. Brahmer JR, Lee J-S, Ciuleanu T-E, Bernabe Caro R, Nishio M, Urban L, et al. Five-Year Survival Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab Versus Chemotherapy as First-Line Treatment for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer in CheckMate 227. *J Clin Oncol*. 2023;41:1200–12.

40. Research C for DE and. FDA approves nivolumab plus ipilimumab for first-line mNSCLC (PD-L1 tumor expression $\geq 1\%$). FDA [Internet]. 2024 [cited 2024 Dec 8]; Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-nivolumab-plus-ipilimumab-first-line-mnslc-pd-l1-tumor-expression-1>
41. Reck M, Ciuleanu T-E, Schenker M, Bordenave S, Cobo M, Juan-Vidal O, et al. Five-year outcomes with first-line nivolumab plus ipilimumab with 2 cycles of chemotherapy versus 4 cycles of chemotherapy alone in patients with metastatic non-small cell lung cancer in the randomized CheckMate 9LA trial. *Eur J Cancer*. 2024;211:114296.
42. Makharadze T, Gogishvili M, Melkadze T, Baramidze A, Giorgadze D, Penkov K, et al. Cemiplimab Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy Alone in Advanced NSCLC: 2-Year Follow-Up From the Phase 3 EMPOWER-Lung 3 Part 2 Trial. *Journal of Thoracic Oncology*. 2023;18:755–68.
43. Johnson ML, Cho BC, Luft A, Alatorre-Alexander J, Geater SL, Laktionov K, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab in Combination With Chemotherapy as First-Line Therapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: The Phase III POSEIDON Study. *J Clin Oncol*. 2023;41:1213–27.
44. (SAo) Subcomisión asesora de terapias oncológicas - Farmacia y productos sanitarios - GVAAsanitat [Internet]. Farmacia y productos sanitarios. [cited 2024 Dec 11]. Available from: <https://www.san.gva.es/es/web/farmacia-i-productes-sanitaris/subcomision-asesora-terapias-oncologicas>
45. Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:185–90.
46. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*. 2016;375:1767–78.
47. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3:541–7.
48. Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*. 2001;291:319–22.
49. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995;270:985–8.
50. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11:141–51.
51. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192:1027–34.
52. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2:261–8.

53. Chen L, Linsley PS, Hellström KE. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today*. 1993;14:483–6.
54. Allison JP, Hurwitz AA, Leach DR. Manipulation of costimulatory signals to enhance antitumor T-cell responses. *Curr Opin Immunol*. 1995;7:682–6.
55. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711–23.
56. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2443–54.
57. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol*. 2007;19:813–24.
58. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11:3887–95.
59. Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol*. 2008;181:4832–9.
60. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*. 2009;10:29–37.
61. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219–42.
62. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27:111–22.
63. Xiao Y, Yu S, Zhu B, Bedoret D, Bu X, Francisco LM, et al. RGMb is a novel binding partner for PD-L2 and its engagement with PD-L2 promotes respiratory tolerance. *J Exp Med*. 2014;211:943–59.
64. Yoshida T, Jiang F, Honjo T, Okazaki T. PD-1 deficiency reveals various tissue-specific autoimmunity by H-2b and dose-dependent requirement of H-2g7 for diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:3533–8.
65. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006;203:883–95.
66. 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;8:793–800.
67. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:12293–7.

68. Sheppard K-A, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 2004;574:37–41.
69. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal.* 2012;5:ra46.
70. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25:9543–53.
71. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol.* 2000;20:5010–8.
72. Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem.* 2001;276:993–8.
73. Patsoukis N, Li L, Sari D, Petkova V, Boussiotis VA. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol Cell Biol.* 2013;33:3091–8.
74. Bivona TG, Pérez De Castro I, Ahearn IM, Grana TM, Chiu VK, Lockyer PJ, et al. Phospholipase Cgamma activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1. *Nature.* 2003;424:694–8.
75. Quigley M, Pereyra F, Nilsson B, Porichis F, Fonseca C, Eichbaum Q, et al. Transcriptional analysis of HIV-specific CD8+ T cells shows that PD-1 inhibits T cell function by upregulating BATF. *Nat Med.* 2010;16:1147–51.
76. Wei F, Zhong S, Ma Z, Kong H, Medvec A, Ahmed R, et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:E2480–2489.
77. Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature.* 2004;427:154–9.
78. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol.* 2009;10:1185–92.
79. Honda T, Egen JG, Lämmermann T, Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Germain RN. Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. *Immunity.* 2014;40:235–47.
80. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:259–83.
81. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015;6:6692.
82. Jaudszus A, Gruen M, Watzl B, Ness C, Roth A, Lochner A, et al. Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. *J Lipid Res.* 2013;54:923–35.

83. Tkachev V, Goodell S, Opipari AW, Hao L-Y, Franchi L, Glick GD, et al. Programmed death-1 controls T cell survival by regulating oxidative metabolism. *J Immunol*. 2015;194:5789–800.
84. Chang C-H, Qiu J, O’Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*. 2015;162:1229–41.
85. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L. B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood*. 2008;111:3635–43.
86. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, Altabef A, Tchaicha JH, Christensen CL, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov*. 2013;3:1355–63.
87. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:20852–7.
88. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med*. 2014;211:781–90.
89. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O’Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116:3268–77.
90. Fang W, Zhang J, Hong S, Zhan J, Chen N, Qin T, et al. EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget*. 2014;5:12189–202.
91. Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, Xu X, Camargo MC, Solcia E, et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget*. 2016;7:32925–32.
92. Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol*. 2016;27:409–16.
93. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:467–77.
94. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124–8.
95. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515:568–71.
96. Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, et al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4:194–203.
97. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515:563–7.

98. Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC, Schindler K, Lacouture ME, et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol*. 2015;26:2375–91.
99. Schneider BJ, Naidoo J, Santomasso BD, Lacchetti C, Adkins S, Anadkat M, et al. Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2021;39:4073–126.
100. Haanen J, Obeid M, Spain L, Carbonnel F, Wang Y, Robert C, et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up☆. *Annals of Oncology*. 2022;33:1217–38.
101. Simarro J, Pérez-Simó G, Mancheño N, Ansotegui E, Muñoz-Núñez CF, Gómez-Codina J, et al. Impact of Molecular Testing Using Next-Generation Sequencing in the Clinical Management of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in a Public Healthcare Hospital. *Cancers (Basel)*. 2023;15:1705.
102. Simarro J, Murria R, Pérez-Simó G, Llop M, Mancheño N, Ramos D, et al. Development, Implementation and Assessment of Molecular Diagnostics by Next Generation Sequencing in Personalized Treatment of Cancer: Experience of a Public Reference Healthcare Hospital. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1196.
103. Tostes K, Siqueira AP, Reis RM, Leal LF, Arantes LMRB. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor Response in NSCLC: Current Developments and Applicability. *Int J Mol Sci*. 2023;24:11887.
104. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol*. 2020;15:499–519.
105. Sholl LM, Hirsch FR, Hwang D, Botling J, Lopez-Rios F, Bubendorf L, et al. The Promises and Challenges of Tumor Mutation Burden as an Immunotherapy Biomarker: A Perspective from the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol*. 2020;15:1409–24.
106. Niu M, Yi M, Li N, Luo S, Wu K. Predictive biomarkers of anti-PD-1/PD-L1 therapy in NSCLC. *Exp Hematol Oncol*. 2021;10:18.
107. Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjjatic S, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18:345–62.
108. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol*. 2017;12:208–22.
109. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley M-B, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1302–11.
110. Tsao MS, Kerr KM, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR. IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry Testing in Lung Cancer. Editorial Rx Press; 2017.
111. National Cancer Institute (NCI). EA5163/S1709 INSIGNA : A Randomized, Phase III Study of Firstline Immunotherapy Alone or in Combination With Chemotherapy in

Induction/Maintenance or Postprogression in Advanced Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) With Immunobiomarker SIGNature-Driven Analysis [Internet]. [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov/study/NCT03793179); 2024 Dec. Report No.: NCT03793179. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03793179>

112. Aguilar EJ, Ricciuti B, Gainor JF, Kehl KL, Kravets S, Dahlberg S, et al. Outcomes to first-line pembrolizumab in patients with non-small-cell lung cancer and very high PD-L1 expression. *Ann Oncol*. 2019;30:1653–9.

113. Schaer DA, Geeganage S, Amaladas N, Lu ZH, Rasmussen ER, Sonyi A, et al. The Folate Pathway Inhibitor Pemetrexed Pleiotropically Enhances Effects of Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2019;25:7175–88.

114. Doroshow DB, Wei W, Gupta S, Zugazagoitia J, Robbins C, Adamson B, et al. Programmed Death-Ligand 1 Tumor Proportion Score and Overall Survival From First-Line Pembrolizumab in Patients With Nonsquamous Versus Squamous NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2021;16:2139–43.

115. Bassanelli M, Sioletic S, Martini M, Giacinti S, Viterbo A, Staddon A, et al. Heterogeneity of PD-L1 Expression and Relationship with Biology of NSCLC. *Anticancer Res*. 2018;38:3789–96.

116. Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, Bell JM, Johnson DB, et al. Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2019;5:1195–204.

117. Hirsch FR, Walker J, Higgs BW, Cooper ZA, Raja RG, Wistuba II. The Combiome Hypothesis: Selecting Optimal Treatment for Cancer Patients. *Clin Lung Cancer*. 2022;23:1–13.

118. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nat Med*. 2018;24:1441–8.

119. Marcus L, Fashoyin-Aje LA, Donoghue M, Yuan M, Rodriguez L, Gallagher PS, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Tumor Mutational Burden-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2021;27:4685–9.

120. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol*. 2020;21:1353–65.

121. Horn L, Mansfield AS, Szczęśna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018;379:2220–9.

122. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med*. 2018;378:2093–104.

123. Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn M-J, et al. Durvalumab With or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: The MYSTIC Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020;6:661–74.

124. Leighl NB, Laurie SA, Goss GD, Hughes BGM, Stockler M, Tsao M-S, et al. CCTG BR34: A Randomized Phase 2 Trial of Durvalumab and Tremelimumab With or Without Platinum-Based Chemotherapy in Patients With Metastatic NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2022;17:434–45.
125. Wang J, Lu S, Hu C, Sun Y, Yang K, Chen M, et al. 1264P Updated analysis of tislelizumab plus chemotherapy vs chemotherapy alone as first-line treatment of advanced squamous non-small cell lung cancer (SQ NSCLC). *Annals of Oncology.* 2020;31:S817.
126. Paz-Ares L, Ciuleanu T-E, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. 980 First-line nivolumab (NIVO) + ipilimumab (IPI) + 2 cycles chemotherapy (chemo) vs 4 cycles chemo in advanced non-small cell lung cancer (aNSCLC): Association of blood and tissue tumor mutational burden (TMB) with efficacy in CheckMate 9LA. *Journal of Thoracic Oncology.* 2021;16:S750–1.
127. Buchhalter I, Rempel E, Endris V, Allgäuer M, Neumann O, Volckmar A-L, et al. Size matters: Dissecting key parameters for panel-based tumor mutational burden analysis. *Int J Cancer.* 2019;144:848–58.
128. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017;9:34.
129. Endris V, Buchhalter I, Allgäuer M, Rempel E, Lier A, Volckmar A-L, et al. Measurement of tumor mutational burden (TMB) in routine molecular diagnostics: in silico and real-life analysis of three larger gene panels. *Int J Cancer.* 2019;144:2303–12.
130. Ramos-Paradas J, Hernández-Prieto S, Lora D, Sanchez E, Rosado A, Caniego-Casas T, et al. Tumor mutational burden assessment in non-small-cell lung cancer samples: results from the TMB2 harmonization project comparing three NGS panels. *J Immunother Cancer.* 2021;9:e001904.
131. Wei B, Kang J, Kibukawa M, Arreaza G, Maguire M, Chen L, et al. Evaluation of the TruSight Oncology 500 Assay for Routine Clinical Testing of Tumor Mutational Burden and Clinical Utility for Predicting Response to Pembrolizumab. *J Mol Diagn.* 2022;24:600–8.
132. Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, Funari V, Chen S-J, White JR, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e000147.
133. Ye L, Creaney J, Redwood A, Robinson B. The Current Lung Cancer Neoantigen Landscape and Implications for Therapy. *J Thorac Oncol.* 2021;16:922–32.
134. Anagnostou V, Smith KN, Forde PM, Niknafs N, Bhattacharya R, White J, et al. Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2017;7:264–76.
135. Fehlings M, Jhunjhunwala S, Kowanetz M, O’Gorman WE, Hegde PS, Sumatoh H, et al. Late-differentiated effector neoantigen-specific CD8⁺ T cells are enriched in peripheral blood of non-small cell lung carcinoma patients responding to atezolizumab treatment. *J Immunother Cancer.* 2019;7:249.
136. Forde PM, Chaft JE, Smith KN, Anagnostou V, Cottrell TR, Hellmann MD, et al. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378:1976–86.

137. Gettinger SN, Choi J, Mani N, Sanmamed MF, Datar I, Sowell R, et al. A dormant TIL phenotype defines non-small cell lung carcinomas sensitive to immune checkpoint blockers. *Nat Commun.* 2018;9:3196.
138. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science.* 2016;351:1463–9.
139. Montesion M, Murugesan K, Jin DX, Sharaf R, Sanchez N, Guria A, et al. Somatic HLA Class I Loss Is a Widespread Mechanism of Immune Evasion Which Refines the Use of Tumor Mutational Burden as a Biomarker of Checkpoint Inhibitor Response. *Cancer Discov.* 2021;11:282–92.
140. De Mattos-Arruda L, Vazquez M, Finotello F, Lepore R, Porta E, Hundal J, et al. Neoantigen prediction and computational perspectives towards clinical benefit: recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31:978–90.
141. Chen Y-P, Zhang Y, Lv J-W, Li Y-Q, Wang Y-Q, He Q-M, et al. Genomic Analysis of Tumor Microenvironment Immune Types across 14 Solid Cancer Types: Immunotherapeutic Implications. *Theranostics.* 2017;7:3585–94.
142. Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z, et al. EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clin Cancer Res.* 2016;22:4585–93.
143. Kauffmann-Guerrero D, Tufman A, Kahnert K, Bollmann BA, Reu S, Syunyaeva Z, et al. Response to Checkpoint Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer with Molecular Driver Alterations. *Oncol Res Treat.* 2020;43:289–98.
144. Ricciuti B, Arbour KC, Lin JJ, Vajdi A, Vokes N, Hong L, et al. Diminished Efficacy of Programmed Death-(Ligand)1 Inhibition in STK11- and KEAP1-Mutant Lung Adenocarcinoma Is Affected by KRAS Mutation Status. *J Thorac Oncol.* 2022;17:399–410.
145. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2018;8:822–35.
146. Zhao Y, Cao Y, Chen Y, Wu L, Hang H, Jiang C, et al. B2M gene expression shapes the immune landscape of lung adenocarcinoma and determines the response to immunotherapy. *Immunology.* 2021;164:507–23.
147. Duruisseaux M, Martínez-Cardús A, Calleja-Cervantes ME, Moran S, Castro de Moura M, Davalos V, et al. Epigenetic prediction of response to anti-PD-1 treatment in non-small-cell lung cancer: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Respir Med.* 2018;6:771–81.
148. Doroshow DB, Sanmamed MF, Hastings K, Politi K, Rimm DL, Chen L, et al. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res.* 2019;25:4592–602.
149. Sanmamed MF, Eguren-Santamaria I, Schalper KA. Overview of Lung Cancer Immunotherapy. *Cancer J.* 2020;26:473–84.

150. Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori J-I, Sato M, Anraku M, et al. An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12:791–803.
151. Shepherd DJ, Tabb ES, Kunitoki K, Zhang ML, Kem M, Barth J, et al. Lymphocyte-activation gene 3 in non-small-cell lung carcinomas: correlations with clinicopathologic features and prognostic significance. *Mod Pathol.* 2022;35:615–24.
152. Shirasawa M, Yoshida T, Imabayashi T, Okuma K, Matsumoto Y, Masuda K, et al. Baseline PD-L1 expression and tumour-infiltrated lymphocyte status predict the efficacy of durvalumab consolidation therapy after chemoradiotherapy in unresectable locally advanced patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2022;162:1–10.
153. Shirasawa M, Yoshida T, Shimoda Y, Takayanagi D, Shiraishi K, Kubo T, et al. Differential Immune-Related Microenvironment Determines Programmed Cell Death Protein-1/Programmed Death-Ligand 1 Blockade Efficacy in Patients With Advanced NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16:2078–90.
154. Yeong J, Suteja L, Simoni Y, Lau KW, Tan AC, Li HH, et al. Intratumoral CD39+CD8+ T Cells Predict Response to Programmed Cell Death Protein-1 or Programmed Death Ligand-1 Blockade in Patients With NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2021;16:1349–58.
155. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1+ CD8+ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med.* 2018;24:994–1004.
156. Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, et al. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol.* 2020;21:1346–58.
157. Datar I, Sanmamed MF, Wang J, Henick BS, Choi J, Badri T, et al. Expression Analysis and Significance of PD-1, LAG-3, and TIM-3 in Human Non-Small Cell Lung Cancer Using Spatially Resolved and Multiparametric Single-Cell Analysis. *Clin Cancer Res.* 2019;25:4663–73.
158. Eiva MA, Omran DK, Chacon JA, Powell DJ. Systematic analysis of CD39, CD103, CD137, and PD-1 as biomarkers for naturally occurring tumor antigen-specific TILs. *Eur J Immunol.* 2022;52:96–108.
159. Gide TN, Quek C, Menzies AM, Tasker AT, Shang P, Holst J, et al. Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. *Cancer Cell.* 2019;35:238-255.e6.
160. Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, McLaughlin J, Altan M, Velcheti V, Gaule P, et al. Differential Expression and Significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in Human Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23:370–8.
161. Zhang ML, Kem M, Mooradian MJ, Eliane J-P, Huynh TG, Iafrate AJ, et al. Differential expression of PD-L1 and IDO1 in association with the immune microenvironment in resected lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2019;32:511–23.
162. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, Su TT, Ji L, Sun J, et al. Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell.* 2019;176:334-347.e12.

