



Universidad Autónoma  
de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Universidad Autónoma de Madrid

**Repertorio de linfocitos T y perfiles de expresión génica  
y mutacional: nuevos biomarcadores en quimio-  
inmunoterapia neoadyuvante de cáncer de pulmón**

Marta Casarrubios García

Madrid, 2022



Universidad Autónoma  
de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

# **Repertorio de linfocitos T y perfiles de expresión génica y mutacional: nuevos biomarcadores en quimio- inmunoterapia neoadyuvante de cáncer de pulmón**

## **Autora**

Marta Casarrubios García, Graduada en Farmacia

## **Directores de tesis**

Dr. Mariano Provencio Pulla y Dr. Alberto Cruz Bermúdez

## **Tutora**

Rosario Perona Abellón

Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro – Segovia de Arana

Hospital Universitario Puerta de Hierro – Majadahonda

Mariano Provencio Pulla, Doctor en Medicina, Profesor titular de la Universidad Autónoma de Madrid e investigador principal del grupo de Investigación en Cáncer de Pulmón del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Segovia de Arana y Alberto Cruz Bermúdez, Doctor en Biociencias Moleculares e investigador del grupo de Investigación en Cáncer de Pulmón del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Segovia de Arana.

#### CERTIFICAN

Que Marta Casarrubios García, Graduada en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título:

**Repertorio de linfocitos T y perfiles de expresión génica y mutacional: nuevos biomarcadores en quimio-inmunoterapia neoadyuvante de cáncer de pulmón**

Revisado este trabajo, se considera que reúne las condiciones de calidad, contenido y forma exigidas y se autoriza a su presentación para ser evaluado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Madrid a 1 de junio de 2022.

Fdo. Mariano Provencio Pulla

Fdo. Alberto Cruz Bermúdez

# Aprobación del estudio y fuentes de financiación

El trabajo presentado en esta memoria titulado “Repertorio de linfocitos T y perfiles de expresión génica y mutacional: nuevos biomarcadores en quimio-inmunoterapia neoadyuvante de cáncer de pulmón” ha sido realizado en el laboratorio de Oncología Médica del Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana. Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de Bristol-Myers Squibb, Thermo Fisher Scientific, el Instituto de Salud Carlos III (PI19/01652) y Horizonte 2020.

La doctoranda Marta Casarrubios García ha sido financiada a través de un contrato dentro del Programa Operativo de Empleo Juvenil como Investigador Predoctoral (PEJD-2019-PRE/BMD-17006) concedido a Alberto Cruz Bermúdez.

El desarrollo del ensayo clínico, así como la recogida de muestras se organizó y promovió por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) de acuerdo a la declaración de Helsinki y las Reglas de Buena Práctica Clínica del Comité Europeo.

A la más linda.

“If you wanna make the world a better place,  
take a look at yourself and then make a change”

*Michael Jackson*

# Agradecimientos

No me puedo aún creer que esta etapa se esté acabando, la más importante de mi vida. No he querido escribir los agradecimientos hasta el final porque, sin duda, es la parte más difícil de estas 143 páginas y sentía que al hacerlo le ponía el broche final a toda esta historia.

Siempre digo que soy la persona más afortunada del mundo; y se debe principalmente a que he tenido la grandísima suerte de tener a mi alrededor a la gente más buena, atenta y estupenda: siempre dándome consejos, siempre haciéndome reír, siempre apoyándome y levantándome. Nunca he caminado sola, he tenido siempre un ejército detrás.

Solamente espero poder plasmar en estas pocas páginas lo INMENSAMENTE AGRADECIDA que estoy y lo mucho, muchísimo que os debo. Compañeras, compañeros, amigas, amigos y familia: **gracias por tanto.**

Gracias, en primer lugar, a mis directores: Mariano Provencio y Alberto Cruz. Gracias a los dos por confiar en mí desde el principio, por darme las herramientas necesarias para que esto avanzara y por la gran oportunidad de formar parte de este laboratorio. Gracias **Mariano** por siempre darnos el empujón necesario para que nos creyésemos nuestro trabajo y aspirásemos a más. Gracias **Alberto** por creer en todo lo que he estado haciendo, gracias por las críticas constructivas y las bromas en cualquier momento.

Aunque estos años hayan sido super enriquecedores a nivel profesional, no han sido nada fáciles a nivel personal. Siempre digo que trabajar aquí me ha ayudado a levantarme cuando más lo necesitaba, a despejarme de todo lo demás; y eso ha sido gracias a las grandísimas personas con las que he tenido oportunidad de pasar la mayor parte de mi tiempo. La tercera planta en general y el cuartí en particular se han convertido en mi segunda casa estos años, y no puedo más que agradecerles a todos por los momentos de risas que nos salvan un poco de la locura (¿o nos acercan?). A pesar de las condiciones precarias en las que trabajamos, ellos no dejan de ser unos grandísimos profesionales.

No tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy de haber trabajado contigo, **Raquel**. Esta tesis ni de broma se hubiese hecho en 3 años sin tu trabajo previo, pieza fundamental del labo. Gracias por confiar en mí, por tu profesionalidad, por tu generosidad, por las charlas científicas y no tan científicas. Llegué siendo un topillo y te preocupaste por enseñarme todo lo que sabías y más: a ser más crítica, a valorar mi trabajo y a no parar hasta conseguir más y más. Ha sido todo un placer haber compartido espacio contigo, no me llevo una compañera de

trabajo, me llevo una amiga. Estoy segura de que llegarás lejos y que serás una jefa dura pero justa.

**Ali**, mi bebé favorito. Qué alegría haberme hecho un huequito en ese corazón tan duro que tienes. Voy a echar de menos que me hagas procrastinar, que me zarandees de la silla cada vez que te aburres, que me obligues a ir a desayunar y que me hagas ser un poquitín más mala. Me hacen feliz nuestros vaciles, que intentes hacer una “señorita” de mí y que yo, en cambio, te escandalice con mi forma de ser. Espero que volvamos a viajar juntas, no se me ocurre una compañera mejor, más entusiasta y que haga mejores reportajes fotográficos.

Y para persona entusiasta y luchadora, tenemos a **Lucía**. No te cansas de luchar por el labo y por los demás. Dentro de esa persona a la que le cuesta dar abrazos se esconde un corazón enorme: siempre pendiente de los demás y de las injusticias. Trabajadora y luchadora, te mereces la tesis más que nadie y la conseguirás. Gracias por tus consejos de sabia, gracias por intentar espabilarme. Espero de veras que volvamos a coincidir, haríamos un equipo estupendo.

En todo labo que se precie se necesita a un bioinfo un poco friki que te transmita paz y pasión, y ese es nuestro **Isma**. Gracias por acercarte siempre a saludar con esa gran sonrisa, transmitirnos esa serenidad y simpatía. Por crear debates polémicos y hacernos pensar un poquito. Por prestar tu ayuda en todo momento, sin un mal gesto. Nos has transmitido tu amor por la montaña y has conseguido que nos aficionemos a la escalada. Cuando nos volvamos a encontrar, te seguiré saludando con un “¡buu linfoma!”.

Nuestro chico que nos aguanta cuando más parlanchinas estamos es **Adri**. El más currante y el que más nos vacila. Cualquiera que no te conozca pensará que estás fatal de la cabeza y así es, pero además eres una persona con un corazón enorme: siempre andas atento de todo lo que nos pasa. Podemos confiarte nuestros secretos sin miedo, y aprovecharnos de ti cada vez que necesitemos un abrazo lleno de sinceridad y cariño. Gracias por dar un toque de paz al cuarti.

Gracias **Belén**, mi querida compi, por ser tú también transmisora de paz y tranquilidad. Por querer siempre aprender y por implicarte en todo lo referente al labo. Te has convertido en el eje sobre el que se apoya el laboratorio. Gracias por las charlas críticas y por nuestros momentos de confesión. Gracias por creer en mi trabajo.

Otro eje importantísimo de toda la planta es **Sagra**. Cuantísimo tenemos que aprender de ti. Eficiente, trabajadora y generosa. Siempre, siempre dispuesta a ayudar y a enseñarnos. Eres una de las mayores profesionales que he conocido.



Otra gran profesional, entusiasta, inteligente e inundadora de buen rollo es nuestra querida postdoc **Natalia**. Siempre tienes tiempo para dedicarnos, eres todo un ejemplo de buena organización. Gracias por tu positividad, por tu sonrisa siempre. Gracias por contagiarnos el amor y la pasión que sientes por la ciencia y por, como tú dices, “jugar en el laboratorio”.

**Marta**, tocaya, gracias por llenarnos el cuartito de ilusión. Eres súper trabajadora y siempre estás dispuesta a ayudar. Es una maravilla llegar por la mañana y que una personita te mire desde su asiento y te pregunte con todo el amor del mundo “qué tal”, así da gusto entrar a trabajar. No te pierdes ni un desayuno y eres nuestra monita favorita en la escalada.

Otra linfomita que no se me olvida es **Bea**. Gracias por tu bondad, tu inocencia y tus ganas de trabajar y aprender de todo. Vas a ser también una gran profesional.

También quería aprovechar para dar las gracias en conjunto a mis queridos “malditos linfomas”. Por hacerme sentir una más del grupo, a pesar de todo lo que me meto con vosotros.

Pero mi grupo tampoco se queda atrás. **Cris**, inteligente y aplicada, vas a ser una bioinfo genial. Poco a poco hemos logrado que te soltases más y te encontrases a gusto. No es tarea fácil porque no estamos nada bien de la cabeza por aquí. Quienes tampoco están del todo bien son **Anaís y Carlos**: chicos, gracias por darle vida al laboratorio, gracias por sacar adelante todo lo que se os eche encima, y siempre con una sonrisa y buen rollo.

**Miguel** tu eres un ejemplo para todos nosotros. Por tu amor al arte, a la literatura y tu capacidad de resiliencia, gracias.

Muchísima gente conforma la tercera planta. Trabajamos codo con codo y mantenemos el buen ambiente, aunque sea difícil a veces con todos los que somos y con todo el trabajo con el que lidiamos. **Estela, Rober, Sandra, Alex y Dunixe**: compartimos equipo y tareas. Gracias por estar siempre dispuestos a unas risas, una fiesta y al buen rollo.

Gracias a **Mari, Elvira y May**, por saludar siempre con una sonrisa, por preguntarnos siempre qué tal. Gracias **Silvia** por tu paciencia infinita en cultivos. Muchas gracias, **José Miguel** por las discusiones literarias, por nuestros intercambios de libros y por tu simpatía siempre. Se os nota en la mirada y en el comportamiento que sois buenas personas de verdad.

Gracias a los médicos, al grupo español de cáncer de pulmón y a los pacientes y familias. Gracias a vosotros y a vuestra confianza en la investigación se pueden lograr descubrimientos grandes.

Fuera del laboratorio tengo un arsenal de amigas y amigos, que me han demostrado saber estar en los momentos más bonitos y más difíciles.

Las primeras mis amigas, mi chopped-pandi: **Merry, Ester, María, Bea, Nat, Ire y Moni**. Gracias por estar, gracias por no fallar. Sin vosotras todo sería mucho más difícil. Gracias por no rendiros conmigo.

**Adri**, mi enfermero favorito. Gracias por estar en las buenas, y, sobre todo, gracias por tu cariño y apoyo en las malas.

Mis queridísimos boticarios: **Raúl, Noe, María, Bar, Beita, Chema, Bea, Lara, Isma, Roberto y Jorge**. Gracias por el amor que me dais, por los buenos ratos que hemos pasado juntos y por los que nos quedan por vivir. **Bar**, siempre te tenemos presente.

Gracias **Álvaro** por tu cariño y apoyo incondicional, por preocuparte por mí más que yo misma. Gracias por convertirte en “casa” y ser mi red de seguridad.

**Mer**, gracias por darle tanta vida a nuestro hogar. Tu risa es una poción que hace olvidar las cosas malas del día.

**Diego, Gabi y Javi**: los que más comprenden el trabajo de científico, las personas a las que menos veo del mundo, pero con las que mejor me lo paso. Gracias por seguir presentes.

Me inicié en la ciencia con los mejores profesores: **Dani, Silvia y Mirna**. Gracias por enseñarme todo lo referente al trabajo en laboratorio.

Mi familia, tan importante siempre.

**Primiglia**, gracias por hacerme ver lo bonita que es nuestra profesión. Quién nos iba a decir que acabaríamos siendo doctoras después de nuestras ocurrencias investigadoras con 7 años.

“Cuida de mi niña, **Pilar**”. Y así lo has hecho y sigues haciendo. Gracias tita por tus cuidados, tu amor y cariño, por preocuparte siempre. Gracias **Paco** por cuidar a nuestra chica, por regalarle años de felicidad y viajes. Pequeña **Maya**, gracias por alegrarme la existencia cada vez que llegaba a casa, amargada por haberme pasado 3 horas en el transporte público.

Desde pequeña has sido mi referente, **Tate**. Todo mi lado friki (que no es pequeño) te lo debo a ti. Gracias por enseñarme tantísimo y ser desde siempre tu ojito derecho. Después de esta tesis tienes todo mi apoyo para llamarme “gilí”.

**Papá** gracias por creer en mí siempre, por alentarme para llegar lejos. Gracias por tu incalculable amor. Estoy tremendamente orgullosa de ti y de la fortaleza que estás demostrando.

**Mamá**, más linda, esta tesis es por ti y para ti. Desde siempre tuve claro sobre qué quería investigar, y que cuando lo acabase tendría tu nombre bien grande escrito. Ojalá estuvieses aquí para ver y disfrutar esta tesis. Las alegrías son menos alegrías desde que no las puedo compartir contigo.

Gracias a ti soy quien soy. Gracias a ti intento siempre ser mejor, dar lo máximo y aspirar cada vez a más. Eres el mayor ejemplo de valentía y fortaleza que conozco. Quiero que te sientas orgullosa de la persona en la que me estoy convirtiendo, que pienses que todo tu esfuerzo y lucha estos años han merecido la pena. Ojalá sientas la mitad de orgullo por mí, que el que yo siento por ti.

Este año no ha sido nada fácil, pero me alivia tenerte presente en cada momento de mi vida, en cada lugar: cada vez que encontramos aparcamiento en la puerta, cada vez que me llaman “Puri” o “cosita” y cada vez que sale el arcoíris. Me gusta pensar que parte de ti se mantiene dentro de mí, que soy una “Raquelita” en potencia. Nada me hace más feliz que me digan que me parezco, aunque sea solo un poquito, a ti.

Nos has dejado mil enseñanzas, tu pasión por la cocina y los viajes y un ejemplo de vida. Te quiero mamá, no hay ni un solo día en el que no te eche de menos.

Por último, me gustaría dar las gracias a todos los científicos y científicas por creer en la buena ciencia, por intentar comprender el mundo un poco mejor y por seguir aun en las condiciones tan precarias en las que se trabaja.

Gracias científicas por ir rompiendo el techo de cristal que nos cubre. Un paso vuestro es un mundo para todas las que vienen detrás.

Espero que esta tesis os guste, y que pueda servir para investigaciones futuras.

# Resumen

El cáncer de pulmón no microcítico representa el 80% de los casos de cáncer de pulmón, y un tercio de los pacientes son diagnosticados con un estadio localmente avanzado considerado potencialmente curable y reseccable. El tratamiento neoadyuvante busca la reducción del tamaño tumoral para mejorar su reseccabilidad además de tratar de manera temprana la enfermedad metastásica. En el ensayo clínico NADIM se presenta un nuevo enfoque terapéutico con la adición de la inmunoterapia a la quimioterapia en el tratamiento neoadyuvante de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en estadios IIIA. Las altas tasas de respuesta patológica completa (CPR) logradas en este ensayo han dado lugar a la búsqueda de biomarcadores que ayuden en la predicción de la respuesta a la intervención.

Por tanto, el **objetivo principal** de este estudio es la identificación de biomarcadores de respuesta a la quimio-inmunoterapia neoadyuvante, así como la caracterización del microambiente tumoral. Para ello, se ha llevado a cabo la determinación de biomarcadores utilizados previamente como es la expresión de PD-L1, así como la determinación de la carga mutacional tumoral en las muestras de tejido basal. Además, proponemos biomarcadores emergentes como son el análisis mediante tecnología NGS del receptor de linfocitos T (TCR), y la expresión génica de una firma inmunitaria en las muestras de tejido pre- y postratamiento.

En este trabajo se muestra cómo una mayor expresión de PD-L1 en el tejido pretratamiento se asocia positivamente a la respuesta al tratamiento con inmunoterapia. Además, se ha encontrado una asociación positiva entre un repertorio de TCR más sesgado en las muestras pretratamiento y la CPR. El repertorio de TCR de los tumores CPR en el momento pretratamiento parece estar dominado por un conjunto de clones más frecuentes (top 1%) que ocupa un mayor espacio clonal con respecto al total y que caracteriza a los tumores que responderán de manera completa al tratamiento neoadyuvante. Por otro lado, la firma de expresión génica caracteriza los tumores CPR en el momento pretratamiento, mostrando estos un perfil proinflamatorio dominado por una firma génica de IFN $\gamma$ . Asimismo, los mayores cambios en la expresión génica producidos tras el tratamiento neoadyuvante se encuentran en los tumores CPR, reflejando una respuesta inmunitaria antitumoral activa que cesa tras la resolución del tumor.

**En conclusión**, los resultados reflejan las diferencias entre las respuestas completas y no completas y le dan valor a la respuesta patológica completa como una entidad con características inmunitarias diferenciadas.

# Abstract

Non-small cell lung cancer accounts for 80% of lung cancer cases, and one third of patients are diagnosed with a locally advanced stage considered potentially curable and resectable. Neoadjuvant treatment aims to reduce tumor size to improve its resectability in addition to early treatment of metastatic disease. The NADIM clinical trial presents a new therapeutic approach with the addition of immunotherapy to chemotherapy in the treatment of patients with stage IIIA non-small cell lung cancer prior to surgery. The high pathologic complete response rates achieved in this trial have prompted the search for biomarkers to aid in the prediction of response to intervention.

Therefore, the **main objective of this study** is the identification of biomarkers of response to neoadjuvant chemo-immunotherapy, as well as the characterization of the tumor microenvironment and the changes caused in it because of the therapeutic intervention. For this purpose, we have carried out the determination of biomarkers previously used in immunotherapy studies such as PD-L1 expression, as well as the determination of the tumor mutational burden in pre-treatment tissue samples. In addition, we propose emerging biomarkers such as the analysis by NGS technology of the T-cell receptor (TCR), and the gene expression of an immune signature in pre- and post-treatment tissue samples.

In this work we show how increased PD-L1 expression in pre-treatment tissue is positively associated with response to immunotherapy treatment. Furthermore, a positive association was found between a more skewed TCR repertoire in pre-treatment samples and the achievement of a complete pathological response. The TCR repertoire of CPR tumors at pre-treatment time appears to be dominated by a set of more frequent clones (top 1%) that occupies a larger clonal space with respect to the total and characterizes tumors that will respond completely to neoadjuvant treatment. On the other hand, the gene expression signature characterizes CPR tumors at pre-treatment time, these showing a proinflammatory profile dominated by an IFN $\gamma$  gene signature. Likewise, the greatest changes in gene expression following neoadjuvant treatment are found in CPR tumors, reflecting an active antitumor immune response that ceases after tumor resolution.

**In conclusion**, the results reflect the differences between complete and non-complete responses and give value to the complete pathologic response as an entity with distinct immune characteristics.

# Contenido

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>I. Cáncer de pulmón.....</b>	<b>18</b>
i. Epidemiología.....	18
ii. Patología .....	19
iii. Etiología.....	19
iv. Diagnóstico y estadificación .....	20
v. Tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico.....	21
vi. Estado actual de la neoadyuvancia en tumores resecables.....	22
<b>II. Inmunología del microambiente tumoral .....</b>	<b>23</b>
i. El sistema inmunitario: inmunidad innata y adaptativa. Conceptos generales .....	23
ii. Linfocitos T .....	24
iii. Respuesta inmunitaria a los tumores: inmunidad antitumoral .....	27
iv. Reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T .....	28
v. Mecanismos de evasión de las células tumorales al sistema inmunitario.....	30
vi. Biomarcadores.....	32
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
I. Diseño del estudio y pacientes .....	40
II. Aislamiento de células polimorfonucleares en sangre periférica .....	41
III. Extracción de ARN y ADN .....	41
IV. Preparación de librerías y secuenciación .....	42
V. Determinación de la expresión de PD-L1.....	44
VI. Análisis bioinformático.....	44
VII. Análisis estadístico .....	47
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
<b>I. Determinación de PD-L1 como biomarcador en quimio-inmunoterapia.....</b>	<b>48</b>
<b>II. CMT y mutaciones como biomarcadores de respuesta patológica .....</b>	<b>49</b>
<b>III. Receptor de linfocitos T como biomarcador emergente .....</b>	<b>50</b>
i. Caracterización del repertorio de TCR en sangre y tejido .....	50

iii.	Independencia de la uniformidad y top 1% de factores técnicos.....	53
iv.	Expresión génica diferencial de tumores con top 1% alto.....	55
v.	Seguimiento de clones del top 1% de las biopsias pretratamiento en diferentes compartimentos biológicos.....	56
vi.	Seguimiento de clones pertenecientes al top 1% postratamiento .....	59
vii.	Seguimiento de clones del top 1% postratamiento en sangre.....	61
<b>IV.</b>	<b>Firma de expresión génica como biomarcador emergente. ....</b>	<b>62</b>
i.	Perfil de expresión génica en las muestras pretratamiento .....	63
ii.	Perfil de expresión génica en las muestras postratamiento.....	66
iii.	Cambios en el perfil de expresión con el tratamiento neoadyuvante.....	71
iv.	Perfil de expresión génica en tumores según biomarcadores PD-L1, TMB y top 1% .....	74
a.	Diferencias en el microambiente inmunitario en tumores con alta o baja expresión de PD-L1 ...	75
b.	Diferencias en el microambiente inmunitario en tumores con alta o baja CMT.....	76
c.	Diferencias en el microambiente inmunitario en tumores con alto o bajo top 1%.....	78
	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
	Expresión de PD-L1 como biomarcador en los pacientes del ensayo clínico NADIM .....	82
	Carga mutacional tumoral como biomarcador en los pacientes del ensayo clínico NADIM.....	84
	Receptor de linfocitos T como biomarcador emergente .....	85
	Receptor de linfocitos T e inmunovigilancia.....	88
	Firma de IFN $\gamma$ como potencial predictor de respuesta al tratamiento con quimio- inmunoterapia .....	90
	Microambiente inmunitario en las muestras postratamiento: diferencias entre CPR y no-CPR	91
	Genes de proliferación asociados con la progresión en tumores no-CPR.....	92
	Cambios en la firma genética con el tratamiento neoadyuvante.....	93
	Valor del estudio, limitaciones y direcciones futuras .....	94
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>96</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>98</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>
	<b>ANEXO I. Material suplementario.....</b>	<b>109</b>
	<b>Tabla 1.</b> Tabla con características de los pacientes y técnicas realizadas.....	109
	<b>Tabla 2.</b> Genes analizados con el panel de RNA-seq y set de GSEA.....	110
	<b>Tabla 3.</b> Tablas de expresión diferencial de genes por DESeq2 .....	116
	<b>ANEXO II. Curriculum vitae y publicaciones científicas .....</b>	<b>121</b>

# Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AUC</b>	Área bajo la curva ( <i>area under the curve</i> )
<b>CDR</b>	Región determinante de complementariedad ( <i>complementary-determining region</i> )
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CMT</b>	Carga mutacional tumoral
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígeno
<b>CPR</b>	Respuesta patológica completa ( <i>complete pathological response</i> )
<b>EGFR</b>	Factor de crecimiento epidérmico ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>FBC</b>	Fibrobroncoscopia
<b>FDA</b>	Agencia sanitaria americana ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FDR</b>	Tasa de descubrimiento falso ( <i>false discovery rate</i> )
<b>GEDs</b>	Genes expresados diferencialmente
<b>GSEA</b>	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes ( <i>Gene-Set Enrichment Analysis</i> )
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano ( <i>human leukocyte antigen</i> )
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IPR</b>	Respuesta patológica incompleta ( <i>incomplete pathological response</i> )
<b>MAGEA</b>	Antígeno asociado al melanoma ( <i>melanoma-associated antigen</i> )
<b>MPR</b>	Respuesta patológica mayor ( <i>major pathological response</i> )
<b>NETs</b>	Entramados extracelulares de neutrófilos ( <i>neutrophil extracellular traps</i> )
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación ( <i>next-generation sequencing</i> )
<b>NIH</b>	Instituto Nacional del Cáncer (National Institute of Environmental Health Sciences)



<b>NK</b>	Células asesinas naturales ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NOS</b>	Tipo de cáncer de pulmón no especificado ( <i>not-otherwise specified</i> )
<b>nsSNV</b>	Variante de un nucleótido no sinónima ( <i>non-synonymous single nucleotide variant</i> )
<b>NY-ESO-1</b>	Antígeno I asociado a cancer esofágico escamoso ( <i>New York-oesophageal squamous cell carcinoma I</i> )
<b>PAAF</b>	Punción-aspiración con aguja fina
<b>PD-1</b>	Proteína 1 de muerte programada ( <i>programmed cell death protein-1</i> )
<b>PD-L1</b>	Ligando 1 de muerte programada ( <i>programmed cell death-ligand 1</i> )
<b>PET</b>	Tomografía de emisión de positrones
<b>RNA-seq</b>	Secuenciación masiva del ARN
<b>ROC</b>	Característica operativa del receptor ( <i>receiver operating characteristic</i> )
<b>SG</b>	Supervivencia global
<b>SLP</b>	Supervivencia libre de progresión
<b>TAC</b>	Tomografía computerizada de tórax
<b>TCR</b>	Receptor de linfocitos T ( <i>T-cell receptor</i> )
<b>TLS</b>	Estructuras linfoides terciarias ( <i>tertiary lymphoid structures</i> )
<b>TPM</b>	Tránscritos por millón
<b>TPS</b>	Puntuación de proporción de expresión ( <i>tumor proportion score</i> )
<b>UDG</b>	Uracil-DNA Glicosilasa
<b>WES</b>	Secuenciación completa del exoma ( <i>whole-exome sequencing</i> )
<b>WGS</b>	Secuenciación completa del genoma ( <i>whole-genome sequencing</i> )

# Capítulo 1

## Introducción

### I. Cáncer de pulmón

#### i. Epidemiología

##### **Incidencia**

De acuerdo con estimaciones de la organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades oncológicas son la primera causa de muerte en los países desarrollados, con una incidencia estimada en 2020 de 19.3 millones de nuevos casos <sup>1</sup>. En concreto, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer, representando hasta un 18% de las muertes por cáncer <sup>1</sup>, así como la primera neoplasia en incidencia en hombres (14.3%) y la tercera en mujeres (8.4%) después del cáncer mama y el cáncer colorrectal <sup>1</sup>.

En el caso de España, se estima que para 2022 el cáncer de pulmón suponga el tercer cáncer más diagnosticado en hombres y mujeres y el primero en número de defunciones para hombres y segundo para mujeres después del cáncer de mama.

Sin embargo, en los últimos años se ha observado una disminución de las muertes por cáncer de pulmón, debido principalmente a la prevención primaria, el control de los factores de riesgo y la reducción del tabaquismo, así como por las mejoras en los tratamientos. Es conveniente destacar el hecho de que la incidencia en mujeres tiene una tendencia al alza, debido al incremento progresivo del tabaquismo en este grupo desde los años 70 <sup>2</sup>.

##### **Factores de riesgo**

El tabaquismo es considerado el principal factor de riesgo en el cáncer de pulmón y se estima que es responsable de más de un 80% de los casos de cáncer de pulmón <sup>3</sup>.

Si bien la nicotina en sí no es cancerígena, hay hasta 55 sustancias en el humo del cigarrillo que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer ha considerado cancerígenas. Estos carcinógenos conducen a la formación de mutaciones en el ADN, metilación de genes, cambios

en la secuencia de ADN, amplificación o eliminación de segmentos de ADN <sup>4</sup>. El riesgo relativo de cáncer de pulmón en los fumadores en comparación con los no fumadores varía de 10 a 30 veces más, y el grado de riesgo depende de la cantidad de cigarrillos fumados diariamente y los paquetes-año consumidos. Sin embargo, existen otros factores de riesgo como es la exposición al asbesto, al radón, níquel, arsénico, contaminación, la genética o la edad <sup>3</sup>.

## ii. Patología

El cáncer de pulmón se puede clasificar en dos grandes tipos histológicos principales: el cáncer de pulmón microcítico (o de célula pequeña), que supone el 15% de los tumores de pulmón diagnosticados; y el tipo mayoritario, el cáncer de pulmón no microcítico (o de célula no pequeña), que alcanza hasta el 85% de los casos. Este último, a su vez, se divide en otros 3 subtipos histológicos: carcinoma escamoso de pulmón, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes <sup>5</sup>.

## iii. Etiología

Factores de riesgo como el tabaco, la exposición al asbesto o la predisposición genética pueden interactuar para promover la carcinogénesis en el epitelio del pulmón. Estos factores, provocan daños en el tejido en forma de mutaciones, pérdida de la heterocigosidad o metilaciones que pueden persistir a lo largo del tiempo y dar lugar a una activación aberrante de vías de señalización que conducen a la transformación tumoral de las lesiones. Se han identificado diferentes alteraciones genéticas relacionadas con el cáncer de pulmón, usándose algunas de ellas como biomarcadores o como diana para el desarrollo de terapias dirigidas <sup>6</sup>.

Las mutaciones en el gen del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*), son una de las alteraciones más estudiadas en el cáncer de pulmón con una frecuencia de presentación en este tipo de tumores de un 10% aproximadamente. Mutaciones activadoras del gen que codifica para este receptor favorecen diferentes procesos tumorales como la proliferación, supervivencia o resistencia a apoptosis, angiogénesis e invasión de las células malignas. Entre estas mutaciones se encuentran la delección del exón 19 (19Del), mutaciones en el exón 21 (L858R), o mutaciones en el exón 20 <sup>7</sup>. Son varios los fármacos de terapia dirigida a este protooncogén que se utilizan en la clínica, por lo que su determinación en las biopsias de pacientes es crucial para su enfoque terapéutico <sup>5,6,8,9</sup>.

La vía de señalización de Ras-Raf-Mek es otra de las más frecuentemente mutadas en cáncer de pulmón, presentándose en hasta el 25% de los pacientes. Esta vía de señalización está estrechamente relacionada con el receptor de crecimiento epidérmico *EGFR*, y se vincula con la resistencia a la terapia dirigida contra *EGFR* <sup>10</sup>.

Otras mutaciones de importancia en el cáncer de pulmón, y que han hecho que el enfoque terapéutico hacia este tipo de tumor sea tan extenso son: mutaciones en *ALK* (7% de los tumores), *ROS1* (2%), *HER2* (5%), *RET* (2%), *MET* (2%), *BRAF* (4%), *AKT1* (1%), *KRAS G12C*, *NTRK1*, *STK11* o *TTF1*, entre otras <sup>6 5 11</sup>.

#### iv. Diagnóstico y estadificación

El diagnóstico del cáncer de pulmón se lleva a cabo mediante las manifestaciones clínicas con las que cursa y procedimientos radiológicos. Además, se realiza un diagnóstico anatomopatológico a partir de las muestras obtenidas por biopsia. La primera prueba que se realiza a los pacientes con sospecha de cáncer de pulmón es la radiografía de tórax. Además, al paciente se le realiza una tomografía computerizada (TAC) de tórax con el objetivo de valorar de manera precisa la extensión de la enfermedad. Otras pruebas de imagen utilizadas son la resonancia magnética nuclear y la tomografía de emisión de positrones (PET) <sup>12</sup>.

Para la obtención de muestras de biopsia, que posteriormente se analizarán en el laboratorio de anatomía patológica y a las que se les realizarán las determinaciones histológicas y moleculares, se somete al paciente a una fibrobroncoscopia (FBC), a la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) o a mediastinoscopia. Con todo ello, se consigue una correcta estadificación patológica de la enfermedad, permitiendo no sólo la identificación de la lesión primaria si no también la afectación ganglionar que presenta el paciente <sup>13, 14</sup>.

La estadificación del cáncer de pulmón no microcítico se realiza en base al Sistema Internacional de Clasificación o International Staging System (ISS), basado en el sistema TNM (T: tumor; N: nódulos o ganglios afectos; y M: metástasis). El sistema TNM utiliza el examen físico, endoscópico y de imagen para establecer el estadio en el que se encuentra el paciente y, con ello, el tratamiento y pronóstico (**tabla 1**) <sup>15,14</sup>. Actualmente este sistema se encuentra en su octava edición, si bien se está llevando a cabo su actualización a la novena.

v. Tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico

El tratamiento y pronóstico del cáncer de pulmón dependerá de la extensión de la enfermedad, siendo este último más favorable conforme menor sea el estadio en el que se encuentra el tumor. Para el tratamiento, se tendrá en cuenta si los tumores son localizados, si son resecales, así como de la infiltración ganglionar y la presencia de metástasis (**tabla 1**).

		Afectación ganglionar (N)			
		N0	N1	N2	N3
Tamaño del tumor (T)	T1 ( $\leq 2$ cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
	T1 ( $> 2$ cm $\leq 3$ cm)	IA	IIA	IIIA	IIIB
	T2 ( $> 3$ cm $\leq 5$ cm)	IB	IIA	IIIA	IIIB
	T2 ( $> 5$ cm $< 7$ cm)	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T2 ( $\geq 7$ cm)	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
	T3 (invasión directa)	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
	T3 (nódulos en el mismo lóbulo)	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
	T4 (extensión)	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
	T4 (nódulos ipsilaterales)	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
Metástasis (M)	M1a (efusión pleural)	IV	IV	IV	IV
	M1a (nódulos contralaterales)	IV	IV	IV	IV
	M1b (metástasis a distancia)	IV	IV	IV	IV

**Tabla 1.** Estadificación TNM según la octava edición del cáncer de pulmón no microcítico.

- En los estadios I y II el tratamiento de elección es la resección quirúrgica del tumor, si bien es importante la evaluación prequirúrgica del paciente para predecir si posteriormente éste podría mantener una adecuada calidad de vida <sup>16</sup>. En aquellos pacientes con estadio I localizado con comorbilidades que dificulten la cirugía, la radioterapia es el tratamiento de elección <sup>17</sup>.
- En pacientes con estadio II y III se recomienda tratamiento con quimioterapia tras la cirugía (adyuvante) dado que aumenta en un 4-5% la supervivencia global de estos pacientes a los 5 años. La quimioterapia de elección suele ser 4 ciclos de cisplatino en combinación con vinorelbina, aunque otras combinaciones con docetaxel, gemcitabina o pemetrexed están siendo administradas <sup>18</sup>.

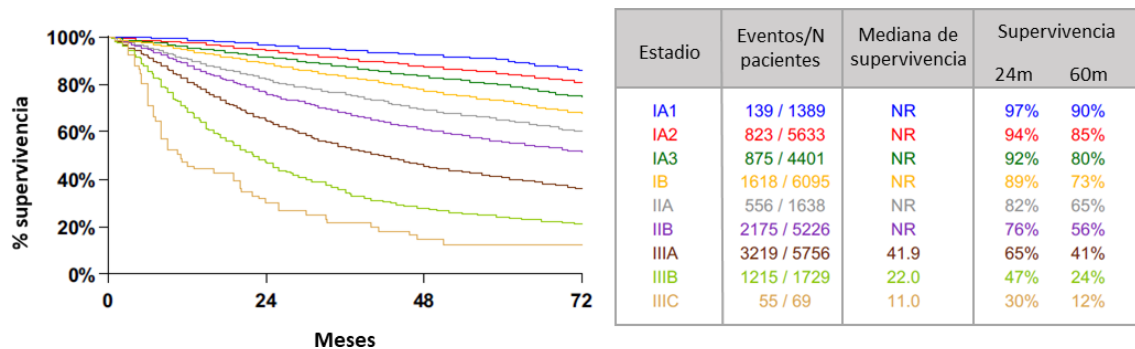
- En estadios IIIA con enfermedad localmente avanzada se lleva a cabo un enfoque multidisciplinar debido a la gran heterogeneidad que presentan estos pacientes. La cirugía es el tratamiento de elección, valorándose su combinación con radioterapia, quimioterapia o inmunoterapia antes (neo-) o después (adyuvante) de la cirugía <sup>16,19</sup>.
- En los estadios no resecables como los IIIB, el tratamiento de elección será quimioterapia y/o radioterapia concomitante <sup>20</sup>.
- En el tratamiento de pacientes con enfermedad metastásica (estadios IV) se utilizan combinaciones de quimioterapia: cisplatino con paclitaxel, gemcitabina o docetaxel, o carboplatino con paclitaxel, sin diferencias entre ellas <sup>21</sup>. Además, el análisis de biomarcadores moleculares determinará el tratamiento del paciente con terapia dirigida o inmunoterapia. Esta terapia dirigida dependerá de las mutaciones presentes en las muestras tumorales, entre las que se determinan actualmente están: ALK (con sus respectivos inhibidores crizotinib <sup>22</sup>, alectinib <sup>23</sup>, brigatinib <sup>24</sup> y lorlatinib <sup>25</sup>), EGFR (erlotinib <sup>26</sup>, afatinib <sup>27</sup>, dacomitinib <sup>28</sup> y osimertinib <sup>29</sup>), ROS1 <sup>30</sup> y BRAF (dabrafenib <sup>31</sup>). En cuanto al tratamiento con inmunoterapia, cobra especial importancia la evaluación de la carga mutacional tumoral (CMT) y la inmunohistoquímica de PD-L1 para el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-PD-1 o anti-PD-L1. Pacientes con cáncer de pulmón avanzado con expresión de PD-L1 tratados con nivolumab o pembrolizumab obtienen mayores tasas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global que los tratados con quimioterapia <sup>32,33</sup>.

vi. Estado actual de la neoadyuvancia en tumores resecables.

Las supervivencias a 5 años para pacientes con estadios patológicos tempranos IA se encuentran entre el 80%, mientras que para los estadios localmente avanzados IIIA se sitúan en torno al 41% (**figura 1**).

Por otro lado, el objetivo de la terapia neoadyuvante en estadios localmente avanzados es principalmente el de reducir el estadio del tumor para mejorar su resecabilidad además del tratamiento temprano de la enfermedad micrometastásica temprana, pudiendo disminuirse así las posibles recaídas en la enfermedad tras la cirugía. Un metaanálisis de 15 ensayos clínicos que incluyó 2385 pacientes concluyó que la quimioterapia neoadyuvante mejoraba la supervivencia global (SG) (con un aumento de ésta del 5% a 5 años) y la supervivencia libre de progresión (SLP) en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico resecable <sup>34</sup>. Además, se ha comenzado a evaluar recientemente el papel de la inmunoterapia en la neoadyuvancia. Así, el primer estudio publicado en estadios resecables de cáncer de pulmón no microcítico tratados con

inmunoterapia en monoterapia mostró porcentajes de respuesta patológica mayor (esto es, menos del 10% de células viables en el momento de la cirugía) del 45% y una supervivencia libre de progresión del 73% a 18 meses <sup>19</sup>.



**Figura 1.** Supervivencia del cáncer de pulmón no microcítico dependiendo del estadio patológico del tumor. Adaptado de: “*The IASLC Lung Cancer Staging Project*” <sup>15</sup>, octava edición.

## II. Inmunología del microambiente tumoral

### i. El sistema inmunitario: inmunidad innata y adaptativa. Conceptos generales.

La función fisiológica del sistema inmunitario consiste en la defensa contra microorganismos o macromoléculas ajenas, ya sean de procedencia exógena o endógena (como es el caso de los tumores, enfermedades autoinmunes y alergias). Desde el punto de vista funcional el sistema inmunitario se clasifica en dos tipos de inmunidad: inmunidad innata y adaptativa, si bien existe una cooperación bidireccional entre ambas para que se produzca una respuesta efectiva <sup>35</sup>.

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a patógenos o moléculas ajenas y está formada por barreras físicas y químicas como los epitelios, proteínas como los factores del sistema del complemento, mediadores de inflamación y citocinas, y células fagocíticas como los neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales también conocidos como células NK (*Natural Killer*) <sup>35</sup>. Además, las células que forman la inmunidad innata son las responsables, junto con los linfocitos B, de presentar los péptidos a las células del sistema inmunitario adaptativo.

La característica principal del sistema inmunitario adaptativo es la del reconocimiento de los péptidos ajenos y la capacidad de reaccionar frente a ellos en sucesivas exposiciones a los mismos. La inmunidad adaptativa, a su vez, está formada por la inmunidad humoral y celular. Las células encargadas de la inmunidad humoral son los linfocitos B que, tras reconocer al antígeno, se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos específicos para éste.

Por su parte, los linfocitos T, como responsables de la inmunidad celular, reconocen y reaccionan frente a antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) <sup>35</sup>.