163. Hou A, Hou K, Huang Q, Lei Y, Chen W. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cell, a Promising Strategy to Overcome Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol.* 2020;11:783.
164. Zhuo M, Chen H, Zhang T, Yang X, Zhong J, Wang Y, et al. The potential predictive value of circulating immune cell ratio and tumor marker in atezolizumab treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomark.* 2018;22:467–76.
165. Kang DH, Chung C, Sun P, Lee DH, Lee S-I, Park D, et al. Circulating regulatory T cells predict efficacy and atypical responses in lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2022;71:579–88.
166. Rogado J, Pozo F, Troule K, Sánchez-Torres JM, Romero-Laorden N, Mondejar R, et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Predict Therapeutic Efficacy of Immunotherapy in NSCLC. *Cancers.* 2022;14:2898.
167. Wang Q, He Y, Li W, Xu X, Hu Q, Bian Z, et al. Soluble Immune Checkpoint-Related Proteins in Blood Are Associated With Invasion and Progression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2022;13:887916.
168. Mildner F, Sopper S, Amann A, Pircher A, Pall G, Köck S, et al. Systematic review: Soluble immunological biomarkers in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;153:102948.
169. Mazzaschi G, Minari R, Zecca A, Cavazzoni A, Ferri V, Mori C, et al. Soluble PD-L1 and Circulating CD8+PD-1+ and NK Cells Enclose a Prognostic and Predictive Immune Effector Score in Immunotherapy Treated NSCLC patients. *Lung Cancer.* 2020;148:1–11.
170. Honrubia-Peris B, Garde-Noguera J, García-Sánchez J, Piera-Molons N, Llombart-Cussac A, Fernández-Murga ML. Soluble Biomarkers with Prognostic and Predictive Value in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13:4280.
171. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017;127:2930–40.
172. Ott PA, Bang Y-J, Piha-Paul SA, Razak ARA, Bennouna J, Soria J-C, et al. T-Cell-Inflamed Gene-Expression Profile, Programmed Death Ligand 1 Expression, and Tumor Mutational Burden Predict Efficacy in Patients Treated With Pembrolizumab Across 20 Cancers: KEYNOTE-028. *J Clin Oncol.* 2019;37:318–27.
173. Trujillo JA, Sweis RF, Bao R, Luke JJ. T Cell-Inflamed versus Non-T Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. *Cancer Immunol Res.* 2018;6:990–1000.
174. 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. *Lancet.* 2016;387:1837–46.
175. Higgs BW, Morehouse CA, Streicher K, Brohawn PZ, Pilataxi F, Gupta A, et al. Interferon Gamma Messenger RNA Signature in Tumor Biopsies Predicts Outcomes in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma or Urothelial Cancer Treated with Durvalumab. *Clin Cancer Res.* 2018;24:3857–66.

176. Damotte D, Warren S, Arrondeau J, Boudou-Rouquette P, Mansuet-Lupo A, Biton J, et al. The tumor inflammation signature (TIS) is associated with anti-PD-1 treatment benefit in the CERTIM pan-cancer cohort. *J Transl Med*. 2019;17:357.
177. Hwang S, Kwon A-Y, Jeong J-Y, Kim S, Kang H, Park J, et al. Immune gene signatures for predicting durable clinical benefit of anti-PD-1 immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Sci Rep*. 2020;10:643.
178. Leng Y, Dang S, Yin F, Gao T, Xiao X, Zhang Y, et al. GDPLichi: a DNA Damage Repair-Related Gene Classifier for Predicting Lung Adenocarcinoma Immune Checkpoint Inhibitors Response. *Front Oncol*. 2021;11:733533.
179. Jang H-J, Lee H-S, Ramos D, Park IK, Kang CH, Burt BM, et al. Transcriptome-based molecular subtyping of non-small cell lung cancer may predict response to immune checkpoint inhibitors. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2020;159:1598-1610.e3.
180. Ocariz-Diez M, Cruellas M, Gascón M, Lastra R, Martínez-Lostao L, Ramírez-Labrada A, et al. Microbiota and Lung Cancer. Opportunities and Challenges for Improving Immunotherapy Efficacy. *Front Oncol*. 2020;10:568939.
181. Ciernikova S, Sevcikova A, Stevurkova V, Mego M. Tumor microbiome – an integral part of the tumor microenvironment. *Front Oncol* [Internet]. 2022 [cited 2024 Dec 31];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.1063100/full>
182. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res*. 2020;30:492–506.
183. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350:1084–9.
184. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015;350:1079–84.
185. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpnits TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359:97–103.
186. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359:104–8.
187. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018;359:91–7.
188. Baruch EN, Youngster I, Ben-Betzalel G, Ortenberg R, Lahat A, Katz L, et al. Fecal microbiota transplant promotes response in immunotherapy-refractory melanoma patients. *Science*. 2021;371:602–9.
189. Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin J-M, Morrison RM, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021;371:595–602.

190. McLean L, Leal JL, Solomon BJ, John T. Immunotherapy in oncogene addicted non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10:2736–51.
191. Jin C, Lagoudas GK, Zhao C, Bullman S, Bhutkar A, Hu B, et al. Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via $\gamma\delta$ T Cells. *Cell.* 2019;176:998-1013.e16.
192. Tsay J-CJ, Wu BG, Sulaiman I, Gershner K, Schluger R, Li Y, et al. Lower Airway Dysbiosis Affects Lung Cancer Progression. *Cancer Discov.* 2021;11:293–307.
193. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res.* 2012;160:258–66.
194. Dickson RP. The Lung Microbiome and ARDS. It Is Time to Broaden the Model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;197:549–51.
195. Le Noci V, Guglielmetti S, Arioli S, Camisaschi C, Bianchi F, Sommariva M, et al. Modulation of Pulmonary Microbiota by Antibiotic or Probiotic Aerosol Therapy: A Strategy to Promote Immunosurveillance against Lung Metastases. *Cell Rep.* 2018;24:3528–38.
196. Aykut B, Pushalkar S, Chen R, Li Q, Abengozar R, Kim JI, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature.* 2019;574:264–7.
197. Hannigan GD, Duhaime MB, Ruffin MT, Koumpouras CC, Schloss PD. Diagnostic Potential and Interactive Dynamics of the Colorectal Cancer Virome. *mBio.* 2018;9:e02248-18.
198. Conforti F, Pala L, Bagnardi V, De Pas T, Martinetti M, Viale G, et al. Cancer immunotherapy efficacy and patients' sex: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2018;19:737–46.
199. Tagliamento M, Frelaut M, Baldini C, Naigeon M, Nencioni A, Chaput N, et al. The use of immunotherapy in older patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews.* 2022;106:102394.
200. Zhang P, Ma M, Nie J, Dai L, Hu W, Zhang J, et al. Real-world data on the first-line immune checkpoint inhibitors or in combination with chemotherapy in older patients (aged ≥ 75 years) with advanced non-small cell lung cancer. *Heliyon.* 2024;10:e26026.
201. Suay G, Garcia-Cañaveras J-C, Aparisi F, Lahoz A, Juan-Vidal O. Sex Differences in the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Neoadjuvant Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* 2023;15:4433.
202. Zhou H, Zheng Z, Fan C, Zhou Z. Mechanisms and strategies of immunosenescence effects on non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment: A comprehensive analysis and future directions. *Semin Cancer Biol.* 2025;109:44–66.
203. Suay G, Ortiz-Gracia A, Rodrigo C, Linares J, Garcia-Cañaveras J-C, Armero A, et al. EP.11A.10 Chronological and Biological Age as a Response Factor to Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology.* 2024;19:S599–600.
204. Cho Y-H, Choi MG, Kim DH, Choi YJ, Kim SY, Sung KJ, et al. Natural Killer Cells as a Potential Biomarker for Predicting Immunotherapy Efficacy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Targ Oncol.* 2020;15:241–7.

205. Arasanz H, Zuazo M, Bocanegra A, Gato M, Martínez-Aguillo M, Morilla I, et al. Early Detection of Hyperprogressive Disease in Non-Small Cell Lung Cancer by Monitoring of Systemic T Cell Dynamics. *Cancers*. 2020;12:344.
206. Miao K, Zhang X, Wang H, Si X, Ni J, Zhong W, et al. Peripheral Blood Lymphocyte Subsets Predict the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:912180.
207. Mazzaschi G, Facchinetti F, Missale G, Canetti D, Madeddu D, Zecca A, et al. The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung Cancer*. 2019;127:153–63.
208. Gascón-Ruiz M, Ramírez-Labrada A, Lastra R, Martínez-Lostao L, Paño-Pardo JR, Sesma A, et al. A Subset of PD-1-Expressing CD56bright NK Cells Identifies Patients with Good Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15:329.
209. Choi MG, Kim YJ, Lee JC, Rho JK, Choi C-M. Efficacy of natural killer cell activity as a biomarker for predicting immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2020;11:3337–45.
210. Yamaguchi O, Atarashi K, Yoshimura K, Shiono A, Mouri A, Nishihara F, et al. Establishing a whole blood CD4+ T cell immunity measurement to predict response to anti-PD-1. *BMC Cancer*. 2022;22:1325.
211. Tsai Y-T, Schlom J, Donahue RN. Blood-based biomarkers in patients with non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint blockade. *J Exp Clin Cancer Res*. 2024;43:82.
212. Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, Charrier M, Remon J, Planchard D, et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4:351–7.
213. Lenci E, Cantini L, Pecci F, Cognigni V, Agostinelli V, Mentrasti G, et al. The Gustave Roussy Immune (GRIm)-Score Variation Is an Early-on-Treatment Biomarker of Outcome in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients Treated with First-Line Pembrolizumab. *J Clin Med*. 2021;10:1005.
214. Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, Yoshimura K, Horimoto K, Kitazawa M, et al. CD4+ T-cell Immunity in the Peripheral Blood Correlates with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2020;8:334–44.
215. Lababede O, Meziane MA. The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. *Oncologist*. 2018;23:844–8.
216. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2022;40:1301–11.
217. Frasci G, Lorusso V, Panza N, Comella P, Nicoletta G, Bianco A, et al. Gemcitabine plus vinorelbine versus vinorelbine alone in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18:2529–36.
218. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40:373–83.

219. 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;45:228–47.
220. Mu J, Liu Q, Kuo L, Hu G. Bayesian variable selection for the Cox regression model with spatially varying coefficients with applications to Louisiana respiratory cancer data. *Biom J*. 2021;63:1607–22.
221. Makowski D, Ben-Shachar MS, Lüdtke D. bayestestR: Describing Effects and their Uncertainty, Existence and Significance within the Bayesian Framework. *Journal of Open Source Software*. 2019;4:1541.
222. Huntington ND, Cursons J, Rautela J. The cancer-natural killer cell immunity cycle. *Nat Rev Cancer*. 2020;20:437–54.
223. Oh DY, Fong L. Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox. *Immunity*. 2021;54:2701–11.
224. Wu S-Y, Fu T, Jiang Y-Z, Shao Z-M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer*. 2020;19:120.
225. Mensurado S, Blanco-Domínguez R, Silva-Santos B. The emerging roles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20:178–91.
226. Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2019;49:1140–6.
227. Hektoen HH, Tsuruda KM, Fjellbirkeland L, Nilssen Y, Brustugun OT, Andreassen BK. Real-world evidence for pembrolizumab in non-small cell lung cancer: a nationwide cohort study. *Br J Cancer*. 2025;132:93–102.
228. Cramer-van der Welle CM, Verschueren MV, Tonn M, Peters BJM, Schramel FMNH, Klungel OH, et al. Real-world outcomes versus clinical trial results of immunotherapy in stage IV non-small cell lung cancer (NSCLC) in the Netherlands. *Sci Rep*. 2021;11:6306.
229. Veluswamy R, Hu L, Smith C, Ji J, Wang X, Wisnivesky J, et al. Immunotherapy Outcomes in Individuals With Non-Small Cell Lung Cancer and Poor Performance Status. *JNCI Cancer Spectr*. 2022;6:pkac013.
230. Meyers DE, Pasternak M, Dolter S, Grosjean HAI, Lim CA, Stukalin I, et al. Impact of Performance Status on Survival Outcomes and Health Care Utilization in Patients With Advanced NSCLC Treated With Immune Checkpoint Inhibitors. *JTO Clin Res Rep*. 2023;4:100482.
231. Mustafa SS. Steroid-induced secondary immune deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2023;130:713–7.
232. Shimomura K, Yamaguchi T, Oya Y, Uchida K, Murotani K. Impact of Corticosteroids for IrAEs on the Clinical Outcome of Immunotherapy in Patients With NSCLC. *Anticancer Res*. 2022;42:5961–9.
233. Arbour KC, Mezquita L, Long N, Rizvi H, Auclin E, Ni A, et al. Impact of Baseline Steroids on Efficacy of Programmed Cell Death-1 and Programmed Death-Ligand 1 Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36:2872–8.

234. Zheng N, Wang T, Luo Q, Liu Y, Yang J, Zhou Y, et al. M2 macrophage-derived exosomes suppress tumor intrinsic immunogenicity to confer immunotherapy resistance. *Oncoimmunology*. 2023;12:2210959.
235. Seier S, Bashiri Dezfouli A, Lennartz P, Pockley AG, Klein H, Multhoff G. Elevated Levels of Circulating Hsp70 and an Increased Prevalence of CD94+/CD69+ NK Cells Is Predictive for Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14:5701.
236. Mendes AS, Romão R, Febra J, Azevedo SX, Fidalgo P, Araújo A. Chemotherapy: A partnership with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*. 2023;14:437–41.
237. Salas-Benito D, Pérez-Gracia JL, Ponz-Sarvisé M, Rodríguez-Ruiz ME, Martínez-Forero I, Castañón E, et al. Paradigms on Immunotherapy Combinations with Chemotherapy. *Cancer Discov*. 2021;11:1353–67.
238. Wang Y-N, Wang Y-Y, Wang J, Bai W-J, Miao N-J, Wang J. Vinblastine resets tumor-associated macrophages toward M1 phenotype and promotes antitumor immune response. *J Immunother Cancer*. 2023;11:e007253.
239. Chen Y-C, Hsiao C-C, Chen K-D, Hung Y-C, Wu C-Y, Lie C-H, et al. Peripheral immune cell gene expression changes in advanced non-small cell lung cancer patients treated with first line combination chemotherapy. *PLoS One*. 2013;8:e57053.
240. Moon WY, Powis SJ. Does Natural Killer Cell Deficiency (NKD) Increase the Risk of Cancer? NKD May Increase the Risk of Some Virus Induced Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:1703.
241. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WFN, Anderson CC, Lantz O, et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007;109:5346–54.
242. Garassino MC, Gadgeel S, Speranza G, Felip E, Esteban E, Dómine M, et al. Pembrolizumab Plus Pemetrexed and Platinum in Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: 5-Year Outcomes From the Phase 3 KEYNOTE-189 Study. *J Clin Oncol*. 2023;41:1992–8.
243. Trefny MP, Kaiser M, Stanczak MA, Herzig P, Savic S, Wiese M, et al. PD-1+ natural killer cells in human non-small cell lung cancer can be activated by PD-1/PD-L1 blockade. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69:1505–17.
244. Yang X, Li Q, Zeng T. Peripheral CD4+ T cells correlate with response and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemo-immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2024 [cited 2024 Jun 26];15. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1364507/full>
245. Cossarizza A, De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Bartolomeo R, Nasi M, et al. Cytometry, immunology, and HIV infection: three decades of strong interactions. *Cytometry A*. 2013;83:680–91.
246. Kestens L, Mandy F. Thirty-five years of CD4 T-cell counting in HIV infection: From flow cytometry in the lab to point-of-care testing in the field. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92:437–44.
247. Cai Q, Lan H, Yi D, Xian B, Zidan L, Li J, et al. Flow cytometry in acute myeloid leukemia and detection of minimal residual disease. *Clin Chim Acta*. 2025;564:119945.

248. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1054.
249. Peters JM, Ansari MQ. Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:44–54.
250. Rebutti SE, Prelaj A, Friedlaender A, Cortellini A, Addeo A, Genova C, et al. Prognostic scores including peripheral blood-derived inflammatory indices in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2022;179:103806.
251. Escoin-Perez C, Blasco S, Juan-Vidal O. Immune checkpoint inhibitors in special populations. A focus on advanced lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2020;144:1–9.
252. Lahiri A, Maji A, Potdar PD, Singh N, Parikh P, Bisht B, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Mol Cancer.* 2023;22:40.
253. Desai A, Peters S. Immunotherapy-based combinations in metastatic NSCLC. *Cancer Treat Rev.* 2023;116:102545.
254. Peng L, Liang W-H, Mu D-G, Xu S, Hong S-D, Stebbing J, et al. First-Line Treatment Options for PD-L1-Negative Non-Small Cell Lung Cancer: A Bayesian Network Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2021;11:657545.
255. Liu L, Bai H, Wang C, Seery S, Wang Z, Duan J, et al. Efficacy and Safety of First-Line Immunotherapy Combinations for Advanced NSCLC: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Thorac Oncol.* 2021;16:1099–117.
256. Waterhouse D, Lam J, Betts KA, Yin L, Gao S, Yuan Y, et al. Real-world outcomes of immunotherapy-based regimens in first-line advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2021;156:41–9.
257. Velcheti V, Hu X, Piperdi B, Burke T. Real-world outcomes of first-line pembrolizumab plus pemetrexed-carboplatin for metastatic nonsquamous NSCLC at US oncology practices. *Sci Rep.* 2021;11:9222.
258. Mouritzen MT, Carus A, Ladekarl M, Meldgaard P, Nielsen AWM, Livbjerg A, et al. Nationwide Survival Benefit after Implementation of First-Line Immunotherapy for Patients with Advanced NSCLC-Real World Efficacy. *Cancers (Basel).* 2021;13:4846.
259. Descourt R, Greillier L, Perol M, Ricordel C, Auliac J-B, Falchero L, et al. First-line single-agent pembrolizumab for PD-L1-positive (tumor proportion score $\geq$ 50%) advanced non-small cell lung cancer in the real world: impact in brain metastasis: a national French multicentric cohort (ESKEYP GFPC study). *Cancer Immunol Immunother.* 2023;72:91–9.
260. Welle CMC der, Peters BJM, Schramel FMNH, Klungel OH, Groen HJM, Garde EMW van de, et al. Systematic evaluation of the efficacy–effectiveness gap of systemic treatments in metastatic nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal [Internet].* 2018 [cited 2025 Jan 21];52. Available from: <https://publications.ersnet.org/content/erj/52/6/1801100>
261. Unidades de referencia - La Fe - organismos [Internet]. La Fe. [cited 2025 Feb 2]. Available from: <https://lafe.san.gva.es/es/asistencia-unidades-de-referencia>