## ii. Linfocitos T

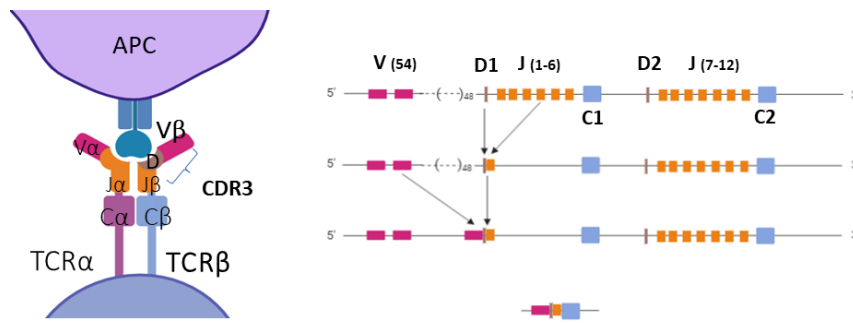
Los linfocitos T son las células encargadas de la respuesta a los diferentes antígenos presentados por las células presentadoras de antígeno (CPA). Para ello, los linfocitos T poseen una doble especificidad: por un lado, reconocen las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) propio; por otro lado, reconocen los antígenos presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Se dice, por lo tanto, que los linfocitos T están restringidos al CMH propio y que presentan gran especificidad en el reconocimiento de antígenos extraños.

### **Receptor de linfocitos T (*T-cell receptor*, TCR)**

El responsable del reconocimiento del complejo péptido antigénico y CMH es el receptor de los linfocitos T (TCR por sus siglas en inglés: *T-cell receptor*), cuya característica principal es la de poseer una distribución clonal, esto es, los diferentes clones de linfocitos T expresan recetores distintos, con la capacidad potencial de reconocer diferentes antígenos <sup>35</sup>.

La estructura del receptor de linfocitos T, CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>, es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas entre sí de forma covalente por puentes disulfuro. Cada una de las cadenas está constituida por un dominio o región variable (V) N-terminal y una región constante (C), cuyos genes sufren un reordenamiento somático al producirse la maduración del linfocito, además de una región transmembrana y una región citoplasmática. La región variable de las dos cadenas forma las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3, de *complementary-determining region*) siendo ésta donde se concentra la mayor variabilidad existente entre los diferentes receptores de linfocitos T y donde se produce el reconocimiento del complejo antígeno-CMH <sup>35</sup>. Estas regiones hipervariables se componen de los segmentos génicos V (variable), D (diversidad) y J (unión, solamente en la cadena  $\beta$ ). En humanos, el locus de la cadena  $\beta$  del receptor de linfocitos T está formado por 54 genes TRBV, 2 TRBD y 12 genes TRBJ, mientras que el locus de la cadena  $\alpha$  lo forman 47 genes TRAV y 61 TRAJ, lo que da lugar a una diversidad de hasta  $10^{15}$ - $10^{21}$  receptores de TCR potenciales distintos (**figura 2**) <sup>36</sup>.



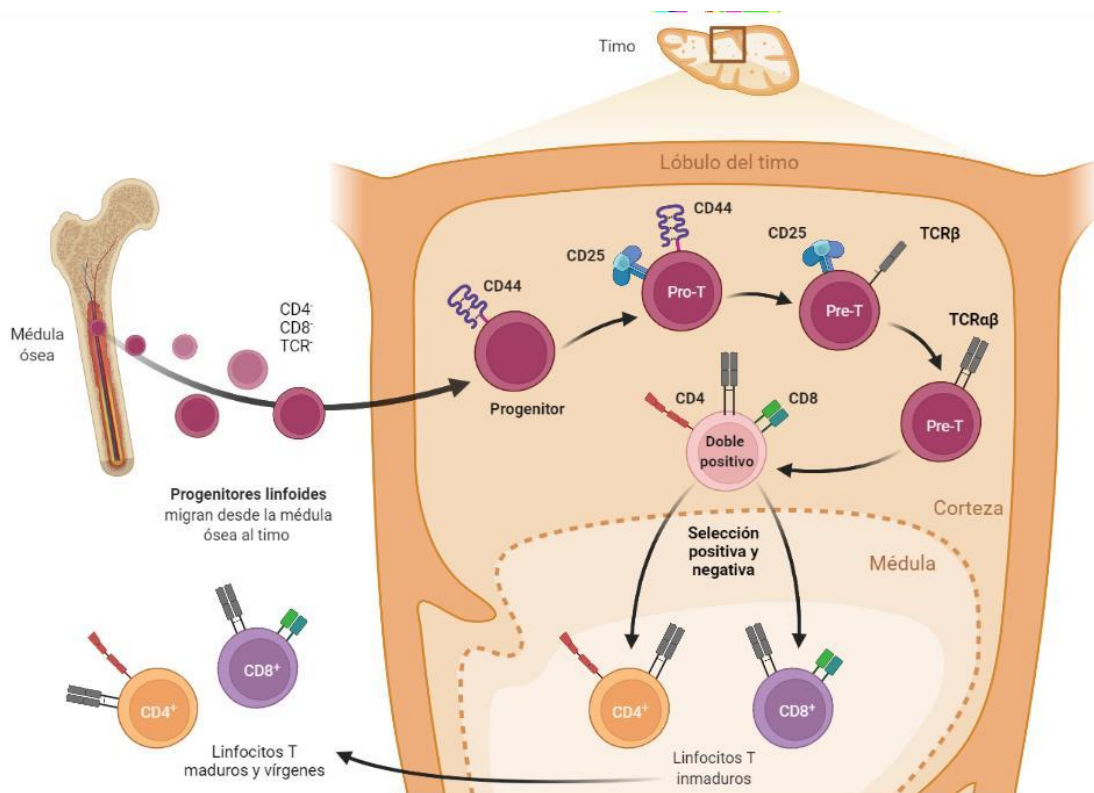


**Figura 2. Estructura del TCR y reordenamiento de los segmentos génicos de la cadena β.**

Al receptor de linfocitos T se encuentran asociadas de forma no covalente las proteínas CD3 y ζ, siendo éstas las que transmiten las señales que dan lugar a la activación de los linfocitos T.

### Ontogenia de los linfocitos T

La maduración de los linfocitos T se produce en el timo. Desde la médula ósea, los precursores de los linfocitos T, con negatividad en la expresión de CD4, CD8 y TCR, llegan al timo a través de la sangre. En el timo, la maduración se produce en dos zonas diferenciadas: la corteza y la médula. En la corteza tímica, los progenitores de los linfocitos Tαβ expresan los correceptores CD4 y CD8, además de producirse la reorganización secuencial de los genes del receptor TCR.



**Figura 3. Fases de la maduración de los linfocitos T.**

Primero se produce la reorganización de los genes del TCR. Comienza con la reorganización de las regiones D $\beta$ -J $\beta$  en el locus de la cadena  $\beta$  del TCR, esto es, la unión de la región D $\beta$  con una de las seis regiones de J $\beta$ . A continuación, se lleva a cabo la reorganización de V $\beta$  a DJ $\beta$ , dando lugar a un ARNm maduro en el que las regiones VDJ $\beta$  se encuentran yuxtapuestas a cualquiera de los dos genes C $\beta$  y el que se han eliminado las secuencias entre los diferentes exones VDJC recombinados. Una vez se ha producido el ensamblaje de las cadenas  $\alpha\beta$  del TCR en los linfocitos doble positivos CD4 y CD8<sup>+</sup>, en la superficie del linfocito T se expresará este TCR asociado a las proteínas CD3 y  $\zeta$ . **Cada TCR posee una única especificidad de antígeno, determinada por la estructura del sitio de unión de este.** En este punto, los linfocitos dobles positivos se hacen reactivos a los antígenos, y se produce la selección positiva y negativa: se favorece la supervivencia de aquellos timocitos cuyos receptores TCR se unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad propio con baja afinidad y se eliminan los timocitos autorreactivos. Una vez en la médula, se lleva a cabo la diferenciación funcional y fenotípica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Finalmente, los linfocitos T maduros se liberan desde médula a la circulación <sup>35</sup> (**figura 3**).

### **Activación de los linfocitos T**

Las células dendríticas presentan complejos antígeno-molécula de CMH a los linfocitos maduros y vírgenes (que no han tenido previo contacto con antígeno), que se activan produciéndose su expansión clonal. Estos conjuntos de linfocitos, que presentan exactamente la misma secuencia de TCR (alfa y beta), son capaces de reconocer al mismo antígeno y se diferencian posteriormente en linfocitos efectores y de memoria.

En tejido periférico, los linfocitos T efectores reconocen a los antígenos para los que son específicos y se activan para ejercer su función.

- Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> efectores se encargan de la activación de los linfocitos B, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y macrófagos.
- Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores desencadenan mecanismos que dan lugar a la apoptosis de las células diana.

En cambio, los linfocitos T de memoria son linfocitos específicos de antígeno que no se han activado pero que responderán de manera inmediata si se encuentran con el mismo antígeno al cabo de un tiempo <sup>35</sup>.

iii. Respuesta inmunitaria a los tumores: inmunidad antitumoral

Las células tumorales se caracterizan por la adquisición de diferentes mutaciones, que globalmente dan lugar a una activación constitutiva de las vías de señalización de crecimiento celular e inhibición de los puntos de control <sup>37</sup>. Esto da lugar a la generación, por parte de estas células, de neoantígenos que serán presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de la célula tumoral en su propia superficie y que las distinguirá de las células no tumorales <sup>38,39</sup>. Los primeros estudios sobre la inmunidad antitumoral surgieron en el siglo pasado y demostraron que las células T de los pacientes eran capaces de reconocer estos complejos neoantígeno-CMH y generar una respuesta efectiva contra las células tumorales <sup>40</sup>.

En 2013, Daniel S. Chen e Ira Mellman propusieron el “ciclo de inmunidad antitumoral” en el que se explica la generación de la inmunidad antitumoral como un proceso cíclico formado por 7 pasos principales <sup>39</sup> (**figura 4**). Primero, los neoantígenos generados por las células tumorales son captados y procesados por las células presentadoras de antígeno, que presentan el complejo péptido-CMH de clase I o II a los linfocitos T lo que da lugar a la activación de sus funciones efectoras contra estos antígenos específicos de tumor. Posteriormente, los linfocitos T efectores activados viajan desde los ganglios linfáticos hasta el lecho tumoral, produciéndose su infiltración en el mismo. Finalmente, el reconocimiento de las células tumorales por el receptor de los linfocitos T da lugar a la destrucción de la célula tumoral, que liberará antígenos tumorales continuando con el ciclo <sup>39</sup>.

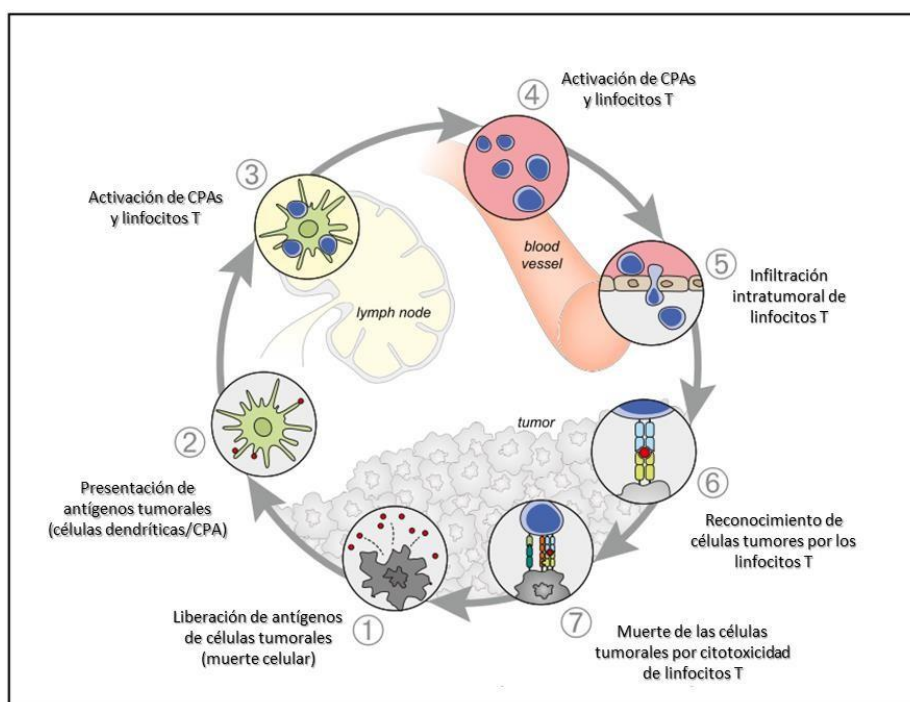
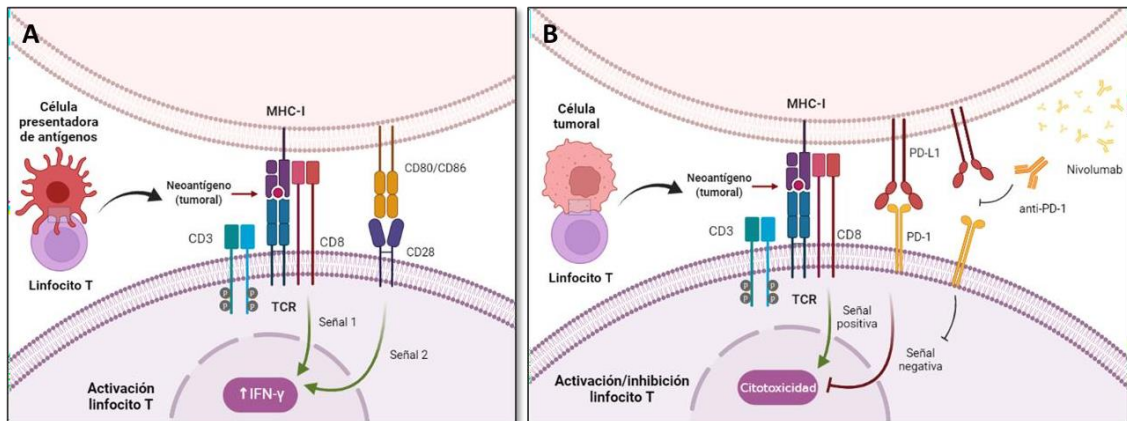


Figura 4. El ciclo de la inmunidad antitumoral, adaptado de <sup>39</sup>

iv. Reconocimiento de las células tumorales por los linfocitos T

El receptor del linfocito T reconoce los péptidos presentados por las células tumorales mediante el CMH. Para que se produzca la activación del linfocito, además es necesario una señal coestimuladora mediante la unión del correceptor CD28 a los ligandos CD80 o CD86 de la superficie de la célula presentadora. A partir de esto, el linfocito T comienza a expresar receptores inhibitorios como CTLA-4 o PD-1, de manera que se limite la respuesta inmunitaria una vez destruida la célula tumoral <sup>41</sup> (figura 5). En esta sinapsis participan, por tanto, varios actores.



**Figura 5. Reconocimiento antigénico y activación de los linfocitos T.**

**A.** Presentación de neoantígeno tumoral por la célula presentadora de antígenos al linfocito T y activación.  
**B.** Reconocimiento de la célula tumoral por el linfocito T, mecanismo de inhibición por la expresión de PD-L1 y bloqueo del axis PD-L1/PD-1 por nivolumab.

- **Neoantígenos.**

Generados por las células tumorales, ya sean producidos por mutaciones somáticas en las células tumorales, o proteínas no mutadas pero que se producen de forma aberrante en estas células <sup>42</sup>. Se presentarán en forma de péptidos en su superficie celular formando un complejo con el CMH que será reconocido por el receptor de linfocitos T <sup>41</sup>.

Entre las proteínas que se producen de forma aberrante en las células tumorales se encuentran los antígenos asociados a melanoma (MAGEAs, de sus siglas en inglés *melanoma-associated antigens*) o NY-ESO-1 (de sus siglas en inglés: *New York oesophageal squamous cell carcinoma I*), antígenos para los que actualmente se están desarrollando vacunas <sup>43, 44, 45, 46</sup>.

Por otro lado, se encuentran aquellos neoantígenos producidos por mutaciones somáticas en las células tumorales, que pueden ser variantes de un solo nucleótido no sinónimas (nsSNVs; *non-synonymous single nucleotide variants*) o pequeñas deleciones o inserciones en el

genoma<sup>47</sup>. Estas se producen en las células, principalmente, por la influencia de carcinógenos como pueden ser el humo del tabaco o la luz ultravioleta<sup>4</sup>.

- **CMH**

La función del complejo mayor de histocompatibilidad es la de presentar péptidos en la membrana de células presentadoras de antígeno o células tumorales al receptor de las células T para desencadenar una respuesta en éstas <sup>48</sup>.

El CMH se define en dos clases:

- El CMH de clase I, expresado en todas las células nucleadas en condiciones no patológicas (incluidas las células tumorales) y que presenta antígenos intracelulares a los linfocitos T CD8+.
- EL CMH de clase II que, a diferencia del CMH de clase I, se expresa solamente en las células presentadoras de antígeno profesionales y los linfocitos B y presenta los péptidos (procedentes de proteínas exógenas) a células T CD4+ <sup>35</sup>.

El CMH posee un gran polimorfismo, codificado por seis genes del antígeno leucocitario humano (HLA de sus siglas en inglés: *Human Leukocyte Antigen*): tres de ellos codifican para el CMH de clase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) y los otros tres para el CMH de clase II <sup>49,50</sup>. Esto les permite unirse a una gran cantidad de péptidos diferentes que presentarán en la membrana.

Por tanto, para que la respuesta inmunitaria contra el tumor sea efectiva, es necesario que las células tumorales expresen las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad que puedan presentar los péptidos tumorales a los linfocitos T <sup>51</sup>. Además, la expresión de CMH en el nicho tumoral determinará la configuración del microambiente tumoral, pudiendo ser éste más o menos restrictivo a la infiltración y activación de linfocitos T <sup>52</sup>.

- **Receptor de los linfocitos T**

Para una correcta respuesta antitumoral, las células presentadoras de antígeno deben procesar los péptidos de los antígenos tumorales para presentarlos a las células T y activarlas. Posteriormente, las células T previamente activadas deben reconocer los antígenos presentados por el tumor para desencadenar la respuesta que conduzca a la eliminación de estas células tumorales.

El receptor de los linfocitos T es el encargado de reconocer el complejo péptido tumoral-CMH y proporcionar la primera de las señales de activación necesarias para desencadenar su respuesta, compuesta por un complejo entramado de rutas de señalización intracelular del linfocito T <sup>53</sup>. La

segunda señal necesaria, vendrá dada por los receptores co-estimuladores presentes en el linfocito T.

Una vez se ha producido el reconocimiento antigénico, se producirá una expansión clonal de estos linfocitos con el receptor específico para el antígeno tumoral. Diversos estudios muestran este evento, en el que los clones de los linfocitos T expandidos poseen una especificidad para el antígeno tumoral al que han sido expuestos <sup>54,55</sup>.

- **Moléculas accesorias: co-estimuladoras e inhibitorias.**

Son varios los ligandos que regulan la respuesta del linfocito T al antígeno presentado, proporcionando la segunda señal necesaria para la activación de éste <sup>56</sup>. Entre los receptores y ligandos co-estimuladores se encuentran CD28 con su unión a los ligandos CD80 o CD86, ICOS con su unión al ligando B7RP1, CD137 y CD137L, OX40 y OX40L; y CD27 con su ligando CD70, entre otras citoquinas co-estimuladoras <sup>57</sup>. Sin embargo, también es necesaria la expresión de receptores inhibidores en el linfocito T, que al unirse a su ligando limiten la respuesta y una continua activación del linfocito. Estos receptores inhibidores se expresan en la membrana de los linfocitos una vez que se ha producido su activación, para limitar su respuesta. Entre ellos se encuentran CTLA-4 (que al igual que CD28 se une a los ligandos CD80 y CD86 expresados en las células presentadoras de antígeno o las células tumorales), BTLA que se une a HVEM, LAG3, TIM3, el receptor de adenosina A2aR y PD-1, que se une a su ligando PD-L1 <sup>57</sup>. Este último, el receptor de muerte PD-1 (del inglés "*programmed cell death protein-1*") es expresado por las células T activadas y tras su unión con su ligando PD-L1 lleva a cabo funciones de regulación de la activación de las células T, tolerancia de las células T y vuelta al estado de homeostasis. Todo ello, desencadenado por una cascada de señalización intracelular en las células T por la que se disminuye la señalización del receptor de células T, la señalización de CD28 y aumento de factores de transcripción BATF que provocan una disminución de la proliferación de las células T, de la producción de citoquinas y aumento de la muerte de las células T <sup>58</sup>.

v. Mecanismos de evasión de las células tumorales al sistema inmunitario

Sin embargo, hay diferentes mecanismos por los cuales se produce la evasión de la respuesta inmunitaria por parte de los tumores, afectando a cada uno de los puntos del reconocimiento tumoral de los que se ha hablado en el apartado anterior.

Puede ocurrir que la generación de neoantígenos no sea efectiva <sup>59,60</sup>:

- por defectos en la maduración de las células dendríticas o en su procesamiento y presentación de péptidos <sup>61</sup>;
- por una depleción en los antígenos presentados por las células tumorales consecuencia de la presión ejercida por el sistema inmunitario, que pierden estos neoantígenos que no son críticos para la supervivencia del tumor, volviéndose invisibles <sup>62,63</sup>.

Además, pueden existir alteraciones en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, que disminuyan la presentación de los antígenos tumorales a las células T. En concreto, se han estudiado en profundidad las alteraciones en la maquinaria de presentación de las moléculas del CMH de clase I <sup>64</sup>. Las células tumorales y no tumorales pueden expresar hasta seis alelos diferentes del CMH de clase I (dos por cada uno de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C), cada uno de los cuales presentan un set de péptidos. Sin embargo, mutaciones en éstos o pérdida del número de copias (proceso también llamado “pérdida de la heterocigosidad” que conlleva la pérdida somática del haplotipo HLA-I materno o paterno <sup>65</sup>) da lugar a una disminución de la presentación antigénica pudiendo hacer que el microambiente tumoral sea inmuno-excluyente <sup>66</sup>. En concreto, en el cáncer de pulmón no microcítico se ha identificado una pérdida de la heterocigosidad en hasta un 40% de los pacientes <sup>65</sup>. Estas mutaciones pueden ocurrir en la cadena pesada tipo  $\alpha$  o en la cadena  $\beta$  microglobulina (*B2M*) del CMH <sup>67,68</sup>. Además, es posible que los propios tumores reduzcan la expresión de las moléculas de CMH en su superficie celular, sin presentar una mutación en el propio CMH, mediante una pérdida de la señalización de IFN $\gamma$  <sup>69,70</sup> o de mutaciones de componentes del complejo de carga de péptidos <sup>59</sup>.

Otro de los mecanismos de evasión de las células tumorales a la actividad citolítica de las células T es la sobreexpresión en su membrana del ligando inhibidor PD-L1, que se unirá al receptor inhibitorio PD-1 expresado en la superficie de los linfocitos T. Este ligando se expresa de forma constitutiva tanto en células del sistema inmunitario (linfocitos B y T, células dendríticas y macrófagos) como en células del estroma, vasculares o endoteliales, entre otras. Señales proinflamatorias y, en concreto, la familia de los interferones de tipo I y tipo II son capaces de inducir la expresión de PD-L1 <sup>58</sup>. Sin embargo, tanto las células tumorales como las células mieloides del microambiente tumoral son capaces de sobre expresar PD-L1 como forma de resistencia inmunitaria adaptativa a la acción de los linfocitos T, inhibiendo su proliferación y actividad <sup>71,72,73</sup>.

## vi. Biomarcadores

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NIH, *National Institute of Environmental Health Sciences*), un biomarcador es una “molécula biológica que se encuentra en la sangre o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una enfermedad, o de respuesta a una intervención terapéutica”. Según el propósito para el que sean utilizados, estos biomarcadores se dividen en:

- Biomarcadores de pronóstico: proporcionan información del desarrollo de la enfermedad, independientemente del tratamiento o intervención. Se mide antes del tratamiento y define características moleculares del tumor que se asocian una evolución a largo plazo, pero ésta es independientemente del tratamiento o intervención que se le aplique al paciente.
- Biomarcadores predictivos: se miden antes del tratamiento e identifica pacientes que puedan tener mayor o menor probabilidad de beneficiarse de un tratamiento o intervención.
- Biomarcadores farmacodinámicos: aquellos con los que se evalúa la efectividad y seguridad del fármaco administrado.
- Biomarcadores surrogados: biomarcadores que actúan como sustitutos de un criterio de valoración clínico en la respuesta a una intervención.
- Biomarcadores de monitorización: aquellos que se utilizan para el seguimiento de la eficacia en el tiempo de una intervención.

El problema para la identificación de un buen biomarcador predictivo en pacientes que reciben inmunoterapia es que éstos son variables en el tiempo y en el espacio dado que están influenciados por diferentes interacciones complejas<sup>74, 75</sup>. El objetivo de un buen biomarcador es identificar grupos de pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con inmunoterapia y de tener menos efectos adversos. Además, son varios los biomarcadores que se utilizan en combinación para aumentar su poder predictivo e identificar de forma más precisa los pacientes que se pudieran beneficiar de esta intervención terapéutica.

### **PD-L1**

Como se ha comentado anteriormente, son varios los fármacos que modulan el eje PD-1/PD-L1 que se han aprobado para su uso en cáncer de pulmón. Todos ellos son anticuerpos monoclonales que reconocen al ligando PD-L1 (atezolizumab<sup>76</sup> y durvalumab<sup>77</sup>) o que reconocen



al propio receptor PD-1 (pembrolizumab<sup>78</sup>, nivolumab<sup>79</sup> y cemiplimab<sup>80</sup>), por tanto, cabe esperar que la respuesta a este tipo de inmunoterapia pueda depender, en parte, de la expresión de PD-L1 intratumoral<sup>75</sup>. De manera que, pacientes con una respuesta inmunitaria preexistente en el tumor al momento de la inmunoterapia que se haya visto bloqueada por la alta expresión del ligando inhibidor PD-L1, tendrán más opciones de beneficiarse de ésta<sup>81</sup>. La expresión de PD-L1 intratumoral se cuantifica mediante ensayos de inmunohistoquímica y se define por el TPS (de las siglas en inglés de *Tumor Proportion Score*), que es el porcentaje de células tumorales viables que muestran una tinción de la membrana con el anticuerpo anti-PD-L1<sup>82</sup>. Asimismo, las muestras se clasifican según la expresión positiva o negativa de PD-L1, basándose en si esta es mayor o igual al 1%<sup>83</sup>, al 5%<sup>84</sup> o al 50%<sup>83</sup>. Son varios los estudios en los que se encuentra una asociación positiva entre la expresión de PD-L1 en tejido y la respuesta a la inmunoterapia en diferentes tipos de tumores<sup>85</sup> y, en concreto, en el cáncer de pulmón no microcítico<sup>32, 83</sup>. Sin embargo, la expresión de PD-L1 no parece ser un biomarcador predictivo perfecto dado que hay estudios en los que no se encuentra una asociación positiva entre este biomarcador y la respuesta a la inmunoterapia<sup>84</sup>.

### **Carga mutacional tumoral**

Generalmente, el nicho tumoral está formado por células tumorales que poseen no una si no varias mutaciones adquiridas a lo largo del tiempo. Al número de mutaciones somáticas por Megabase de ADN tumoral se le conoce por la Carga Mutacional Tumoral (CMT, o TMB de sus siglas en inglés, *Tumor Mutational Burden*)<sup>47</sup>. La CMT se determina mediante secuenciación de nueva generación (*Next-Generation Sequencing*, NGS) cuantificando el número de mutaciones no sinónimas presentes en la muestra a analizar. Los pacientes con alta carga mutacional generan, por tanto, una gran cantidad de neoantígenos tumorales distintos que pueden ser reconocidos por un repertorio amplio de células T específicas de tumor capaces de desencadenar una respuesta antitumoral<sup>86, 87</sup>. Por ello, es uno de los biomarcadores que se determina actualmente en ensayos clínicos de inmunoterapia<sup>88</sup>. Además, la alta carga tumoral en muestras de tumores al pretratamiento se ha asociado con mayores respuestas a la inmunoterapia<sup>89</sup> y mayor supervivencia<sup>87</sup> en diferentes tumores y, específicamente, en cáncer de pulmón<sup>90,38</sup>. De especial interés es el hecho de que en pacientes fumadores la CMT es mayor que en no fumadores, probablemente debido al hecho de que éstos están expuestos a un mayor número de compuestos carcinogénicos que dan lugar a una alta tasa de mutaciones, y parecen beneficiarse más del tratamiento con inmunoterapia<sup>33</sup>.

Sin embargo, como la determinación de PD-L1, la CMT es una variable estática que se determina en biopsias pretratamiento y que puede variar tras su administración y la respuesta al mismo <sup>74</sup>. De esta manera, hay estudios en los que no se correlaciona la alta CMT con la respuesta al tratamiento, existiendo pacientes que con baja CMT se benefician del tratamiento con inmunoterapia y pacientes en los que la CMT no parece correlacionar con la respuesta a ésta <sup>91</sup>. Además, se trata de una variable continua, esto es, con diferentes definiciones dependiendo del ensayo que se realice para determinarla <sup>75</sup> siendo también dependiente del porcentaje de tumor que contenga la muestra pretratamiento <sup>92</sup>.

### **Complejo Mayor de Histocompatibilidad**

El genotipado del CMH ha cobrado importancia como biomarcador de la respuesta a inmunoterapia, dado que éste va a determinar en gran medida los neoantígenos presentados por las células tumorales <sup>38</sup>. La heterocigosidad en el HLA-I se ha asociado con una mayor supervivencia en pacientes tratados con inmunoterapia, probablemente debido a un mayor rango de presentación antigénica dando lugar a una mayor expansión clonal en el repertorio de linfocitos T <sup>93, 65</sup>. Además, se han identificado algunos supertipos de HLA, como es el HLA-B44 <sup>94</sup>, que se asocian a una mayor supervivencia tras el tratamiento con inmunoterapia <sup>93</sup>. Se ha visto que este biomarcador, en concreto la pérdida de la heterocigosidad de HLA-I, en conjunción con la determinación de la CMT puede servir para seleccionar pacientes que se puedan beneficiar del tratamiento con inmunoterapia con mayor capacidad predictiva que la sola determinación de la CMT <sup>95</sup>.

### **Linfocitos infiltrantes de tumor**

Uno de los objetivos de la inmunoterapia es el de producir una revigorización de la respuesta inmunitaria del paciente contra el tumor. El tratamiento con inhibidores de PD-1, provoca una respuesta en el tumor que se traduce en el aumento de distintos tipos celulares infiltrados como los linfocitos T CD8+, expansión clonal de los linfocitos T y activación de rutas de señalización y genes implicados en la respuesta inmunitaria, especialmente en pacientes que responden al tratamiento <sup>96, 97</sup>. De hecho, los niveles pretratamiento de linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor pueden servir como biomarcador de respuesta al bloqueo de PD-1 <sup>97</sup> y clasifican en **tres perfiles** el microambiente tumoral existente <sup>98</sup>: el perfil inflamado, con abundancia de linfocitos T en el parénquima del tumor y próximos a las células tumorales y asociado a respuesta a

inmunoterapia <sup>97</sup>; el perfil excluyente, con células inmunitarias en el estroma tumoral sin llegar a infiltrar en el parénquima; y el perfil desierto inmunológicamente, sin células inmunitarias por lo que no suelen responder bien a este tipo de terapia <sup>81</sup>. Además, es importante el estudio no sólo de la infiltración inmunitaria si no de los tipos celulares que la forman, siendo favorable la respuesta en pacientes con una actividad positiva para las células T efectoras <sup>96</sup> pero negativa para pacientes con infiltración de macrófagos asociados al tumor que inhiben la respuesta a la inmunoterapia <sup>99</sup>.

La evaluación del microambiente tumoral al inicio del tratamiento se realiza en las biopsias de tejido mediante inmunofluorescencia multiplexada, Inmunoscore y secuenciación del ARN por técnicas de secuenciación de nueva generación <sup>100</sup>.

- La inmunofluorescencia multiplexada es una técnica de tinción mediante inmunohistoquímica que permite la visualización de varias proteínas de interés en una sola muestra de tejido en parafina <sup>101</sup>. Con ella se puede extraer mucha información acerca de la estructura del microambiente tumoral y correlacionarla con la respuesta al tratamiento con inmunoterapia <sup>97,102</sup>.
- El “Inmunoscore” se trata de un sistema estandarizado que permite medir la infiltración intra- y peri tumoral de los linfocitos T e integra esta información en un sistema de puntuación. Esta puntuación tiene en cuenta la densidad de los linfocitos T CD8+, de los linfocitos T CD3+ y su localización en el nicho tumoral <sup>103</sup>. Este sistema se encuentra validado actualmente en colon y se está desarrollando para el cáncer de pulmón <sup>104</sup>.
- Por su parte, la secuenciación de ARN permite la identificación de una firma genética inmunitaria que posteriormente se pueda correlacionar con la respuesta al tratamiento <sup>105</sup>. No sólo tienen en cuenta los receptores expresados por las células tumorales e inmunitarias, si no la expresión de diferentes ligandos y proteínas (como pueden ser interferones, factores de necrosis tumoral o citoquinas) que tienen una implicación en la respuesta inmunitaria como potenciadores o inhibidores. La ventaja que tiene esta técnica es que no está limitada al número de genes a evaluar, pudiendo obtenerse información de hasta 3000 genes en una misma secuenciación <sup>106</sup>. Además, con los datos de esta secuenciación se puede inferir la composición en términos de proporción de diferentes tipos de células inmunitarias en el tejido en cuestión <sup>107</sup>.

### **Repertorio de TCR**

El repertorio de receptores de linfocitos T de un individuo refleja la capacidad de estas células de reconocer los neoantígenos generados por el tumor. De manera que, como se ha comentado

anteriormente, una respuesta efectiva de los linfocitos T dará lugar a la expansión de clones de éstos que sean reactivos frente a los neoantígenos tumorales siendo un indicador de la inmunogenicidad del tumor y la respuesta que tendrá a la inmunoterapia <sup>108</sup>.

La determinación del repertorio de TCR se realiza mediante técnicas de secuenciación masiva en las que se secuencia, habitualmente, la cadena  $\beta$  del TCR en sus regiones VDJ dado que es la que mayor variabilidad presenta y la que media el reconocimiento antigénico. En concreto, la región del receptor hipervariable CDR3 (del inglés *complementary-determining region 3*, o región determinante complementaria 3) que es única para cada clon de linfocito T y que es la que establece más contactos con los péptidos antigénicos. Por lo tanto, la frecuencia de una secuencia específica de CDR3 es un indicativo de la abundancia de un clon de linfocito T en concreto <sup>109</sup>.

El repertorio de los TCR de un individuo se puede caracterizar mediante tres parámetros, que son la convergencia, la uniformidad o clonalidad y la diversidad <sup>110</sup>.

- La convergencia del TCR se define como la frecuencia agregada de clones, o secuencias de nucleótidos únicas de la cadena  $\beta$  del receptor, que comparten un gen variable y una secuencia de aminoácidos de CDR3 con al menos otro clon.
- La uniformidad describe cómo de uniformemente distribuido está el repertorio TCR, acercándose a 0 si el repertorio está desequilibrado por un número reducido de clones predominantes y acercándose a 1 si el repertorio está equilibrado, con frecuencias similares de todos los clones. Es el inverso de la clonalidad.
- La diversidad refleja cuán diverso es el repertorio de receptores de linfocitos T, como número de secuencias únicas expresadas.

Además, la similitud entre dos repertorios de TCR, ya sea entre distintos individuos o en el mismo individuo pero en diferentes compartimentos (sangre o tejido) o tiempos, se puede medir mediante el índice de Jaccard.

Se ha estudiado cómo la heterogeneidad antigénica en el nicho tumoral se corresponde con una mayor heterogeneidad de los TCR, que serán los que reconozcan el amplio espectro de neoantígenos y provoquen una respuesta antitumoral frente a ellos (McGranahan Science 2016) <sup>111</sup>. Un análisis del repertorio de TCR en diferentes regiones del tumor en el mismo paciente pone de manifiesto que hay clones de linfocitos T que se conservan entre diferentes regiones, probablemente debido a que son los que reconocen las mutaciones más inmunogénicas <sup>112</sup>. Además, la heterogeneidad en el repertorio de TCR intratumoral se ha asociado a un mayor

riesgo de recaída <sup>112</sup>, esto es, un repertorio de TCR en el tumor menos enfocado en el reconocimiento de neoantígenos tumorales se correlaciona con peor pronóstico <sup>113</sup>.

La relación entre el repertorio de TCR intratumorales con el panorama mutacional y neoantigénico que presenta el nicho tumoral ha potenciado el uso del TCR como posible biomarcador de respuesta a la inmunoterapia. En muestras de tumores de melanoma pre y postratamiento con pembrolizumab se ha visto un incremento en clones expandidos de linfocitos T en las muestras postratamiento de aquellos pacientes que responden a la inmunoterapia <sup>97</sup>. En este mismo tipo tumoral, se ha visto que cambios en la diversidad del repertorio de TCR debido a la expansión de clones específicos de neoantígenos tumorales se relacionan con respuesta a la inmunoterapia <sup>96</sup>. De la misma manera, un repertorio de TCR intratumoral más clonal en las muestras postratamiento se ha asociado con la respuesta patológica a la inmunoterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de pulmón <sup>114</sup>. Además, se ha demostrado su relación con el CMH, viéndose una mayor clonalidad del TCR en pacientes heterocigotos para HLA <sup>93</sup>.

Una de las ventajas que presenta la caracterización del repertorio de TCR es su consideración de biomarcador dinámico por la posibilidad de monitorización de cambios en el mismo en sangre periférica. A este respecto, se ha visto que una mayor diversidad en el repertorio de TCR durante el tratamiento con inmunoterapia se asocia a mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con cáncer de pulmón <sup>115</sup>. Además, pacientes con un repertorio periférico de TCR clonal se benefician más del tratamiento con inmunoterapia en melanoma <sup>116</sup> y en cáncer de pulmón <sup>117</sup>. Por último, clones de linfocitos T específicos de tumor presentes en las muestras de tejido se pueden identificar en sangre y correlacionar la expansión periférica de los mismos con la respuesta al tratamiento con inmunoterapia <sup>114</sup>.

# Capítulo 2

## Objetivos

El **objetivo principal** del trabajo consiste en la búsqueda de biomarcadores de respuesta a la quimio-inmunoterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico de estadio IIIA, tratados dentro del ensayo clínico NADIM.

Los objetivos intermedios incluyen:

- Validar la utilidad de biomarcadores clásicos del tratamiento con inmunoterapia, como PD-L1 y TMB, en las muestras de tejido pretratamiento.
- Definir el papel del repertorio del receptor de linfocitos T como biomarcador emergente en pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimio-inmunoterapia neoadyuvante.
- Caracterizar el repertorio del receptor de linfocitos T en sangre periférica de los pacientes y determinar cambios en el mismo a consecuencia del tratamiento.
- Caracterizar el repertorio del receptor de linfocitos T en las muestras de tejido tumoral de los pacientes, haciendo un seguimiento de los clones en los compartimentos de tejido pre- y postratamiento y sangre pre- y postratamiento.
- Analizar la expresión génica diferencial de genes relacionados con la respuesta inmunitaria entre tumores con respuesta completa y no completa en tejido pretratamiento.
- Identificar genes relacionados con la progresión de los pacientes cuyos tumores no alcanzan la respuesta patológica completa tras la intervención terapéutica.
- Analizar los cambios en la expresión génica de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en tejido producidos a consecuencia del tratamiento con quimio-inmunoterapia neoadyuvante.

# Capítulo 3

## Material y métodos

### I. Diseño del estudio y pacientes

Las muestras utilizadas en este estudio traslacional son las pertenecientes a los pacientes participantes del ensayo clínico NADIM (*Neo-Adjuvant Immunotherapy*, NCT03081689) promovido por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP). En este ensayo multicéntrico de fase II, 46 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y estadios resecables IIIA N2 fueron tratados con quimioterapia (paclitaxel 200mg/m<sup>2</sup> y carboplatino AUC 6) e inmunoterapia anti-PD1 (nivolumab 360mg) neoadyuvante durante 3 ciclos para posteriormente someterse a cirugía y a la resección completa del tumor. Los pacientes continuaron el tratamiento con inmunoterapia anti-PD1 adyuvante durante un año. Los pacientes se clasificaron en tres grupos<sup>102</sup>, dependiendo de la respuesta patológica obtenida tras el tratamiento neoadyuvante y medida en el tejido resecado en la cirugía: CPR (*Complete Pathological Response* o respuesta patológica completa, esto es, 0% de células tumorales viables en el tumor primario y en los ganglios analizados), MPR (*Major Pathological Response* o respuesta patológica mayor, con menos del 10% de células tumorales viables) e IPR (*Incomplete Pathological Response* o respuesta patológica incompleta, con más del 10% de células tumorales viables). Para este estudio se consideraron dos grupos diferenciados: pacientes con CPR y pacientes con no-CPR (que son aquellos con alguna célula viable en el tejido de la cirugía, esto es, pacientes con MPR o IPR).

El número total de pacientes del ensayo fue 46, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre y tejido en el momento basal, previo al tratamiento neoadyuvante; muestras de sangre y tejido en el momento postratamiento neoadyuvante, esto es, la cirugía; y muestras de sangre tras la cirugía durante el tratamiento adyuvante, a los 6 y 12 meses de seguimiento. La disponibilidad de las muestras y las técnicas realizadas se detallan en el **anexo 1**.

Asimismo, la características clínico-patológicas de los pacientes del estudio se detallan en el **anexo 1**<sup>102</sup>.

## II. Aislamiento de células polimorfonucleares en sangre periférica.

Las muestras de sangre se recogieron en cada uno de los hospitales de referencia en tubos de EDTA de 10 ml y se enviaron al Hospital Universitario Puerta de Hierro – Majadahonda para su procesamiento dentro de las 24 h siguientes a la extracción. Las muestras se diluyeron 1:1 con RPMI 1640 y se aislaron las células polimorfonucleares mediante separación del resto por gradiente de densidad, utilizando el reactivo *Lymphoprep* (Stemcell) y centrifugación sin freno a 1200 rpm durante 25 minutos. Las células se recogieron en tubos de 15 ml y se lavaron con RPMI 1640; posteriormente, se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se congelaron en viales de  $3-5 \times 10^6$  células con 1 ml de medio de congelación (1:1 FBS/RPMI 1640 con 10% de DMSO) en nitrógeno líquido.

## III. Extracción de ARN y ADN

### a. Extracción de ARN (Maxwell)

La extracción de ARN a partir de células polimorfonucleares aisladas de sangre periférica y criocongeladas se realizó con el kit *Maxwell RSC simply RNA Cells* (Promega). Se descongeló un vial por momento del tratamiento y paciente, a partir del cual se realizó la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la concentración de ARN se realizó con el kit *Qubit RNA BR Assay* (Thermo Fisher Scientific) y se midió en un aparato Qubit.

### b. Extracción de ARN y ADN de muestras de tejido parafinado

Los centros colaboradores del proyecto enviaron las muestras de biopsia de tejido parafinado en el momento del diagnóstico del tumor y de la resección quirúrgica. Se adjunta una tabla en el **anexo 1** donde se detalla el origen (ganglio o tumor) de cada una de las muestras de tejido utilizadas en el estudio.

Se cortaron 2 virutas de 10  $\mu$ m cada una de cada una de las muestras de tejido parafinado para proceder a la extracción de ARN y ADN mediante el kit de *truXTRAC FFPE DNA* (Covaris). Para aumentar el rendimiento de extracción de ADN se incubaron las muestras 16 horas a 56°C tras la extracción del ARN y tras haber realizado la sonicación con el programa de *truXTRAC FFPE microTUBE-130 Tissue Resuspension Time*. Las muestras de ADN ya extraído se procesaron según el protocolo de *GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit* con el objetivo de aumentar el rendimiento de la secuenciación, eliminar posibles impurezas de parafina y aumentar la concentración de muestra. La cuantificación de la concentración de ARN se realizó con el kit



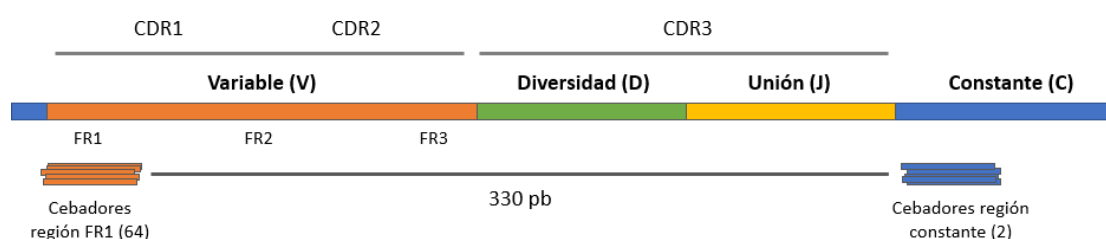
*Qubit RNA BR Assay* (Thermo Fisher Scientific) mientras que la cuantificación de ADN se realizó con el kit *Qubit dsDNA HS Assay* (Thermo Fisher Scientific).

Tanto las muestras de ARN como de ADN se almacenaron a  $-80^{\circ}$ .

#### IV. Preparación de librerías y secuenciación.

La preparación de las librerías y su secuenciación se lleva a cabo en 3 pasos principales. Primero, se generan las librerías a partir de las muestras de ARN y ADN mediante tecnología AmpliSeq. Posteriormente, se carga del chip de secuenciación con las librerías generadas mediante el aparato Ion Chef™ (Thermo Fisher Scientific). Por último, se lleva a cabo la secuenciación del chip cargado con el secuenciador Ion S5™ System.

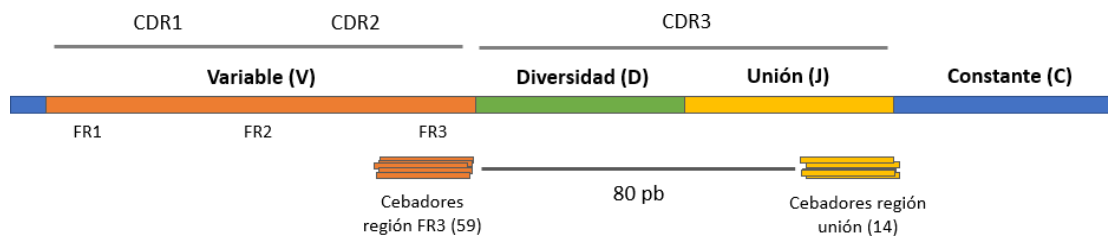
Las librerías del receptor de linfocitos T a partir de **ARN extraído de muestras de células polimorfo-nucleadas aisladas de sangre periférica** se realizó con el ensayo de *Oncomine TCR Beta-LR*, utilizando 25 ng de ARN inicial previamente transcrito a ADNc mediante la enzima SuperScript™ IV VILO™ Master Mix. Posteriormente, se generó la librería a partir del ADNc, mediante la tecnología “Ampliseq”. Este panel contiene 64 cebadores que reconocen la región determinante de complementariedad 1 del gen variable y 2 cebadores que reconocen la región constante de la cadena  $\beta$  del receptor de linfocitos T, generando amplicones de 330 pares de bases correspondientes a las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del TCR. Para la carga del chip de secuenciación se agruparon hasta 8 librerías de 25 pmol/L e igual volumen de cada una de ellas en una misma mezcla, de la que se cargó 25  $\mu$ l en un chip Ion 530 utilizando para ello el aparato Ion Chef™.



**Figura 6.** Esquema de cebadores y región secuenciada del TCR con el panel Oncomine TCR Beta-LR

Las librerías del TCR a partir de **muestras de tejido en parafina** se realizaron con el ensayo de *Oncomine TCR Beta-SR*, con un ARN inicial de 100 ng previamente transcrito a ADNc mediante la enzima SuperScript™ IV VILO™ Master Mix. Los cebadores de este panel dan lugar a un

amplificón de 80 pares de bases que se corresponde con la región CDR3 del TCR: 59 cebadores que reconocen la región marco FR3 correspondiente con el final de la región CDR2 del gen variable y 14 cebadores que reconocen el gen de unión (J). Para la carga del chip de secuenciación se agruparon hasta 32 librerías de 25 pmol/L e igual volumen de cada una de ellas en una misma mezcla, de la que se cargó 25 µl en un chip Ion 540 utilizando para ello el aparato Ion Chef™.



**Figura 7.** Esquema de cebadores y región secuenciada del TCR con el panel Oncomine TCR Beta-SR

Por su parte, para las **librerías de la firma inmunitaria en tejido** se utilizó el *Oncomine™ Immune Response Research Assay*, cuyo panel contiene cebadores para la determinación de hasta 395 genes relacionados con procesos inmunitarios, generándose amplicones de 110 pares de bases. Para éstas, se utilizaron 10 ng de ARN inicial (previamente transcritos a ADNc utilizando la enzima SuperScript™ IV VILO™ Master Mix), y no se consideraron para la secuenciación aquellos tejidos procedentes de ganglio linfático. Las librerías se cargaron en un chip Ion 530, agrupándose hasta 8 librerías de 50 pmol/L e igual volumen de cada una de ellas en una misma mezcla de la que se cargó 25 µl. Adicionalmente, se realizaron librerías en una selección de muestras de tejido pretratamiento (n=10) con el panel de *HTG EdgeSeq Precision Immuno-Oncology* en la entidad colaboradora MD Anderson Houston, con las que se llevó a cabo el análisis diferencial de la expresión génica entre tumores con top 1% alto y bajo.

En el caso de las **librerías para la determinación de mutaciones tumorales** y la carga mutacional tumoral se utilizaron 20 ng de ADN de input procedente de biopsias pretratamiento con un mínimo de 20% de células tumorales. Este ADN se trató con 1 µl de Uracil-DNA Glicosilasa (UDG) para eliminar las bases deaminadas antes de proceder a la amplificación con los cebadores. Posteriormente, la realización de las librerías se llevó a cabo en un aparato Ion Chef™ con el kit Ion AmpliSeq™ DL8 para Chef y utilizando el panel de *Oncomine Tumor Mutation Load Assay*, que cubre 1.7 megabases de 409 genes previamente asociados con alteraciones tumorales. Las bibliotecas finales se agruparon y ajustaron a una concentración final de 50 pM y se cargaron ocho muestras en un chip Ion 540 con el aparato Ion Chef™.

## V. Determinación de la expresión de PD-L1

La determinación de la expresión de PD-L1 se llevó a cabo en las muestras de tejido parafinado en el momento del diagnóstico, cortado a 4 µm y dispuesto en un portaobjetos, mediante el ensayo de inmunohistoquímica 22C3 pharmaDx (SK006; Dako) en un aparato de tinción automático. La cuantificación de la positividad de PD-L1 en cada una de las muestras se definió por el TPS según la guía de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASCL, *International Association for the Study of Lung Cancer*)<sup>82,118</sup>.

Las muestras se consideraron positivas para PD-L1 si el porcentaje de células tumorales que presentaban expresión de PD-L1 en la membrana era mayor o igual al 1%. En el caso de existir varias muestras pretratamiento del mismo paciente, se le consideró PD-L1 positivo si al menos una de las muestras presentaba expresión de PD-L1 en las células tumorales, considerándose el mayor porcentaje determinado en varias de las muestras como el válido para el análisis. Se definieron diferentes puntos de corte para el TPS de PD-L1 según el método definido anteriormente por otros autores<sup>119</sup>.

## VI. Análisis bioinformático

El procesado inicial de los archivos BAM generados en la secuenciación se realizó con la herramienta Ion Reporter versión 5.12 de Thermo Fisher Scientific.

### a. Determinación de la frecuencia clonal, convergencia, diversidad y uniformidad de los repertorios de TCR.

Las secuencias correspondientes a las librerías del receptor de linfocitos T se alinearon con la herramienta Ion Reporter - OncoPrint TCR Beta versión 1.2, que utiliza la base de datos IMGT® como referencia de los genes de las regiones variable, diversidad y unión del TCR para reportar las frecuencias, las secuencias y el número de clonotipos identificados en cada una de las muestras además de las métricas derivadas. Las métricas analizadas por el Ion Reporter son:

- Índice de diversidad de Shannon, calculado según la fórmula:

$$\text{Índice de diversidad de Shannon } (H) = - \sum_{i=1}^N p_i \log_2(p_i)$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del clonotipo  $i$  para la muestra con un número  $N$  de clonotipos únicos.

- La uniformidad está calculada a partir del índice de diversidad de Shannon, dividiendo éste por el  $\log_2(N)$ , siendo  $N$  el número total de clones detectados en la muestra.
- La convergencia, definida como la frecuencia agregada de aquellos clones que comparten secuencia de aminoácidos, pero distinta secuencia de nucleótidos.
- El índice de Jaccard ( $I_j$ ) mide el grado de similitud entre dos conjuntos, midiendo el sumatorio de la intersección de ambos repertorios dividida por el sumatorio de su unión. Toma valores entre 0 y 1, siendo 0 los repertorios completamente distintos y 1 repertorios iguales <sup>120</sup>.

$$I(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

La clasificación por frecuencias de los clones identificados en cada muestra se hizo de acuerdo con su abundancia relativa en el repertorio de TCR total, denominado espacio clonal, quedando los diferentes clones divididos en las categorías top 1%, top 1-2%, top 2-5% y top 5%. Además de la afiliación de los clones a estas categorías según su frecuencia relativa, se puede determinar el espacio clonal que ocupan las mismas. De este modo, el espacio clonal del top 1% se define como las frecuencias agregadas de los clones más frecuentes, en este caso los que forman parte del top 1% superior.

Para el análisis de las dinámicas de los clones, se definieron los clones contraídos o expandidos como aquellos clones del top 1% de tejido cuya frecuencia clonal en sangre periférica disminuye o aumenta después del tratamiento. Los clones se identificaron por su región variable (V) y su secuencia de nucleótidos (NT).

#### **b. Determinación de la Carga Mutacional Tumoral**

Las lecturas se alinearon al genoma de referencia “hg19” mediante la herramienta Torrent Suite 5.12. Posteriormente, la carga mutacional tumoral se definió por el filtro de TMB y el algoritmo del Ion Reporter – OncoPrint Tumor Mutation Load versión 3.2. Esta herramienta bioinformática detecta y anota las variantes somáticas de baja frecuencia (como son los SNPs y los InDels o variantes de inserción y delección). Las variantes de la línea germinal se filtraron mediante una cadena de filtros basada en bases de datos poblacionales: variantes de alelos presentes en el Proyecto 1000 Genomas, el Proyecto de Secuenciación del Exoma del NHLBI GO (ESP) y ExAC. Además, se identificaron y filtraron mutaciones con posible relevancia clínica mediante el software Ion Reporter OncoPrint Variants 5.12. De éstas, se reportan aquellas mutaciones cuya frecuencia alélica de la variante fue superior al 5%, alcanzó  $\geq 60K$  de cobertura y un valor  $p \leq 0.05$ .

### c. Análisis de datos de librerías de RNAseq (Immune Response).

Las secuencias se alinearon al genoma de referencia (Immunesresponse\_v3.1) con el plugin ImmuneResponse – RNA de la herramienta Torrent Suite 5.12. Se reportaron en el software Ion Reporter las lecturas de secuenciación de cada uno de los genes analizados. Este panel cubre 395 genes relacionados con procesos inmunitarios, la descripción de cada uno de ellos se encuentra en el **anexo 2**.

La **expresión diferencial de genes entre grupos** se realizó mediante el paquete de análisis bioinformático de R DESeq2<sup>121</sup>, utilizando los datos en crudo del número de lecturas de cada gen. Para cada par de comparaciones, se consideraron los genes expresados diferencialmente (GEDs) aquellos que presentaron al menos un cambio superior al 50%, esto es, un  $|\log_2FC| > 1.5$ , y un p-valor ajustado menor de 0.05.

Además, se llevó a cabo el **análisis del enriquecimiento de grupos de genes**: análisis GSEA (Gene-Set Enrichment Analysis)<sup>122, 123</sup>. Se trata de un método computacional que determina si un conjunto predefinido de genes muestra diferencias significativas entre dos estados biológicos (pre- y postratamiento, respuestas patológicas, etc). La diferencia que presenta este análisis con respecto al de la expresión diferencial de genes que se realiza con el DESeq2 es que no considera los genes de manera individual, si no en grupo. De manera que, pequeñas diferencias en la expresión de un grupo de genes puedan dar lugar a una expresión diferencial significativa de la vía de señalización de la que forman parte. En el caso del análisis GSEA de este trabajo se utilizó como *input* la normalización de lecturas de estos genes realizada por el programa DESeq2 y la clasificación de estos genes según los 35 sets predefinidos en el panel utilizado (Immune Response). El p-valor de cada grupo de genes se ajustó mediante el FDR (*False Discovery Rate*) y se consideraron diferencialmente expresados los grupos con un p-valor ajustado  $< 0.05$ .

Adicionalmente, se llevó a cabo la **estimación de las proporciones de diferentes subconjuntos de células inmunitarias** a partir de los datos de secuenciación de ARN. Para ello, se utilizó el programa CIBERSORTx<sup>107</sup>. Esta herramienta puede estimar la infiltración inmunitaria, de cada muestra mediante el uso de un algoritmo y una matriz definida por 22 subtipos de células inmunitarias que se determinan en función de una firma genética de 547 genes. La matriz utilizada fue la predefinida en el programa, LM22, que distingue hasta 22 tipos celulares inmunitarios distintos: linfocitos B *naive*, linfocitos B de memoria, células plasmáticas, linfocitos T CD8<sup>+</sup>, linfocitos T CD4<sup>+</sup> *naive*, linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria no activados y activados, células T foliculares *helper*, linfocitos T reguladores, linfocitos T gamma/delta, células NK inactivadas, células NK activadas, monocitos, macrófagos en sus diferentes estados (M0, M1 y M2), células

dendríticas inactivadas y activadas, mastocitos inactivados y activados y eosinófilos inactivados y activados. Los datos de entrada para el análisis CIBERSORTx fueron la normalización de transcritos por millón (TPM) de los datos de la secuenciación del ARN, realizada mediante la división de la longitud de cada gen por los recuentos totales de lectura. Se consideraron aquellas muestras para las que el p-valor fuera  $<0.05$ .

## VII. Análisis estadístico.

El software usado para el análisis estadístico fue SPSS Statistics v25. Para realizar las gráficas se utilizó el software GraphPad PRISM v.8. Los análisis estadísticos realizados fueron no paramétricos dado que el tamaño muestral era pequeño y se consideró que los datos no estaban ajustados a una normalidad. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para comparaciones entre dos grupos independientes (entre pacientes con CPR y non-CPR, pacientes con top 1% alto o bajo, entre otras). La prueba de rangos con signo de Wilcoxon se utilizó para estudiar el efecto del tratamiento neoadyuvante realizando comparaciones entre muestras pareadas pre- y postratamiento. Para la valoración de la posible capacidad predictiva de respuesta patológica de los biomarcadores propuestos se utilizó el análisis de la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) y su respectiva área bajo la curva (AUC). Este análisis se realizó para la expresión de PD-L1, CMT, top 1%, uniformidad, expresión génica y para las frecuencias estimadas de las células inmunitarias. Los valores con una mayor ratio de probabilidad se usaron como umbrales para categorizar los GEDs y la frecuencia de los subconjuntos celulares de cada paciente en grupos de “alta” y “baja” expresión. Para la categorización de top 1% alto/bajo y CMT alto/bajo se utilizó la mediana de la cohorte. Los análisis de supervivencia (supervivencia libre de progresión y supervivencia global) se llevaron a cabo por curvas Kaplan-Meier utilizando el contraste de log-rank para las comparaciones entre grupos. La significancia positiva se consideró para aquellos valores de p menores a 0.05 tras aplicar la corrección de Bonferroni para test múltiples. El FDR (tasa de descubrimiento falso, o *False Discovery Rate*) se utilizó para definir la significancia en el análisis de GSEA, siendo positiva para valores de FDR menores de 0.05.

# Capítulo 4

## Resultados

### I. Determinación de PD-L1 como biomarcador en quimio-inmunoterapia.

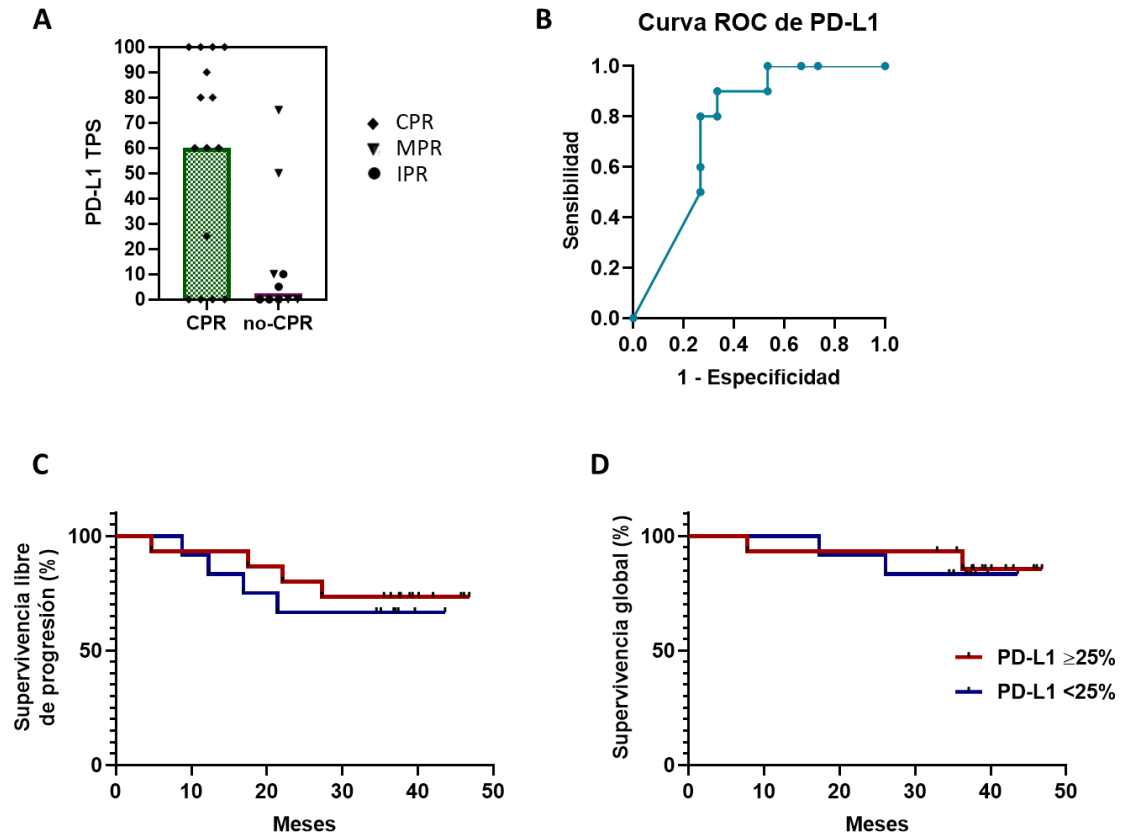
Existen diferencias significativas en la expresión de PD-L1 en las muestras de tejido al diagnóstico, siendo mayor ésta en pacientes cuyos tumores hicieron respuesta patológica completa tras el tratamiento neoadyuvante ( $p=0.021$ ; **figura 8A**). El área bajo la curva ROC de la expresión de PD-L1 para distinguir tumores con respuesta completa o no completa es de 0.7667 ( $p=0.0265$ ; 95% CI 0.578 – 0.955) (**figura 8B**). Para los diferentes puntos de corte de PD-L1, se comprobó que existían diferencias significativas entre tumores con CPR y no-CPR cuando el punto de corte se establecía en un 25% (**tabla 2**). 11 (73.33%) de los 15 pacientes con respuesta patológica completa presentaron un porcentaje de PD-L1 mayor o igual al 25%, en contraposición con los 2 (20%) pacientes que lo obtuvieron de los 10 con respuesta patológica no completa (**tabla 2**). Sin embargo, no se encontraron asociaciones en la supervivencia libre de progresión ( $p=0.637$ ) ni en la supervivencia global (0.772) entre pacientes con tumores con PD-L1 TPS alto ( $\geq 25\%$ ) y bajo (**figura 8C, D**) con una mediana de seguimiento de 36.0 meses. Tampoco se encontraron diferencias en el PD-L1 TPS en la histología del tumor, afectación de ganglios linfáticos o sexo (**tabla 3**).

	CPR (n=15)	non-CPR (n=10)	Valor p
PD-L1 < 1%	4 (26.67%)	5 (50.0%)	0.2072
PD-L1 $\geq$ 1%	11 (73.33%)	5 (50.0%)	
PD-L1 < 10%	4 (26.67%)	6 (60.0%)	0.1221
PD-L1 $\geq$ 10%	11 (73.33%)	4 (40.0%)	
PD-L1 < 25%	4 (26.67%)	8 (80.0%)	0.0151
PD-L1 $\geq$ 25%	11 (73.33%)	2 (20.0%)	

**Tabla 2.** Diferentes puntos de corte para la expresión de PD-L1.

	PD-L1 < 25% (n=13)	PD-L1 $\geq$ 25% (n=15)	Valor p
Mujer	2 (15.38%)	3 (20.0%)	0.000
Hombre	11 (84.62%)	12 (80.0%)	
Escamoso	5	5	0.999
Adenocarcinoma	8	9	
NOS	0	1	
N0	3 (23.08%)	4 (26.67%)	0.999
N2	10 (76.92%)	11 (73.33%)	

**Tabla 3.** Relación de punto de corte de PD-L1 del 25% con las diferentes variables clínicas.



**Figura 8. PD-L1 como biomarcador.**

**A.** Diagrama de barras para la comparación de la expresión de PD-L1 en tejido entre pacientes con CPR y no-CPR, test de U-Mann Whitney ( $p=0.021$ ). **B.** Curva ROC para la clasificación de pacientes según la expresión de PD-L1 en tejido ( $p=0.0265$ ). **C.** Curva de supervivencia libre de progresión para PD-L1. **D.** Curva de supervivencia global para PD-L1.

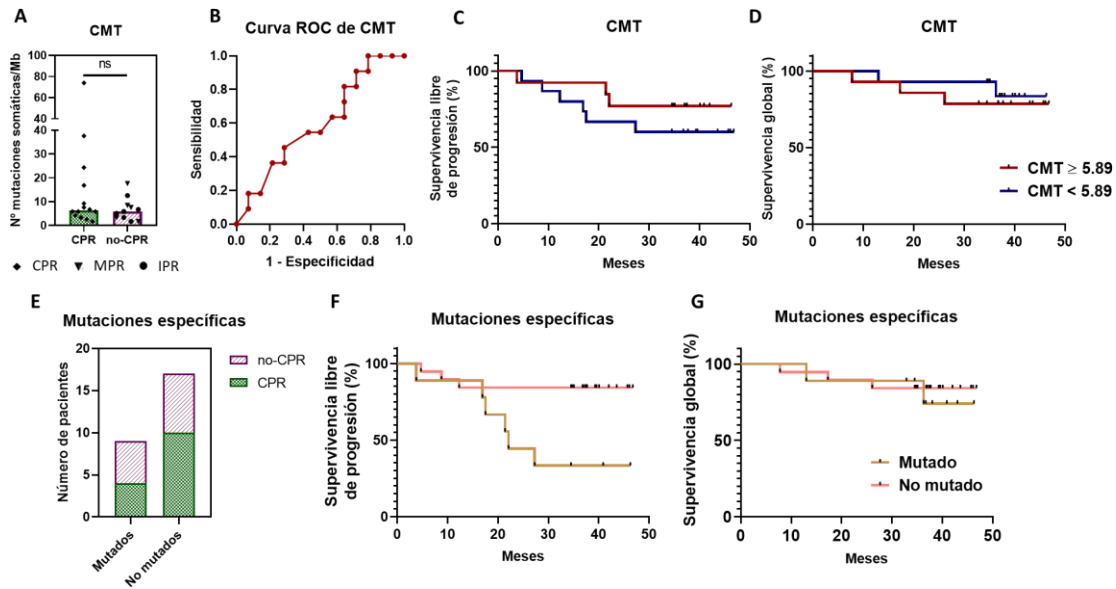
## II. CMT y mutaciones como biomarcadores de respuesta patológica.

No se encontraron diferencias significativas entre pacientes con CPR y no-CPR en cuanto al número de mutaciones somáticas identificadas por megabase ( $p= 0.425$ ; **figura 9A**). Asimismo, la curva ROC para este biomarcador no logra clasificar bien a los pacientes con respuesta patológica completa y no-CPR, siendo ésta no significativa con un área bajo la curva de 0.597 ( $p=0.411$ ; 95% CI 0.3716 – 0.8232) (**figura 9B**). Tomando como punto de corte la mediana de la población ( $\geq 5.89$ ) se clasificó los pacientes en CMT alto y CMT bajo. No se vieron asociaciones en la supervivencia libre de progresión ( $p=0.222$ ) ni en la supervivencia global ( $p=0.6132$ ) entre pacientes con alto y bajo CMT (**figura 9C, D**) con una mediana de seguimiento de 36.0 meses.

Se identificaron mutaciones somáticas patogénicas en las muestras de biopsia pretratamiento de estos pacientes, con especial interés en aquellas mutaciones en genes que se han asociado con un peor pronóstico en pacientes tratados con inmunoterapia. Entre éstas, se encuentran las



mutaciones en *STK11*, *KEAP1*, *RB1* y *EGFR*. La presencia de estas mutaciones no está asociada a la respuesta patológica de los pacientes ( $p=0.682$ ; **figura 9E**) pero sí a una menor supervivencia libre de progresión ( $p=0.011$ ) con una mediana de 22.1 meses en aquellos pacientes con tumores mutados y no alcanzada en los no mutados (**figura 9F**). Con respecto a la supervivencia global, no se vieron diferencias entre tumores mutados y no mutados ( $p=0.700$ ; **figura 9F**).



**Figura 9. Carga Mutacional Tumoral y mutaciones como biomarcadores de respuesta patológica.**

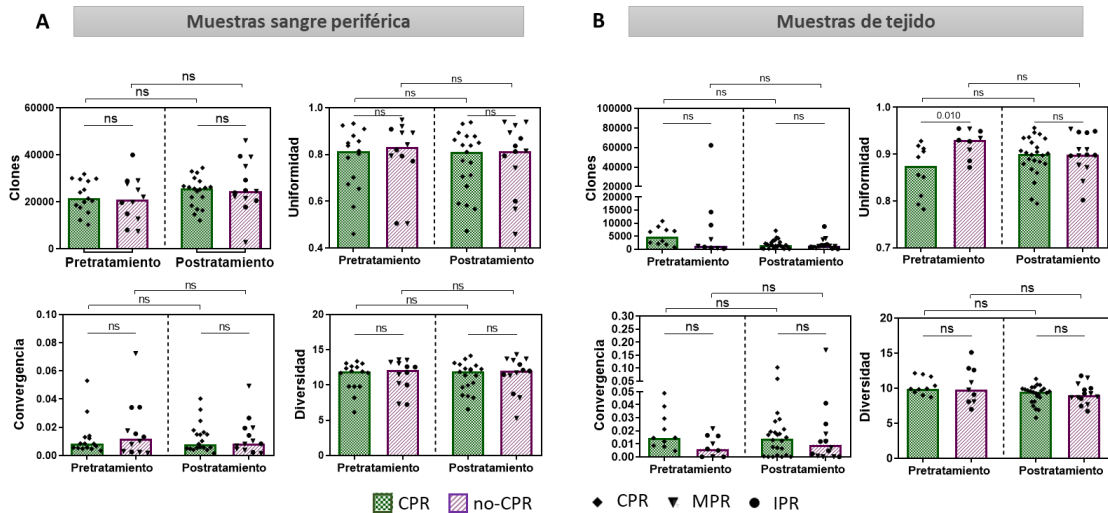
**A.** Diagrama de barras comparando la CMT en pacientes con CPR y no-CPR, test de U-Mann Whitney ( $p=0.425$ ). **B.** Curva ROC para la clasificación de pacientes según la CMT ( $p=0.411$ ). **C.** Curva de SLP para CMT. **D.** Curva de SG para CMT. **E.** Tabla de contingencia de pacientes con mutaciones específicas, pacientes CPR y no-CPR. **F.** Curva de SLP para pacientes con mutaciones específicas. **G.** Curva de SG para pacientes con mutaciones específicas.

### III. Receptor de linfocitos T como biomarcador emergente

#### i. Caracterización del repertorio de TCR en sangre y tejido

Se analizaron los parámetros que caracterizan el repertorio de receptores de linfocitos T de un individuo (clones identificados, uniformidad, convergencia y diversidad) en las muestras de células poliformonucleares de sangre periférica y tejido, en los momentos pre- y postratamiento neoadyuvante. Con respecto a las muestras de sangre, no se encontraron diferencias significativas entre pacientes con CPR y no-CPR en los momentos pre- y postratamiento en ninguno de los parámetros analizados (**figura 10A**). Sin embargo, al comparar muestras de tejido en el momento del diagnóstico, encontramos que los pacientes con CPR tenían una uniformidad

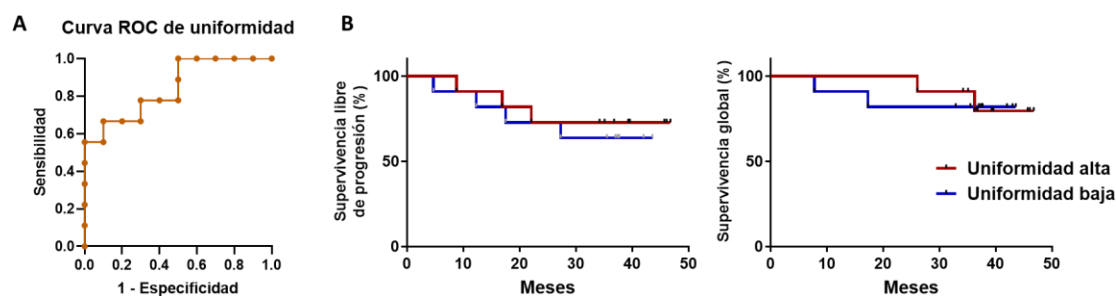
del repertorio de TCR significativamente más baja que los pacientes sin CPR ( $p=0.010$ ), lo que refleja un repertorio más desequilibrado en los pacientes con respuesta patológica completa (figura 10B, panel superior derecho). Si bien no se vieron diferencias en el número de clones identificados, en la convergencia y en la diversidad entre pacientes con CPR y no-CPR en los momentos pre- y postratamiento; si se vio un aumento de la uniformidad ( $p=0.028$ ) y una disminución del número de clones ( $p=0.037$ ) como efecto del tratamiento neoadyuvante que no llegaron a ser estadísticamente significativos tras la corrección por Bonferroni (figura 10B).



**Figura 10. Caracterización del repertorio de TCR en tejido y sangre periférica.**

**A.** Diagrama de barras de los parámetros analizados del repertorio de linfocitos T en las muestras de sangre periférica. **B.** Diagrama de barras de los parámetros analizados del repertorio de linfocitos T en las muestras de tejido. Las comparaciones se realizaron entre las muestras CPR y no-CPR y entre los momentos de pre- y postratamiento. Cada paciente se representa por un símbolo negro. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.0125$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”.

El área bajo la curva ROC del parámetro de uniformidad del TCR para discernir entre pacientes con CPR y no-CPR fue de 0.844 ( $p=0.011$ ; 95% CI, 0.667 – 1.000); alcanzándose valores de sensibilidad y especificidad del 50% y del 100%, respectivamente, en la identificación de pacientes que podrían estar libres de enfermedad en el momento de la cirugía (figura 11A). Sin embargo, este parámetro no parece estar relacionado con la supervivencia libre de progresión ( $p=0.661$ ) ni la supervivencia global ( $p=0.914$ ) en esta cohorte de pacientes (figura 11B).



**Figura 11. Parámetro de uniformidad en las muestras de tejido pretratamiento.**

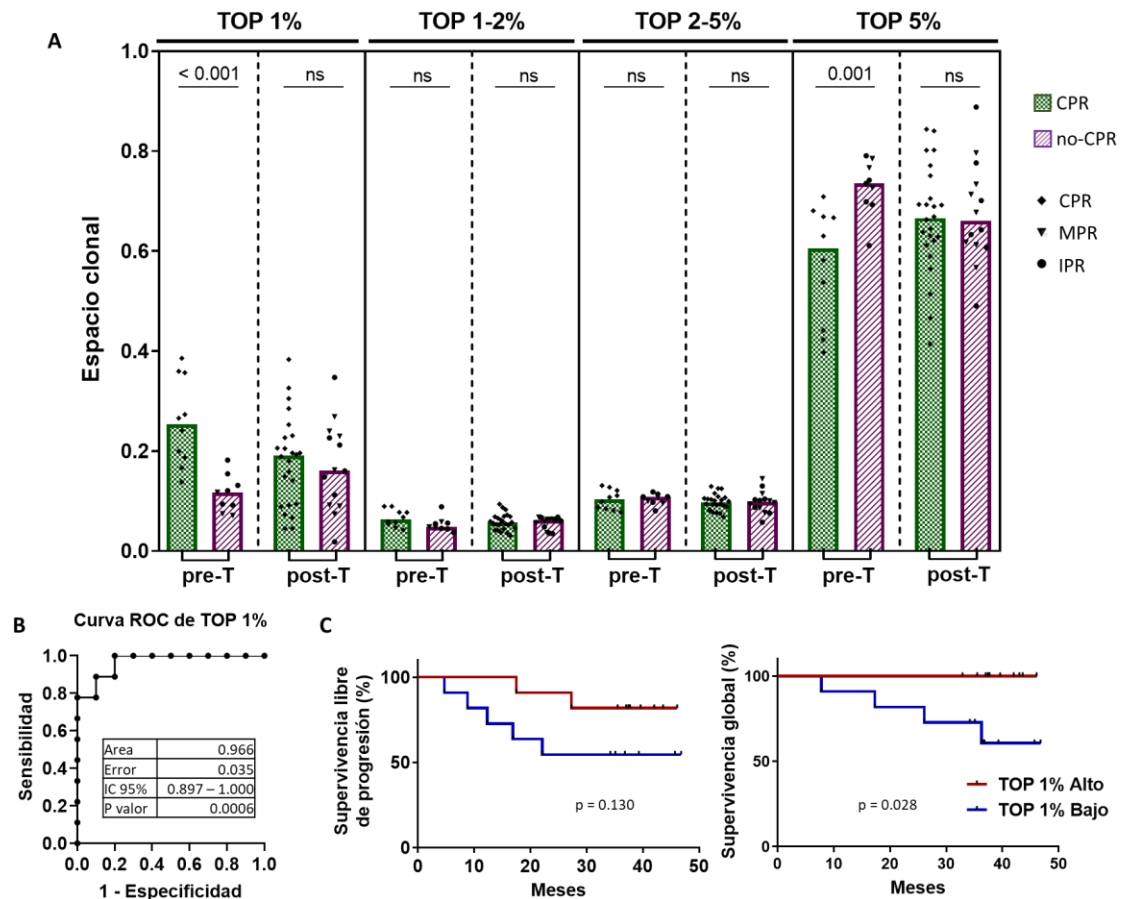
**A.** Curva ROC de la uniformidad para distinguir entre tumores con CPR y no-CPR. **B.** Curvas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global para tumores con uniformidad alta o baja, grupos a partir de la mediana de la uniformidad en el grupo.

## ii. Definición del TOP 1% y del repertorio de TCR.

Con el objeto de caracterizar los clones que estaban produciendo este sesgo en el repertorio de TCR en el tejido pretratamiento, identificado por una menor uniformidad en los pacientes con CPR, se llevó a cabo la clasificación por frecuencias de los clones del repertorio. El top 1% de los clones más frecuentes ocupan un espacio clonal mayor, con respecto al repertorio total, en pacientes con CPR que en pacientes con no-CPR ( $p = 0.00015$ ; **figura 12A**). Con respecto al tejido postratamiento, no se encontraron diferencias entre pacientes con CPR y no-CPR en los diferentes rangos de frecuencias (top 1%, top 1-2%, top 2-5% y top 5%). Si se vio una disminución de la frecuencia del top 1% en pacientes con CPR como consecuencia del tratamiento (**figura 12A**).

La determinación de la frecuencia del top 1% clasifica a los pacientes con CPR y no-CPR con más precisión que el parámetro de uniformidad, con un área bajo la curva ROC de 0.967 (IC del 95 %, 0,897–1,000;  $P = 0,001$ ; **figura 12B**). Una frecuencia del top 1% de clones mayor de 0.182 muestra un 80% de sensibilidad y un 100% de especificidad identificando pacientes que van a obtener una respuesta completa tras el tratamiento de quimioinmunoterapia neoadyuvante (**figura 12B**).

Al clasificar a los pacientes en alta y baja frecuencia del top 1% tomando como referencia la mediana de la población muestral (0.166), se vio que la supervivencia global de los pacientes con una alta frecuencia del top 1% era mayor ( $p=0.028$ ) aunque no se encontraron diferencias en la supervivencia libre de progresión entre ambos grupos ( $p=0.130$ ) (**figura 12C**).



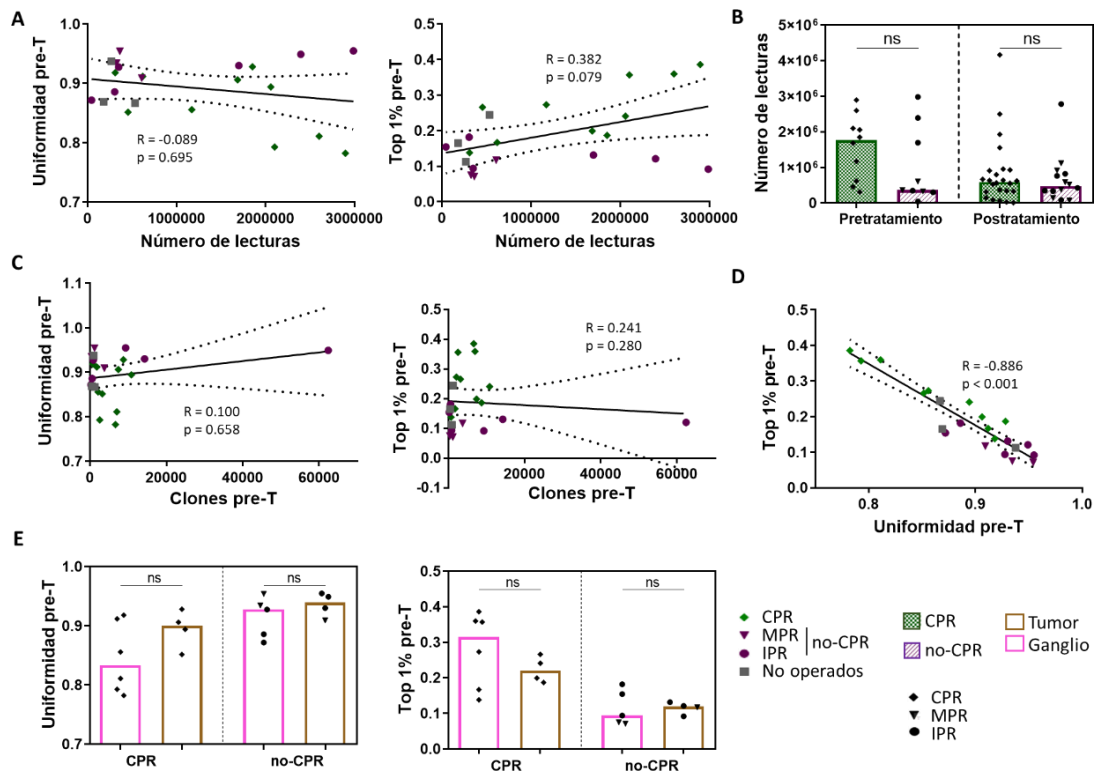
**Figura 12. Definición del top 1% y asociación con respuesta patológica en muestras de tejido pretratamiento.**

**A.** Espacio clonal ocupado por cada una de las divisiones por frecuencias clonales: top 1%, top 1-2%, top 2-5% y top 5%. **B.** Curva ROC del espacio clonal del top 1% para clasificar los tumores entre CPR y no-CPR. **C.** Curvas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global de tumores con frecuencia alta y baja del top 1%. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.0125$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”. Se representan la regresión lineal por una línea negra y los intervalos de confianza del 95% por líneas de puntos.

iii. Independencia de la uniformidad y top 1% de factores técnicos.