262. Roy D, Sylva R, Amin K, Samreen A. 86 Does entering clinical trials achieve better survival outcomes compared to standard of care in metastatic non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2024;190:107647.
263. Di Federico A, De Giglio A, Parisi C, Gelsomino F, Ardizzoni A. PD-1/PD-L1 inhibitor monotherapy or in combination with chemotherapy as upfront treatment for advanced NSCLC with PD-L1 expression $\geq 50\%$: Selecting the best strategy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;160:103302.
264. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:3543–51.
265. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346:92–8.
266. Takezawa K, Okamoto I, Okamoto W, Takeda M, Sakai K, Tsukioka S, et al. Thymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:1594–601.
267. Zhou C, Chen J, Wu L, Wang L, Liu B, Yao J, et al. PL02.04 Phase 3 Study of Ivonescimab (AK112) vs. Pembrolizumab as First-line Treatment for PD-L1-positive Advanced NSCLC: Primary Analysis of HARMONi-2. *Journal of Thoracic Oncology*. 2024;19:S1.
268. Hakozaiki T, Hosomi Y, Shimizu A, Kitadai R, Mirokuji K, Okuma Y. Polypharmacy as a prognostic factor in older patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with anti-PD-1/PD-L1 antibody-based immunotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020;146:2659–68.
269. 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;5:649–55.
270. Lee SM, Schulz C, Prabhash K, Kowalski D, Szczesna A, Han B, et al. First-line atezolizumab monotherapy versus single-agent chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer ineligible for treatment with a platinum-containing regimen (IPSOS): a phase 3, global, multicentre, open-label, randomised controlled study. *Lancet*. 2023;402:451–63.
271. Shaverdashvili K, Reyes V, Wang H, Mehta D, Marsh C, Waas JK, et al. A phase II clinical trial evaluating the safety and efficacy of durvalumab as first line therapy in advanced and metastatic non-small cell lung cancer patients with Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 2. *EClinicalMedicine*. 2023;66:102317.
272. Thomas QD, Chaabouni M, Al herk A, Lefevbre C, Cavaillon S, Sinoquet L, et al. Exploring the Efficacy of Pembrolizumab in Combination with Carboplatin and Weekly Paclitaxel for Frail Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Key Investigative Study. *Cancers (Basel)*. 2024;16:992.
273. Soubeyran P, Bellera C, Goyard J, Heitz D, Curé H, Rousselot H, et al. Screening for vulnerability in older cancer patients: the ONCODAGE Prospective Multicenter Cohort Study. *PLoS One*. 2014;9:e115060.
274. Kaiser M, Semeraro MD, Herrmann M, Absenger G, Gerger A, Renner W. Immune Aging and Immunotherapy in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22:7016.

275. Weng N-P, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009;30:306–12.
276. Owyong M, Efe G, Owyong M, Abbasi AJ, Sitarama V, Plaks V. Overcoming Barriers of Age to Enhance Efficacy of Cancer Immunotherapy: The Clout of the Extracellular Matrix. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:19.
277. Montrone M, Rosati G, Longo V, Catino A, Massafra R, Nardone A, et al. Immunotherapy in Elderly Patients Affected by Non-Small Cell Lung Cancer: A Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine.* 2023;12:1833.
278. Jylhävä J, Pedersen NL, Hägg S. Biological Age Predictors. *EBioMedicine.* 2017;21:29–36.
279. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2019;19:495–509.
280. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debieuvre D, Mosser J, Lena H, et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet.* 2016;387:1415–26.
281. Mhanna L, Guibert N, Milia J, Mazieres J. When to Consider Immune Checkpoint Inhibitors in Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer? *Curr Treat Options in Oncol.* 2019;20:60.
282. Mok TSK, Yao W, Duruisseaux M, Doucet L, Azkárte Martínez A, Gregorc V, et al. KRYSTAL-12: Phase 3 study of adagrasib versus docetaxel in patients with previously treated advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring a KRASG12C mutation. *JCO.* 2024;42:LBA8509–LBA8509.
283. de Langen AJ, Johnson ML, Mazieres J, Dingemans A-MC, Mountzios G, Pless M, et al. Sotorasib versus docetaxel for previously treated non-small-cell lung cancer with KRASG12C mutation: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2023;401:733–46.
284. Lee SJ, Lee J-I, Nam D-H, Ahn YC, Han JH, Sun J-M, et al. Leptomeningeal Carcinomatosis in Non–Small-Cell Lung Cancer Patients: Impact on Survival and Correlated Prognostic Factors. *Journal of Thoracic Oncology.* 2013;8:185–91.
285. Ozcan G, Singh M, Vredenburgh JJ. Leptomeningeal Metastasis from Non-Small Cell Lung Cancer and Current Landscape of Treatments. *Clin Cancer Res.* 2023;29:11–29.
286. Bronte G, Cosi DM, Magri C, Frassoldati A, Crinò L, Calabrò L. Immune Checkpoint Inhibitors in “Special” NSCLC Populations: A Viable Approach? *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 29];24. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10454231/>
287. Goldberg SB, Schalper KA, Gettinger SN, Mahajan A, Herbst RS, Chiang AC, et al. Pembrolizumab for management of patients with NSCLC and brain metastases: long-term results and biomarker analysis from a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21:655–63.
288. Nadal E, Rodríguez-Abreu D, Simó M, Massutí B, Juan O, Huidobro G, et al. Phase II Trial of Atezolizumab Combined With Carboplatin and Pemetrexed for Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer With Untreated Brain Metastases (Atezo-Brain, GECP17/05). *J Clin Oncol.* 2023;41:4478–85.

289. Suay G, Garcia-Cañaveras J-C, Aparisi F, Garcia J, Juan-Vidal O, Lahoz A. Immune checkpoint inhibitors as first-line treatment for brain metastases in stage IV NSCLC patients without driver mutations. *Cancer Letters*. 2024;606:217317.
290. O’Leary CL, Pierce N, Patel SP, Naidoo J. Immune-Related Toxicity in NSCLC: Current State-of-the-Art and Emerging Clinical Challenges. *Journal of Thoracic Oncology*. 2024;19:395–408.
291. Barron CC, Stefanova I, Cha Y, Elsolh K, Zereskian A, Gaafour N, et al. Chronic immune-related adverse events in patients with cancer receiving immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *J Immunother Cancer*. 2023;11:e006500.
292. Toi Y, Sugawara S, Kawashima Y, Aiba T, Kawana S, Saito R, et al. Association of Immune-Related Adverse Events with Clinical Benefit in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with Nivolumab. *Oncologist*. 2018;23:1358–65.
293. Foster CC, Couey MA, Kochanny SE, Khattri A, Acharya RK, Tan Y-HC, et al. Immune-related adverse events are associated with improved response, progression-free survival, and overall survival for patients with head and neck cancer receiving immune checkpoint inhibitors. *Cancer*. 2021;127:4565–73.

8 Anexos

8.1 Anexo 1. Hoja de información al paciente y consentimiento informado



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE ADULTO

Versión: v1	Fecha de la versión: 20-09-2021
Investigador Principal: Agustín Lahoz Rodríguez, Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, agustin.lahoz@uv.es	
CENTRO: IIS Hospital La Fe	
Título del proyecto de investigación: "Búsqueda de biomarcadores en inmunoterapia basados en la metabolómica y estudio del metabolismo de células supresoras de origen mieloide como diana terapéutica en el cáncer de pulmón"	

1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (CEIm La Fe).

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Con este proyecto pretendemos, por un lado, buscar perfiles de metabolitos en sangre de aproximadamente 40 pacientes con cáncer de pulmón que anticipen el potencial beneficio de la inmunoterapia y por otro, encontrar vulnerabilidades metabólicas en células inmunosupresoras con el objetivo de evitar el escape inmunitario de las células cancerosas. Esta doble aproximación puede ayudar en la toma de decisiones médicas y aumentar el beneficio terapéutico, lo que además supondría un importante ahorro económico. El uso combinado de inmunoterapia con fármacos inhibidores del escape inmunitario de las células cancerosas puede contribuir a una mayor eficacia en el tratamiento del cáncer.

Por tanto, dado que se trata de muestras extraídas por necesidades asistenciales habituales, los pacientes incluidos no deberán realizarse ningún procedimiento ni visita adicional de las que corresponden al seguimiento habitual de pacientes diagnosticados de CPNM en tratamiento.

Este análisis se desarrollará en la unidad analítica del Instituto de Investigación La Fe que cuenta con una plataforma de metabolómica.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Al participar en el estudio usted está colaborando en esta investigación. Puede que la información que obtengamos como resultado de su participación no le beneficie a usted directamente, pero podría beneficiar a otras personas afectadas por su misma enfermedad. Participar en este estudio puede ayudar a descubrir nuevos marcadores que en un futuro se podrían emplear para predecir la respuesta al tratamiento con ICIs de pacientes que padecen su misma enfermedad.

Los pacientes incluidos en el estudio no deberán realizarse ningún procedimiento ni visita adicional de las que corresponden según el seguimiento habitual de pacientes diagnosticados de CPNM en tratamiento.

Debe saber que su participación en este estudio puede no aportarle beneficios directos.

5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:

No procede

6. Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO:

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, puede contactar con el médico del estudio, el Dr. Agustín Lahoz Rodríguez, en el número de teléfono 616535288.

7. CONFIDENCIALIDAD:

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos y garantía de los derechos digitales y en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición, cancelación de datos, limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos y solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio o al/a la Delegado/a de Protección de Datos de la Institución, con quién podrá comunicarse a través del teléfono y/o dirección de correo electrónico: Agustin.lahoz@uv.es.

Le recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio, para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de

manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar con el Delegado de Protección de Datos del promotor [[dirección/link](#)].

8. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto.