Se analizó si factores técnicos de la secuenciación como puede ser la profundidad de las lecturas y los clones identificados o las características intrínsecas de las librerías generadas y el tejido de origen podrían influir en estos dos parámetros. No se vio correlación entre el número de lecturas y la uniformidad del repertorio ( $R = -0.079$ ;  $p = 0.748$ ) ni entre el número de lecturas y el top 1% ( $R = 0.384$ ;  $p = 0.104$ ) (**figura 13A**). Tampoco se encontraron diferencias en el número de lecturas entre pacientes con CPR y no-CPR, ni en el tejido al diagnóstico ( $p = 0.182$ ) ni en el tejido de la cirugía ( $p = 0.104$ ) (**figura 13B**). Además, no existe correlación entre el número de clones

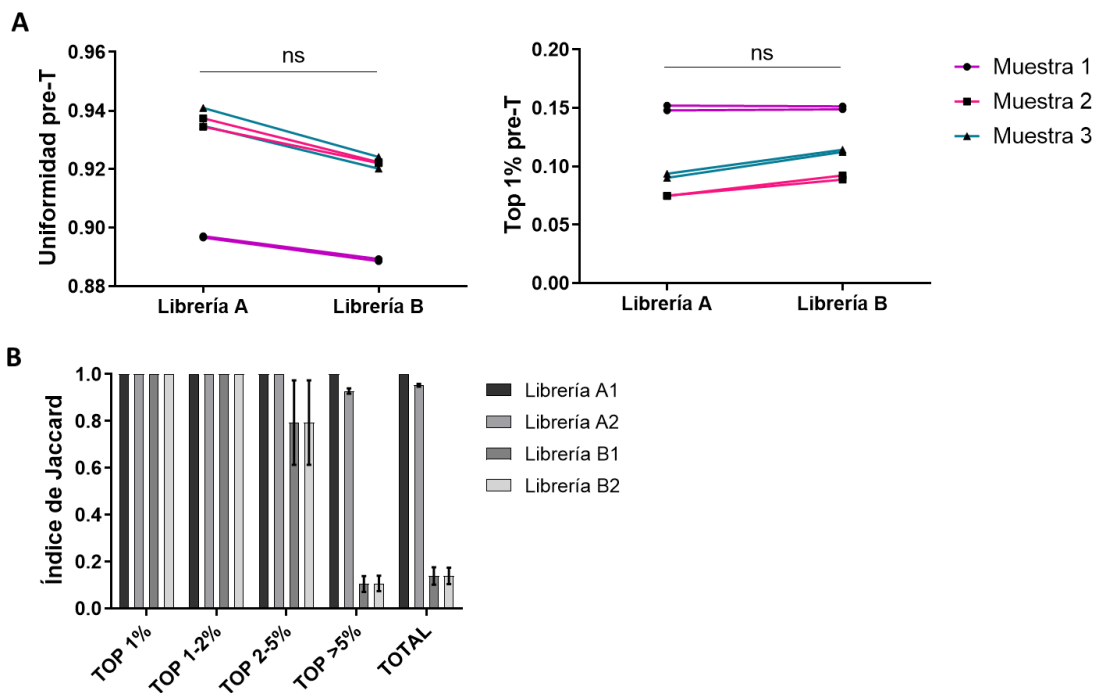
detectados y la uniformidad del repertorio ( $R=0.149$ ;  $p=0.542$ ), ni entre el número de clones y la frecuencia del top 1% ( $R=0.193$ ;  $p=0.429$ ) (**figura 13C**). Por otro lado, la frecuencia de este top 1% en el tejido pretratamiento se correlaciona negativamente con la uniformidad del repertorio ( $R=-0.886$ ;  $p<0.001$ ) lo que revela la dependencia entre estos dos marcadores (**figura 13D**). El origen del tejido, tumor o ganglio linfático, tampoco parece influenciar ninguno de los dos biomarcadores propuestos: no se vieron diferencias entre ganglio y tumor ni en la uniformidad ( $p=0.352$  en CPR y  $p=0.412$  en no-CPR) ni en el top 1% ( $p=0.476$  en CPR y  $p=0.904$  en no-CPR) (**figura 13E**). Además, las diferencias entre tumores con CPR y no-CPR en la frecuencia del top 1% se mantienen independientemente del origen del tejido ( $p=0.030$  en tumor y  $p=0.029$  en ganglio) (**figura 13E**).



**Figura 13. Independencia de la uniformidad y top 1% de los factores técnicos.**

Se representan las correlaciones entre la uniformidad y top 1% del tejido pretratamiento con **A**, el número de lecturas y **C**, el número de clones identificados. **B**. Gráfico de barras del número de lecturas entre pacientes con CPR y no-CPR en el tejido pre- y postratamiento. **D**. Correlación entre el top 1% y la uniformidad en las muestras de tejido pretratamiento. **E**. Uniformidad y top 1% en muestras pretratamiento, diferenciándolas por su origen: tumor o ganglio. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p<0.025$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”. Cada paciente se representa por un símbolo. Se representan la regresión lineal por una línea negra y los intervalos de confianza del 95% por líneas de puntos.

Por último, también se comprobó que estas métricas y la reproducibilidad clonal no variaban significativamente entre diferentes librerías de la misma muestra o entre réplicas de secuenciación de la misma librería. La uniformidad del repertorio y el top 1% se mantuvieron estables en todas las réplicas técnicas (**figura 14A**). La reproducibilidad clonal se mantuvo entre las réplicas de secuenciación, alcanzando un índice de Jaccard cercano a 1 para todos los rangos clonales (**figura 14B**). Sin embargo, la reproducibilidad clonal entre librerías sólo se mantuvo para los rangos de frecuencia del top 1% y del top 1% -2%, disminuyendo para el top 2%-5% y no siendo reproducibles los clones detectados por debajo del top 5% (**figura 14B**).



**Figura 14. Reproducibilidad de la uniformidad y top 1%.**

**A.** Estabilidad de la uniformidad y del top 1% entre replicados técnicos. **B.** Reproducibilidad clonal en los rangos de frecuencia entre replicados de secuenciación o librerías.

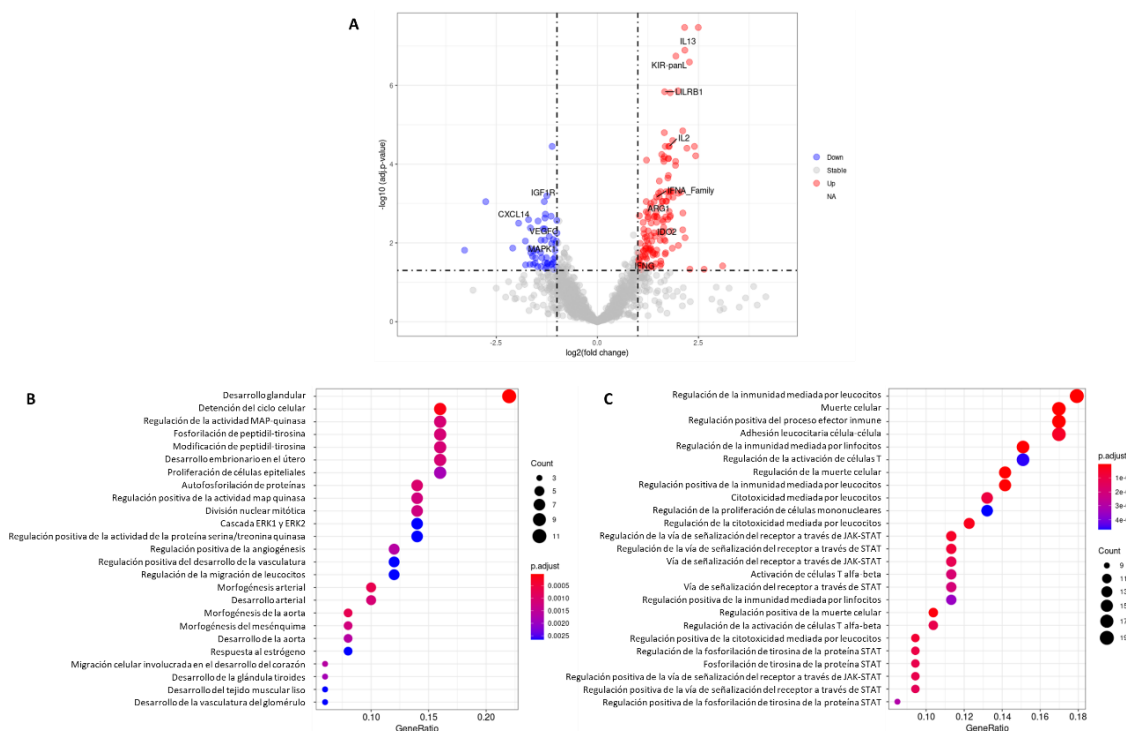
iv. Expresión génica diferencial de tumores con top 1% alto.

Se comprobó mediante la secuenciación masiva de RNA-seq de un panel de 1392 genes si los tumores con un top 1% alto podrían suponer una entidad biológica distinta por su expresión génica. Este experimento surgió de una colaboración externa con el centro MD Anderson en Houston.

Se estratificaron los tumores en alto o bajo top 1%, usando la mediana de la cohorte como punto de corte y se comprobó la expresión diferencial de genes entre ambos grupos, además de los

procesos biológicos diferencialmente regulados entre ellos mediante un análisis de enriquecimiento de ontología génica (o *GO enrichment analysis*).

Cerca de 200 genes se encontraron diferencialmente expresados entre tumores con alto o bajo top 1% (**figura 15A**), de los cuales 139 se encontraron sobreexpresados y 53 infraexpresados. Entre los genes regulados positivamente se encuentran *IFNg*, *IL2* e *IL13*; mientras que entre los regulados negativamente destacan *VEGFC*, *MAPK1* e *IGF1R*. Con respecto al análisis de las vías diferencialmente expresadas, se comprobó que los tumores con alto top 1% poseían una sobreexpresión de las vías relacionadas con procesos efectores inmunitarios, muerte celular o regulación positiva de la vía de señalización de JAK-STAT (**figura 15B**). En contraposición, los tumores con bajo top 1% poseían una sobreexpresión de vías relacionadas con la proliferación, angiogénesis o regulación positiva de la actividad de serina/treonina quinasa (**figura 15C**).



**Figura 15. Expresión génica diferencial de tumores con top 1% alto.**

**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados entre top 1% alto y bajo. **B.** Análisis GO de vías diferencialmente sobreexpresadas en tumores con top 1% alto. **C.** Análisis GO de vías diferencialmente sobreexpresadas en tumores con top 1% bajo.

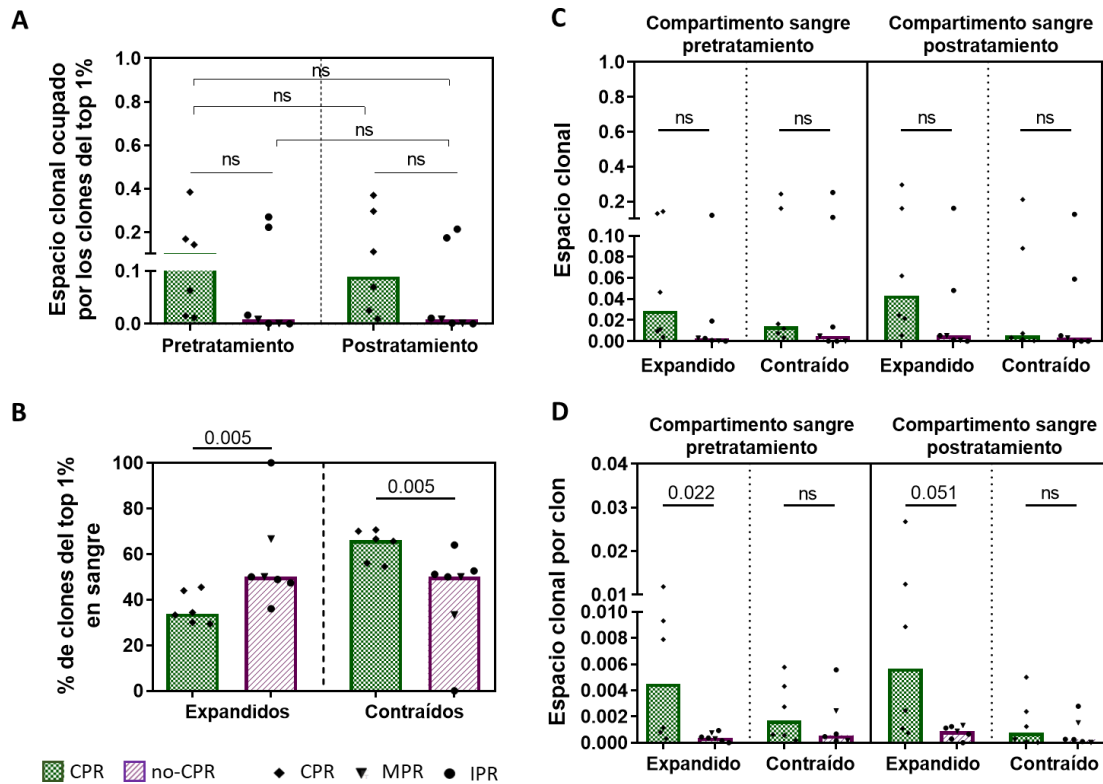
- v. Seguimiento de clones del top 1% de las biopsias pretratamiento en diferentes compartimentos biológicos.

A continuación, dada la aparente importancia de los clones del top 1% del tejido al diagnóstico, se llevó a cabo el seguimiento de éstos en los compartimentos biológicos sangre y tejido en los

momentos de pre- y postratamiento. Se determinó el espacio clonal que ocupaban los clones del top 1% en cada uno de los compartimentos y si éstos se habían expandido o contraído tras el tratamiento neoadyuvante, comparando el espacio clonal ocupado por ellos en el momento de pre- con el postratamiento.

En sangre no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con tumores CPR y no-CPR en el espacio clonal ocupado por los clones del top 1% del tejido al diagnóstico, ni en las muestras pre- ( $p=0.234$ ) ni en postratamiento ( $p=0.059$ ) (**figura 16A**). Tampoco hubo cambios significativos tras el tratamiento en el espacio clonal ocupado por los clones del top 1% del tejido en sangre en pacientes con CPR y no-CPR (**figura 16A**). Se evaluó también el porcentaje de clones del top 1% que se expandieron o contrajeron en sangre tras el tratamiento neoadyuvante. Se vio un mayor porcentaje de clones del top 1% del tejido pretratamiento, contraídos en sangre periférica tras el tratamiento en pacientes con CPR en comparación con no-CPR ( $p=0.005$ ) (**figura 16B**). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el espacio clonal ocupado por los clones expandidos y contraídos del top 1% en sangre periférica, ni entre los compartimentos de pre- y postratamiento, ni entre pacientes con CPR y no-CPR (**figura 16C**). Como el porcentaje de los clones del top 1% contraídos en sangre periférica en los pacientes con CPR fue mayor que en los pacientes con no-CPR, pero el espacio clonal ocupado por éstos se mantuvo similar, se evaluó la contribución individual de cada clon del top 1% al espacio clonal total. Para ello, se normalizó el espacio clonal ocupado por el top 1% en los compartimentos de sangre por el número de clones contraídos o expandidos y se comparó la media del espacio clonal por clon entre pacientes con CPR y no-CPR. El espacio clonal medio ocupado por los clones del top 1% del tejido pretratamiento expandidos en sangre parece ser mayor en los pacientes con CPR en la sangre pretratamiento ( $p=0.022$ ) y en la sangre postratamiento ( $p=0.051$ ) (**figura 16D**).



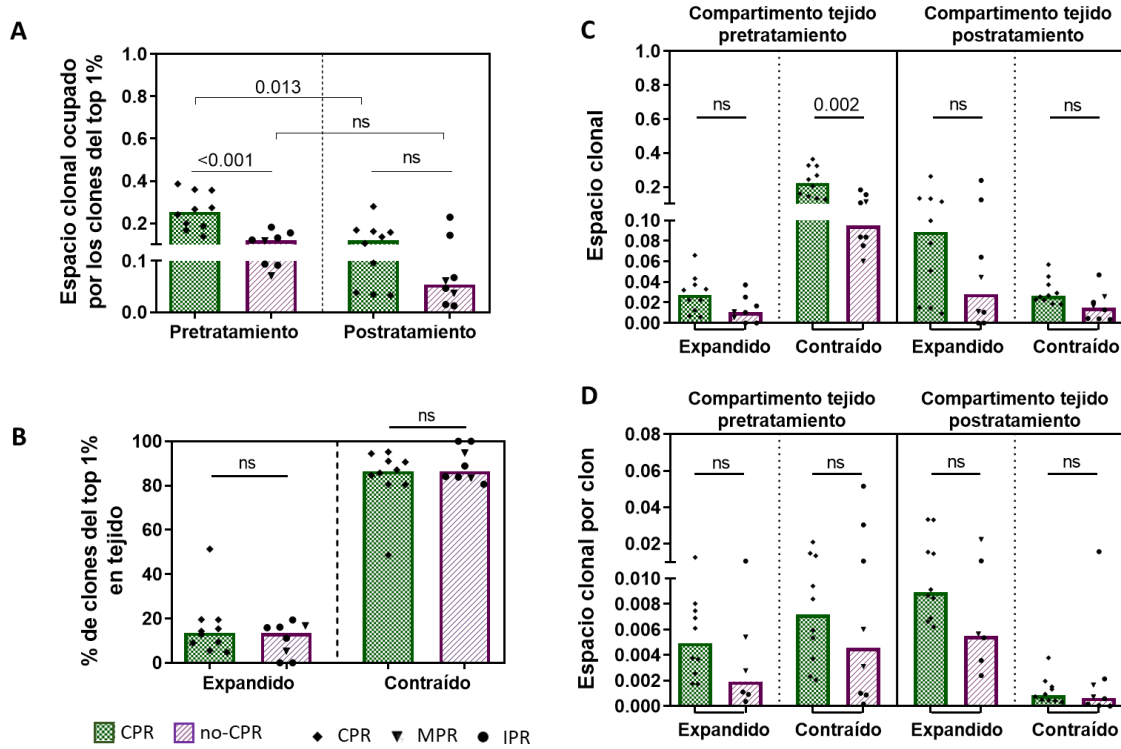


**Figura 16.** Dinámicas de los clones del top 1% de las biopsias pretratamiento en sangre.

**A.** Espacio clonal ocupado por los clones del top 1% de las muestras de tejido pretratamiento en la sangre pre- y postratamiento. **B.** Porcentaje de clones del top 1% que se encontraban expandidos o contraídos periféricamente. **C.** Espacio clonal ocupado por los clones pertenecientes al top 1% pretratamiento expandidos y contraídos tras el tratamiento en el repertorio periférico. **D.** Contribución media de los clones expandidos o contraídos periféricamente en sangre. Se muestran las comparaciones entre CPR y no-CPR. Cada paciente se representa con un símbolo. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.0125$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”.

Del mismo modo se llevó a cabo el análisis de los clones del top 1% en los compartimentos de tejido de diagnóstico y cirugía. El espacio clonal ocupado por el top 1% en tejido se redujo tras el tratamiento, independientemente de la respuesta de los pacientes ( $p=0.005$ ). Sin embargo, al estratificar por respuesta, esta caída solo fue significativa en pacientes con CPR ( $p=0.013$ ). Además, aunque el espacio clonal ocupado en el tejido postratamiento por los clones del top 1% pretratamiento parece mayor en los pacientes con CPR, no existen diferencias significativas con respecto al espacio que ocupan en los pacientes con no-CPR (**figura 17A**). Con respecto a las dinámicas intratumorales y la expansión o contracción tras el tratamiento de los clones del top 1%, se vio que más del 80% de los clones del top 1% se contrajeron en el tejido postratamiento, sin diferencias entre pacientes con CPR y no-CPR (**figura 17B**). El espacio clonal ocupado por los

clones expandidos no era diferente entre pacientes con CPR y no-CPR, aunque sí se vio un mayor espacio clonal ocupado por los clones contraídos pertenecientes al top 1% en el tejido pretratamiento de los pacientes con CPR ( $p=0.002$ ) (figura 17C). Por último, no se vieron diferencias entre pacientes en el espacio clonal medio ocupado por clon en el tejido pre- y postratamiento (figura 17D).



**Figura 17. Dinámicas de los clones del top 1% de las biopsias pretratamiento en tejido.**

**A.** Espacio clonal ocupado por los clones del top 1% de las muestras de pretratamiento en éstas y en las muestras postratamiento. **B.** Porcentaje de clones del top 1% que se encontraban expandidos o contraídos intratumoral. **C.** Espacio clonal ocupado por los clones pertenecientes al top 1% pretratamiento expandidos y contraídos tras el tratamiento en el tejido pre- y postratamiento. **D.** Contribución media de los clones expandidos o contraídos intratumoral en el tejido pre- y postratamiento. Se muestran las comparaciones entre CPR y no-CPR. Cada paciente se representa con un símbolo. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.0125$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”.

vi. Seguimiento de clones pertenecientes al top 1% postratamiento.

En este punto se centró el estudio en los clones del top 1% de las muestras de cirugía con el objetivo de determinar:

- si estos clones son los mismos que pertenecían al top 1% de las biopsias al diagnóstico (clones “pre-post top 1%”);

- si son clones que aparecían en las biopsias al diagnóstico, sin pertenecer al top 1% de los más frecuentes (clones “pre-post no-top 1%”);
- o si, por el contrario, eran clones nuevos que no se encontraron previamente en las muestras de tejido al diagnóstico (clones emergentes).

No se encontraron diferencias en el espacio clonal ocupado en el tejido postratamiento por cada uno de los subgrupos en los que se dividieron los clones del top 1% del tejido postratamiento (clones “pre-post top 1%”, clones “pre-post no-top 1%” y clones emergentes) (**figura 18A**). Tampoco se encontraron diferencias en estos subgrupos entre pacientes con CPR y no-CPR (**figura 18B**). Al comparar el espacio clonal ocupado en postratamiento por los clones “pre-post top 1%” con el ocupado por la suma de clones “pre-post no-top 1%” y clones emergentes se vio que éste era mayor en la suma de los dos grupos ( $p=0.010$ ) (**figura 18C**). Sin embargo, al comparar la suma de espacio clonal ocupado por los clones compartidos con el tejido pretratamiento (del top y no top 1%) con los clones emergentes, se vio que los clones compartidos ocupaban en el tejido postratamiento mayor espacio clonal ( $p=0.020$ ) (**figura 18D**). No siendo este análisis informativo de la respuesta patológica de los pacientes.

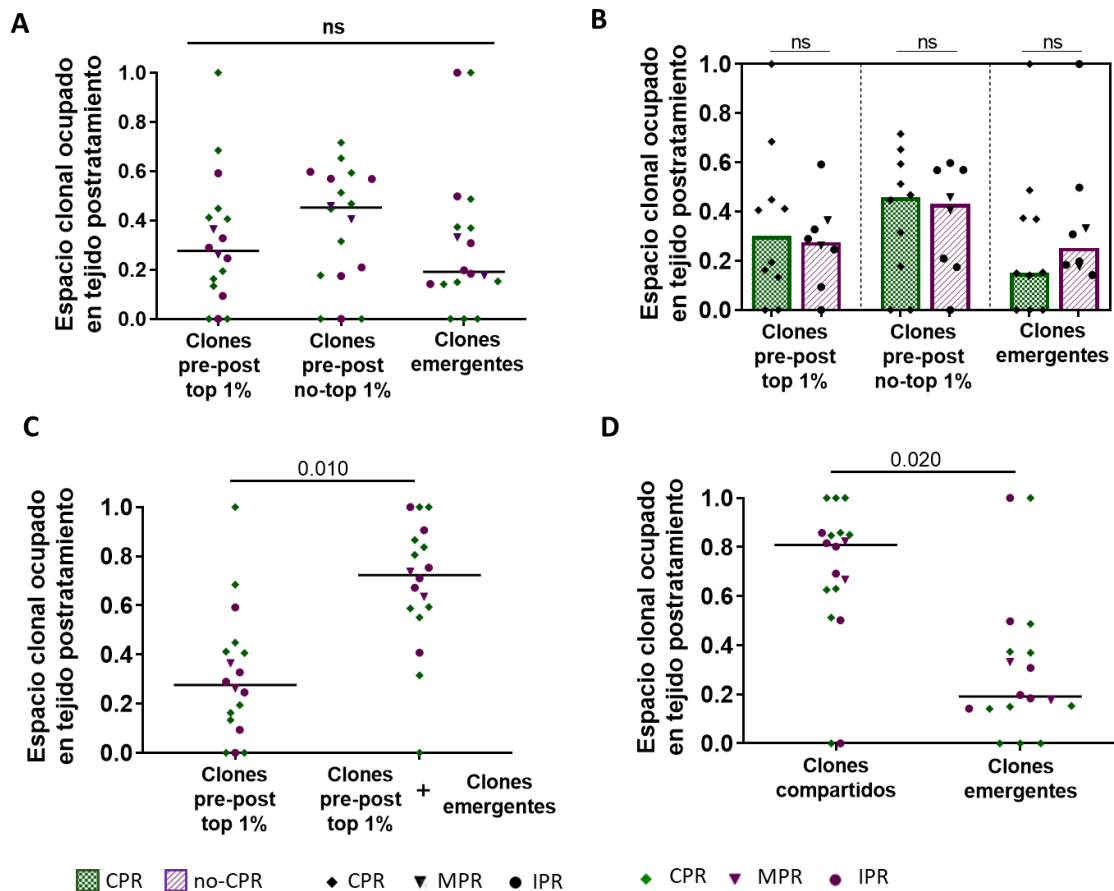


Figura 18. Composición del top 1% de los clones de las muestras postratamiento.

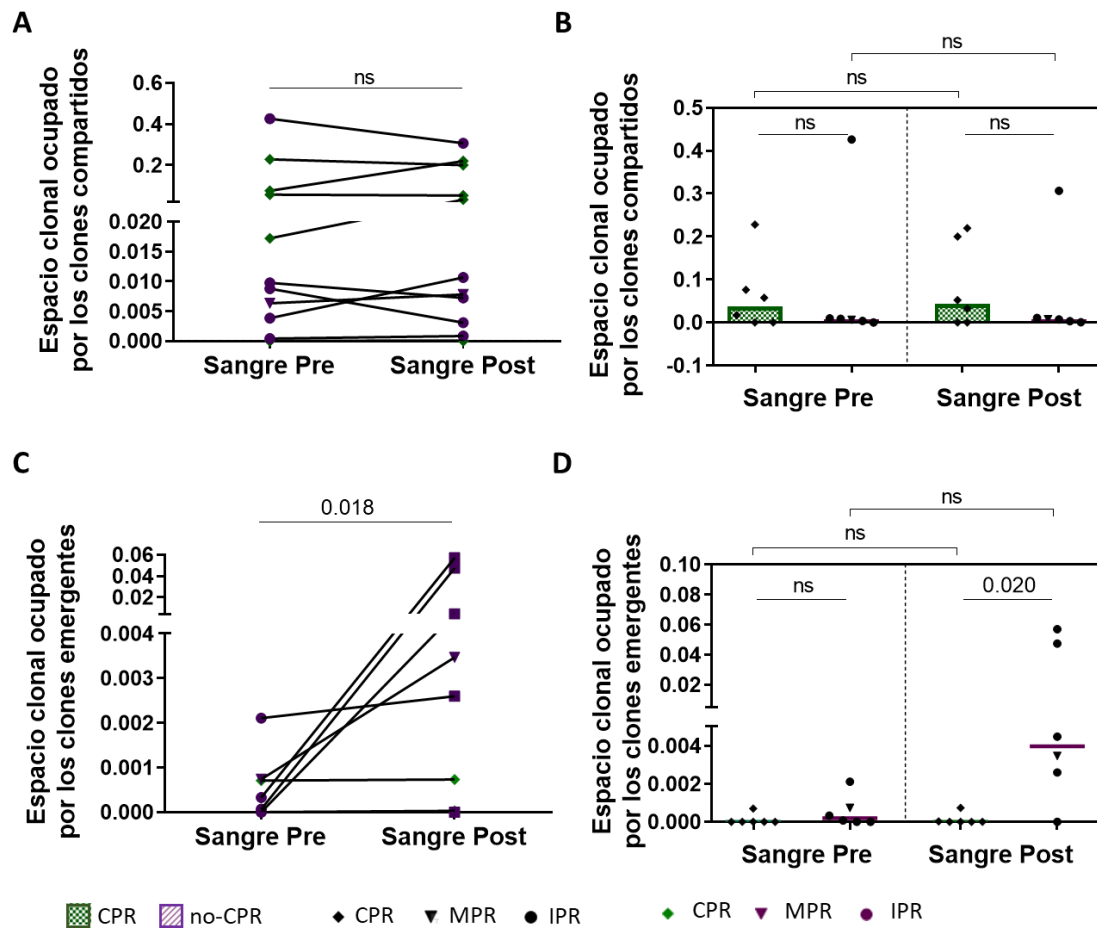
**A.** Espacio clonal del top 1% postratamiento ocupado por los clones emergentes (no compartidos entre pre- y post-) y por los clones compartidos entre pre- y postratamiento (que pertenecen además al top 1% de clones más frecuentes del tejido pretratamiento, “Clones pre-post top 1%”; o no, “Clones pre-post no-top 1%”). **B.** Espacio clonal del top 1% del tejido postratamiento ocupado por estos clones, diferenciando tumores CPR y no-CPR. **C.** Comparación del espacio clonal del top 1% postratamiento ocupado por los clones compartidos con el top 1% pretratamiento frente a los demás. **D.** Comparación del espacio clonal del top 1% postratamiento ocupado por los clones compartidos pre-postratamiento y clones emergentes. Cada paciente se representa con un símbolo. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.0125$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”.

vii. Seguimiento de clones del top 1% postratamiento en sangre

A continuación, se llevó a cabo el seguimiento en sangre de los clones pertenecientes al top 1% de las muestras de tejido postratamiento, divididos en los subgrupos de:

- compartidos, aquellos clones del top 1% de tejido postratamiento que se encontraron también en las muestras de biopsia pretratamiento;
- y emergentes, o clones nuevos.

Este análisis, por tanto, solamente se pudo realizar en los pacientes que tuvieran muestra en los dos compartimentos biológicos en los dos tiempos (pre- y post-). El espacio clonal ocupado por los clones compartidos que estaban presentes en sangre no se vio alterado por el tratamiento neoadyuvante ( $p=0.966$ ) (**figura 19A**), sin mostrar diferencias entre pacientes con diferentes respuestas patológicas (**figura 19B**). En el caso de los clones emergentes, se vio un aumento del espacio clonal ocupado por los mismos en sangre tras el tratamiento neoadyuvante ( $p=0.018$ ) (**figura 19C**). Al estratificar por respuesta, si bien en las muestras de sangre pretratamiento no se ven diferencias entre pacientes con CPR y no-CPR ( $p=0.151$ ), se ve un aumento del espacio clonal ocupado por los clones emergentes, en la sangre postratamiento de pacientes con no-CPR en comparación con los CPR ( $p=0.020$ ) (**figura 19D**).



**Figura 19. Composición del top 1% de los clones de las muestras postratamiento.**

**A.** Espacio clonal ocupado en sangre por los clones del top 1% compartidos entre pre- y postratamiento. **B.** Espacio clonal ocupado en sangre por estos mismos clones (A) diferenciando por respuesta patológica. **C.** Espacio clonal ocupado en sangre por los clones pertenecientes al top 1% postratamiento y emergentes. **D.** Espacio clonal ocupado en sangre por estos mismos clones (C) diferenciando por respuesta patológica. Cada paciente se representa con un símbolo. Se consideró estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.0125$  tras corrección de test múltiples de Bonferroni, mostrándose solamente estos. Los valores no significativos se representan como “ns”.

#### IV. Firma de expresión génica como biomarcador emergente.

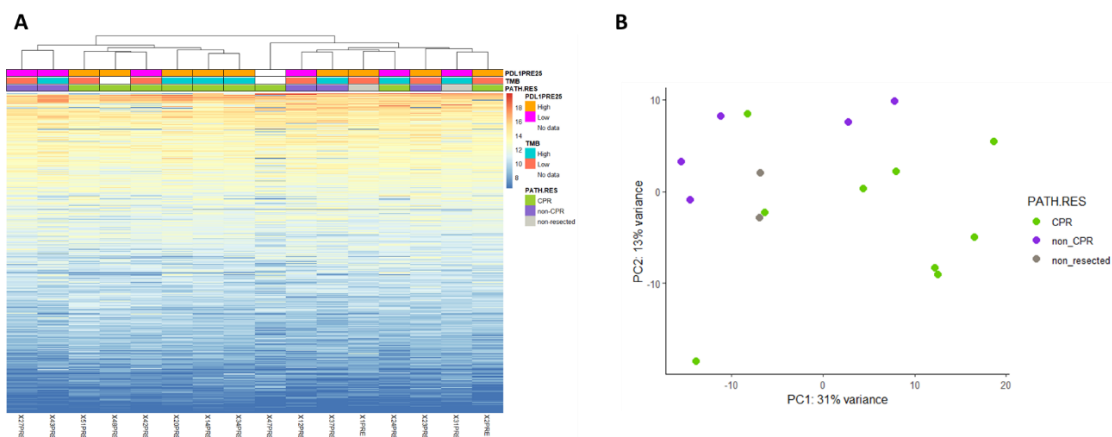
Se llevó a cabo la caracterización del perfil de expresión génica, mediante la técnica de secuenciación masiva *RNA-seq*, en las muestras de tejido de pacientes. Esta técnica se realizó en las muestras de tejido tumoral procedentes de biopsias de tejido pulmonar, no así en aquellas muestras derivadas de tejido de ganglio linfático por la diferencia que muestra este microambiente con respecto al primero.

Las comparaciones se realizaron en grupos de dos a dos llevándose a cabo un análisis de expresión diferencial, determinándose los genes diferencialmente expresados, las vías de señalización, y las diferencias en la frecuencia de diferentes poblaciones inmunitarias entre los dos grupos de comparación.

i. Perfil de expresión génica en las muestras pretratamiento.

Primero se llevó a cabo el análisis de la expresión diferencial génica entre los dos grupos de respuesta, pacientes con respuesta patológica completa y no completa, con el objetivo de determinar marcadores que diferenciarían en el momento pretratamiento la forma de responder de estos pacientes a la terapia.

Con el análisis no supervisado de la expresión génica de las muestras no se logró clasificar a los pacientes en dos grupos claramente diferenciados. Sin embargo, 6 de los 9 pacientes cuyos tumores respondieron de forma completa al tratamiento sí parecen tener un perfil transcriptómico parecido (**figura 20**).

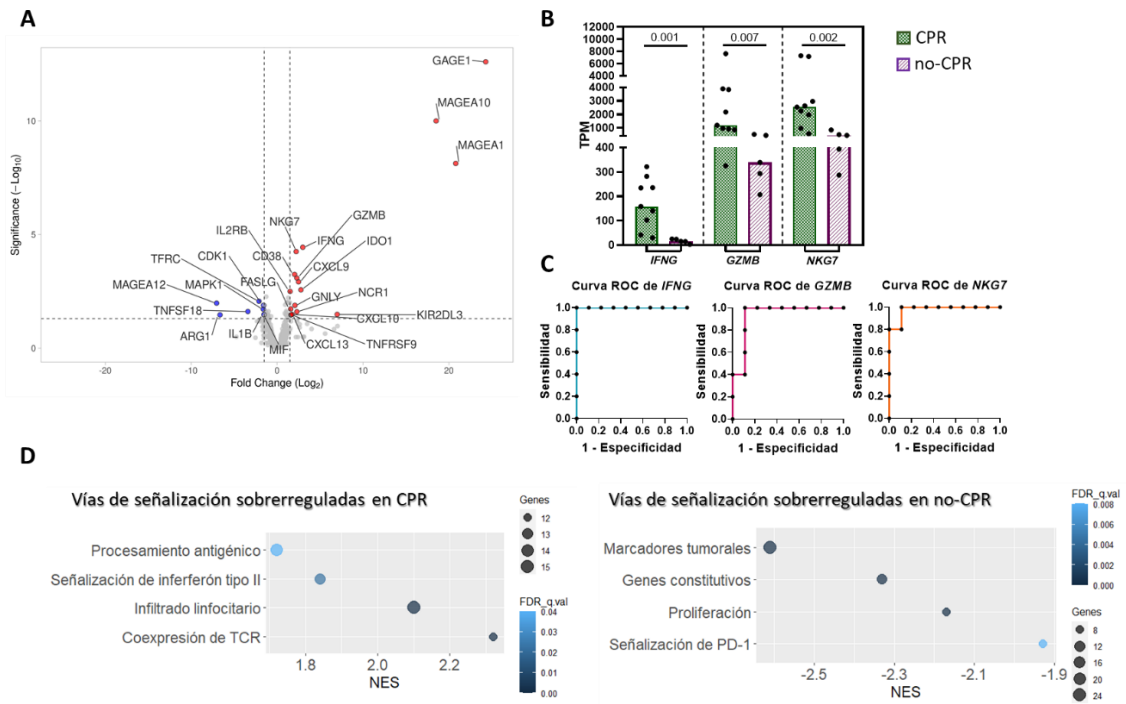


**Figura 20. Perfil de expresión génica en las muestras pretratamiento.**

**A.** Mapa de calor del análisis no supervisado del perfil de expresión génica en las muestras de tejido pretratamiento. **B.** Análisis de componentes principales del perfil de expresión génica de las muestras de tejido pretratamiento.

25 genes se encontraron diferencialmente expresados entre pacientes con tumores con respuesta completa y no completa: 17 de ellos se encontraron sobreexpresados en pacientes con tumores CPR y 8 de ellos en pacientes con tumores no-CPR (**figura 21A**). Los genes sobreexpresados en los tumores CPR se encuentran implicados en la señalización de interferón

de tipo II (*FASLG*, *CXCL13*, *CXCL10*, *CXCL9* y *IFNG*); otros relacionados con las células NK (*NCR1*, *KIR2DL3*, *GZMB*); activación de linfocitos (*NKG7*, *GZMB*, *IL2RB*, *CD38*, *IDO1*, *TNFRSF9* más conocido como *4-1BB*); y antígenos tumorales (*MAGEA10*, *MAGEA1* and *GAGE1*) (**figura 21A**). Como todos estos genes representan un fenotipo proinflamatorio, se analizó la capacidad que podría tener la expresión de alguno de ellos en las muestras pretratamiento para predecir la respuesta de los tumores.



**Figura 21. Genes diferencialmente expresados entre tumores CPR y no-CPR en muestras pretratamiento.**

**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados entre CPR y no-CPR. En rojo se muestran los sobreexpresados en las muestras CPR y en azul los sobreexpresados en no-CPR. **B.** Comparación de los transcritos por millón de *IFNG*, *GZMB* y *NKG7* entre tumores CPR y no-CPR. **C.** Curvas ROC de los genes *IFNG*, *GZMB* y *NKG7* para distinguir tumores CPR y no-CPR. **D.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en tumores CPR y no-CPR.