9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:

Cualquier nueva información que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, en caso de que se hubieran recogido muestras, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables, previamente obtenidas, para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos.

En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad.

10. OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS:

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el Real Decreto 1716/2011, normativas que garantizan el respeto a los derechos que le asisten.

Al firmar este documento, revisado y evaluado favorablemente por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos que ha aprobado este estudio, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

Las muestras biológicas se harán coincidir con las extracciones que habitualmente le practicarán antes de recibir el tratamiento y no supondrán pinchazos adicionales. En todo momento se seguirá la normativa en cuanto a la obtención, conservación y almacenamiento de las muestras obtenidas, así como en el manejo de los datos que se obtengan, de acuerdo a lo establecido en la Ley 14/2007, del 3 de julio, de Investigación Biomédica.

Las muestras biológicas se custodiarán en el IIS Hospital La Fe, durante 5 años.

CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: "Búsqueda de biomarcadores en inmunoterapia basados en la metabolómica y estudio del metabolismo de células supresoras de origen mieloide como diana terapéutica en el cáncer de pulmón"

Yo,

(nombre y apellidos).

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con: (nombre del Investigador)
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firma del Participante

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del Investigador

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para mi salud: ☐ **Sí** ☐ **No**

Firma del representante _____ Fecha: ____/____/____ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: _____ Fecha: ____/____/____

Deseo que me comuniquen la información derivada de las pruebas genéticas realizadas (únicamente para aquellos estudios que incluyan este tipo de pruebas, siempre que estén validadas y que puedan tener relevancia para la salud del paciente): ☐ **Sí** ☐ **No**

Firma del representante _____ Fecha: ____/____/____ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: _____ Fecha: ____/____/____

CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Título del estudio: "Búsqueda de biomarcadores en inmunoterapia basados en la metabolómica y estudio del metabolismo de células supresoras de origen mieloide como diana terapéutica en el cáncer de pulmón"

Yo, _____ (nombre y apellidos),

- He recibido la hoja de información sobre el estudio.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He sido informado por: _____ (nombre del investigador)
- Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Declaro bajo mi responsabilidad que: _____ (nombre del participante del estudio)

- Comprende que su participación es voluntaria.
- Comprende que puede retirarse del estudio:
 - 1º Cuando quiera
 - 2º Sin tener que dar explicaciones.
 - 3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Firma del testigo (Nombre, firma y fecha de puño y letra)

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del Investigador:

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

El paciente desea que le comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para su salud (si procede): ☐ Sí ☐ No

Firma del testigo (Nombre, firma y fecha de puño y letra)

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del Investigador:

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

El paciente desea que le comuniquen la información derivada de las pruebas genéticas realizadas (únicamente para aquellos estudios que incluyan este tipo de pruebas, siempre que estén validadas y que puedan tener relevancia para la salud del paciente): ☐ Sí ☐ No

Firma del testigo (Nombre, firma y fecha de puño y letra)

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Firma del Investigador:

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Título del estudio: "Búsqueda de biomarcadores en inmunoterapia basados en la metabolómica y estudio del metabolismo de células supresoras de origen mieloide como diana terapéutica en el cáncer de pulmón"

Yo, _____ (nombre y apellidos)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del Investigador)

Comprendo que la participación de _____ (nombre del participante) es voluntaria.

Comprendo que _____ (nombre del participante) puede retirarse del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a _____ (nombre del participante), toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Recibiré una copia firmada y fechada de este documento de consentimiento informado.

Y presto mi conformidad con que _____ (nombre del participante) participe en el estudio.

Firma del Representante

Firma del Investigador

Nombre: _____

Nombre: _____

Fecha: ____/____/____

Fecha: ____/____/____

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para mi salud: ☐ **Sí** ☐ **No**

Firma del representante _____ Fecha: ____/____/____ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: _____ Fecha: ____/____/____

Deseo que me comuniquen la información derivada de las pruebas genéticas realizadas (únicamente para aquellos estudios que incluyan este tipo de pruebas, siempre que estén validadas y que puedan tener relevancia para la salud del paciente): ☐ **Sí** ☐ **No**

Firma del representante _____ Fecha: ____/____/____ (Nombre, firma y fecha de puño y letra del representante legal)

Firma del investigador: _____ Fecha: ____/____/____

8.2 Anexo 2. Informe del comité de ética en investigación médica Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

MARÍA TORDERA BAVIERA, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE**,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha 20/10/2021, el Proyecto de Investigación:

Título: “**Búsqueda de biomarcadores en inmunoterapia basados en la metabolómica y estudio del metabolismo de células supresoras de origen mieloide como diana terapéutica en el cáncer de pulmón.**”

Nº de registro: 2020-174-1

Documento	Versión - Fecha
Protocolo - FIS-2020	sin versión ni fecha
Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado	Versión v1. Fecha de la versión 20-09-2021

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE por el/la Dr. / Dra. **AGUSTIN LAHOZ RODRÍGUEZ** del servicio/unidad/grupo de investigación de **UNIDAD DE BIOMARCADORES Y MEDICINA DE PRECISIÓN** como Investigador Principal.

Que el CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE, es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 20/10/2021

Firmat per Maria Tordera Baviera el
29/10/2021 14:06:17

Fdo.: MARÍA TORDERA BAVIERA
Secretario/a Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos

ANEXO I COMPOSICIÓN CEIm

Presidente:

ADELA CAÑETE NIETO - Facultativo Especialista en Pediatría. Jefe Sección de Unidad de Hematología y Oncología Pediátrica

Vicepresidente:

OSCAR DÍAZ CAMBRONERO - Facultativo especialista en Anestesiología y Reanimación. Jefe Sección Anestesiología y Reanimación

Secretario:

MARÍA TORDERA BAVIERA - Farmacéutica Especialista en Farmacia Hospitalaria. Farmacéutica adjunta del Servicio de Farmacia

Vocales:

MARÍA VICTORIA PARICIO GÓMEZ - Diplomada Enfermería. Supervisora del Servicio de Hematología y Trasplante de Progenitores Hemáticos

JAVIER LLUNA GONZÁLEZ - Facultativo Especialista en Cirugía Pediátrica. Médico adjunto del Servicio de Cirugía Pediátrica

PAULA RAMÍREZ GALLEYMORE - Facultativo Especialista en Medicina Intensiva. Médico adjunto del Servicio de Medicina Intensiva

JOSÉ MARÍA CANELLES GAMIR - Farmacéutico de Atención Primaria del Departamento de Salud Valencia La Fe

SERAFÍN RODRÍGUEZ CAPELLÁN - Licenciado en Derecho. Técnico de Función Administrativa adscrito a la Dirección de Investigación

VICENTE INGLADA ALCAIDE - Miembro Lego, representante de los intereses de los pacientes

MIGUEL ÁNGEL CANO TORRES - Licenciado en Derecho. Técnico de Función Administrativa adscrito a la Dirección de Investigación

LUIS VICENTE MARTÍNEZ DOLZ - Facultativo Especialista en Cardiología. Jefe de Servicio de Cardiología

BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH - Facultativo Especialista en Neurología. Médico adjunto del Servicio de Neurología

SARA BRUGGER FRIGOLS - Facultativo Especialista en Radiodiagnóstico. Médico adjunto del Área de Imagen Médica

M^a ISABEL IZQUIERDO MACIÁN - Facultativo Especialista en Pediatría (Neonatología). Jefa de Servicio de Neonatología

MATTEO FRASSON - Facultativo Especialista en Cirugía. Médico adjunto del Servicio de Cirugía General y Digestiva

JOSÉ VICENTE SOLANAS PRATS - Facultativo Especialista en Medicina de Familia y Comunitaria. Médico del Centro de Salud Trinitat

ANTONIO ORDUÑA GALÁN - Ing. de aplicaciones y sistemas. Responsable Área de Seguridad y Calidad de Sistemas de Información

ANA PEIRÓ PEIRÓ - Fac. especialista en Farmacología Clínica. Médica Adjunta del Servicio Farmacología Clínica. DSA-HG.

9 Actividades científicas relacionadas

9.1 Concesión beca GIDO proyectos Investigación 2022

Resolución Beca GIDO Proyecto de Investigación 2022 - GIDO

Resolución Beca GIDO Proyecto de Investigación 2022

ACTA DE RESOLUCIÓN DE LA BECA GIDO PROYECTO DE INVESTIGACIÓN 2022

Reunido el Jurado Evaluador de la Beca GIDO Proyecto de Investigación 2021 compuesto por los Doctores María Guirado, Martín Oré Arce y Alfredo Sánchez.

Resuelven por unanimidad, que la Beca GIDO Proyecto de Investigación 2022 se otorga a los siguientes proyectos presentados con las siguientes cuantías:

1.- Nuevas aproximaciones en la oncología de precisión: modelos 3D (Organoides)

Presentado por: Dra. Silvia Calabuig Fariñas
Bióloga, Investigadora Postdoctoral. Fundación de Investigación del Hospital General Universitario Valencia
Beca: 5.000€

2.- Diseño de un modelo in vitro para el screening farmacológico que emule el microambiente tumoral en cáncer de pulmón

Presentado por: Dr. José Marcelo Galbis Caravajal
Jefe de Servicio de Cirugía Torácica. Hospital Universitario de la Ribera.
Beca: 3.000€

3.- Análisis de biomarcadores de sinergia en la combinación de platino-pemetrexed-pembrolizumab en el tratamiento del carcinoma no microcítico de pulmón

Presentado por: Dr. Guillermo Suay Montagud
Facultativo Residente. Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitari i Politècnic La Fe.
Beca: 2.000€

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente documento en Valencia a 11 de marzo de 2022.

Dr. Alfredo Sánchez Hernández
Coordinador de la Beca GIDO Proyecto de Investigación 2022
Vicepresidente de Gido

9.2 Póster en congreso nacional

Congreso de la Sociedad Española de Oncología Médica 2024 – Madrid – 15OCT2024 a 18OCT2024.



La Sociedad Española de Oncología Médica, certifica que:

Guillermo Suay Montagud, Alba Ortiz Gracia, Carmina Rodrigo Jarque, Julio Linares Díaz, Juan Carlos García Cañaveras, Andrea Armero Mateu, Francisco Aparisi Aparisi, Agustín Lahoz Rodríguez, Oscar Jose Juan Vidal

han presentado la comunicación titulada

Análisis de la influencia de la polifarmacia sobre el tratamiento con inhibidores de punto de control inmunitario en pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón metastásicos: datos de vida real en un centro de referencia.

seleccionada como ePóster con el número

EPOSTER-264

incluida en la obra "Libro de comunicaciones SEOM2024" (ISBN: 978-84-88014-58-0) durante el Congreso SEOM2024, celebrado en Madrid del 15 al 18 de octubre de 2024.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos el presente certificado en Madrid, 18 de octubre de 2024.

Dr. César Serrano García
Secretario General de la Sociedad Española
de Oncología Médica (SEOM)

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)
Velázquez, 7 - 3ª
28001 Madrid

C/ Velázquez, 7 - 3ª planta. 28001 Madrid / Tel.: 91 577 52 81 / Fax: 91 139 35 56 / www.seom.org

DOI: 10.3252/pso.es.SEOM2024.2024

CONCLUSIÓN PRINCIPAL:
LA POLIFARMACIA INFLUYE EN LA MEDIANA DE SG DE LOS PACIENTES CON CPCNP TRATADOS CON IPCI. FUTUROS ESTUDIOS PROSPECTIVOS DEBERÍAN EVALUAR ESTE FACTOR.

PALABRAS CLAVE:
CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN, INHIBIDORES DE PUNTO DE CONTROL INMUNITARIO, POLIFARMACIA, DATOS DE VIDA REAL, INMUNOTERAPIA



Análisis de la influencia de la polifarmacia sobre el tratamiento con inhibidores de punto de control inmunitario en pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón metastásico: datos de vida real en un centro de referencia

Autores: GUILLERMO SUAY^{1,2}, ALBA ORTIZ-GRACIA¹, CARMINA RODRÍGUEZ¹, JULIO LINARES¹, JUAN-CARLOS GARCÍA-CAÑAVERAS¹, ANDREA ARMERO¹, FRANCISCO APARISI^{1,2}, AGUSTÍN LAHOZ¹, OSCAR JUAN VIDAL^{1,2}

¹Servicio de Oncología Médica, Hospital La Fe, Valencia, España; ²Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, IIS La Fe, Valencia, España.

Introducción

- El carcinoma no microcítico de pulmón (CPCNP) ha experimentado una revolución en el tratamiento con la aparición de los inhibidores de punto de control inmunitario (IPCI), generando un aumento en la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG).
- No existen marcadores fiables para valorar qué pacientes pueden beneficiarse en mayor o menor medida de los IPCI y existen poblaciones infrarepresentadas¹.
- Entre los factores que pueden interaccionar con el sistema inmunológico escatamos la polifarmacia.

Objetivo

- El objetivo de nuestro estudio es el análisis de papel de la polifarmacia en la mediana de SG de los pacientes con CPCNP metastásico que van a recibir IPCI.

Métodos

- Se analizó la influencia de la polifarmacia, definida por la presencia de 15 fármacos, en la respuesta y supervivencia al tratamiento con IPCI en pacientes con CPCNP metastásico.
- Criterios de inclusión: Pacientes que van a iniciar un tratamiento de primera línea con IPO en monoterapia, o IPO en combinación con quimioterapia.
- Los pacientes se reclutaron en un hospital terciario de referencia de forma retrospectiva entre enero de 2016 y diciembre de 2023.

Conclusiones

- Aunque podría haber una asociación entre el número de comorbilidades y polifarmacia, la relación es débil y no implica la supervivencia de forma final.
- La polifarmacia influye en la mediana de SG de los pacientes con CPCNP tratados con IPCI. Futuros estudios prospectivos deberían valorar este parámetro para optimizar los tratamientos de los pacientes.

Agradecimientos

Gracias a los pacientes y sus familias. Gracias al apoyo de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión. Este trabajo ha sido apoyado por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad a través de un contrato "Se Strategic" n.º 2016/00017 y por el Plan de Investigación Biomédica n.º 2016/00017.

Referencias

1. Bar-Eck et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(25):3455-3462. doi:10.1200/JCO.2018.7925.
2. Linde et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(25):3455-3462. doi:10.1200/JCO.2018.7925.
3. Linde et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(25):3455-3462. doi:10.1200/JCO.2018.7925.

4

Resultados

Tabla 1. Características basales de los pacientes (N=247)	
Sexo	• Masculino: 231 (93%) • Femenino: 16 (6%)
Edad (media)	• 63 (rango: 35-85)
Tobaquismo previo	• No: 124 (50%) • Sí: 123 (50%)
Histología	• Adenocarcinoma: 170 (68%) • Carcinoma escamoso: 54 (22%) • Otros: 23 (9%)
Metástasis contralateral	• Sí: 124 (50%) • No: 123 (50%)
Exposición de PD-L1	• ≥ 1%: 124 (50%) • < 1%: 123 (50%)
Protocolo de tratamiento	• IPO en monoterapia: 86 (34%) • IPO en combinación: 161 (66%)
Estado tumoral	• 0-15 (7%) • 16-35 (14%) • 36-45 (14%) • 46-60 (24%) • > 60 (41%)
Número de comorbilidades (Mediana)	• 1 (rango: 0-11)
Número de fármacos (Mediana)	• 3 (rango: 0-11)

- Se reclutaron un total de 247 pacientes. La población femenina era de un 30%, la mediana de edad fue de 63 años, y un 23,5% de pacientes presentaban histología escamosa. Un 34,8% recibían IPO en monoterapia, frente a un 65,2% que llevaban IPO en combinación con quimioterapia u otros IPCI.
- No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los diferentes cofactores, a excepción del número de comorbilidades y el número de fármacos, que aunque fue estadísticamente significativo, la correlación es débil y no explicaría los datos ($p < 0,7$).
- La mediana de SG fue de 28 meses (IC 95% 7,15-14,87) en el grupo con 4 fármacos frente a 11 meses (IC 95% 12,07-12,92) en el grupo con 5 fármacos. La Hazard Ratio fue de 0,528 (IC 95% 0,418-0,681).

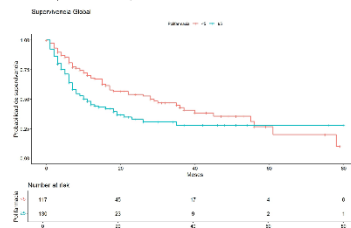


Figura 1. Curvas de vida libre de enfermedad (SG) en pacientes con polifarmacia (0-5 fármacos) en el estudio.

9.3 Poster en congreso internacional

World Conference on Lung Cancer 2024 – San Diego, California, USA – 07SEP2024 to 09SEP2024.



EP.11A.10: Chronological and Biological Age as a Response Factor to Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer

Guillermo Suay¹, Alba Ortiz-Gracia¹, Carmina Rodrigo², Julio Linares¹, Juan-Carlos García-Cañaveras², Andrea Armero², Francisco Aparisi², Agustín Lahoz², Oscar Juan-Vidal¹

¹University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain; ²Health Research Institute Hospital La Fe – Correspondence: guillermo_suay@islafe.es



2024 World Conference on Lung Cancer
SEPTEMBER 7-10, 2024
SAN DIEGO, CA, USA

Background

- Special populations have been underrepresented in approbatory Immune checkpoint inhibitors (ICIs) trials, and real-world data is scarce¹.
- Some doubts exist regarding elder patients since it has been suggested that immunosenescence may deter ICIs efficacy in this subgroup².
- Our study aimed to analyze the efficacy of ICIs according to age in patients with advanced NSCLC.

Methods

- This is a retrospective study in a tertiary reference Hospital in Spain.

Key Eligibility Criteria
N = 247

- Age ≥18 years old.
- Diagnosis of advanced NSCLC (stage III and IV patients not amenable to radical treatment).
- Candidates to receive 1st line ICIs.

Stratification Factors:

- Age <70 years old vs ≥70 years old.
- Number of comorbidities as a surrogate of biological age: 0-2 vs ≥3 comorbidities.

Primary Endpoint: Overall Survival (OS) of the cohort stratified by age and number of comorbidities.

Discussion and Conclusion

Take away message

- There are no statistically significant differences in OS stratified by chronological age.
- When considering the number of comorbidities as a surrogate of biological age, median OS was worse in patients who had ≥3 comorbidities.
- Other baseline characteristics do not have statistically significant relationship with the 2 stratification factors.
- Therefore, immunosenescence may be a process triggered by biological factors instead of age.

Future direction for research

- Further research should be done to better understand the immunosenescence process, and to personalize treatments to each patient.