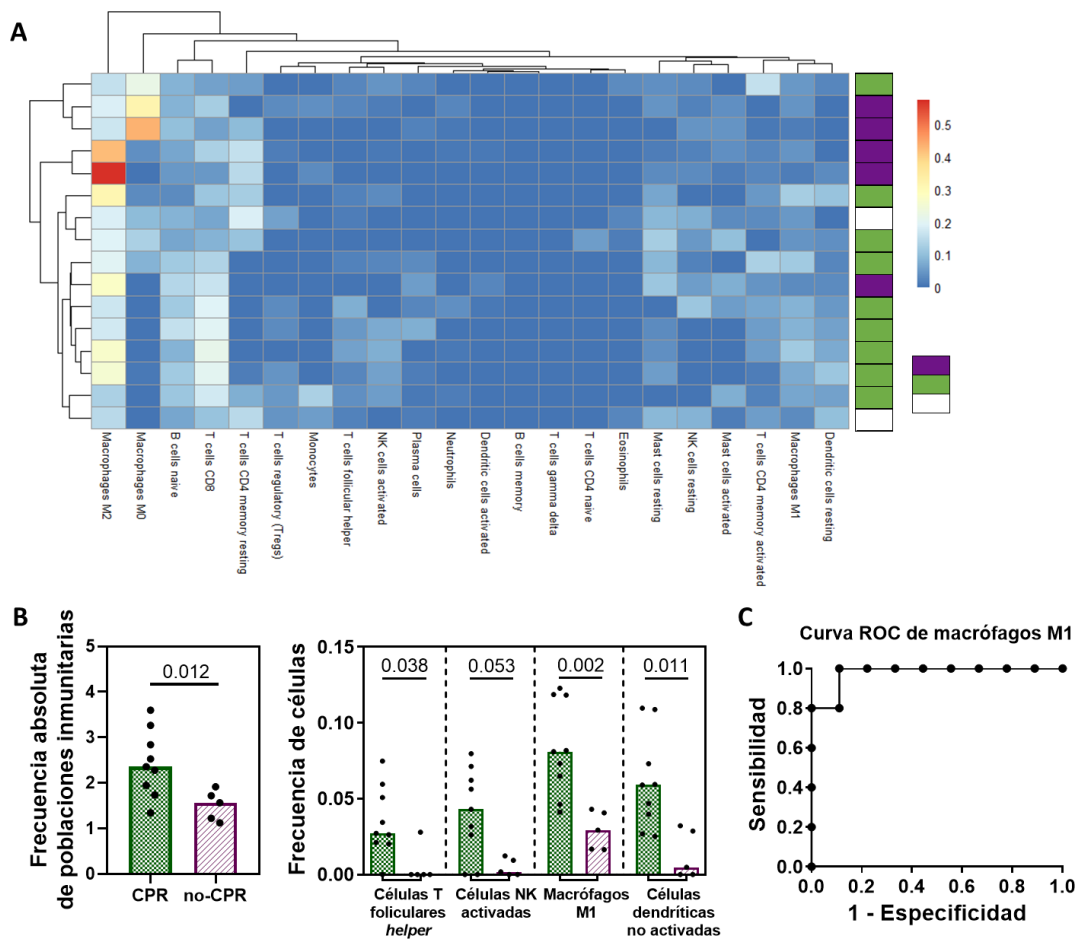
En concreto, se centró el estudio en el *IFNG* debido a su gran implicación de la regulación de la respuesta inflamatoria; y los genes de *GZMB* y *NKG7*, por su función en la respuesta de los linfocitos T citotóxicos y células NK induciendo la apoptosis de la célula diana. La mayor expresión de estos genes, en términos de transcritos por millón, caracteriza a los tumores con CPR (**figura 21B**); además de ser capaz de distinguir entre tumores con CPR y no-CPR con valores de área bajo la curva ROC de hasta 1.000. En concreto, un valor mayor de 27.08 en el TPM de *IFNG* es capaz de clasificar con un 100% de especificidad y sensibilidad a los tumores que van a

realizar una respuesta patológica completa, obteniéndose un área bajo la curva de 1.000 (95% CI, 1.000 a 1.000) ( $p=0.002$ ). Con respecto a los genes *GZMB* y *NKG7*, se vio que sus valores del área bajo la curva ROC fueron de 0.933 (95% CI, 0.793 a 1.000) ( $p=0.009$ ) y 0.977 (95% CI, 0.910 a 1.000) ( $p=0.004$ ), respectivamente, al clasificar los tumores con CPR y no-CPR basándose en su expresión en transcritos por millón (**figura 21C**).

El análisis funcional de vías de señalización llevado a cabo con GSEA mostró una sobreexpresión de vías relacionadas con la coexpresión del receptor de linfocitos T, el infiltrado linfocitario, la vía de señalización de interferón de tipo II y vías de procesamiento antigénico en tumores con CPR. En contraposición, en el caso de los tumores no-CPR se vio una sobreexpresión de vías relacionadas con marcadores tumorales, genes constitutivos, de proliferación y de señalización de la vía inhibitoria PD-1 (**figura 21D**).

Con el análisis mediante el programa CIBERSORTx, se estimó la proporción relativa de diferentes subconjuntos de células inmunitarias en las muestras pretratamiento. El perfil basado en la proporción de células inmunitarias no clasificó estas muestras en CPR y no-CPR (**figura 22A**). Sin embargo, los tumores con CPR mostraron una mayor proporción de células inmunitarias totales ( $p=0.012$ ), además de una mayor proporción de células T foliculares ( $p=0.038$ ), células NK activadas ( $p=0.053$ ), macrófagos M1 ( $p=0.002$ ) y células dendríticas no activadas ( $p=0.011$ ); aunque la proporción de macrófagos M1 fue la única estadísticamente significativa tras la corrección por comparaciones múltiples (**figura 22B**). La curva ROC para predecir la respuesta en estos tumores basada en la proporción de macrófagos M1 fue de 0.9778 9778 (95% CI, 0.910 a 1.045) ( $p=0.004$ ), de manera que una proporción de macrófagos M1 superior a 0.04471 mostró un 100% de sensibilidad y 88.9% de especificidad en identificar tumores que lograrían una respuesta patológica completa tras el tratamiento neoadyuvante (**figura 22C**).





**Figura 22. Análisis de subconjuntos de poblaciones inmunitarias en las muestras de tejido pretratamiento.**

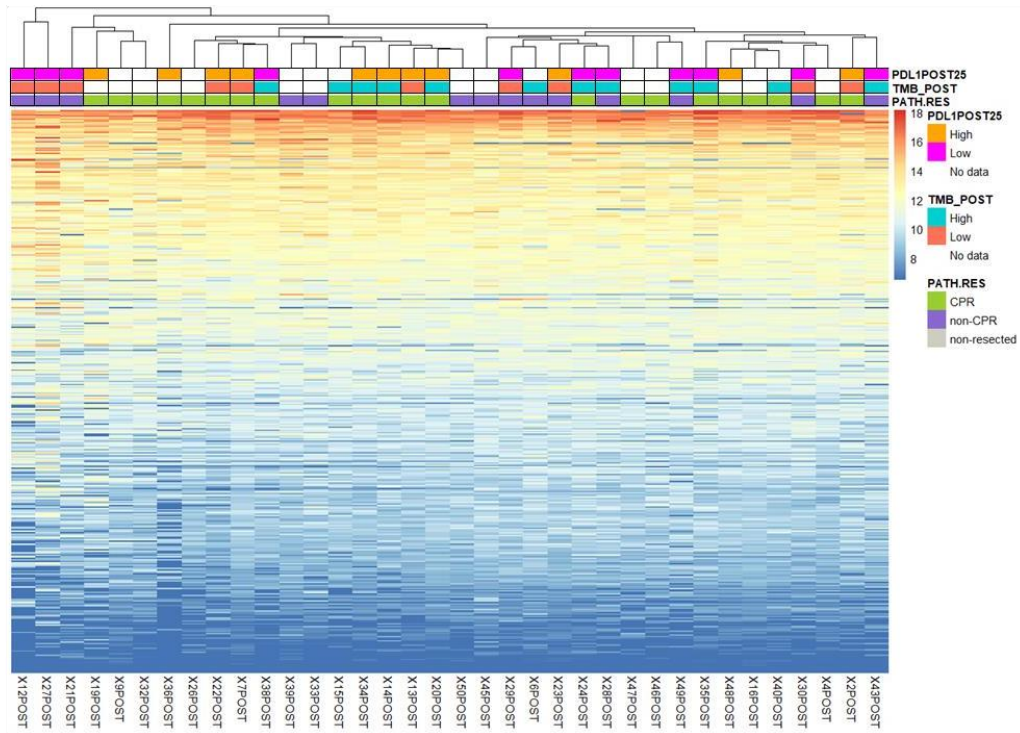
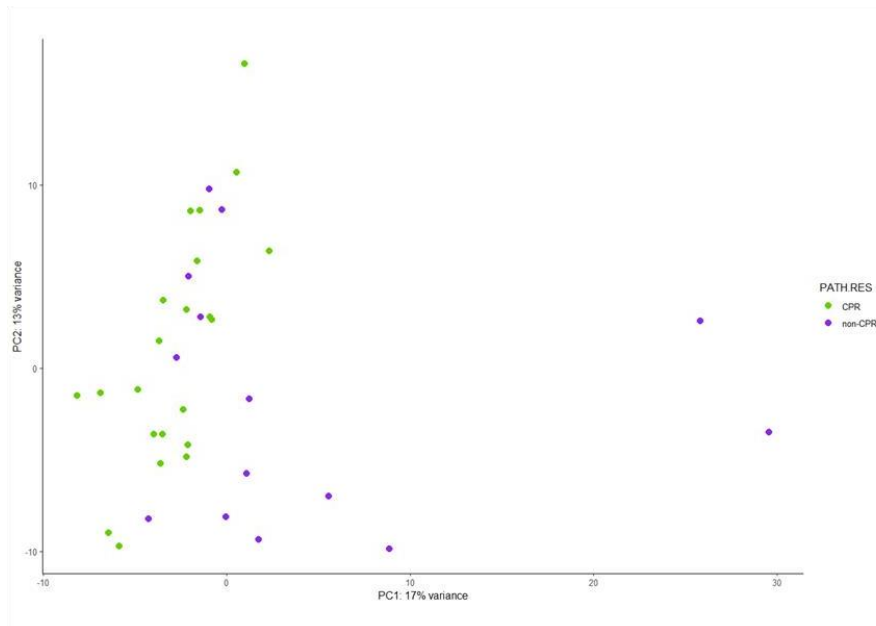
**A.** Mapa de calor del análisis de subconjuntos de poblaciones inmunitarias. **B.** Comparación de la proporción de células inmunitarias totales entre tumores CPR y no-CPR. **C.** Comparación entre tumores CPR y no-CPR de la frecuencia de poblaciones inmunitarias. **D.** Curva ROC de la proporción de macrófagos M1 para diferenciar tumores CPR y no-CPR.

ii. Perfil de expresión génica en las muestras postratamiento.

Con respecto a las muestras postratamiento, se llevaron a cabo dos tipos de comparaciones: la primera entre tumores CPR y no-CPR y la segunda entre tumores no-CPR que progresan y no.

**Expresión diferencial entre tumores con CPR y no-CPR**

El análisis no supervisado no consiguió clasificar juntas las muestras postratamiento que habían logrado una repuesta completa o incompleta al tratamiento neoadyuvante, tal y como se muestran en el mapa de calor y en el análisis por componentes principales (**figura 23**).

**A****B**

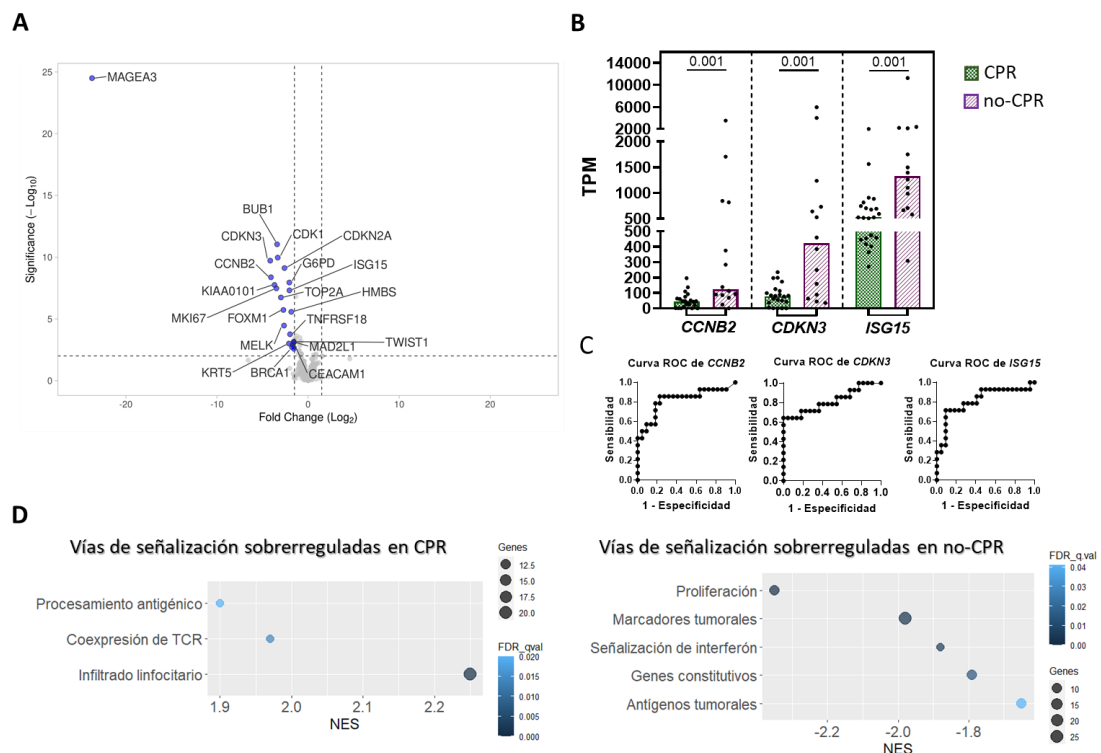
**Figura 23. Perfil de expresión génica en las muestras postratamiento.**

**A.** Mapa de calor del análisis no supervisado del perfil de expresión génica en las muestras de tejido postratamiento. **B.** Análisis de componentes principales del perfil de expresión génica de las muestras de tejido postratamiento.

Sin embargo, se identificaron hasta 22 genes diferencialmente expresados entre las muestras de tumores CPR y no-CPR, encontrándose todos ellos sobreexpresados en los tumores con CPR.

La mayoría de estos genes se encuentran implicados en rutas de proliferación celular (*CDKN3*, *CCNB2*, *KIAA0101*, *MKI67*, *BUB1*, *CDK1*, *TOP2A*, *FOXM1*, *MELK*, *MAD2L1*, *G6PD*, *DGAT2*), otros son marcadores tumorales (*CDKN2A*, *KRT5*, *BRCA1*, *TWIST1*), además de los antígenos tumorales *MAGEA3* y *CEACAM1* (**figura 24A**). En concreto, entre los genes diferencialmente expresados se realizó una comparación de sus valores de TPM entre tumores CPR y no-CPR. Aquellos cuyos valores p fueron significativos después de la corrección de test múltiples ( $p < 0.002$ ) fueron representados gráficamente: el gen ciclina B2 *CCNB2*, y *CDKN3* ambos involucrados en el ciclo celular, e *ISG15* involucrado en la señalización del interferón tipo I (**figura 24B**). El área bajo la curva ROC para distinguir tumores CPR y no-CPR en función del valor TPM de estos tres genes fue 0.821, 0.818 y 0.814, respectivamente (**figura 24C**).

El análisis de rutas de señalización mostró una sobreexpresión de rutas relacionadas con el procesamiento antigénico, coexpresión de TCR e infiltrado de linfocitos en tumores con CPR. Mientras que aquellas muestras tumorales con no-CPR mostraron una sobreexpresión de rutas de señalización de interferón, proliferación, marcadores tumorales, antígenos tumorales y genes constitutivos (**figura 24D**).

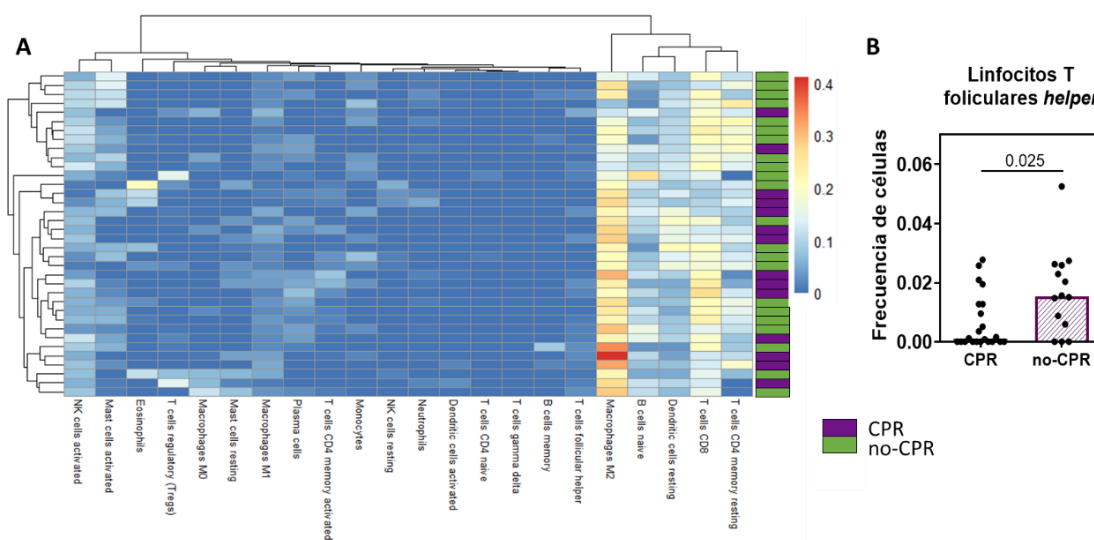


**Figura 24. Genes diferencialmente expresados entre tumores CPR y no-CPR en muestras postratamiento.**

**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados entre CPR y no-CPR. En rojo se muestran los sobreexpresados en las muestras CPR y en azul los sobreexpresados en no-CPR. **B.** Comparación de los transcritos por millón de *CCNB2*, *CDKN3* y *ISG15* entre tumores CPR y no-CPR. **C.** Curvas ROC de los genes

*CCNB2*, *CDKN3* y *ISG15* para distinguir tumores CPR y no-CPR. **D.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en tumores CPR y no-CPR.

En cuanto al infiltrado de células inmunitarias, se encontró una mayor proporción de células T foliculares *helper* en tumores no-CPR, sin embargo, sin significancia estadística tras realizar la corrección por comparación múltiple ( $p=0.025$ ) (**figura 25**).



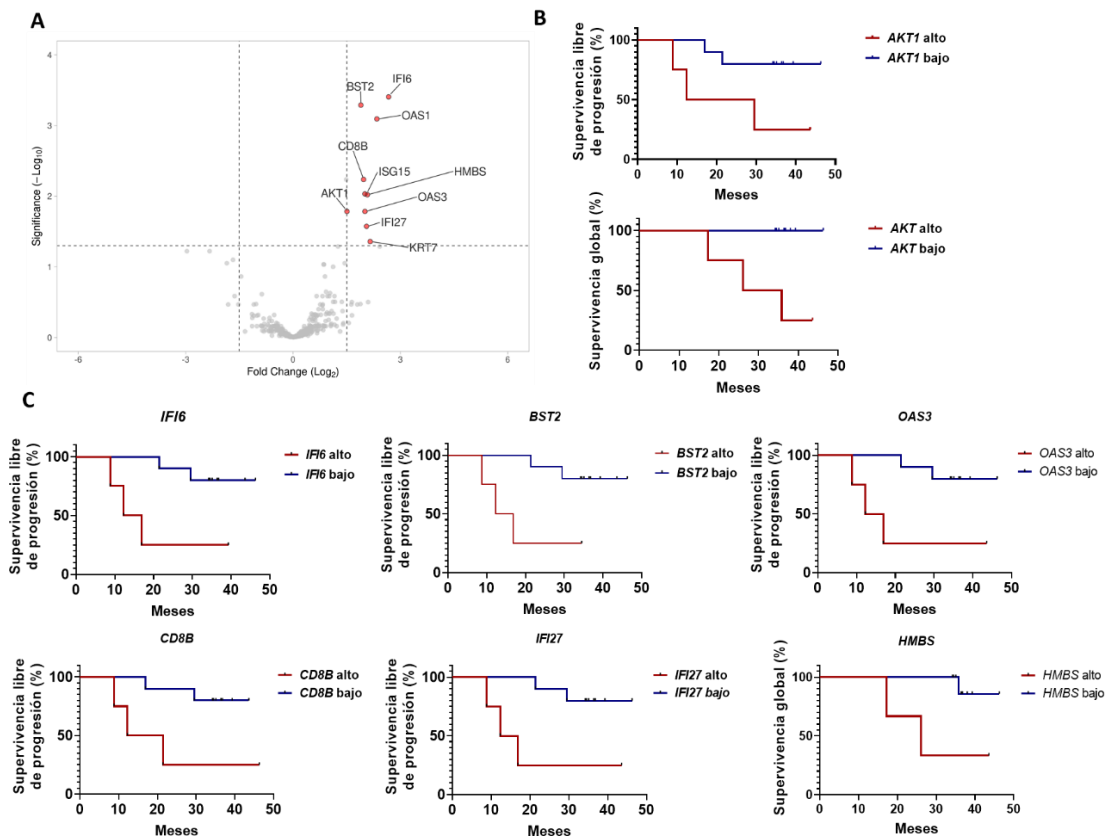
**Figura 25.** Análisis de subconjuntos de poblaciones inmunitarias en las muestras de tejido postratamiento.

**A.** Mapa de calor del análisis de subconjuntos de poblaciones inmunitarias. **B.** Comparación entre tumores CPR y no-CPR de la frecuencia de linfocitos T foliculares.

### Expresión diferencial entre tumores no-CPR que progresan y no

Se llevó a cabo el análisis de la expresión diferencial de genes entre aquellas muestras de cirugía con tumores no-CPR que posteriormente progresaron o no. Se identificaron hasta 10 genes diferencialmente sobreexpresados en aquellos tumores con progresión posterior: *IFI6* y *OAS3*, implicados ambos en la señalización de interferón; los marcadores tumorales *AKT* y *KRT7*; los genes implicados en la señalización de interferón de tipo I *BST2*, *ISG15* e *IFI27*; además de los genes *CD8B*, *SDHA*, *HMBS* y *OAS1* (**figura 26A**). Para comprobar cómo la expresión de estos genes podría influenciar la supervivencia de los pacientes, se llevó a cabo el análisis de supervivencia global (SG) y libre de progresión (SLP) tras categorizar los tumores en alta o baja expresión según la expresión de cada gen. Altos niveles de expresión de *IFI6* ( $p=0.010$ ), *BST2* ( $p=0.010$ ), *CD8B* ( $p=0.019$ ), *OAS3* ( $p=0.010$ ) e *IFI27* ( $p=0.010$ ) en las muestras postratamiento de tumores no-CPR se asociaban con una menor supervivencia libre de progresión en estos

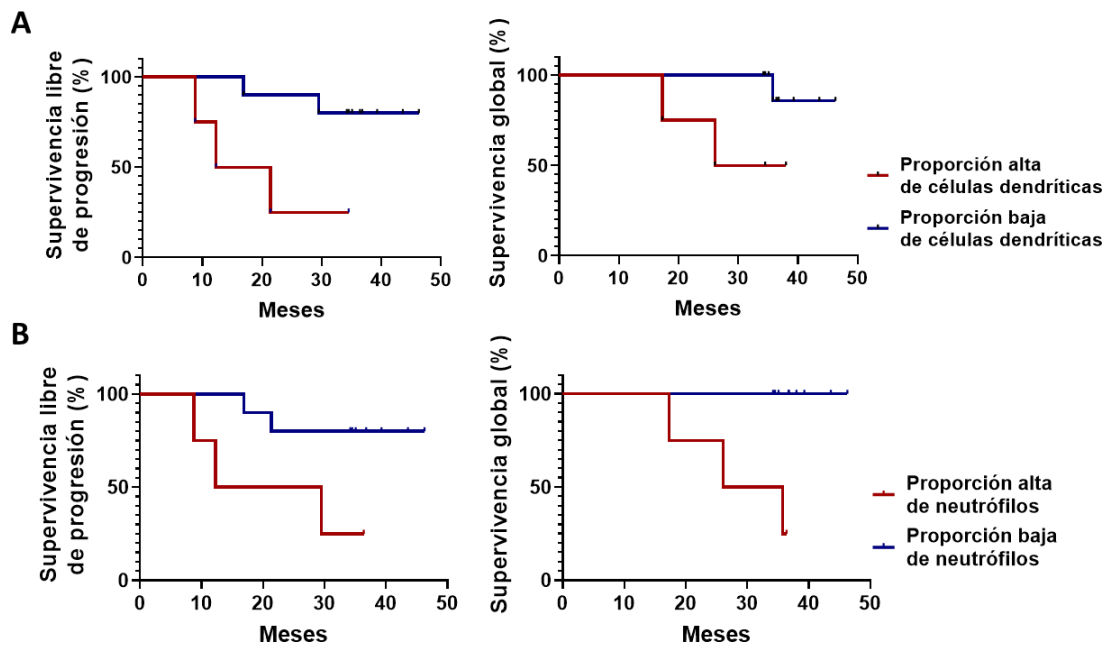
pacientes (**figura 26C**). Además, altos niveles de expresión de *HBMS* ( $p=0.018$ ) se asociaron con una menor supervivencia global (**figura 26C**). Por último, los altos niveles de *AKT* en las muestras postratamiento de tumores no-CPR se asociaron con una menor supervivencia libre de progresión ( $p=0.033$ ) y una menor supervivencia global ( $p=0.003$ ). La supervivencia libre de progresión y supervivencia global de aquellos pacientes con tumores que no alcanzan una respuesta completa al tratamiento neoadyuvante y que expresan bajos niveles de *AKT* fue del 80% (95% IC 14.58-39.13) y 100% a 36.0 meses, respectivamente, en comparación con 25% (95% IC 41.53-24.10) y 25% (95% IC 41.53-24.10) en pacientes con tumores no-CPR con alta expresión de *AKT* (**figura 26B**). Por el contrario, no se encontró ninguna ruta de señalización diferencialmente expresada entre tumores no-CPR progresores o no, tras el análisis con GSEA.



**Figura 26. Genes diferencialmente expresados entre tumores no-CPR que progresan y no.**

**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados entre tumores no-CPR que progresan y no. En rojo se muestran los sobreexpresados en las muestras de tumores que progresan y en azul los sobreexpresados en los no progresores. **B.** Curvas de supervivencia global y libre de progresión de pacientes con tumores postratamiento con altos y bajos niveles de *AKT*. **C.** Curvas de supervivencia global y libre de progresión de pacientes con tumores postratamiento con altas y bajas proporciones de células dendríticas. **C.** Curvas de supervivencia global y libre de progresión de pacientes con tumores postratamiento con alta y baja expresión de *IFI6*, *BST2*, *OAS3*, *CD8B*, *IFI27* y *HBMS*. Se representan la regresión lineal por una línea negra y los intervalos de confianza del 95% por líneas de puntos.

No se vieron diferencias entre los dos grupos de progresión o no de la enfermedad en los estimados de infiltrado de células inmunitarias. Sin embargo, altos niveles de células dendríticas o neutrófilos en los tumores no-CPR se asociaron con una menor supervivencia libre de progresión ( $p=0.019$ ,  $p=0.033$ ) y supervivencia global ( $p=0.052$ ,  $p=0.003$ ), respectivamente (figura 27).



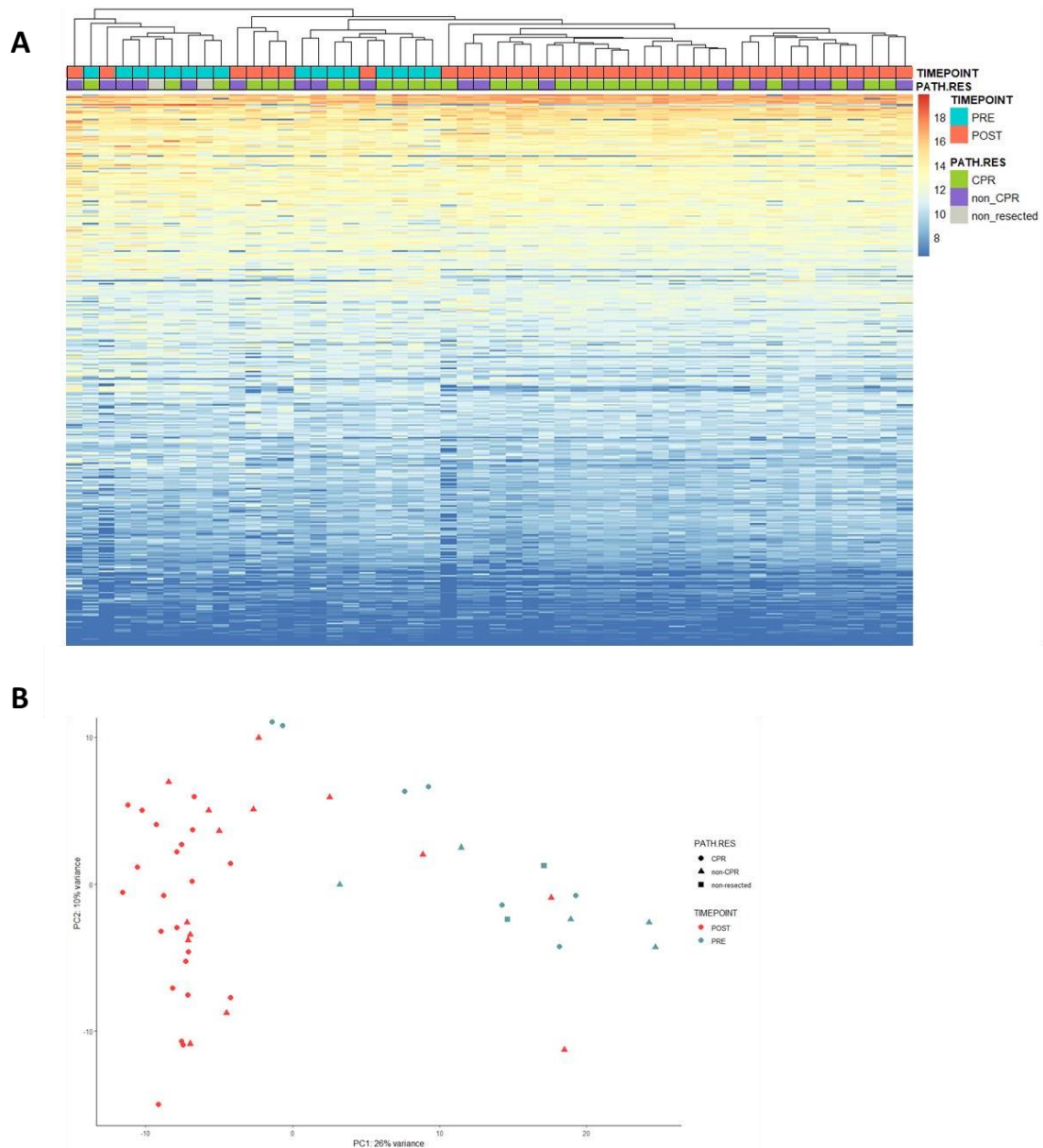
**Figura 27. Proporción de poblaciones celulares entre tumores no-CPR que progresan y no.**

**A.** Proporción alta/baja de células dendríticas y correlación con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global. **B.** Proporción alta/baja de neutrófilos y correlación con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global. Se representan la regresión lineal por una línea negra y los intervalos de confianza del 95% por líneas de puntos.

iii. Cambios en el perfil de expresión con el tratamiento neoadyuvante.

El estudio de las diferencias entre las muestras de tejido pareadas pre- y postratamiento se realizó para determinar los cambios en el perfil de expresión génica producidos por el tratamiento neoadyuvante, diferenciándose entre muestras de tumores CPR y no-CPR.

El análisis no supervisado, considerando todas las muestras, parece clasificar las muestras pretratamiento y postratamiento en dos grupos diferenciados tanto en el mapa de calor como en el análisis por componentes principales (figura 28).

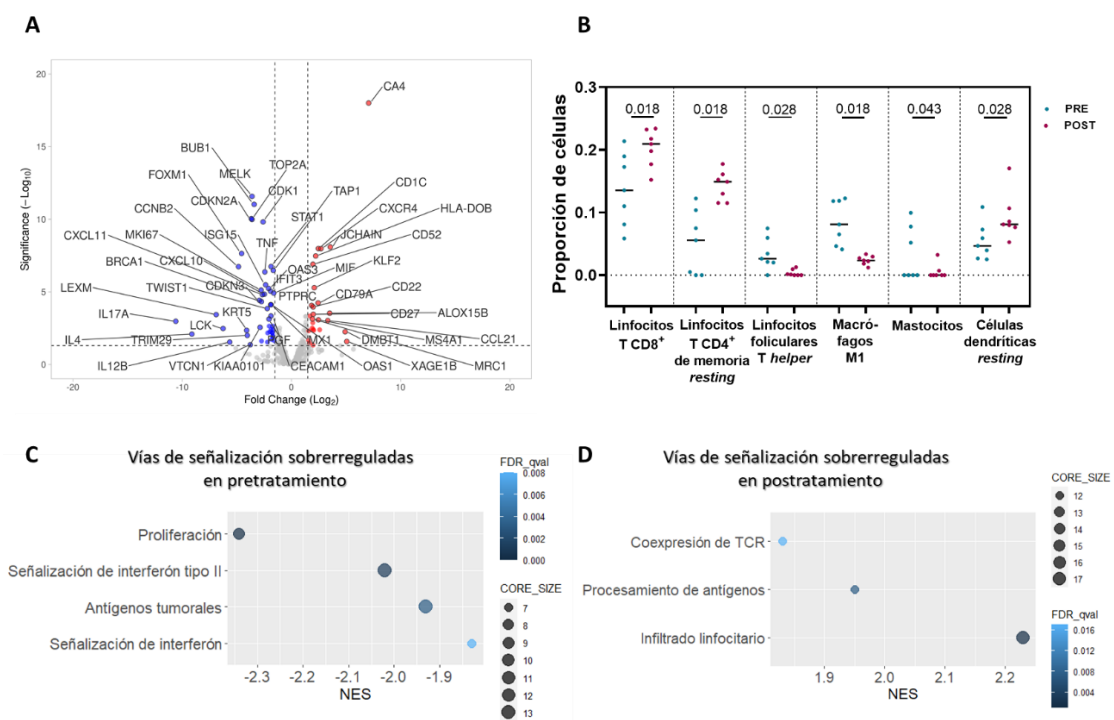


**Figura 28. Perfil de expresión génica en las muestras pre- y postratamiento.**

**A.** Mapa de calor del análisis no supervisado del perfil de expresión génica en las muestras de tejido pre- y postratamiento. **B.** Análisis de componentes principales del perfil de expresión génica de las muestras de tejido pre- y postratamiento.

Los **tumores con CPR** poseen una expresión diferencial de hasta 74 genes, entre sus muestras pareadas pre- y postratamiento. 47 genes se encontraron regulados negativamente en las muestras de tejido postratamiento neoadyuvante: 17 de ellos relacionados con proliferación celular (*MAD2L1*, *CDK1*, *MKI67*, *KIAA0101*, *CDKN3*, *BUB1*, *MELK*, *TOP2A*, *FOXM1*, *CCNB2*) y marcadores tumorales (*BRCA2*, *PGF*, *BRCA1*, *CDKN2A*, *TRIM29*, *KRT5*, *TWIST1*) además de 12 relacionados con la señalización por interferón (*IFI6*, *MX1*, *OAS3*, *IFIT3*, *ISG15*, *TAP1*, *OAS1*,

*STAT1, CXCL9, IFNG, CXCL10, CXCL11*). En contraposición, 27 genes se sobreexpresaron tras el tratamiento neoadyuvante: principalmente relacionados con el infiltrado linfocitario (*CCL21, CXCR4, GZMK, CD52, IL7R, LAMP3, PTPRC*), neutrófilos (*CA4*) y macrófagos (*MRC1, ALOX15B*), entre otros. De especial interés es la sobreexpresión de genes relacionados con los linfocitos B, como los marcadores de linfocitos B *JCHAIN, FCRLA* y *CD22*, o como los genes relacionados con el complejo de receptor de B *CD79A* y *CD79B* (**figura 29A**). El análisis con GSEA confirmó la infraexpresión de la señalización por interferón, antígenos tumorales y rutas de proliferación en las muestras postratamiento de pacientes con CPR (**figura 29C**), además de una sobreexpresión de las rutas relacionadas con la infiltración linfocitaria, el procesamiento antigénico y marcadores de coexpresión de TCR (**figura 29D**).



**Figura 29. Genes diferencialmente expresados tras el tratamiento en tumores CPR.**

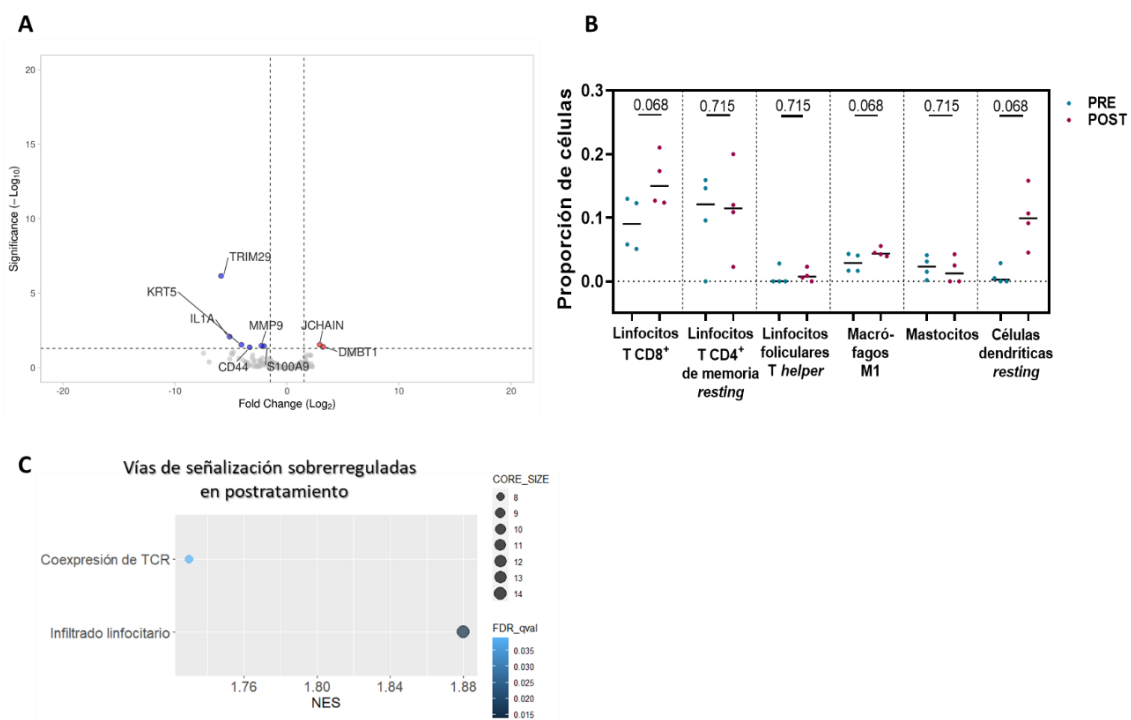
**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento en CPR. En rojo se muestran los sobreexpresados en postratamiento y en azul los sobreexpresados en pretratamiento. **B.** Cambios en la proporción de células tras el tratamiento. **C y D.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en tumores CPR pre- y postratamiento.

Por último, el análisis del infiltrado de poblaciones inmunitarias con CIBERSORTx reflejó una mayor proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ( $p=0.018$ ), de linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> no activados ( $p=0.018$ ) y células dendríticas no activadas ( $p=0.028$ ); además de una menor proporción de



linfocitos T foliculares *helper* ( $p=0.028$ ) y macrófagos M1 ( $p=0.018$ ) en las muestras postratamiento de los tumores CPR (**figura 29B**).

Con respecto a los **tumores no-CPR**, solamente 8 genes se encontraron diferencialmente expresados entre las muestras pre- y postratamiento: *TRIM29*, *IL1A*, *KRT5*, *MMP9*, *S100A9* y *CD44* se encontraron infraexpresados en las muestras postratamiento mientras que *JCHAIN* y *DMBT1* fueron sobreexpresados (**figura 30A**). El análisis de rutas con GSEA mostró una sobreexpresión de las rutas relacionadas con el infiltrado linfocitario y coexpresión de TCR en las muestras postratamiento de tumores no-CPR (**figura 30C**). No se vieron diferencias en las poblaciones inmunitarias (**figura 30B**).



**Figura 30. Genes diferencialmente expresados tras el tratamiento en tumores no-CPR.**

**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento en no-CPR. En rojo se muestran los sobreexpresados en postratamiento y en azul los sobreexpresados en pretratamiento. **B.** Cambios en la proporción de células tras el tratamiento. **C y D.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en tumores no-CPR pre- y postratamiento.