References and Acknowledgements

- A focus on advanced lung cancer patients. Lung Cancer. doi: 10.1016/j.lungcan.2020.03.028.
- Immunosenescence and immunecheckpoint inhibitors in non-small cell lung cancer patients: Does age really matter? doi: 10.1016/j.ctrv.2017.08.003.

Acknowledgements: Thanks for all the patients and their families. Thanks for all the support by the Biomarker and Precision Medicine Unit. This work has been supported by the Carlos III Health Institute of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through a "Río Hortega" contract to G.S.M. (CM23/00014) and a "Proyecto de I+D+i en Salud" to A.L. (PI23/01369).

Results

Table 1. Patient Baseline Characteristics (N=247)

Sex	Male: 172 (70%) Female: 74 (30%)
Age (Median)	65 (Range: 39-85)
Smoking History	Yes: 232 (93.9%) No: 15 (6.1%)
Histology	Adenocarcinoma: 170 (68.8%) Squamous: 59 (23.9%) Other histology: 18 (7.3%)
Brain Metastases	Yes: 65 (26.3%) No: 182 (73.7%)
PD-L1 expression	<1%: 86 (34.8%) 1-49%: 68 (27.5%) ≥50%: 86 (34.8%) Unknown: 7 (2.8%)
Treatment Protocols	ICI Monotherapy: 86 (34.8%) ICI Combination: 161 (65.2%)
Performance Status	0-1: 157 (63.6%) 2-3: 23 (9.3%) 4-5: 67 (27.1%)
Number of Comorbidities (Median)	3 (Range 0-13)
Number of Drugs (Median)	5 (Range 0-21)

Image 1A - Overall survival stratified by chronological age
Age <70 years old – ≥70 years old

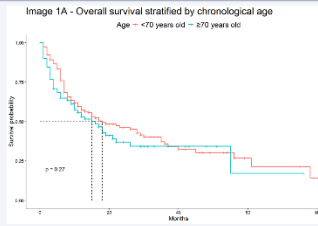
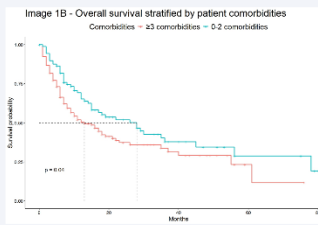


Image 1B - Overall survival stratified by patient comorbidities
Comorbidities ≥3 comorbidities – 0-2 comorbidities



- No statistically significant difference in median OS was observed when comparing patients with <70 years old and patients with ≥70 years old (18 vs 15 months; p=0.270) (Image 1A).
- Median OS stratified by comorbidities showed statistically significant differences in patients who had 0-2 comorbidities, compared with patients who had ≥3 comorbidities (28 months vs 13 months; HR= 0.697; p=0,04) (Image 1B).

EP.11A.10 Chronological and Biological Age as a Response Factor to Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer

G. Suay¹ · A. Ortiz-Gracia¹ · C. Rodrigo² · ... · F. Aparisi² · A. Lahoz¹ · O. Juan-Vidal¹... [Show more](#)

[Affiliations & Notes](#) [Article Info](#)

DOI: [10.1016/j.jtho.2024.09.1121](https://doi.org/10.1016/j.jtho.2024.09.1121) Also available on [ScienceDirect](#)

[Get Access](#) [Cite](#) [Share](#) [Set Alert](#) [Get Rights](#) [Reprints](#)

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have radically changed the prognosis of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) by increasing the overall survival (OS). However, some doubts exist regarding special populations such as elder patients, which show less benefit to different ICIs in different subgroup analyses of approbatory trials. It has been suggested that this may be a consequence of immunosenescence. However, the elder population was underrepresented in those trials, and there is scarce real-world data.

166

9.4 Publicaciones relacionadas en revistas científicas

Suay G, Garcia-Cañaveras JC, Aparisi F, Lahoz A, Juan-Vidal O. Sex Differences in the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Neoadjuvant Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Cancers* (Basel). 2023 Sep 6;15(18):4433. doi: 10.3390/cancers15184433. PMID: 37760403; PMCID: PMC10526439.



cancers



Review

Sex Differences in the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Neoadjuvant Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis

Guillermo Suay ¹, Juan-Carlos Garcia-Cañaveras ¹, Francisco Aparisi ¹, Agustin Lahoz ^{1,*} and Oscar Juan-Vidal ^{2,*}

¹ Biomarkers and Precision Medicine Unit, Health Research Institute La Fe, Av. Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain; guillermo_suay@islafe.es (G.S.); juancarlos_garcia@islafe.es (J.-C.G.-C.); francisco_aparisi@islafe.es (F.A.)

² Medical Oncology Department, La Fe University and Polytechnic Hospital, Av. Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain

* Correspondence: agustin.lahoz@uv.es (A.L.); juan_osc@gva.es (O.J.-V.)

Simple Summary: Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have transformed the treatment paradigm for metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (IB-IIIa) with no targetable driver mutations. Although genetic and physiological factors could suggest a priori differences in response to ICIs regarding sex, there are few works addressing it, and the available results are confusing. It is well established that women have a more proficient immune system; thus, a higher immune editing level is needed to develop metastatic disease, which could explain their better responses in the early phases of disease. Furthermore, the encouraging results observed for metastatic disease have promoted the use of ICIs as neoadjuvant treatments. Here, we aimed to first review the landscape of current neoadjuvant settings used in resectable NSCLC patients, before analyzing whether sex may be a factor that modulates responses to ICIs. To this end, we have carried out a meta-analysis of the available data.



Citation: Suay, G.; Garcia-Cañaveras, J.-C.; Aparisi, F.; Lahoz, A.; Juan-Vidal, O. Sex Differences in the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Neoadjuvant Therapy of Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Cancers* **2023**, *15*, 4433. <https://doi.org/10.3390/cancers15184433>

Academic Editor: Akiteru Goto

Received: 4 August 2023

Revised: 30 August 2023

Accepted: 4 September 2023

Published: 6 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the world's leading causes of morbidity and mortality. ICIs alone or combined with chemotherapy have become the standard first-line treatment of metastatic NSCLC. The impressive results obtained have stimulated our interest in applying these therapies in early disease stage treatments, as neoadjuvant immunotherapy has shown promising results. Among many of the factors that may influence responses, the role played by sex is attracting increased interest and needs to be addressed. Here, we aim to first review the state of the art regarding neoadjuvant ICIs, whether they are administered in monotherapy or in combination with chemotherapy at stages IB-IIIa, particularly at stage IIIa, before analyzing whether sex may influence responses. To this end, a meta-analysis of publicly available data comparing male and female major pathological responses (MPR) and pathological complete responses (pCR) was performed. In our meta-analysis, MPR was found to be significantly higher in females than in males, with an odds ratio (OR) of 1.82 (95% CI 1.13–2.93; $p = 0.01$), while pCR showed a trend to be more favorable in females than in males, but the OR of 1.62 was not statistically significant (95% CI 0.97–2.75; $p = 0.08$). Overall, our results showed that sex should be systematically considered in future clinical trials settings in order to establish the optimal treatment sequence.

Keywords: immune checkpoint inhibitors; NSCLC; neoadjuvant; sex; PD-L1; immune system

1. Introduction

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the main causes of cancer death worldwide, which is attributed to its late stage diagnosis [1–3]. Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have emerged as a new treatment option in those patients without target mutations.

Suay G, Garcia-Cañaveras JC, Aparisi F, Garcia J, Juan-Vidal O, Lahoz A. Immune checkpoint inhibitors as first-line treatment for brain metastases in stage IV NSCLC patients without driver mutations. *Cancer Lett.* 2024 Dec 1;606:217317. doi: 10.1016/j.canlet.2024.217317. Epub 2024 Nov 1. PMID: 39489211.

 Article Advance

Cancer Letters
Volume 606, 1 December 2024, 217317



Review Articles

Immune checkpoint inhibitors as first-line treatment for brain metastases in stage IV NSCLC patients without driver mutations

Guillermo Suay ^{a, b}, Juan-Carlos Garcia-Cañaveras ^b, Francisco Aparisi ^{a, b}, José García ^c, Oscar Juan-Vidal ^{a, b}, Agustín Lahoz ^b  

[Show more](#) 

[+ Add to Mendeley](#) [Share](#) [Cite](#)

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.217317> [Get rights and content](#) 

Highlights

- Controversy exists regarding ICI use in non-targetable NSCLC brain metastases.
- Microglia is key to modulate brain metastases growth and immune infiltration.
- Brain metastases respond to ICIs due to BBB damage or indirect immune infiltration.
- ICI upfront treatment without local CNS therapy may be used in selected cases.

Abstract

Immune checkpoint inhibitors (ICI) therapy with or without chemotherapy has been established as the first-line treatment for patients with non-oncogene addicted advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Yet some clinical settings, such as the treatment sequence in patients with brain metastases, have barely been evidenced. Although ICIs cannot directly cross the blood-brain barrier (BBB), evidence suggests that BBB damage could allow ICIs into the central nervous system, or that they can have an indirect effect on the tumor immune microenvironment (TIME) and cause an anti-tumor response. Pivotal phase III trials have included a highly selected population but offer few data on these patients. Here we first review how ICIs can indirectly shape the brain metastases microenvironment through different mechanisms, and some possible causes of ICIs resistance. We also analyze the evidence reported in pivotal phase III trials and phase II trials focused on NSCLC brain metastases for first-line treatment, and the evidence for upfront or delayed local brain therapy. Finally, we discuss the best evidence-based approach to treat NSCLC patients with brain metastases and propose future research.