- iv. Perfil de expresión génica en tumores según biomarcadores PD-L1, TMB y top 1%

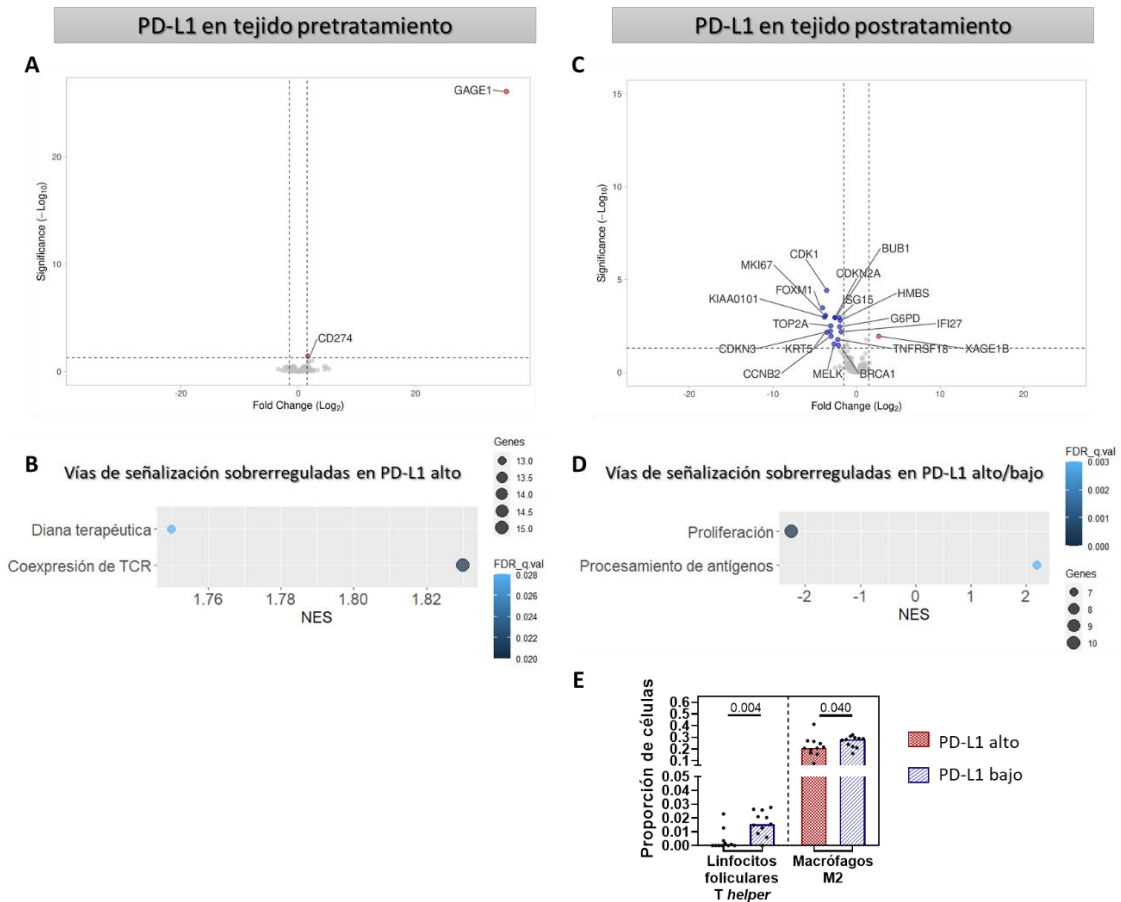
Dado que tanto la expresión de PD-L1 como la carga mutacional tumoral influyen el microambiente tumoral, se realizó un análisis diferencial de la expresión génica en las muestras pre- y postratamiento categorizando los tumores en:

- Expresión de PD-L1 alta ( $\geq 25\%$ ) o baja ( $< 25\%$ ).
- CMT alta ( $\geq 5.89$ ) o baja ( $< 5.89$ ).
- Top 1% alto ( $\geq 0.166$ ) o bajo ( $< 0.166$ )

a. Diferencias en el microambiente inmunitario en tumores con alta o baja expresión de PD-L1

Primero se analizó la expresión diferencial de genes en las muestras pretratamiento con PD-L1-alto o PD-L1-bajo. 2 genes se encontraron diferencialmente sobreexpresados en las muestras con PD-L1 alto: el antígeno tumoral *GAGE1* y el gen que codifica para la proteína de PD-L1, *CD274* (**figura 31A**). El análisis de rutas de señalización de GSEA mostró una sobreexpresión de las rutas de coexpresión del TCR y de vías de señalización de fármacos (**figura 31B**). Con respecto a las proporciones de subtipos de células inmunitarias no se encontraron tampoco diferencias entre tumores con alta y baja expresión de PD-L1.

Posteriormente, se comprobó cómo la expresión de PD-L1 en las muestras pretratamiento influenciaba el microambiente durante el tratamiento, reflejándose en diferencias en el microambiente tumoral en las muestras postratamiento. Con respecto a esto, se vio que la expresión de PD-L1 en las muestras pretratamiento dio lugar a la expresión diferencial de 18 genes en las muestras postratamiento: 17 de ellos sobreexpresados en las muestras con PD-L1 bajo en pretratamiento y 1 infraexpresado en éstas mismas. Los genes sobreexpresados en las muestras postratamiento de los tumores con bajo PD-L1 pretratamiento se corresponden con: los marcadores de proliferación *CDK1*, *FOXM1*, *MKI67*, *KIAA0101*, *BUB1*, *TOP2A*, *CDKN3*, *CCNB2* y *MELK*; los genes constitutivos *HMBS* and *G6PD*; los marcadores tumorales *CDKN2A*, *KRT5* and *BRCA1*; las moléculas de señalización de la vía de interferón de tipo I, *ISG15* y *IFI27*; y el miembro de la superfamilia de receptores TNF, *TNFRSF18*. Además, el antígeno tumoral *XAGE1B* se encontró sobreexpresado en las muestras postratamiento con PD-L1 alto en pretratamiento (**figura 31C,D**). Con respecto al estimado de infiltrado inmunitario, las muestras postratamiento con baja expresión de PD-L1 al pretratamiento parecen tener mayor proporción de linfocitos T foliculares *helper* ( $p=0.004$ ) y macrófagos M2 ( $p=0.040$ ) (**figura 31E**).



**Figura 31. Genes diferencialmente expresados en muestra pre- y postratamiento según expresión alta/baja de PD-L1 en las muestras pretratamiento.**

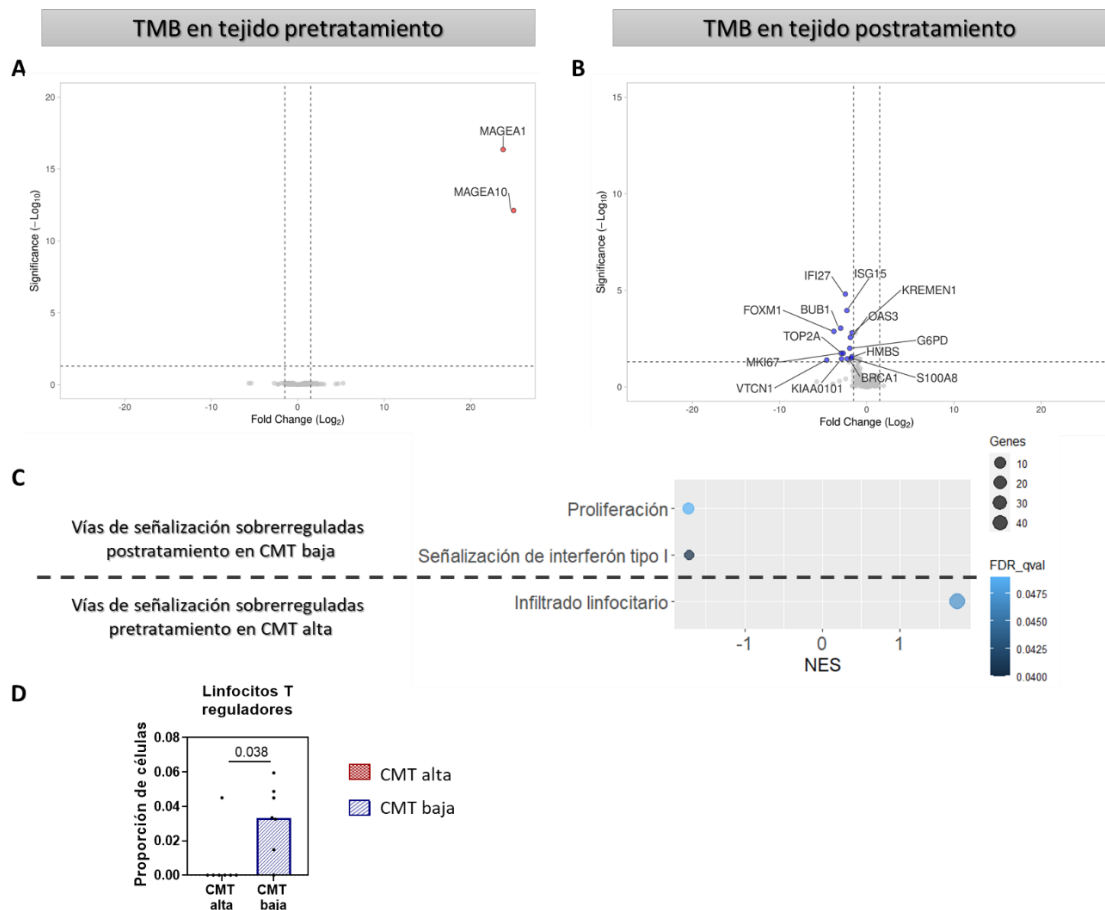
**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en muestras pretratamiento con PD-L1-alto o PD-L1-bajo. En rojo se muestran los sobreexpresados en PD-L1 alto y en azul los sobreexpresados en PD-L1 bajo. **B.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en muestras pretratamiento con PD-L1 alto. **C.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en muestras postratamiento con PD-L1-alto o PD-L1-bajo en pretratamiento. En rojo se muestran los sobreexpresados en PD-L1 alto y en azul los sobreexpresados en PD-L1 bajo. **D.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en muestras postratamiento con PD-L1-alto o PD-L1-bajo en pretratamiento. **E.** Proporción de linfocitos T foliculares y macrófagos M2 en muestras postratamiento con PD-L1-alto o PD-L1-bajo en pretratamiento.

b. Diferencias en el microambiente inmunitario en tumores con alta o baja CMT

En la comparación entre tumores con alta y baja CMT se vio la sobreexpresión de los genes referentes a los antígenos tumorales *MAGEA1* y *MAGEA10* en las muestras pretratamiento con alta CMT, junto con una sobreexpresión de los genes pertenecientes al infiltrado linfocitario medida por GSEA (**figura 32A,C**). Además, la frecuencia de los linfocitos T reguladores pareció

ser mayor en las muestras tumorales con alta CMT, sin ser significativa tras corrección por test múltiples (**figura 32D**).

Al comprobar la influencia que tenía la CMT en el momento pretratamiento sobre las muestras postratamiento, se comprobó que hasta 14 genes se encontraban sobreexpresados en las muestras postratamiento con CMT baja al pretratamiento: los marcadores de proliferación *FOXM1*, *TOP2A*, *BUB1*, *MKI67* y *KIAA0101*, los genes constitutivos *G6PD* y *HMBS*, el marcador de neutrófilos *KREMEN1*, los genes de señalización por interferón *OAS3*, *ISG15* y *IFI27*; el regulador negativo de las células mediadas por linfocitos T *VTCN1*; y los genes implicados en la respuesta inmunitaria innata *LCN2* y *S100A8* (**figura 32B**). Además, el análisis con GSEA mostró una sobreexpresión de las vías de señalización por interferón de tipo I y de proliferación en las muestras postratamiento con CMT bajo en pretratamiento (**figura 32C**). Por último, no se encontraron diferencias en las proporciones de los subtipos inmunitarios analizados.



**Figura 32. Genes diferencialmente expresados en muestra pre- y postratamiento según alta/baja CMT en las muestras pretratamiento.**

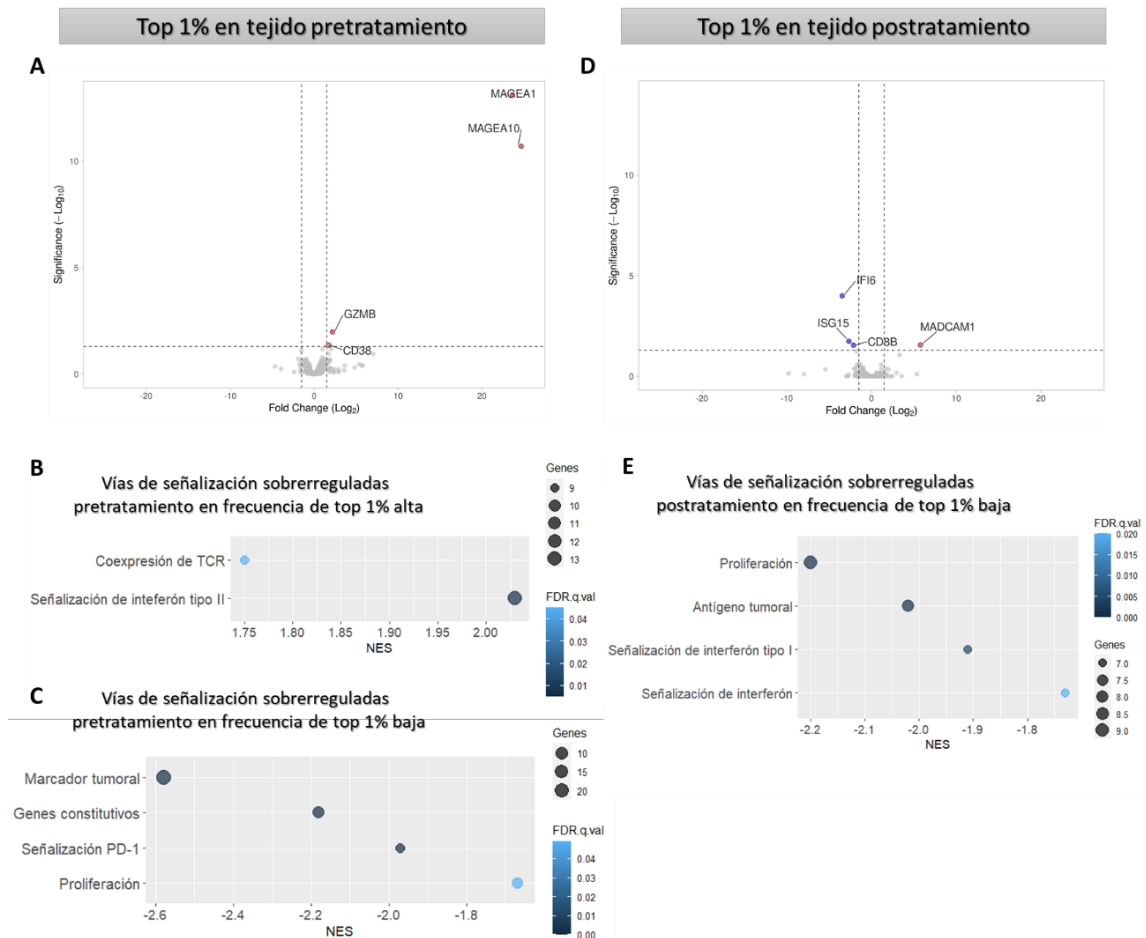
**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en muestras pretratamiento con CMT-alta o CMT-baja. En rojo se muestran los sobreexpresados en CMT-alta y en azul los sobreexpresados en CMT-

baja. **B.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en muestras pretratamiento con CMT-alta y en postratamiento con CMT-baja en pretratamiento. **C.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en muestras postratamiento con CMT-alta o CMT-baja en pretratamiento. En rojo se muestran los sobreexpresados en CMT-alta y en azul los sobreexpresados en CMT-baja. **D.** Proporción de linfocitos T reguladores en muestras postratamiento con CMT-alta o CMT-baja en pretratamiento.

c. Diferencias en el microambiente inmunitario en tumores con alto o bajo top 1%

Con respecto a las diferencias entre los tumores con alta o baja proporción de clones del top 1%, se vio que aquellos tumores pretratamiento con alto top 1% sobreexpresaban los genes correspondientes a los antígenos tumorales *MAGEA1* y *MAGEA10*, además de los genes relacionados con el infiltrado linfocitario *CD38* y *GZMB*; este último también sobreexpresado en los tumores CPR al pretratamiento (**figura 33A**). Además, el análisis de las rutas de señalización por GSEA reveló una sobreexpresión de las rutas de coexpresión de TCR y señalización de interferón de tipo II en tumores con alta frecuencia del top 1% (**figura 33B**). Para los tumores con baja frecuencia del top 1% el análisis por GSEA mostró una sobreexpresión de los marcadores tumorales, genes constitutivos, la señalización por PD-1 y rutas relacionadas con la proliferación (**figura 33C**).

Además, como con la expresión de PD-L1 y la CMT, se comprobó cómo la proporción de clones del top 1% en los tumores pretratamiento influenciaba el microambiente inmunitario en los tumores postratamiento. A este respecto, en el tejido postratamiento se vio un aumento en los genes implicados en la señalización por interferón tipo I *IFI6* e *ISG15*, además de *CD8B* en los tumores con top 1% bajo al pretratamiento (**figura 33D**); además de una sobreexpresión en las rutas de proliferación, antígeno tumoral, señalización de interferón de tipo I y señalización de interferón en estas mismas muestras (**figura 33E**). Con respecto a los tumores postratamiento con una alta proporción de top 1% en pretratamiento, se vio un aumento de la expresión del gen de adhesión *MADCAM1* (**figura 33D**), sin diferencias en las rutas de señalización.



**Figura 33. Genes diferencialmente expresados en muestra pre- y postratamiento según alta/baja top 1% en las muestras pretratamiento.**

**A.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en muestras pretratamiento con proporción del top 1% alta o baja. En rojo se muestran los sobreexpresados en top 1%-alto y en azul los sobreexpresados en top 1%-bajo. **B.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en muestras pretratamiento con top 1%-alto. **C.** Análisis funcional de vías de señalización diferencialmente reguladas en muestras pretratamiento con top 1%-bajo. **D.** Volcano plot de los genes diferencialmente expresados en muestras postratamiento con top 1%-bajo en pretratamiento. En rojo se muestran los sobreexpresados en top 1%-alto y en azul los sobreexpresados en top 1%-bajo. **E.** Vías de señalización diferencialmente reguladas en muestras postratamiento con top 1% bajo en pretratamiento.

# Capítulo 5

## Discusión

Las bajas tasas de supervivencia que presentan los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico de estadios IIIA y la gran heterogeneidad de estos ha dado lugar a una revolución en los últimos años en la investigación del arsenal terapéutico que va desde la quimioterapia a la inmunoterapia y, recientemente, a la combinación de quimio- e inmunoterapia.

En este escenario se desarrolló el ensayo clínico NADIM, en el que pacientes con estadio IIIA de cáncer de pulmón no microcítico fueron tratados con quimio-inmunoterapia neoadyuvante, lográndose hasta un 83% de respuestas patológicas mayores y supervivencias globales del 97.8% al año <sup>102</sup>. Estos datos de supervivencia superan a los obtenidos con quimioterapia o inmunoterapia neoadyuvante en monoterapia <sup>34, 124</sup>, obteniéndose además mayores tasas de respuesta patológica completa medidas en el momento de la cirugía que con la monoterapia <sup>124</sup>. Además, los resultados del seguimiento a 3 años muestran un beneficio mantenido a largo plazo con una supervivencia libre de progresión y supervivencia global del 81.1% y 91.0%, respectivamente <sup>125</sup>. Esto ha dado lugar al desarrollo de un ensayo clínico fase III donde se ratifican los resultados ya obtenidos en el ensayo clínico NADIM: un aumento significativo de la supervivencia libre de progresión en los pacientes tratados con el régimen de quimio-inmunoterapia con respecto a los pacientes que recibieron quimioterapia en monoterapia (31.6 meses frente a 20.8), además de un obtenerse un aumento de respuesta patológica completa con un 24.0% en la combinación terapéutica frente al 2.2% de la rama control <sup>126</sup>. Esto, a su vez, ha supuesto la aprobación por parte de la agencia sanitaria americana, la FDA, del tratamiento neoadyuvante de pacientes de cáncer de pulmón no microcítico en estadios tempranos con la terapia combinada nivolumab y platino.

Con este nuevo enfoque terapéutico surge la necesidad de proporcionar una serie de biomarcadores que puedan ayudar en la predicción de la respuesta a la intervención. Primero, para lograr identificar a aquellos pacientes que más se puedan beneficiar de este tratamiento, pudiendo ofrecer otras opciones más convenientes a los que no. Segundo, porque la predicción de las respuestas patológicas completas en estos pacientes de una forma no invasiva podría ahorrar los costes sanitarios y las complicaciones postoperatorias que conlleva una cirugía de este tipo.

En esta tesis, a partir de las muestras de sangre y tumor de pacientes del ensayo clínico NADIM se describen algunos biomarcadores clásicos usados previamente en estudios de inmunoterapia (como son la expresión de PD-L1 y la CMT) además de nuevos biomarcadores (como son el repertorio del linfocitos T y la firma de expresión génica) con el objetivo de predecir la respuesta a la quimio-inmunoterapia neoadyuvante, predecir las recaídas en estos pacientes, además de describir los cambios que se producen en el microambiente tumoral como respuesta al tratamiento (figura 34).

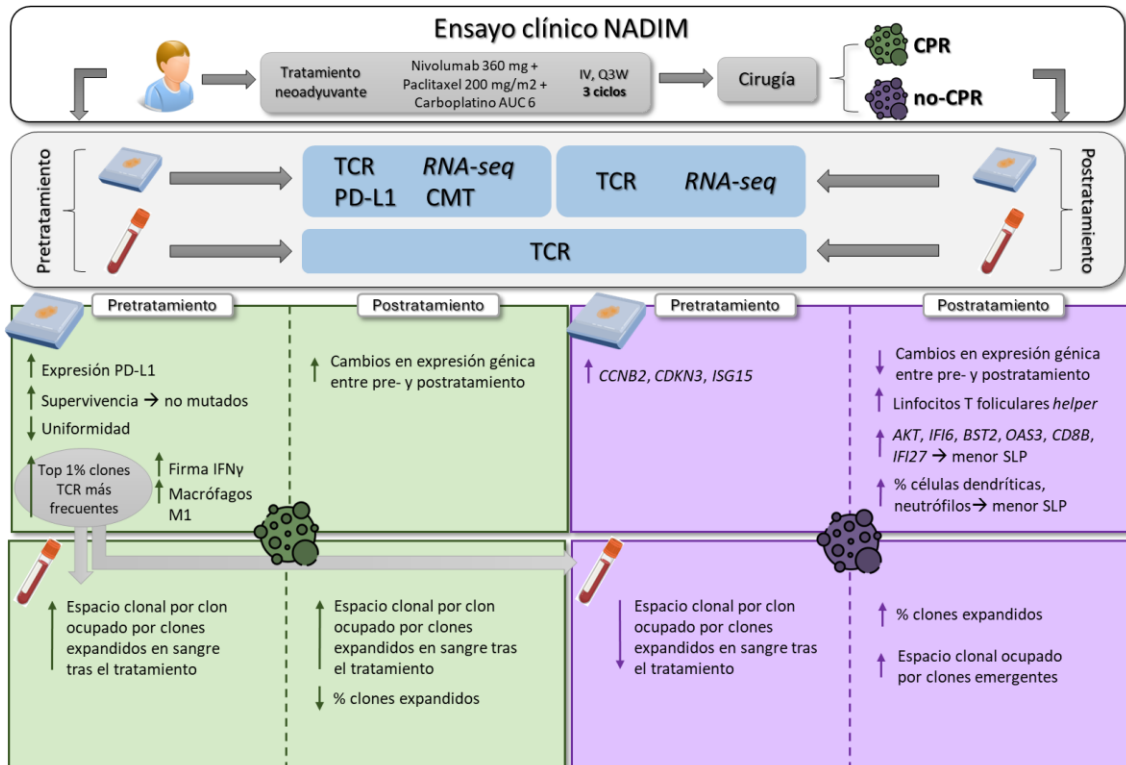


Figura 34. Resumen gráfico de las técnicas y resultados de la tesis.

### Expresión de PD-L1 como biomarcador en los pacientes del ensayo clínico NADIM

Tanto la expresión de PD-L1 como la CMT se han considerado biomarcadores clásicos de respuesta en el tratamiento con agentes inmunoterapéuticos por la descripción del microambiente tumoral que se deduce de ellos<sup>41</sup>.

Con respecto a la expresión de PD-L1, es lógico pensar que una mayor respuesta a agentes que bloquean el ligando PD-1 se producirá en aquellos tumores en los que haya una alta expresión del ligando inhibitorio PD-L1<sup>19,127,83</sup>. En consecuencia, se han desarrollado ensayos de inmunohistoquímica para determinar la expresión de la proteína PD-L1 en las muestras tumorales que se utilizan actualmente en la clínica<sup>82,118</sup>. En concreto, un trabajo reciente ha



demostrado una asociación positiva entre la expresión de PD-L1 y la respuesta patológica completa y la supervivencia libre de progresión en pacientes de cáncer de pulmón no microcítico tratados con quimio-inmunoterapia neoadyuvante <sup>126</sup>.

En este trabajo se ha medido la expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica en las muestras de tejido pretratamiento de pacientes tratados con quimio-inmunoterapia, categorizando a los tumores según su expresión porcentual. Un PD-L1 TPS mayor o igual del 25% se asoció con respuestas patológicas completas tras la cirugía. Sin embargo, un 20% de los tumores con respuestas incompletas (2 de 10) presentaron un PD-L1 TPS mayor del 25% y un 26.67% de los tumores con respuesta completa (4 de 15) presentaron una expresión de PD-L1 menor del 25%, siendo este biomarcador poco sensible en estos pacientes. No se encontraron tampoco asociaciones entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia libre de progresión ni la supervivencia global, indicando, de nuevo, que este biomarcador no funciona de forma perfecta en nuestra cohorte de pacientes. Otros autores tampoco encontraron asociación entre este biomarcador y la respuesta al tratamiento con agentes inmunoterapéuticos o la supervivencia global de los pacientes <sup>84,79</sup> o pacientes que sin expresión o con expresión baja de PD-L1 en tejido obtienen beneficio clínico también de la inmunoterapia anti-PD-1 o anti-PD-L1<sup>128</sup>. Algunos autores apuntan hacia la importancia del tipo celular positivo para PD-L1 al realizar la inmunohistoquímica, y que es el número de células inmunitarias positivas para PD-L1 las que se correlacionan con la eficacia de la inmunoterapia, y no la expresión de este ligando por las células tumorales <sup>129,130</sup>. Con respecto a esto, algunos ensayos han incluido la medición de la expresión de PD-L1 también en las células inmunitarias infiltrantes de tumor <sup>131</sup>.

Para el tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios es necesario que estos puntos de control se encuentren alterados en la población a tratar, de manera que se considera que la expresión de PD-L1 es un marcador de una respuesta inmunitaria antitumoral activa del huésped<sup>132,127</sup> que puede condicionar la estructura del microambiente tumoral<sup>73</sup>. Esto se demostró en un estudio en el que se vio 4 tipos distintos de relación del tumor con el microambiente inmunitario: uno caracterizado por una amplia expresión constitutiva de PD-L1 con una completa ausencia de respuesta inmunitaria; otro con una expresión de PD-L1 más focalizada y asociada con una respuesta inmunitaria contra el tumor; tumores sin expresión de PD-L1 y con infiltrado inmunitario; y tumores sin expresión de PD-L1 ni infiltrado inmunitario<sup>73</sup>.

Por ello, en este trabajo se han analizado las diferencias en la expresión génica entre los tumores con alta y baja expresión de PD-L1 y cómo la expresión de PD-L1 influye en la expresión génica del tumor durante el tratamiento con inmunoterapia. A este respecto, tumores con alta

expresión de PD-L1 muestran también una sobreexpresión del gen que codifica para su proteína, *CD274*, además de mayor coexpresión de genes del TCR; lo que indica que se trata probablemente de tumores más inmunogénicos. Otros autores apuntan hacia la misma dirección, encontrando una mayor infiltración inmunitaria en el lecho tumoral que se correlaciona positivamente con la expresión de PD-L1, y que podría reflejar un microambiente inmunológicamente activo<sup>127</sup>. Por otro lado, en los tumores con baja expresión de PD-L1 en pretratamiento se produce una sobreexpresión de marcadores de proliferación en sus respectivos tumores al momento de postratamiento. Esto puede ser debido a que el tumor no era inmunogénico en pre-, por lo que no se ha producido una respuesta tan efectiva al tratamiento con el inmunomodulador anti-PD-1, aumentándose los marcadores de proliferación en el momento postratamiento como un reflejo del curso natural de la enfermedad. Además, la sobreexpresión de genes relacionados con el procesamiento antigénico en las muestras postratamiento de tumores con PD-L1 alto puede estar apoyando también esta afirmación.

#### Carga mutacional tumoral como biomarcador en los pacientes del ensayo clínico NADIM

La carga mutacional tumoral es el número de mutaciones por megabase que presenta un tejido tumoral, siendo un reflejo de los péptidos inmunogénicos que potencialmente puede generar el tumor. A mayor diversidad antigénica, mayor inmunogenicidad presentará el nicho tumoral influenciando la respuesta al tratamiento con agentes inmunoterapéuticos<sup>41,38</sup>. Sin embargo, el valor de la carga mutacional tumoral como biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia ha sido ampliamente discutido, encontrándose estudios contradictorios al respecto<sup>91, 87,133</sup>. En la combinación con quimio-inmunoterapia, se han visto también resultados contradictorios en cuanto a la correlación entre la respuesta y la carga mutacional tumoral basal<sup>124134135</sup>.

En el trabajo realizado en esta tesis no se han encontrado asociaciones entre la CMT en el momento del diagnóstico y la respuesta al tratamiento con quimio-inmunoterapia, ni entre ésta y la supervivencia global y libre de progresión. Uno de los factores que hace que este biomarcador pueda no ser específico de la respuesta ni comparable entre distintos estudios es la diversidad de plataformas diagnósticas para la determinación, que pueden incluir desde plataformas que secuencian todo el genoma (*whole-genome sequencing*, WGS), todo el exoma (*whole-exome sequencing*, WES) o paneles específicos formados por 400 o 600 genes. Además, para el cálculo de la CMT cada uno de ellos cubre una región más o menos amplia de megabases,

tienen en cuenta las mutaciones no sinónimas, sinónimas o ambas. Todo ello, hace difícil el establecimiento de un umbral que defina el tumor como con CMT alta o baja y que sea válido y comparable entre los distintos estudios<sup>88,136,137</sup>.

La presencia de mutaciones específicas, las cuales se saben que juegan un papel importante en la resistencia a la inmunoterapia<sup>92,138-140</sup>, también se ha analizado en esta cohorte de pacientes. No se encontraron diferencias en el número de mutaciones específicas de resistencia a inmunoterapia en tumores con CPR y no-CPR, sin embargo, sí se vio un aumento en la supervivencia libre de progresión en aquellos pacientes con tumores que no poseían estas mutaciones. Sí parece que la ausencia de estas mutaciones que potencialmente confieren resistencia a la inmunoterapia produce un efecto protector frente a la progresión de la enfermedad en nuestra cohorte de pacientes, si bien no se observan diferencias en la supervivencia global de los mismos.

Como se ha comentado anteriormente, al igual que en el caso de la expresión de PD-L1, la determinación de la carga mutacional de un tumor proporciona información sobre la inmunogenicidad que presenta su microambiente tumoral<sup>38,63,86</sup>. Por ello, se analizó la expresión génica diferencial entre los tumores con alta y baja CMT, encontrándose una sobreexpresión de los antígenos tumorales *MAGEA1* y *MAGEA10* en tumores con alta CMT, además de una mayor expresión de genes relacionados con el infiltrado linfocitario; confirmando la mayor inmunogenicidad de estas muestras. Sin embargo, esta CMT alta no parece tener implicación en la respuesta patológica completa ni en la supervivencia de nuestra cohorte de pacientes. Además, esta menor inmunogenicidad de los tumores con CMT bajo se podría traducir en una baja reactividad de los linfocitos frente a los antígenos tumorales y una menor capacidad para la eliminación del tumor por el sistema inmunitario cuya consecuencia directa es la sobreexpresión de marcadores de proliferación en el tejido de la cirugía.

### Receptor de linfocitos T como biomarcador emergente

La cuantificación de las regiones únicas de CDR3 del receptor de linfocitos T se ha propuesto como biomarcador emergente, ya que estas secuencias determinarán el reconocimiento específico de antígenos mediado por el TCR<sup>36, 141</sup>. Por ello, la caracterización del repertorio en el tejido pretratamiento en términos de clonalidad, diversidad y convergencia proporciona información sobre la inmunogenicidad del tumor y el estado de la respuesta inmunitaria mediada por los linfocitos T<sup>113,141</sup>. Además, al ser estas regiones de CDR3 específicas de antígeno, y pudiendo correlacionarse con diferentes péptidos tumorales<sup>142</sup>, eventualmente se podría

llevar a cabo una monitorización de la respuesta mediante la secuenciación y determinación de las secuencias de TCR a lo largo de la intervención terapéutica<sup>19,142</sup>.

En este trabajo se ha realizado la secuenciación de la región CDR3 específica de antígeno tanto en tumores como en sangre periférica en los momentos pre- y postratamiento de pacientes con cáncer de pulmón tratados con quimio-inmunoterapia neoadyuvante con el objetivo de caracterizar el repertorio e inferir la respuesta al tratamiento.

Uno de los parámetros analizados para caracterizar el repertorio de TCR fue la **uniformidad**. La uniformidad trata de describir cómo de uniformemente distribuido se encuentra el repertorio de TCR, en cuanto a cómo se distribuyen las frecuencias de los clones que lo forman. A este respecto, en este trabajo se ha visto cómo el repertorio de TCR de los tumores pretratamiento que alcanzaron una respuesta completa tras la quimio-inmunoterapia neoadyuvante presentaba una menor uniformidad, esto es, las frecuencias de los clones que conformaban el repertorio eran muy diferentes.

La razón por la que las frecuencias de los clones no se mantenían uniformes en el repertorio de estos pacientes podría deberse a que unos clones se presentasen en una proporción mayor que otros. Por ello, los clones identificados se clasificaron según su abundancia relativa en el repertorio, quedando divididos en las categorías de top 1%, top 1-2%, top 2-5% y top 5%; y se comprobó qué grupo de clones estaban produciendo este desajuste en el espacio clonal del repertorio de TCR. Se vio que los **clones pertenecientes al top 1% más frecuentes**, ocupaban un mayor espacio clonal en los tumores pretratamiento que obtuvieron respuestas completas tras la neoadyuvancia en comparación con los tumores no-CPR. El uso de los clones más frecuentes como biomarcadores de respuesta en pacientes tratados con inmunoterapia se ha propuesto en varios estudios: una mayor frecuencia de estos clones más frecuentes en sangre periférica se ha asociado con mayores tasas de supervivencia libre de progresión a 9 meses<sup>54</sup> y un mayor espacio clonal ocupado por el top 1% de los clones presentes en la pieza quirúrgica se ha asociado con la respuesta patológica mayor<sup>114</sup>. Sin embargo, el número de clones más frecuentes utilizados para el análisis es arbitrario, de manera que unos autores proponen el top del percentil 25 para el análisis<sup>143</sup>, otros los 100 clonotipos más frecuentes<sup>113</sup> o los 10 más abundantes<sup>117,144</sup>. Lo que sí parece claro es que los clones de TCR más abundantes poseen una implicación biológica en la respuesta a la inmunoterapia. Nuestro estudio es el primero que demuestra su capacidad predictiva.

Además, un mayor espacio clonal ocupado por este top 1% parece tener implicaciones en el perfil inmunitario del tumor, demostrado en este trabajo mediante el análisis de dos paneles

distintos de RNA-seq. A este respecto, se ha visto que tumores con una mayor frecuencia del top 1% poseían un perfil proinflamatorio, caracterizado por la sobreexpresión de vías de señalización relacionadas con la coexpresión de TCR; así como un aumento en la señalización de interferón de tipo II, con una sobreexpresión del gen que codifica para la granzima citotóxica B, *GZMB*. Este perfil proinflamatorio en el tejido pretratamiento podría explicar el desequilibrio del repertorio de receptores de linfocitos T y la consecución posterior de las respuestas patológicas completas, ya que en un microambiente más permisivo se favorecería la activación específica de los clones y su expansión tras el reconocimiento antigénico<sup>145,146,147</sup>. En contraposición, los tumores pretratamiento con bajo espacio clonal ocupado por los clones del top 1% mostraban una sobreexpresión de vías relacionadas con la proliferación, marcadores tumorales y señalización de PD-1, denotando un perfil menos permisivo inmunológicamente que se mantenía en las mismas muestras tumorales postratamiento. Este fenotipo, denominado por algunos autores como “inmunológicamente desierto”, se caracteriza por la ausencia de una inmunidad antitumoral preexistente lo que hace que no respondan a la inmunoterapia causando una progresión en la enfermedad<sup>98</sup>. Esto produce a su vez una sobreexpresión de marcadores tumorales y de proliferación en el microambiente tumoral tal y como se ve en este trabajo.

La **independencia de la uniformidad del repertorio y del top 1% de parámetros técnicos**, como el número de lecturas y el número de clones identificados en la muestra, hacen que sean unos buenos candidatos a ser considerados biomarcadores. Además, es importante el hecho de que las diferencias entre CPR y no-CPR se mantengan independientemente del origen del tejido, ya que en muchas ocasiones se hace complicada la biopsia del tejido tumoral en el cáncer de pulmón, obteniéndose la mayoría de las veces biopsias de ganglio linfático afecto<sup>14</sup>. Esto presenta una **ventaja con respecto a la determinación de PD-L1 y CMT como biomarcadores**. Mientras que para la determinación del repertorio de TCR se necesitan 100 ng de ARN de tejido independientemente de su origen, los requerimientos técnicos para la evaluación de la expresión del PD-L1 y de la CMT son mayores: para el primero es necesaria la presencia de al menos 100 células tumorales en la muestra de tejido para comprobar la expresión de PD-L1 exclusivamente en ellas; y para el segundo es necesario un porcentaje mínimo de 20% de células tumorales en la muestra, haciendo su determinación imposible en algunos ganglios afectados con una baja proporción de éstas. Sin embargo, tanto PD-L1 como CMT llevan la delantera en su consideración de biomarcadores, y actualmente son de casi obligada determinación en ensayos clínicos que impliquen tratamiento con agentes inmunoterapéuticos<sup>90,148,102</sup>. Además, tanto la FDA como la EMA han aprobado el uso de un ensayo específico de determinación de la expresión de PD-L1 (PD-L1 22C3 pharmDx™) en base a los resultados de un ensayo clínico de

pembrolizumab en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, en el que todos los pacientes presentaban una expresión positiva ( $\geq 1\%$ ) de PD-L1, y pacientes con expresión del  $\geq 50\%$  eran los que más se beneficiaban del tratamiento<sup>32</sup>. Por otro lado, las limitaciones para la determinación del repertorio de TCR y la CMT son similares: primero la falta de estandarización entre plataformas, que hace que exista una falta de armonización en los puntos de corte utilizados para cada uno de ellos<sup>88,132,137</sup>; y segundo el alto coste que presentan las técnicas de secuenciación masiva, haciendo difícil su aplicación en la práctica clínica habitual. Por último, si bien en esta cohorte de pacientes la determinación del top 1% de los clones más frecuentes posee una capacidad predictiva mayor para tumores que logran CPR tras la quimio-inmunoterapia que la expresión de PD-L1 o la CMT, sería necesario su validación en cohortes más amplias; incluyendo un grupo control en ellas con pacientes solamente tratados con quimioterapia además de un mayor número de respuestas patológicas no completas.

#### Receptor de linfocitos T e inmunovigilancia

Dada la importancia que parece tener el top 1% de clones del tejido pretratamiento en el establecimiento de una respuesta patológica completa, en este trabajo además se han intentado inferir los mecanismos subyacentes.

Por una parte, se postula que estos clones no estén implicados directamente en la respuesta al tratamiento, si no que sean nuevos clones, o clones que no pertenecen al top 1% los que la estén llevando a cabo. Esto se explicaría por el aumento en la sangre postratamiento de los clones emergentes en tejido postratamiento, la pérdida de espacio clonal ocupado por el top 1% de clones pretratamiento en el momento post-, y el aumento del espacio clonal ocupado en el top 1% del tejido postratamiento de los clones emergentes y de los no pertenecientes al top 1% pretratamiento. Además, parece que la implicación de los clones del no-top 1% es más relevante que la de los clones emergentes, dado el mayor espacio clonal relativo que estos ocupan en el top 1% del tejido postratamiento con respecto a los últimos. Esto sugeriría una revigorización de clones preexistentes específicos de tumor que sí podrían ser importantes para llevar a cabo una respuesta, aunque no parecen tener un papel específico en la consecución de una respuesta patológica completa. Otros autores llegaron a una conclusión parecida, de manera que el bloqueo de puntos de control inmunitario en tumores que eran inmunológicamente activos favorecía la llegada de nuevos clones de TCR que eran los que presumiblemente llevaban a cabo la respuesta, más que la revigorización de clones preexistentes en el tejido<sup>149</sup>.

Por otro lado, en este trabajo se ha visto cómo este top 1% de clones pretratamiento permanecían en el tejido postratamiento, encontrándose también en sangre. Esto sugiere diferentes funciones para estos clones tanto *in situ* en el tumor como a nivel periférico. Con respecto a sus funciones *in situ*, cabe destacar su presencia (en torno al 30%) en el top 1% del tejido postratamiento por lo que podrían estar participando en la respuesta. Además, es posible que tras la eliminación del tumor se haya producido una disminución de los linfocitos T infiltrantes, con consecuencias en las poblaciones de linfocitos pertenecientes al top 1% pretratamiento. Esto es, para el momento en el que se ha realizado este análisis los linfocitos ya no se encuentran porque ya han llevado a cabo la respuesta pertinente. Con todo ello, no se puede descartar la revigorización de los clones del top 1% pre- en postratamiento para llevar a cabo la respuesta<sup>111</sup>. En cuanto a su papel a nivel periférico, se ha visto que estos clones del top 1% pretratamiento permanecen en sangre tras el tratamiento. Además, los pacientes con tumores con CPR parecen tener en sangre una expansión selectiva de los clones pertenecientes al top 1% pretratamiento, en comparación con los no-CPR. Esto podría indicar una posible inmunovigilancia periférica que sería capaz de eliminar las posibles recaídas a nivel sistémico, lo que también explicaría las bajas progresiones en el grupo con alto espacio clonal ocupado por el top 1% y la mayor supervivencia en estos pacientes.

Es importante destacar el trabajo previo de otros autores con respecto a la expansión clonal de los linfocitos T consecuencia del tratamiento con inmunoterapia. En concreto, el trabajo de Riaz y colaboradores<sup>96</sup> presenta de manera detallada los cambios genómicos que se producen en el microambiente tumoral de pacientes con melanoma durante el tratamiento con nivolumab. Estos autores encontraron una disminución de la uniformidad del repertorio de TCR consecuencia del tratamiento, que se presentaba tanto en tumores respondedores y no respondedores. Sugieren que, este cambio en la arquitectura clonal de linfocitos T en tumores que respondían al tratamiento se explica por una expansión y acumulación de clones T específicos en respuesta a las mutaciones que presentaba el tumor. Mientras que para los tumores que no responden sugieren dos escenarios: el primero, en el que estos clones de linfocitos T que se expanden puedan estar eliminando mutaciones subclonales en lugar de mutaciones clonales; o que esta expansión clonal se esté produciendo en linfocitos T reguladores, dando lugar a un microambiente tumoral inmunosupresor<sup>96</sup>. Además, parece que la expansión de los clones de linfocitos T en el tejido tras el tratamiento con anti-PD-1, conlleva también cambios a nivel génico<sup>150</sup>.

Con respecto al estudio de los clones de TCR en sangre periférica, Anagnostou y colaboradores<sup>151</sup> estudiaron cómo el bloqueo con inhibidores de PD-1 afecta al repertorio de TCR periférico y

si los cambios producidos en el mismo, reflejado por clones contraídos y expandidos, podrían reflejar una respuesta inmunitaria antitumoral a nivel sistémico. A este respecto, se encontró una expansión de clones de linfocitos T preexistentes en sangre periférica en el momento de respuesta radiológica al tratamiento con anti-PD-1 en pacientes con respuesta clínica. Sin embargo, no se encontró expansión clonal en sangre de pacientes cuyos tumores eran resistentes al tratamiento con inmunoterapia<sup>151</sup>. Además se vio, en una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón tratados con inmunoterapia neoadyuvante, que el top 1% de los clones intratumorales en el tejido de la cirugía se encontraban expandidos en sangre tras el segundo ciclo de nivolumab; poniendo en valor el correlato que puede hacer la sangre periférica con lo que se encuentra en tejido y pudiéndose así monitorizar las respuestas tempranas de los linfocitos T durante el tratamiento<sup>114</sup>.

Por último, a pesar de todas las hipótesis planteadas, con este trabajo no es posible dilucidar un mecanismo por el cual los linfocitos T están ejerciendo su función dada la falta de secuenciación de la cadena  $\alpha$ , así como del desconocimiento del fenotipo y de la especificidad antigénica de los linfocitos T secuenciados<sup>142</sup>. Si bien demuestra el papel clave de las células T en la respuesta a quimio-inmunoterapia y puede ayudar a incrementar el interés en el estudio del receptor de los linfocitos T como biomarcador.

#### Firma de IFN $\gamma$ como potencial predictor de respuesta al tratamiento con quimio-inmunoterapia

La presencia de un perfil de expresión génica proinflamatorio medido en las muestras pretratamiento se ha asociado con la consecución de una respuesta patológica completa tras la quimio-inmunoterapia neoadyuvante, caracterizado por mayores niveles de *IFNG*, *GZMB* y *NKG7*, además de una mayor proporción de macrófagos en las muestras de CPR. Estos resultados refuerzan los mostrados anteriormente en la tesis y en otros trabajos relacionados, de manera que parece que los tumores CPR presentan una respuesta inmunitaria preestablecida, tanto en tejido como en sangre<sup>152</sup>. Concuerdia, con el trabajo de otros autores que señalan también la presencia de una respuesta inmunitaria antitumoral previa al tratamiento con inmunomoduladores, caracterizada también por una firma de IFN $\gamma$ <sup>96</sup>. El papel de IFN $\gamma$  en la respuesta inmunitaria antitumoral ha sido estudiado previamente<sup>153,154</sup>. Esta citoquina es producida por los linfocitos T *helper*, los linfocitos T citotóxicos y las células NK. La señalización que media da lugar al aumento de la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, favoreciendo la presentación antigénica, la activación de las células NK



y linfocitos T, así como la diferenciación de los macrófagos antiinflamatorios (M2) a proinflamatorios (M1), todo ello promoviendo la eliminación del tumor <sup>153</sup>. Una firma de IFN $\gamma$  se ha visto asociada a una mayor respuesta al tratamiento con inmunoterapia en melanoma, cáncer de cabeza y cuello y cáncer gástrico <sup>105,155</sup>, sin embargo, no ha sido aún demostrada en cáncer de pulmón no microcítico <sup>156,157</sup>. Los resultados de este trabajo sugieren que una firma de IFN $\gamma$  en el tejido antes del tratamiento, caracterizada por la mayor expresión diferencial de los genes de respuesta al interferón *IFNG*, *GZMB*, *NKG7*, *IDO1*, *CXCL9* y *CXCL10*; podría distinguir a los pacientes cuyos tumores alcanzarán una CPR tras la quimio-inmunoterapia neoadyuvante. Se postula que la respuesta inmunitaria antitumoral se encontraba previamente orquestada en muestras de pretratamiento, donde los altos niveles de *CXCL9* y *CXCL10* podrían estar regulando la infiltración y activación de células inmunitarias y *NKG7* y *GZMB* podrían estar induciendo la desgranulación y la apoptosis de células diana en los linfocitos T citotóxicos y las células NK <sup>158</sup>. Además, las vías de señalización diferencialmente sobreexpresadas en los tumores CPR al pretratamiento como son la coexpresión del receptor de linfocitos T, infiltrado linfocitario y las vías de procesamiento antigénico, así como la mayor proporción de macrófagos M1 podrían estar apoyando esta hipótesis. Desafortunadamente, el bajo número de eventos en esta cohorte de pacientes limitó el análisis de supervivencia con la firma de expresión de IFN $\gamma$ .

Microambiente inmunitario en las muestras postratamiento: diferencias entre CPR y no-CPR

En el análisis diferencial de la expresión génica en los tumores que habían obtenido una respuesta completa al tratamiento neoadyuvante y los que no, se identificó una sobreexpresión de genes relacionados con la proliferación y marcadores tumorales en muestras de no-CPR, consistente con la presencia de células tumorales viables en éstas. En contraposición, los tumores CPR mostraron una sobreexpresión diferencial de genes relativos al procesamiento antigénico, coexpresión de TCR y genes relativos al infiltrado linfocitario, lo que parece indicar que el tratamiento con quimio-inmunoterapia ha dado lugar a una respuesta inmunitaria efectiva frente a estos tumores. Estos resultados se corresponden con los publicados recientemente en una mayor cohorte de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, donde se vio que aquellos tumores con una respuesta patológica mayor (CPR o MPR) a la quimio-inmunoterapia tenían mayores infiltrados de linfocitos T CD8<sup>+</sup> además de una sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata <sup>106</sup>. Asimismo, vieron una sobreexpresión de genes relacionados con la replicación del ADN y del ciclo celular en tumores

con respuesta patológica incompleta<sup>106</sup>. Todo esto le da valor a la consideración de la respuesta patológica completa como una entidad única y diferente.

### Genes de proliferación asociados con la progresión en tumores no-CPR

La caracterización de pacientes que presentan un alto riesgo de recaída tras la cirugía podría mejorar el enfoque terapéutico que estos reciban tras la intervención. Con respecto a esto, en este trabajo se ha identificado una asociación positiva entre los altos niveles de expresión del marcador tumoral AKT en las muestras postratamiento y el riesgo de recaída y fallecimiento tras la intervención terapéutica. Además, los niveles de AKT no se correlacionan con el porcentaje de células tumorales residuales presentes en la pieza quirúrgica de estos pacientes, lo que refuerza su papel más allá de ser un gen marcador tumoral con implicaciones en la resistencia a la quimio-inmunoterapia. AKT es conocido por participar en la regulación del ciclo celular y la supervivencia, mediante la vía de señalización de PI3K-AKT-mTOR<sup>159</sup>, favoreciendo el crecimiento tumoral independientemente de la respuesta inmunitaria antitumoral. Alteraciones en esta vía de supervivencia se han visto en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico que muestran progresión en la enfermedad tras el tratamiento con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR<sup>160</sup>.

Por otro lado, se ha visto que altos niveles de neutrófilos en las muestras postratamiento de estos pacientes con tumores no-CPR se asocian con una menor supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Otros autores apuntan a la implicación de este tipo celular y la presencia de entramados extracelulares de neutrófilos en el favorecimiento de la metástasis tumoral<sup>161,162</sup>. Los entramados extracelulares de neutrófilos (NETs, *neutrophil extracellular traps*) son estructuras grandes, extracelulares, similares a una red, compuestas de proteínas citosólicas y granulares<sup>163</sup>. La desregulación de estas puede contribuir a la patogénesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, entre ellas el cáncer<sup>161</sup>. Algunos mecanismos en los que parecen contribuir estos NETs son en el mayor riesgo de trombosis por su asociación con las plaquetas<sup>164</sup>, o la metástasis del tumor mediante la captura por parte de estas NETs de células tumorales y reclutamiento a focos de inflamación<sup>165</sup>. Parece que estos entramados de neutrófilos se encuentran presentes en muestras tumorales de pacientes con cáncer de pulmón<sup>166,167</sup>, sin embargo, no se ha podido confirmar de momento en esta cohorte de pacientes.

Cambios en la firma genética con el tratamiento neoadyuvante.

Los mayores cambios en el perfil de expresión inmunitario durante el tratamiento neoadyuvante se observaron en los tumores CPR, reflejando una respuesta inmunitaria antitumoral activa. Los marcadores tumorales y de proliferación, así como los genes implicados en la vía de señalización de IFN $\gamma$ , parecen estar regulados a la baja después del tratamiento en comparación con los mismos tumores previos al tratamiento, lo que podría indicar la resolución del tumor en pacientes con tumores CPR.

La regulación a la baja de la proliferación y los marcadores tumorales y la señalización de IFN $\gamma$  en muestras postratamiento de tumores CPR se contrasta con la sobreexpresión de genes relacionados con la infiltración de linfocitos, el procesamiento de antígenos y marcadores de células B, lo que posiblemente refleja una reducción de las células tumorales con una evolución a una respuesta inmunitaria más madura en la que las células B podrían estar adquiriendo un mayor protagonismo. Esto también se refleja con el descenso de la proporción de macrófagos M1 y linfocitos T foliculares. Esto parece concordar con estudios previos de nuestro grupo, en los que se encontraron agregados linfoides compatibles con estructuras linfoides terciarias (TLS, *tertiary lymphoid structures*) presentes en las muestras postratamiento de tumores CPR, con una gran infiltración de células inmunitarias<sup>102</sup>. Las estructuras linfoides terciarias son estructuras parecidas a órganos linfáticos ectópicos, formadas por agregados linfoides maduros conformados por grupos de linfocitos T y linfocitos B, además de centros germinales<sup>168,169</sup>. La formación de estas estructuras depende de la estimulación antigénica y representan una respuesta inmunitaria adaptativa en curso, por lo que se suelen encontrar en zonas donde se presente una inflamación crónica como puede ser en un tumor<sup>168</sup>. Además, la presencia de TLS y la infiltración de células B se ha asociado con la respuesta a la inmunoterapia en diferentes tumores sólidos<sup>170-172</sup> y con la expresión de genes relacionados con las células B y la respuesta inmunitaria<sup>173</sup>. Parece que la presencia de estos TLS parece generar una inmunidad protectora en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico<sup>174-178</sup> y es característica de la regresión del lecho tumoral en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con inmunoterapia neoadyuvante<sup>172</sup>.

No obstante, no se observó una mayor proporción relativa estimada de células B en las muestras postratamiento de pacientes con CPR, si no una mayor proporción estimada de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos T de memoria CD4<sup>+</sup> *resting*, lo que sugiere la existencia de una inmunidad protectora contra el tumor. Esto también coincide con el papel hipotético que juegan las TLS en el

mantenimiento de un microambiente de respuesta inmunitaria, propuesto por otros autores, debido a su asociación con la infiltración de linfocitos T CD8<sup>+</sup> 171,173.

Por otro lado, hubo pocas diferencias entre las muestras de tumores pareados de pacientes con tumores no-CPR, lo que denota una estimulación inmunitaria ineficaz después del tratamiento. De manera similar, no se observaron cambios en las proporciones celulares estimadas entre las muestras previas y posteriores al tratamiento, lo que indica un escenario menos activo inmunológicamente en los tumores no-CPR.

### Valor del estudio, limitaciones y direcciones futuras

Este estudio ha tratado de abordar la caracterización de los actores participantes del reconocimiento antigénico tumoral, y la implicación de estos como posibles biomarcadores en el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico con quimio-inmunoterapia neoadyuvante. Se ha llevado a cabo el estudio de biomarcadores “clásicos” como son el CMT y la expresión de PD-L1, concluyéndose que, a pesar de informar del estado inmunológico del tumor en el momento pretratamiento, no parecen funcionar de manera eficaz como biomarcadores de respuesta en todos los pacientes. Además, se ha propuesto el estudio de biomarcadores nuevos, como son el receptor de linfocitos T y la secuenciación masiva de ARN del microambiente tumoral.

En concreto, este trabajo ha pretendido darle un valor a la caracterización del TCR y a su papel como biomarcador por el reconocimiento directo que realiza de los antígenos tumorales y por su posible monitorización en sangre periférica. Además, el análisis de la expresión génica del microambiente tumoral permite la caracterización de éste y la identificación de patrones de expresión que se asocien con la respuesta completa al tratamiento neoadyuvante o con un mayor riesgo de recaídas posteriores. Un conocimiento completo del microambiente tumoral podría guiar el tratamiento de estos pacientes, pudiéndose implementar en la práctica clínica.

Una de las mayores limitaciones del estudio es el bajo número de pacientes analizados y el bajo número de respuestas patológicas no completas, lo que hace que la significancia estadística en algunos casos sea limitada. Además, al carecer de un grupo control no se puede determinar el valor predictivo o pronóstico de los biomarcadores descritos, o si los cambios producidos tras el tratamiento neoadyuvante son consecuencia exclusivamente de la inmunoterapia, de la quimioterapia, o de la combinación de ambas. En cualquier caso, nuestra cohorte es la más amplia y completa publicada hasta la fecha, siendo necesario esperar los posibles estudios

traslacionales derivados de ensayos randomizados fase II como NADIM II, o fase III como el Checkmate-816 <sup>126</sup>.

Otra de las limitaciones es la incapacidad de comprobar el mecanismo exacto por el cual los clones del top 1% se encuentran elevados en las muestras de tejido pretratamiento de los pacientes CPR, y las dinámicas presentadas por el repertorio de TCR durante el tratamiento tanto en tejido como en sangre periférica. Sin embargo, con respecto a ello se proponen diferentes hipótesis que pueden ser abordadas en trabajos posteriores sobre modelos animales y cohortes más amplias de pacientes y para las que se necesitará, eventualmente, la secuenciación de la cadena  $\alpha$  del TCR así como la caracterización de los antígenos para los que estos TCR secuenciados son específicos.

Por último, entre las direcciones futuras que se proponen con este trabajo se incluyen:

- la caracterización de los TCR específicos de antígenos tumorales, con lo que se podría llevar a cabo una monitorización en sangre en el tiempo que, eventualmente, serviría como biomarcador de las recaídas como ocurre con el uso del ADN circulante de tumor;
- la caracterización del receptor de linfocitos B y su papel en la respuesta inmunitaria y en la formación de las estructuras linfoides terciarias, para dilucidar el mecanismo por el cual se dan lugar estas formaciones en los tumores con CPR y su papel en prevenir las recaídas;
- la determinación de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, lo que daría una información precisa de cómo se está produciendo el reconocimiento antigénico y si una deficiencia en el mismo es la consecuencia por la que algunos tumores no responden al tratamiento con inmunoterapia.

Con todo ello se podrá alcanzar un conocimiento más completo y avanzado de la respuesta inmunitaria producida frente al tumor, por qué unos pacientes se pueden beneficiar de una manera más clara de la terapia que otros y cuáles son los mecanismos por los que se produce una progresión tras la intervención terapéutica.

# Capítulo 6

## Conclusiones

1. Una mayor expresión de PD-L1 en el tejido pretratamiento de los pacientes está relacionado con la respuesta patológica completa tras el tratamiento con quimio-inmunoterapia neoadyuvante, aunque su expresión no se relaciona ni con la supervivencia libre de progresión ni con la supervivencia global de los pacientes.
2. La carga mutacional tumoral no es un buen biomarcador predictivo de la respuesta en estos pacientes, ya que no se encuentra relacionado ni con la respuesta patológica, ni con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global.
3. Los tumores con respuesta patológica completa poseen una menor uniformidad en el repertorio del receptor de linfocitos T en tejido pretratamiento, que se traduce en un mayor espacio clonal ocupado por el top 1% de los clones más frecuentes.
4. El espacio clonal del top 1% es un biomarcador de respuesta completa y de supervivencia global en estos pacientes, mejorando la capacidad predictiva de PD-L1 y TMB.
5. Los tumores CPR presentan una expansión selectiva de los clones del top 1% pretratamiento de tejido en sangre indicando una posible inmunovigilancia periférica.
6. La presencia de una firma proinflamatoria de interferón gamma, caracterizada por la expresión de *IFNG*, *GZMB* y *NKG7* entre otros genes, en el tejido pretratamiento es característica de los tumores con respuesta patológica completa.
7. Los altos niveles de expresión de los genes *AKT*, *IFI6*, *BST2*, *OAS3*, *CD8B* e *IFI27* en tejido postratamiento de tumores no-CPR se relacionan con un mayor riesgo de recaída posterior, disminuyendo la supervivencia libre de progresión de estos pacientes.
8. Los tumores con CPR tienen una mayor respuesta inmunitaria al tratamiento que los tumores no-CPR, caracterizada por la expresión diferencial de al menos 74 genes entre los momentos de pre- y postratamiento.

# Bibliografía

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Clèries, R. *et al.* Contribution of changes in demography and in the risk factors to the predicted pattern of cancer mortality among Spanish women by 2022. *Cancer Epidemiol.* **40**, 113–118 (2016).
3. Schabath, M. B. & Cote, M. L. Cancer progress and priorities: Lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **28**, 1563–1579 (2019).
4. Alexandrov, L. B. *et al.* Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science (80-. ).* **354**, 618–622 (2016).
5. Rodríguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E. & Wistuba, I. I. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat. Res.* **170**, 25–46 (2016).
6. Desai, S. R. Lung cancer. *Lung Cancer* 1–169 (2006) doi:10.1017/CBO9780511545351.
7. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 169–181 (2007).
8. Romero, A. *et al.* Comprehensive cross-platform comparison of methods for non-invasive EGFR mutation testing: results of the RING observational trial. *Mol. Oncol.* **15**, 43–56 (2021).
9. Pérez-Barrios, C. *et al.* CtDNA from body fluids is an adequate source for EGFR biomarker testing in advanced lung adenocarcinoma. *Clin. Chem. Lab. Med.* **59**, 1221–1229 (2021).
10. Pao, W. *et al.* KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLOS Med.* **2**, e17 (2005).
11. Middleton, G. *et al.* The National Lung Matrix Trial of personalized therapy in lung cancer. *Nat.* 2020 5837818 **583**, 807–812 (2020).
12. Gridelli, C. *et al.* Non-small-cell lung cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 1–16 (2015).
13. Nooreldeen, R. & Bach, H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
14. De leyn, P. *et al.* Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* **45**, 787–798 (2014).
15. Goldstraw, P. *et al.* The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 39–51 (2016).
16. Postmus, P. E. *et al.* Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **28**, iv1–iv21 (2017).
17. Versteegen, N. E. *et al.* Patterns of disease recurrence after SABR for early stage non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1195–1200 (2015).

18. Cortés, Á. A., Urquizu, L. C. & Cubero, J. H. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: State-of-the-art. *Transl. Lung Cancer Res.* **4**, 191–197 (2015).
19. Forde, P. M. *et al.* Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer TL - 378. *N. Engl. J. Med.* **378 VN-**, 1976–1986 (2018).
20. Aupérin, A. *et al.* Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non - small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2181–2190 (2010).
21. Schiller, J. H. *et al.* Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 92–98 (2002).
22. Costa, D. B. *et al.* Clinical experience with crizotinib in patients with advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer and brain metastases. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1881–1888 (2015).
23. Peters, S. *et al.* Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK -Positive Non–Small-Cell Lung Cancer . *N. Engl. J. Med.* **377**, 829–838 (2017).
24. Camidge, D. R. *et al.* Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor–Naive Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial. *J. Thorac. Oncol.* **16**, 2091–2108 (2021).
25. Ou, S. H. I. *et al.* Continuation of Lorlatinib in ALK-Positive NSCLC Beyond Progressive Disease. *J. Thorac. Oncol.* **17**, 568–577 (2022).
26. Cappuzzo, F. *et al.* Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* **11**, 521–529 (2010).
27. Yang, J. C. H. *et al.* Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol.* **16**, 141–151 (2015).
28. Mok, T. S. *et al.* Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J. Clin. Oncol.* **36**, 2244–2250 (2018).
29. Ramalingam, S. S. *et al.* Osimertinib as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **36**, 841–849 (2018).
30. Shaw, A. T. *et al.* Lorlatinib in advanced ROS1-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, open-label, single-arm, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol.* **20**, 1691–1701 (2019).
31. Planchard, D. *et al.* Dabrafenib in patients with BRAFV600E-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 642–650 (2016).
32. Reck, M. *et al.* Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1823–1833 (2016).
33. Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1627–1639 (2015).
34. Burdett, S. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet* **383**, 1561–1571 (2014).
35. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology - 10th



Edition. 600 (2021).

36. Turner, S. J., Doherty, P. C., McCluskey, J. & Rossjohn, J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 883–894 (2006).
37. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214–218 (2013).
38. Rizvi, N. A. *et al.* Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (80-. )*. **348**, 124–128 (2015).
39. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
40. Boon, T., Cerottini, J. C., Van Den Eynde, B., Van Der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 337–365 (1994).
41. Havel, J. J., Chowell, D. & Chan, T. A. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* (2019) doi:10.1038/s41568-019-0116-x.
42. Heemskerk, B., Kvistborg, P. & Schumacher, T. N. M. The cancer antigenome. *EMBO J.* **32**, 194–203 (2013).
43. Coulie, P. G., Van Den Eynde, B. J., Van Der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 135–146 (2014).
44. Robbins, P. F. *et al.* Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J. Clin. Oncol.* **29**, 917–924 (2011).
45. Lu, Y. C. *et al.* Treatment of patients with metastatic cancer using a major histocompatibility complex class II-restricted T-cell receptor targeting the cancer germline antigen MAGE-A3. *J. Clin. Oncol.* **35**, 3322–3329 (2017).
46. Sadelain, M., Rivière, I. & Brentjens, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 35–45 (2003).
47. Jardim, D. L., Goodman, A., de Melo Gagliato, D. & Kurzrock, R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell* **39**, 154–173 (2021).
48. Neefjes, J., Jongstra, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836 (2011).
49. Trowsdale, J. HLA genomics in the third millennium. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 498–504 (2005).
50. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H. & Kulski, J. K. The HLA genomic loci map: Expression, interaction, diversity and disease. *J. Hum. Genet.* **54**, 15–39 (2009).
51. La Gruta, N. L., Gras, S., Daley, S. R., Thomas, P. G. & Rossjohn, J. Understanding the drivers of MHC restriction of T cell receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 467–478 (2018).
52. Perea, F. *et al.* The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int. J. Cancer* **140**, 888–899 (2017).

53. Gaud, G., Lesourne, R. & Love, P. E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 485–497 (2018).
54. Poran, A. *et al.* Combined TCR Repertoire Profiles and Blood Cell Phenotypes Predict Melanoma Patient Response to Personalized Neoantigen Therapy plus Anti-PD-1. *Cell Reports Med.* **1**, 100141 (2020).
55. Page, D. B. *et al.* Deep Sequencing of T-cell Receptor DNA as a Biomarker of Clonally Expanded TILs in Breast Cancer after Immunotherapy. *Cancer Immunol Res* **4**, (2016).
56. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
57. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
58. Sharpe, A. H. & Pauken, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 153–167 (2018).
59. Jhunjhunwala, S., Hammer, C. & Delamarre, L. Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nat. Rev. Cancer* **21**, 298–312 (2021).
60. Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D. & Rock, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
61. Roberts, E. W. *et al.* Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* **30**, 324–336 (2016).
62. Rosenthal, R. *et al.* Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature* **567**, 479–485 (2019).
63. Anagnostou, V. *et al.* Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **7**, 264–276 (2017).
64. Shukla, S. A. *et al.* Comprehensive analysis of cancer-associated somatic mutations in class I HLA genes. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1152–1158 (2015).
65. McGranahan, N. *et al.* Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* **171**, 1259-1271.e11 (2017).
66. Aptsiauri, N., Ruiz-Cabello, F. & Garrido, F. The transition from HLA-I positive to HLA-I negative primary tumors: the road to escape from T-cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* **51**, 123–132 (2018).
67. Castro, A. *et al.* Elevated neoantigen levels in tumors with somatic mutations in the HLA-A, HLA-B, HLA-C and B2M genes. *BMC Med. Genomics* **12**, 1–13 (2019).
68. Garrido, M. A., Perea, F., Vilchez, J. R., Rodríguez, T. & Anderson, P. Loss of heterozygosity of HLA class I and  $\beta 2$ -microglobulin genes is an early and widespread mechanism of cancer immune escape. 1–16 (2021).
69. Gao, J. *et al.* Loss of IFN- $\gamma$  Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell* **167**, 397-404.e9 (2016).
70. Wong, G. H., Clark-Lewis, I., McKimm-Breschkin, L., Harris, A. W. & Schrader, J. W. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *J. Immunol.* **131**, (1983).

71. Iwai, Y. *et al.* 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.* **99**, 12293–12297 (2002).
72. Liu, Y., Zeng, B., Zhang, Z., Zhang, Y. & Yang, R. B7-H1 on myeloid-derived suppressor cells in immune suppression by a mouse model of ovarian cancer. *Clin. Immunol.* **129**, 471–481 (2008).
73. Taube, J. M. *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci. Transl. Med.* **4**, (2012).
74. Joost Lesterhuis, W. *et al.* Dynamic versus static biomarkers in cancer immune checkpoint blockade: Unravelling complexity. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 264–272 (2017).
75. Camidge, D. R., Doebele, R. C. & Kerr, K. M. Comparing and contrasting predictive biomarkers for immunotherapy and targeted therapy of NSCLC. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 341–355 (2019).
76. Gandara, D. R. *et al.* Atezolizumab Treatment Beyond Progression in Advanced NSCLC: Results From the Randomized, Phase III OAK Study. *J. Thorac. Oncol.* **13**, 1906–1918 (2018).
77. Antonia, S. J. *et al.* Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2342–2350 (2018).
78. Herbst, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540–1550 (2016).
79. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
80. Sezer, A. *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* **397**, 592–604 (2021).
81. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nat.* 2014 5157528 **515**, 563–567 (2014).
82. Lantuejoul, S. *et al.* PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J. Thorac. Oncol.* **15**, 499–519 (2020).
83. Herbst, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540–1550 (2016).
84. Carbone, D. P. *et al.* First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 2415–2426 (2017).
85. Topalian, S. L. *et al.* Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
86. Jia, Q. *et al.* Local mutational diversity drives intratumoral immune heterogeneity in non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **9**, 1–10 (2018).
87. Samstein, R. M. *et al.* Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy

- across multiple cancer types. *Nat. Genet.* **51**, 202–206 (2019).
88. Chan, T. A. *et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: Utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* **30**, 44–56 (2019).
  89. Yarchoan, M., Hopkins, A. & Jaffee, E. M. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2500–2501 (2017).
  90. Hellmann, M. D. *et al.* Nivolumab plus ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N. Engl. J. Med.* **378**, 2093–2104 (2018).
  91. McGrail, D. J. *et al.* High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann. Oncol.* **32**, 661–672 (2021).
  92. Anagnostou, V. *et al.* Multimodal genomic features predict outcome of immune checkpoint blockade in non-small-cell lung cancer. *Nat. Cancer* **1**, (2020).
  93. Chowell, D. *et al.* Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science (80-. ).* **359**, 582–587 (2018).
  94. Hillen, N. *et al.* Essential differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2993–3003 (2008).
  95. Shim, J. H. *et al.* HLA-corrected tumor mutation burden and homologous recombination deficiency for the prediction of response to PD-(L)1 blockade in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* **31**, 902–911 (2020).
  96. Riaz, N. *et al.* Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. *Cell* **171**, 934-949.e15 (2017).
  97. Tumei, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nat.* 2014 5157528 **515**, 568–571 (2014).
  98. Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**, 321–330 (2017).
  99. Arlauckas, S. P. *et al.* In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaal3604 (2017).
  100. Voong, K. R., Feliciano, J., Becker, D. & Levy, B. Beyond PD-L1 testing-emerging biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann. Transl. Med.* **5**, (2017).
  101. Parra, E. R. *et al.* Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
  102. Provencio, M. *et al.* Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **21**, 1413–1422 (2020).
  103. Pagès, F. *et al.* International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* **391**, 2128–2139 (2018).
  104. Boscolo, A. *et al.* Combined Immunoscore for Prognostic Stratification of Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 1963 (2020).

105. Liu, R. *et al.* Influence of Tumor Immune Infiltration on Immune Checkpoint Inhibitor Therapeutic Efficacy: A Computational Retrospective Study. *Front. Immunol.* **12**, 1–15 (2021).
106. Rocha, P. *et al.* Distinct immune gene programs associated with host tumor immunity, neoadjuvant chemotherapy and chemoimmunotherapy in resectable NSCLC. *Clin. Cancer Res.* (2022) doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-3207.
107. Newman, A. M. *et al.* Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat. Biotechnol.* **37**, 773–782 (2019).
108. Schrama, D., Ritter, C. & Becker, J. C. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Semin. Immunopathol.* **39**, 255–268 (2017).
109. Ruggiero, E. *et al.* High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nat. Commun.* **6**, 1–7 (2015).
110. Kidman, J. *et al.* Characteristics of TCR Repertoire Associated With Successful Immune Checkpoint Therapy Responses. *Front. Immunol.* **11**, 1–11 (2020).
111. Joshi, K. *et al.* Spatial heterogeneity of the T cell receptor repertoire reflects the mutational landscape in lung cancer. *Nat. Med.* **25**, 1549–1559 (2019).
112. Reuben, A. *et al.* TCR Repertoire Intratumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas: An Association with Predicted Neoantigen Heterogeneity and Postsurgical Recurrence. *Cancer Discov.* **7**, 1088–1097 (2017).
113. Reuben, A. *et al.* Comprehensive T cell repertoire characterization of non-small cell lung cancer. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
114. Zhang, J. *et al.* Compartmental analysis of T cell clonal dynamics as a function of pathologic response to neoadjuvant PD-1 blockade in resectable non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **26**, clincanres.2931.2019 (2019).
115. Dong, N. *et al.* Characterization of Circulating T Cell Receptor Repertoire Provides Information about Clinical Outcome after PD-1 Blockade in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. (2021).
116. Hogan, S. A. *et al.* Peripheral Blood TCR Repertoire Profiling May Facilitate Patient Stratification for Immunotherapy against Melanoma. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 77–85 (2019).
117. Han, J. *et al.* TCR repertoire diversity of peripheral PD-1+CD8+ T cells predicts clinical outcomes after immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Res.* canimm.0398.2019 (2019) doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0398.
118. Thunnissen, E., de Langen, A. J. & Smit, E. F. PD-L1 IHC in NSCLC with a global and methodological perspective. *Lung Cancer* **113**, 102–105 (2017).
119. Liu, X. Classification accuracy and cut point selection. *Stat. Med.* **31**, 2676–2686 (2012).
120. Real, R. & Vargas, J. M. The Probabilistic Basis of Jaccard's Index of Similarity. *Syst. Biol.* **45**, 380–385 (1996).
121. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).
122. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for

- interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 15545–15550 (2005).
123. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **2003** *343* **34**, 267–273 (2003).
  124. Forde, P. M. *et al.* Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1976–1986 (2018).
  125. Provencio, M. *et al.* Overall Survival and Biomarker Analysis of Neoadjuvant Nivolumab Plus Chemotherapy in Operable Stage IIIA Non – Small-Cell Lung Cancer ( NADIM phase II trial ) original reports abstract. (2022) doi:10.1200/JCO.21.02660.
  126. Forde, P. M. *et al.* Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *NEJM* (2022) doi:10.1056/NEJM0A2202170.
  127. Taube, J. M. *et al.* Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res.* **20**, 5064–5074 (2014).
  128. Daud, A. I. *et al.* Programmed death-ligand 1 expression and response to the anti-programmed death 1 antibody pembrolizumab in melanoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 4102–4109 (2016).
  129. Tang, H. *et al.* PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade–mediated tumor regression. *J. Clin. Invest.* **128**, 580–588 (2018).
  130. Zhang, L. *et al.* Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 203–213 (2003).
  131. Herbst, R. S. *et al.* Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **383**, 1328–1339 (2020).
  132. Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A. & Pardoll, D. M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 275–287 (2016).
  133. Marabelle, A. *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.* **21**, 1353–1365 (2020).
  134. Kwiatkowski, D. J. *et al.* Neoadjuvant atezolizumab in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim analysis and biomarker data from a multicenter study (LCMC3). [https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15\\_suppl.8503](https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.8503) **37**, 8503–8503 (2019).
  135. Provencio, M., Calvo, V., Romero, A., Spicer, J. D. & Cruz-Bermúdez, A. Treatment Sequencing in Resectable Lung Cancer: The Good and the Bad of Adjuvant Versus Neoadjuvant Therapy. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* 1–18 (2022) doi:10.1200/EDBK\_358995.
  136. Sha, D. *et al.* Tumor mutational burden as a predictive biomarker in solid tumors. *Cancer Discov.* **10**, 1808–1825 (2020).
  137. Meléndez, B. *et al.* Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Transl. Lung Cancer Res.* **7**, 661–667 (2018).

138. Rizvi, H. *et al.* Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J. Clin. Oncol.* **36**, 633–641 (2018).
139. Frank, R. *et al.* Clinical and pathological characteristics of KEAP1- and NFE2L2-mutated Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC). *Clin. Cancer Res.* **24**, 3087–3096 (2018).
140. Bhateja, P. *et al.* Retinoblastoma mutation predicts poor outcomes in advanced non small cell lung cancer. *Cancer Med.* **8**, 1459–1466 (2019).
141. Aversa, I., Malanga, D., Fiume, G. & Palmieri, C. Molecular T-cell repertoire analysis as source of prognostic and predictive biomarkers for checkpoint blockade immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
142. Danilova, L. *et al.* The mutation-associated neoantigen functional expansion of specific T cells (MANAFEST) assay: A sensitive platform for monitoring antitumor immunity. *Cancer Immunol. Res.* **6**, 888–899 (2018).
143. Faham, M. *et al.* Improved Survival with T Cell Clonotype Stability After Anti-CTLA-4 Treatment in Cancer Patients. *Sci. Transl. Med.* **6**, 238ra70-238ra70 (2014).
144. Cui, J. H. *et al.* TCR repertoire as a novel indicator for immune monitoring and prognosis assessment of patients with cervical cancer. *Front. Immunol.* **9**, 2729 (2018).
145. Binnewies, M. *et al.* Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat. Med.* **24**, 541–550 (2018).
146. Palermo, B. *et al.* Antigen-specificity and DTIC before peptide-vaccination differently shape immune-checkpoint expression pattern, anti-tumor functionality and TCR repertoire in melanoma patients. *Oncoimmunology* **7**, e1465163 (2018).
147. Inoue, H. *et al.* Intratumoral expression levels of *PD-L1*, *GZMA*, and *HLA-A* along with oligoclonal T cell expansion associate with response to nivolumab in metastatic melanoma. *Oncoimmunology* **5**, e1204507 (2016).
148. Ott, P. A. *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.* **37**, 318–327 (2019).
149. Yost, K. E. *et al.* Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *bioRxiv* 648899 (2019) doi:10.1101/648899.
150. Bassez, A. *et al.* A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer. *Nature Medicine* vol. 27 (Springer US, 2021).
151. Anagnostou, V. *et al.* Dynamics of Tumor and Immune Responses during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **79**, 1214–1225 (2019).
152. Laza-Briviesca, R. *et al.* Blood biomarkers associated to complete pathological response on NSCLC patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy included in NADIM clinical trial. *Clin. Transl. Med.* **11**, (2021).
153. Ni, L. & Lu, J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med.* **7**, 4509–4516 (2018).
154. Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 836–848 (2006).

155. Ayers, M. *et al.* IFN- $\gamma$ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J. Clin. Invest.* **127**, 2930–2940 (2017).
156. Dizier, B. *et al.* A Th1/IFNG gene signature is prognostic in the adjuvant setting of resectable high-risk melanoma but not in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **26**, 1725–1735 (2020).
157. Karachaliou, N. *et al.* Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, (2018).
158. Ng, S. S. *et al.* The NK cell granule protein NKG7 regulates cytotoxic granule exocytosis and inflammation. *Nat. Immunol.* **21**, 1205–1218 (2020).
159. Tan, A. C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac. Cancer* **11**, 511–518 (2020).
160. Fang, W. *et al.* PI3K-AKT-mTOR pathway alterations in advanced NSCLC patients after progression on EGFR-TKI and clinical response to EGFR-TKI plus everolimus combination therapy. *Transl. Lung Cancer Res.* **9**, 1258–1267 (2020).
161. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 134–147 (2018).
162. Wang, W. *et al.* The role of neutrophil extracellular traps in cancer metastasis. *Clin. Transl. Med.* **10**, 2–5 (2020).
163. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-. ).* **303**, 1532–1535 (2004).
164. Demers, M. *et al.* Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13076–13081 (2012).
165. Wculek, S. K. & Malanchi, I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nat.* 2015 5287582 **528**, 413–417 (2015).
166. Fang, C. *et al.* A innovative prognostic symbol based on neutrophil extracellular traps (NETs)-related lncRNA signature in non-small-cell lung cancer. *Aging (Albany. NY).* **13**, 17864–17879 (2021).
167. de Andrea, C. E. *et al.* Heterogenous presence of neutrophil extracellular traps in human solid tumours is partially dependent on IL-8. *J. Pathol.* **255**, 190–201 (2021).
168. Colbeck, E. J., Ager, A., Gallimore, A. & Jones, G. W. Tertiary lymphoid structures in cancer: Drivers of antitumor immunity, immunosuppression, or Bystander Sentinels in disease? *Front. Immunol.* **8**, 1–18 (2017).
169. Goc, J., Fridman, W. H., Sautès-Fridman, C. & Dieu-Nosjean, M. C. Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers. <https://doi.org/10.4161/onci.26836> **2**, 1–9 (2013).
170. Vanhersecke, L. *et al.* Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of PD-L1 expression. *Nat. Cancer* **2**, 794–802 (2021).
171. Cabrita, R. *et al.* Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* **577**, 561–565 (2020).



172. Cottrell, T. R. *et al.* Pathologic features of response to neoadjuvant anti-PD-1 in resected non-small-cell lung carcinoma: A proposal for quantitative immune-related pathologic response criteria (irPRC). *Ann. Oncol.* **29**, 1853–1860 (2018).
173. Helmink, B. A. *et al.* B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* **577**, 549–555 (2020).
174. Feng, Z. *et al.* Integrated bioinformatics analysis of differentially expressed genes and immune cell infiltration characteristics in Esophageal Squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **11**, 1–14 (2021).
175. Germain, C. *et al.* Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 832–844 (2014).
176. Germain, C. *et al.* Tertiary Lymphoid Structure-B Cells Narrow Regulatory T Cells Impact in Lung Cancer Patients. *Front. Immunol.* **12**, 1–14 (2021).
177. Tang, J. *et al.* B cells and tertiary lymphoid structures influence survival in lung cancer patients with resectable tumors. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–17 (2020).
178. Dieu-Nosjean, M. C. *et al.* Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4410–4417 (2008).

# Anexos

## ANEXO I. Material suplementario

Tabla 1. Tabla con características de los pacientes y técnicas realizadas

Paciente	Respuesta patológica	SLP	Estado *	SG	Estado*	PD-L1 TPS PRE	CMT PRE	RNA-seq PRE **	RNA-seq POST **	Secuenciación TCR					
										Sangre periférica		Muestras tejido			
										PRE **	POST **	PRE **	Tumor/ganglio	POST **	Tumor/ganglio
1	N/A	45,7	0	45,7	0	40%	5,05	1	0	0	0	1	Tumor	0	N/A
2	CPR	46,8	0	46,8	0	90%	4,21	1	1	0	0	1	Tumor	1	Tumor
4	CPR	44,8	0	44,8	0	N/A	N/A	0	1	0	0	0	N/A	1	Tumor
6	IPR	46,3	0	46,3	0	N/A	12,57	0	1	0	0	0	N/A	1	Tumor
7	CPR	46,1	0	46,1	0	25%	5,88	0	1	0	0	1	Ganglio 7	1	Tumor
9	CPR	43,6	0	43,6	0	N/A	N/A	0	1	0	0	0	N/A	1	Tumor
11	CPR	44,8	0	44,8	0	N/A	N/A	0	0	0	0	0	N/A	0	N/A
12	IPR	43,6	0	43,6	0	5%	5,88	1	1	0	0	1	Tumor	1	Tumor
13	CPR	17,5	1	43,0	0	100%	2,52	0	1	0	0	1	Ganglio 4R	1	Tumor
14	CPR	42,0	0	42,0	0	100%	9,25	1	1	0	0	1	Tumor	1	Tumor
15	CPR	40,9	0	40,9	0	N/A	73,95	0	1	0	1	0	N/A	1	Tumor
16	CPR	40,7	0	40,7	0	N/A	N/A	0	1	0	1	0	N/A	1	Tumor
17	CPR	41,5	0	41,5	0	N/A	N/A	0	0	0	1	0	N/A	1	Tumor
18	N/A	22,9	1	23,2	1	N/A	N/A	0	0	0	0	0	N/A	0	N/A
19	CPR	38,9	0	38,9	0	60%	N/A	0	1	0	1	0	N/A	1	Tumor
20	CPR	40,1	0	40,1	0	80%	7,56	1	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
21	IPR	8,8	1	26,1	1	0%	1,68	0	1	1	1	1	Ganglio 7	1	Tumor
22	CPR	37,7	0	37,7	0	80%	1,68	0	1	1	1	1	Ganglio 7	1	Tumor
23	MPR	39,3	0	39,3	0	75%	3,36	1	1	1	1	1	Tumor	1	Tumor
24	CPR	39,6	0	39,6	0	0%	5,89	1	1	1	1	1	Tumor	1	Tumor
26	CPR	40,4	0	40,4	0	N/A	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Ganglio 4R
27	IPR	12,3	1	17,3	1	0%	5,06	1	1	1	1	1	Tumor	1	Tumor
28	MPR	21,4	1	38,0	0	0%	17,62	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
29	IPR	16,9	1	36,7	0	10%	3,36	0	1	1	1	1	Ganglio 4R	1	Tumor
30	MPR	36,8	0	36,8	0	0%	1,69	0	1	0	1	1	Ganglio 4R	1	Ganglio 4
31	N/A	37,4	0	37,4	0	0%	6,71	1	0	1	1	1	Tumor	0	N/A
32	CPR	26,2	1	26,2	1	N/A	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
33	MPR	29,5	1	35,8	1	N/A	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
34	CPR	37,5	0	37,5	0	60%	24,36	1	1	1	1	1	Tumor	1	Tumor
35	CPR	25,3	1	25,3	1	0%	37,63	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
36	CPR	36,4	0	36,4	0	100%	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
37	MPR	22,1	1	36,3	1	50%	7,57	1	0	1	1	1	Tumor	0	N/A
38	CPR	37,0	0	37,0	0	0%	6,72	0	1	1	1	1	Ganglio 4R	1	Tumor
39	MPR	36,4	0	36,4	0	N/A	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
40	CPR	34,8	0	34,8	0	N/A	16,83	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
42	CPR	34,5	0	34,5	0	0%	5,88	1	0	1	1	0	N/A	0	N/A
43	IPR	35,1	0	35,1	0	0%	6,72	1	1	1	1	1	Tumor	1	Tumor
44	N/A	3,8	1	13,0	1	N/A	24,39	0	0	1	1	0	N/A	0	N/A
45	IPR	34,2	0	34,2	0	N/A	N/A	0	1	1	1	1	Ganglio 4R	1	Tumor
46	CPR	34,0	1	34,1	0	N/A	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
47	CPR	34,9	0	34,9	0	N/A	N/A	1	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
48	CPR	35,5	0	35,5	0	100%	N/A	1	1	1	1	1	Tumor	1	Tumor
49	MPR	34,5	0	34,5	0	10%	8,42	0	1	1	1	0	N/A	1	Ganglio 10
50	MPR	34,5	0	34,5	0	N/A	N/A	0	1	1	1	0	N/A	1	Tumor
51	CPR	27,3	1	32,9	0	60%	3,36	1	0	1	1	1	Tumor	1	Tumor
52	N/A	4,7	1	7,8	1	75%	4,20	0	0	1	1	1	Ganglio 4R	0	N/A

N/A: no aplica

\* 0 = no progresión, no fallecimiento; 1= progresión/fallecimiento

\*\* 0 = no existe muestra, ni dato; 1 = existe muestra y dato

Tabla 2. Genes analizados con el panel de RNA-seq y set de GSEA

Gen	Nombre NCBI	Acceso NCBI	Set genes GSEA
ADGRE5	adhesion G protein-coupled receptor E5	NM_078481	Adhesión, migración
CD226	CD226 molecule	NM_006566	Adhesión, migración
CD38	CD38 molecule	NM_001775	Adhesión, migración
CD44	CD44 molecule Indian blood group	NM_000610	Adhesión, migración
CD47	CD47 molecule	NM_001777	Adhesión, migración
CD53	CD53 molecule	NM_001040033	Adhesión, migración
IGF1R	insulin like growth factor 1 receptor	NM_000875	Adhesión, migración
ITGA1	integrin subunit alpha 1	NM_181501	Adhesión, migración
ITGAE	integrin subunit alpha E	NM_002208	Adhesión, migración
ITGB1	integrin subunit beta 1	NM_002211	Adhesión, migración
MADCAM1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1	NM_130760	Adhesión, migración
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	NM_181351	Adhesión, migración
NECTIN2	nectin cell adhesion molecule 2	NM_001042724	Adhesión, migración
PECAM1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1	NM_000442	Adhesión, migración
CD1C	CD1c molecule	NM_001765	Presentación antigénica
CD1D	CD1d molecule	NM_001766	Presentación antigénica
CD83	CD83 molecule	NM_004233	Presentación antigénica
CD74	CD74 molecule	NM_001025159	Procesamiento antigénico
HLA-A	major histocompatibility complex class I A	NM_002116	Procesamiento antigénico
HLA-B	major histocompatibility complex class I B	NM_005514	Procesamiento antigénico
HLA-C	major histocompatibility complex class I C	NM_002117	Procesamiento antigénico
HLA-DMA	major histocompatibility complex class II DM alpha	NM_006120	Procesamiento antigénico
HLA-DMB	major histocompatibility complex class II DM beta	NM_002118	Procesamiento antigénico
HLA-DOA	major histocompatibility complex class II DQ alpha	NM_002119	Procesamiento antigénico
HLA-DOB	major histocompatibility complex class II DO beta	NM_002120	Procesamiento antigénico
HLA-DPA1	major histocompatibility complex class II DP alpha 1	NM_033554	Procesamiento antigénico
HLA-DPB1	major histocompatibility complex class II DP beta 1	NM_002121	Procesamiento antigénico
HLA-DQA1	major histocompatibility complex class II DQ alpha 1	NM_002122	Procesamiento antigénico
HLA-DQA2	major histocompatibility complex class II DQ alpha 2	NM_020056	Procesamiento antigénico
HLA-DQB2	major histocompatibility complex class II DQ beta 2	NM_001198858	Procesamiento antigénico
HLA-DRA	major histocompatibility complex class II DR alpha	NM_019111	Procesamiento antigénico
HLA-DRB1	major histocompatibility complex class II DR beta 1	NM_002124	Procesamiento antigénico
HLA-E	major histocompatibility complex class I E	NM_005516	Procesamiento antigénico
HLA-F	major histocompatibility complex class I F	NM_001098479	Procesamiento antigénico
HLA-F-AS1	HLA-F antisense RNA 1	NR_026972	Procesamiento antigénico
HLA-G	major histocompatibility complex class I G	NM_002127	Procesamiento antigénico
BCL2	B-cell CLL lymphoma 2	NM_000633	Apoptosis
BCL2L11	BCL2 like 11	NM_138621	Apoptosis
GADD45GIP1	GADD45G interacting protein 1	NM_052850	Apoptosis
TNFSF10	tumor necrosis factor superfamily member 10	NM_003810	Apoptosis
CD19	CD19 molecule	NM_001178098	Marcador linfocitos B
CD22	CD22 molecule	NM_001771	Marcador linfocitos B
FCGR1A	Fc fragment of IgG receptor Ia	NM_000566	Marcador linfocitos B
FCGR2B	Fc fragment of IgG receptor IIb	NM_004001	Marcador linfocitos B
FCRLA	Fc receptor like A	NM_001184866	Marcador linfocitos B
JCHAIN	joining chain of multimeric IgA and IgM	NM_144646	Marcador linfocitos B
NTN3	netrin 3	NM_006181	Marcador linfocitos B
POU2AF1	POU class 2 associating factor 1	NM_006235	Marcador linfocitos B
SKAP2	src kinase associated phosphoprotein 2	NM_003930	Marcador linfocitos B
TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor superfamily member 17	NM_001192	Marcador linfocitos B
TNFSF13B	tumor necrosis factor superfamily member 13b	NM_006573	Marcador linfocitos B
CD79A	CD79a molecule	NM_001783	Señalización receptor linfocitos B
CD79B	CD79b molecule	NM_001039933	Señalización receptor linfocitos B
FAS	Fas cell surface death receptor	NM_000043	Señalización receptor linfocitos B
ADORA2A	adenosine A2a receptor	NM_000675	Punto de control inmunitario
BTLA	B and T lymphocyte associated	NM_181780	Punto de control inmunitario
C10orf54	chromosome 10 open reading frame 54	NM_022153	Punto de control inmunitario
CD160	CD160 molecule	NM_007053	Punto de control inmunitario
CD244	CD244 molecule	NM_001166663	Punto de control inmunitario
CD274	CD274 molecule	NM_014143	Punto de control inmunitario
CD276	CD276 molecule	NM_001024736	Punto de control inmunitario
CD28	CD28 molecule	NM_006139	Punto de control inmunitario
CD48	CD48 molecule	NM_001778	Punto de control inmunitario
CD69	CD69 molecule	NM_001781	Punto de control inmunitario
CD80	CD80 molecule	NM_005191	Punto de control inmunitario
CD86	CD86 molecule	NM_175862	Punto de control inmunitario
CEACAM1	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1	NM_001712	Punto de control inmunitario
ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	NM_001098175	Punto de control inmunitario
EOMES	eomesodermin	NM_005442	Punto de control inmunitario
HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2	NM_032782	Punto de control inmunitario
ICOS	inducible T-cell costimulator	NM_012092	Punto de control inmunitario
ICOSLG	inducible T-cell costimulator ligand	NM_015259	Punto de control inmunitario
IDO2	indoleamine 23-dioxygenase 2	NM_194294	Punto de control inmunitario
NT5E	5-nucleotidase ecto	NM_002526	Punto de control inmunitario
PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2	NM_025239	Punto de control inmunitario

Gen	Nombre NCBI	Acceso NCBI	Set genes GSEA
PVR	poliovirus receptor	NM_006505	Punto de control inmunitario
TDO2	tryptophan 23-dioxygenase	NM_005651	Punto de control inmunitario
TGFB1	transforming growth factor beta 1	NM_000660	Punto de control inmunitario
TNF	tumor necrosis factor	NM_000594	Punto de control inmunitario
TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily member 14	NM_003820	Punto de control inmunitario
TNFSF14	tumor necrosis factor superfamily member 14	NM_003807	Punto de control inmunitario
TNFSF18	tumor necrosis factor superfamily member 18	NM_005092	Punto de control inmunitario
TNFSF4	tumor necrosis factor superfamily member 4	NM_003326	Punto de control inmunitario
VTCN1	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1	NM_024626	Punto de control inmunitario
CCL17	C-C motif chemokine ligand 17	NM_002987	Señalización de quimiocinas
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	NM_004591	Señalización de quimiocinas
CCL22	C-C motif chemokine ligand 22	NM_002990	Señalización de quimiocinas
CCR4	C-C motif chemokine receptor 4	NM_005508	Señalización de quimiocinas
CCR6	C-C motif chemokine receptor 6	NM_004367	Señalización de quimiocinas
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	NM_001511	Señalización de quimiocinas
CXCR2	C-X-C motif chemokine receptor 2	NM_001557	Señalización de quimiocinas
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3	NM_001504	Señalización de quimiocinas
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1	NM_000265	Señalización de quimiocinas
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	NM_001171623	Señalización de quimiocinas
CCR1	C-C motif chemokine receptor 1	NM_001295	Señalización de citoquinas
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor	NM_005211	Señalización de citoquinas
CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor beta common subunit	NM_000395	Señalización de citoquinas
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	NM_000584	Señalización de citoquinas
HGF	hepatocyte growth factor	NM_000601	Señalización de citoquinas
IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	NM_001547	Señalización de citoquinas
IL13	interleukin 13	NM_002188	Señalización de citoquinas
IL1A	interleukin 1 alpha	NM_000575	Señalización de citoquinas
IL21	interleukin 21	NM_021803	Señalización de citoquinas
IL2RA	interleukin 2 receptor subunit alpha	NM_000417	Señalización de citoquinas
IL4	interleukin 4	NM_000589	Señalización de citoquinas
IL6	interleukin 6	NM_000600	Señalización de citoquinas
IL7	interleukin 7	NM_000880	Señalización de citoquinas
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	NM_003152	Señalización de citoquinas
TNFSF9	tumor necrosis factor superfamily member 9	NM_003811	Señalización de citoquinas
CLEC4C	C-type lectin domain family 4 member C	NM_130441	Células dendríticas
HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	NM_017912	Células dendríticas
IL3RA	interleukin 3 receptor subunit alpha	NM_002183	Células dendríticas
ITGAX	integrin subunit alpha X	NM_000887	Células dendríticas
NRP1	neuropilin 1	NM_003873	Células dendríticas
TLR3	toll like receptor 3	NM_003265	Células dendríticas
ZBTB46	zinc finger and BTB domain containing 46	NM_025224	Células dendríticas
CD14	CD14 molecule	NM_000591	Células dendríticas & Macrófagos
CD209	CD209 molecule	NM_021155	Células dendríticas & Macrófagos
CMKLR1	chemerin chemokine-like receptor 1	NM_001142345	Células dendríticas & Macrófagos
IL17F	interleukin 17F	NM_052872	Células dendríticas & Macrófagos
IL23A	interleukin 23 subunit alpha	NM_016584	Células dendríticas & Macrófagos
MRC1	mannose receptor C type 1	NM_002438	Células dendríticas & Macrófagos
CD27	CD27 molecule	NM_001242	Diana terapéutica
CD40	CD40 molecule	NM_001250	Diana terapéutica
CD70	CD70 molecule	NM_001252	Diana terapéutica
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4	NM_005214	Diana terapéutica
IDO1	indoleamine 23-dioxygenase 1	NM_002164	Diana terapéutica
IL10	interleukin 10	NM_000572	Diana terapéutica
IL12A	interleukin 12A	NM_000882	Diana terapéutica
IL12B	interleukin 12B	NM_002187	Diana terapéutica
IL2	interleukin 2	NM_000586	Diana terapéutica
KIR2DL1	killer cell immunoglobulin like receptor two Ig domains and long cytoplasmic tail 1	NM_014218	Diana terapéutica
KLRD1	killer cell lectin like receptor D1	NM_002262	Diana terapéutica
LAG3	lymphocyte activating 3	NM_002286	Diana terapéutica
MS4A1	membrane spanning 4-domains A1	NM_021950	Diana terapéutica
PDCD1	programmed cell death 1	NM_005018	Diana terapéutica
PMEL	premelanosome protein	NM_006928	Diana terapéutica
SLAMF7	SLAM family member 7	NM_021181	Diana terapéutica
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	NM_139276	Diana terapéutica
TLR9	toll like receptor 9	NM_017442	Diana terapéutica
TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily member 18	NM_004195	Diana terapéutica
TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily member 4	NM_003327	Diana terapéutica
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	NM_001561	Diana terapéutica
BATF	basic leucine zipper ATF-like transcription factor	NM_006399	Linfocitos T helper
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2	NM_001123396	Linfocitos T helper
CD4	CD4 molecule	NM_000616	Linfocitos T helper
GATA3	GATA binding protein 3	NM_001002295	Linfocitos T helper
IL17A	interleukin 17A	NM_002190	Linfocitos T helper
RORC	RAR related orphan receptor C	NM_005060	Linfocitos T helper
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4	NM_003151	Linfocitos T helper
STAT6	signal transducer and activator of transcription 6	NM_003153	Linfocitos T helper
ABCF1	ATP binding cassette subfamily F member 1	NM_001025091	Genes constitutivos
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	NM_000402	Genes constitutivos

Gen	Nombre NCBI	Acceso NCBI	Set genes GSEA
GUSB	glucuronidase beta	NM_000181	Genes constitutivos
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	NM_000190	Genes constitutivos
LMNA	lamin A C	NM_170707	Genes constitutivos
LRP1	LDL receptor related protein 1	NM_002332	Genes constitutivos
POLR2A	polymerase RNA II subunit A	NM_000937	Genes constitutivos
SDHA	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	NM_004168	Genes constitutivos
TBP	TATA-box binding protein	NM_003194	Genes constitutivos
TFRC	transferrin receptor	NM_001128148	Genes constitutivos
TUBB	tubulin beta class I	NM_178014	Genes constitutivos
AXL	AXL receptor tyrosine kinase	NM_021913	Respuesta inmunitaria innata
C1QA	complement component 1 q subcomponent A chain	NM_015991	Respuesta inmunitaria innata
C1QB	complement component 1 q subcomponent B chain	NM_000491	Respuesta inmunitaria innata
DMBT1	deleted in malignant brain tumors 1	NM_007329	Respuesta inmunitaria innata
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	NM_022168	Respuesta inmunitaria innata
LCN2	lipocalin 2	NM_005564	Respuesta inmunitaria innata
LYZ	lysozyme	NM_000239	Respuesta inmunitaria innata
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	NM_139012	Respuesta inmunitaria innata
MIF	macrophage migration inhibitory factor glycosylation-inhibiting factor	NM_002415	Respuesta inmunitaria innata
NOS2	nitric oxide synthase 2	NM_000625	Respuesta inmunitaria innata
TLR7	toll like receptor 7	NM_016562	Respuesta inmunitaria innata
DDX58	DEXD H-box helicase 58	NM_014314	Señalización de interferón
IFI35	interferon induced protein 35	NM_005533	Señalización de interferón
IFI44L	interferon induced protein 44 like	NM_006820	Señalización de interferón
IFI6	interferon alpha inducible protein 6	NM_022873	Señalización de interferón
IRF4	interferon regulatory factor 4	NM_002460	Señalización de interferón
MX1	MX dynamin like GTPase 1	NM_001178046	Señalización de interferón
OAS2	2-5-oligoadenylate synthetase 2	NM_016817	Señalización de interferón
OAS3	2-5-oligoadenylate synthetase 3	NM_006187	Señalización de interferón
LILRB1	leukocyte immunoglobulin like receptor B1	NM_001081637	Inhibición leucocitaria
LST1	leukocyte specific transcript 1	NM_007161	Inhibición leucocitaria
ITGAL	integrin subunit alpha L	NM_002209	Migración de leucocitos
ITGAM	integrin subunit alpha M	NM_001145808	Migración de leucocitos
ITGB7	integrin subunit beta 7	NM_000889	Migración de leucocitos
SELL	selectin L	NM_000655	Migración de leucocitos
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	NM_001078	Migración de leucocitos
SH2D1A	SH2 domain containing 1A	NM_002351	Activación de linfocitos
SH2D1B	SH2 domain containing 1B	NM_053282	Activación de linfocitos
IKZF1	IKAROS family zinc finger 1	NM_006060	Desarrollo linfocitario
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2	NM_016260	Desarrollo linfocitario
IKZF4	IKAROS family zinc finger 4	NM_022465	Desarrollo linfocitario
CCL18	C-C motif chemokine ligand 18	NM_002988	Infiltrado linfocitario
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2	NM_002982	Infiltrado linfocitario
CCL21	C-C motif chemokine ligand 21	NM_002989	Infiltrado linfocitario
CCL3	C-C motif chemokine ligand 3	NM_002983	Infiltrado linfocitario
CCL4	C-C motif chemokine ligand 4	NM_002984	Infiltrado linfocitario
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	NM_002985	Infiltrado linfocitario
CCR5	C-C motif chemokine receptor 5 gene pseudogene	NM_001100168	Infiltrado linfocitario
CD2	CD2 molecule	NM_001767	Infiltrado linfocitario
CD37	CD37 molecule	NM_001774	Infiltrado linfocitario
CD52	CD52 molecule	NM_001803	Infiltrado linfocitario
CD63	CD63 molecule	NM_001780	Infiltrado linfocitario
CORO1A	coronin 1A	NM_007074	Infiltrado linfocitario
CTSS	cathepsin S	NM_004079	Infiltrado linfocitario
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	NM_001337	Infiltrado linfocitario
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	NM_001171172	Infiltrado linfocitario
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	NM_001171171	Infiltrado linfocitario
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	NM_001171174	Infiltrado linfocitario
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	NM_003467	Infiltrado linfocitario
CXCR6	C-X-C motif chemokine receptor 6	NM_006564	Infiltrado linfocitario
FCER1G	Fc fragment of IgE receptor Ig	NM_004106	Infiltrado linfocitario
FYB	FYN binding protein	NM_001465	Infiltrado linfocitario
GZMA	granzyme A	NM_006144	Infiltrado linfocitario
GZMB	granzyme B	NM_004131	Infiltrado linfocitario
GZMH	granzyme H	NM_033423	Infiltrado linfocitario
GZMK	granzyme K	NM_002104	Infiltrado linfocitario
IGSF6	immunoglobulin superfamily member 6	NM_005849	Infiltrado linfocitario
IL10RA	interleukin 10 receptor subunit alpha	NM_001558	Infiltrado linfocitario
IL2RG	interleukin 2 receptor subunit gamma	NM_000206	Infiltrado linfocitario
ITGB2	integrin subunit beta 2	NM_000211	Infiltrado linfocitario
JAML	junction adhesion molecule like	NM_001098526	Infiltrado linfocitario
LAMP1	lysosomal associated membrane protein 1	NM_005561	Infiltrado linfocitario
LAPTM5	lysosomal protein transmembrane 5	NM_006762	Infiltrado linfocitario
LILRB2	leukocyte immunoglobulin like receptor B2	NM_001080978	Infiltrado linfocitario
LY9	lymphocyte antigen 9	NM_002348	Infiltrado linfocitario
NKG7	natural killer cell granule protein 7	NM_005601	Infiltrado linfocitario
PTPN7	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 7	NM_001199797	Infiltrado linfocitario
PTPRC	protein tyrosine phosphatase receptor type C	NM_002838	Infiltrado linfocitario
SAMHD1	SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1	NM_015474	Infiltrado linfocitario

Gen	Nombre NCBI	Acceso NCBI	Set genes GSEA
SIT1	signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1	NM_014450	Infiltrado linfocitario
SLAMF8	SLAM family member 8	NM_020125	Infiltrado linfocitario
SRGN	serglycin	NM_002727	Infiltrado linfocitario
TAGAP	T-cell activation RhoGTPase activating protein	NM_054114	Infiltrado linfocitario
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	NM_001003806	Infiltrado linfocitario
TLR8	toll like receptor 8	NM_138636	Infiltrado linfocitario
TNFAIP8	TNF alpha induced protein 8	NM_014350	Infiltrado linfocitario
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	NM_198125	Infiltrado linfocitario
AIF1	allograft inflammatory factor 1	NM_001623	Macrófagos
ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase type B	NM_001141	Macrófagos
CD163	CD163 molecule	NM_004244	Macrófagos
CD68	CD68 molecule	NM_001251	Macrófagos
FCGR3A	Fc fragment of IgG receptor IIIa	NM_000569	Macrófagos
ARG1	arginase 1	NM_000045	Marcador mieloides
CD33	CD33 molecule	NM_001772	Marcador mieloides
CEACAM8	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 8	NM_001816	Marcador mieloides
MPO	myeloperoxidase	NM_000250	Marcador mieloides
S100A8	S100 calcium binding protein A8	NM_002964	Marcador mieloides
S100A9	S100 calcium binding protein A9	NM_002965	Marcador mieloides
FUT4	fucosyltransferase 4	NM_002033	Marcador mieloides
CA4	carbonic anhydrase 4	NM_000717	Neutrófilos
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	NM_032564	Neutrófilos
KREMEN1	kringle containing transmembrane protein 1	NM_032045	Neutrófilos
LRG1	leucine rich alpha-2-glycoprotein 1	NM_052972	Neutrófilos
PYGL	phosphorylase glycogen liver	NM_002863	Neutrófilos
B3GAT1	beta-13-glucuronyltransferase 1	NM_018644	Activación células NK
FCGR3B	Fc fragment of IgG receptor IIIb	NM_000570	Activación células NK
GNLY	granulysin	NM_006433	Activación células NK
KLRB1	killer cell lectin like receptor B1	NM_002258	Activación células NK
KLRF1	killer cell lectin like receptor F1	NM_016523	Activación células NK
KLRG1	killer cell lectin like receptor G1	NM_005810	Activación células NK
KLRK1	killer cell lectin like receptor K1	NM_007360	Activación células NK
PRF1	perforin 1	NM_005041	Activación células NK
KIR2DL2	killer cell immunoglobulin like receptor two Ig domains and long cytoplasmic tail 2	NM_014218	Marcador células NK
KIR2DL3	killer cell immunoglobulin like receptor two Ig domains and long cytoplasmic tail 3	NM_015868	Marcador células NK
NCR1	natural cytotoxicity triggering receptor 1	NM_004829	Marcador células NK
NCR3	natural cytotoxicity triggering receptor 3	NM_147130	Marcador células NK
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells 1	NM_172387	Señalización de PD-1
PRDM1	PR domain 1	NM_001198	Señalización de PD-1
FOXO1	forkhead box O1	NM_002015	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
HIF1A	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	NM_001530	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
MTOR	mechanistic target of rapamycin	NM_004958	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
PIK3CA	phosphatidylinositol-45-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	NM_006218	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
PIK3CD	phosphatidylinositol-45-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta	NM_005026	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
PTEN	phosphatase and tensin homolog	NM_000314	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
PTPN11	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11	NM_002834	Señalización de PD-1 & Marcador tumoral
BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine threonine kinase	NM_004336	Proliferación
CCNB2	cyclin B2	NM_004701	Proliferación
CDK1	cyclin-dependent kinase 1	NM_001786	Proliferación
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	NM_005192	Proliferación
FOXM1	forkhead box M1	NM_021953	Proliferación
KIAA0101	KIAA0101	NM_014736	Proliferación
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 yeast	NM_002358	Proliferación
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	NM_014791	Proliferación
MKI67	marker of proliferation Ki-67	NM_002417	Proliferación
TOP2A	topoisomerase DNA II alpha	NM_001067	Proliferación
EGR2	early growth response 2	NM_000399	Diferenciación de linfocitos T
LEXM	lymphocyte expansion molecule	NM_001110533	Diferenciación de linfocitos T
CBLB	Cbl proto-oncogene B	NM_170662	Señalización receptor linfocitos T
CD40LG	CD40 ligand	NM_000074	Señalización receptor linfocitos T
IFNA17	interferon alpha 17	NM_021268	Señalización receptor linfocitos T
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	NM_020529	Señalización receptor linfocitos T
PTPN6	protein tyrosine phosphatase non-receptor type 6	NM_080548	Señalización receptor linfocitos T
ZAP70	zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70kDa	NM_001079	Señalización receptor linfocitos T
EBI3	Epstein-Barr virus induced 3	NM_005755	Regulación linfocitos T
FOXP3	forkhead box P3	NM_014009	Regulación linfocitos T
ID2	inhibitor of DNA binding 2 HLH protein	NM_002166	Regulación linfocitos T
ID3	inhibitor of DNA binding 3 HLH protein	NM_002167	Regulación linfocitos T
IL15	interleukin 15	NM_000585	Regulación linfocitos T
IL18	interleukin 18	NM_001562	Regulación linfocitos T
IL22	interleukin 22	NM_020525	Regulación linfocitos T
M6PR	mannose-6-phosphate receptor cation dependent	NM_002355	Regulación linfocitos T
KLF2	Kruppel like factor 2	NM_016270	Regulación linfocitos T
CCR7	C-C motif chemokine receptor 7	NM_001838	Coexpresión de TCR

Gen	Nombre NCBI	Acceso NCBI	Set genes GSEA
CD247	CD247 molecule	NM_198053	Coexpresión de TCR
CD3D	CD3d molecule	NM_000732	Coexpresión de TCR
CD3E	CD3e molecule	NM_000733	Coexpresión de TCR
CD3G	CD3g molecule	NM_000073	Coexpresión de TCR
CD6	CD6 molecule	NM_006725	Coexpresión de TCR
CD8A	CD8a molecule	NM_171827	Coexpresión de TCR
CD8B	CD8b molecule	NM_172213	Coexpresión de TCR
CRTAM	cytotoxic and regulatory T-cell molecule	NM_019604	Coexpresión de TCR
GPR18	G protein-coupled receptor 18	NM_001098200	Coexpresión de TCR
GRAP2	GRB2-related adaptor protein 2	NM_004810	Coexpresión de TCR
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3	NM_012481	Coexpresión de TCR
IL2RB	interleukin 2 receptor subunit beta	NM_000878	Coexpresión de TCR
IL7R	interleukin 7 receptor	NM_002185	Coexpresión de TCR
ITK	IL2 inducible T-cell kinase	NM_005546	Coexpresión de TCR
LAMP3	lysosomal associated membrane protein 3	NM_014398	Coexpresión de TCR
LCK	LCK proto-oncogene Src family tyrosine kinase	NM_001042771	Coexpresión de TCR
PTPRCAP	protein tyrosine phosphatase receptor type C associated protein	NM_005608	Coexpresión de TCR
TIGIT	T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains	NM_173799	Coexpresión de TCR
BAGE	B melanoma antigen	NM_182482	Antígenos tumorales
CTAG1B	cancer testis antigen 1B	NM_001327	Antígenos tumorales
CTAG2	cancer testis antigen 2	ENST00000369585	Antígenos tumorales
GAGE1,GAGE12I,GAGE12F	G antigen 1	NM_001468,NM_001477,N	Antígenos tumorales
GAGE10	G antigen 10	NM_001098413	Antígenos tumorales
GAGE12J	G antigen 12J	NM_001098406	Antígenos tumorales
GAGE13	G antigen 13	NM_001098412	Antígenos tumorales
GAGE2C,GAGE2A,GAGE2E	G antigen 2C	NM_001472,NM_00112721	Antígenos tumorales
MAGEA1	MAGE family member A1	NM_004988	Antígenos tumorales
MAGEA10	MAGE family member A10	NM_021048	Antígenos tumorales
MAGEA12	MAGE family member A12	NM_005367	Antígenos tumorales
MAGEA3	MAGE family member A3	NM_005362,NM_005363	Antígenos tumorales
MAGEA4	MAGE family member A4	NM_001011548	Antígenos tumorales
MAGEC2	MAGE family member C2	NM_016249	Antígenos tumorales
MLANA	melan-A	NM_005511	Antígenos tumorales
SSX2	SSX family member 2	NM_003147	Antígenos tumorales
XAGE1B	X antigen family member 1B	NM_001097594	Antígenos tumorales
AKT1	AKT serine threonine kinase 1	NM_001014431	Marcadores tumorales
BRCA1	BRCA1 DNA repair associated	NM_007300	Marcadores tumorales
BRCA2	BRCA2 DNA repair associated	NM_000059	Marcadores tumorales
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	NM_000077	Marcadores tumorales
EFNA4	ephrin A4	NM_005227	Marcadores tumorales
EGFR	epidermal growth factor receptor	NM_005228	Marcadores tumorales
EGR3	early growth response 3	NM_004430	Marcadores tumorales
IRS1	insulin receptor substrate 1	NM_005544	Marcadores tumorales
KRT5	keratin 5	NM_000424	Marcadores tumorales
KRT7	keratin 7	NM_005556	Marcadores tumorales
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	NM_002745	Marcadores tumorales
MMP2	matrix metalloproteinase 2	NM_004530	Marcadores tumorales
MMP9	matrix metalloproteinase 9	NM_004994	Marcadores tumorales
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	NM_002467	Marcadores tumorales
NOTCH3	notch 3	NM_000435	Marcadores tumorales
PGF	placental growth factor	NM_002632	Marcadores tumorales
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_000963	Marcadores tumorales
PTK7	protein tyrosine kinase 7 inactive	NM_002821	Marcadores tumorales
RB1	RB transcriptional corepressor 1	NM_000321	Marcadores tumorales
RPS6	ribosomal protein S6	NM_001010	Marcadores tumorales
TCF7	transcription factor 7 T-cell specific HMG-box	NM_003202	Marcadores tumorales
TP63	tumor protein p63	NM_003722	Marcadores tumorales
TRIM29	tripartite motif containing 29	NM_012101	Marcadores tumorales
SNAI1	snail family transcriptional repressor 1	NM_005985	Marcadores tumorales
SNAI2	snail family transcriptional repressor 2	NM_003068	Marcadores tumorales
TWIST1	twist family bHLH transcription factor 1	NM_000474	Marcadores tumorales
ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	NM_001174093	Marcadores tumorales
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	NM_004335	Señalización de interferón tipo I
IFI27	interferon alpha inducible protein 27	NM_005532	Señalización de interferón tipo I
IFIT1	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	NM_001548	Señalización de interferón tipo I
IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	NM_001031683	Señalización de interferón tipo I
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	NM_003641	Señalización de interferón tipo I
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2	NM_006435	Señalización de interferón tipo I
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	NM_005101	Señalización de interferón tipo I
ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20	NM_002201	Señalización de interferón tipo I
BCL6	B-cell CLL lymphoma 6	NM_0011706	Señalización de interferón tipo II
CIITA	class II major histocompatibility complex transactivator	NM_000246	Señalización de interferón tipo II
CX3CL1	C-X3-C motif chemokine ligand 1	NM_002996	Señalización de interferón tipo II
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	NM_001565	Señalización de interferón tipo II

en	Nombre NCBI	Acceso NCBI	Set genes GSEA
CXCL11	C-X-C motif chemokine ligand 11	NM_005409	Señalización de interferón tipo II
CXCL13	C-X-C motif chemokine ligand 13	NM_006419	Señalización de interferón tipo II
CXCL9	C-X-C motif chemokine ligand 9	NM_002416	Señalización de interferón tipo II
CXCR5	C-X-C motif chemokine receptor 5	NM_001716	Señalización de interferón tipo II
CYBB	cytochrome b-245 beta chain	NM_000397	Señalización de interferón tipo II
EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2	NM_001135651	Señalización de interferón tipo II
FASLG	Fas ligand	NM_000639	Señalización de interferón tipo II
GBP1	guanylate binding protein 1	NM_002053	Señalización de interferón tipo II
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	NM_002021	Señalización de interferón tipo II
IFNB1	interferon beta 1	NM_002176	Señalización de interferón tipo II
IFNG	interferon gamma	NM_000619	Señalización de interferón tipo II
IL1B	interleukin 1 beta	NM_000576	Señalización de interferón tipo II
IRF1	interferon regulatory factor 1	NM_002198	Señalización de interferón tipo II
IRF9	interferon regulatory factor 9	NM_006084	Señalización de interferón tipo II
OAS1	2-5-oligoadenylate synthetase 1	NM_016816	Señalización de interferón tipo II
PSMB9	proteasome subunit beta 9	NM_002800	Señalización de interferón tipo II
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1	NM_007315	Señalización de interferón tipo II
TAP1	transporter 1 ATP-binding cassette sub-family B MDR TAP	NM_000593	Señalización de interferón tipo II
TBX21	T-box 21	NM_013351	Señalización de interferón tipo II



Tabla 3. Tablas de expresión diferencial de genes por DESeq2

Genes diferencialmente expresados en tumores pretratamiento					
Genes sobreexpresados en CPR			Genes sobreexpresados en no-CPR		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
<b>GAGE1</b>	24,28486752	2,48E-13	<b>TFRC</b>	-2,107448805	0,0086302
<b>MAGEA10</b>	18,51309245	9,93E-11	<b>MAGEA12</b>	-7,038292906	0,01043608
<b>MAGEA1</b>	20,79666927	7,39E-09	<b>CDK1</b>	-1,578670243	0,01304533
<b>IFNG</b>	2,990443609	3,63E-05	<b>MAPK1</b>	-1,606354874	0,01925253
<b>NKG7</b>	2,22100781	5,60E-05	<b>TNFSF18</b>	-3,399806676	0,02443427
<b>CD38</b>	2,040189181	0,00056684	<b>IL1B</b>	-1,527776891	0,0332847
<b>GZMB</b>	2,299797457	0,00082157	<b>MIF</b>	-1,526138789	0,0340213
<b>CXCL9</b>	2,497021766	0,00120363	<b>ARG1</b>	-6,64201872	0,03441656
<b>IDO1</b>	2,778933504	0,00270801			
<b>IL2RB</b>	1,516242109	0,00317802			
<b>GNLY</b>	2,081075652	0,01304533			
<b>FASLG</b>	1,587761472	0,01878898			
<b>NCR1</b>	2,30448723	0,02499924			
<b>CXCL10</b>	1,748063369	0,03271093			
<b>KIR2DL3</b>	7,001408546	0,03271093			
<b>CXCL13</b>	1,617970361	0,03441656			
<b>TNFRSF9</b>	1,644936389	0,03441656			

Genes diferencialmente expresados en tumores pretratamiento según expresión de PD-L1					
Genes sobreexpresados en PD-L1 alto			Genes sobreexpresados en PD-L1 bajo		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
<b>GAGE1</b>	35,49893338	8,42E-27			
<b>CD274</b>	1,639453242	0,03689			

Genes diferencialmente expresados en tumores pretratamiento según expresión de CMT					
Genes sobreexpresados en CMT alto			Genes sobreexpresados en CMT bajo		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
<b>MAGEA1</b>	23,7630116	4,39E-17			
<b>MAGEA10</b>	24,9734959	7,64E-13			

<b>Genes diferencialmente expresados en tumores postratamiento</b>					
<b>Genes sobreexpresados en CPR</b>			<b>Genes sobreexpresados en no-CPR</b>		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
			<b>MAGEA3</b>	-23,71818605	1,22E-22
			<b>BUB1</b>	-3,402076809	1,75E-09
			<b>CDK1</b>	-3,331152003	1,40E-08
			<b>CDKN3</b>	-4,155685652	1,86E-08
			<b>CDKN2A</b>	-2,590543482	5,90E-08
			<b>CCNB2</b>	-4,077019234	2,74E-07
			<b>G6PD</b>	-2,060598875	6,25E-07
			<b>KIAA0101</b>	-3,689359014	8,57E-07
			<b>MKI67</b>	-3,481159381	1,45E-06
			<b>ISG15</b>	-2,048978937	1,89E-06
			<b>TOP2A</b>	-2,982232267	5,91E-06
			<b>FOXM1</b>	-2,707486992	5,60E-05
			<b>HMBS</b>	-1,844939924	7,45E-05
			<b>MELK</b>	-2,640213062	0,00084171
			<b>TNFRSF18</b>	-1,982710228	0,00398811
			<b>TWIST1</b>	-1,570036065	0,01096674
			<b>MAD2L1</b>	-1,566648169	0,01221767
			<b>KRT5</b>	-2,101443704	0,01326576
			<b>CEACAM1</b>	-1,707411016	0,0159579
			<b>BRCA1</b>	-1,76139327	0,02293093
			<b>DGAT2</b>	-1,529247159	0,02319775
			<b>CXCL8</b>	-1,554557595	0,0312646

<b>Genes diferencialmente expresados en tumores postratamiento, según expresión de PD-L1 de los mismos en pretratamiento</b>					
<b>Genes sobreexpresados en PD-L1 alto</b>			<b>Genes sobreexpresados en PD-L1 bajo</b>		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
<b>XAGE1B</b>	2,67318999	0,01147293	<b>CDK1</b>	-3,563090268	3,88E-05
			<b>FOXM1</b>	-4,063547918	0,00033627
			<b>MKI67</b>	-3,708694186	0,000871
			<b>KIAA0101</b>	-3,822769966	0,00106481
			<b>CDKN2A</b>	-2,578737171	0,0011238
			<b>BUB1</b>	-2,570202501	0,0011238
			<b>ISG15</b>	-2,053059645	0,0011238
			<b>HMBS</b>	-1,938616568	0,00158088
			<b>TOP2A</b>	-3,07614694	0,00313244
			<b>G6PD</b>	-2,014127727	0,00349054
			<b>CDKN3</b>	-3,108445271	0,00609695
			<b>IFI27</b>	-1,824311867	0,00655708
			<b>KRT5</b>	-3,5380368	0,00700598
			<b>CCNB2</b>	-3,046220041	0,01147293
			<b>TNFRSF18</b>	-2,227197286	0,01721045
			<b>MELK</b>	-2,683919516	0,02996989
			<b>BRCA1</b>	-2,160202136	0,03502584

<b>Genes diferencialmente expresados en tumores postratamiento, según CMT de los mismos en pretratamiento</b>					
<b>Genes sobreexpresados en CMT alta</b>			<b>Genes sobreexpresados en CMT baja</b>		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
			<b>IFI27</b>	-2,446727782	1,55E-05
			<b>ISG15</b>	-2,27107654	0,00011037
			<b>BUB1</b>	-2,989430185	0,00090209
			<b>FOXM1</b>	-3,763170727	0,00131556
			<b>KREMEN1</b>	-1,68028605	0,00154365
			<b>OAS2</b>	-1,284015777	0,00162014
			<b>OAS3</b>	-1,870059437	0,00271349
			<b>G6PD</b>	-1,945381983	0,00996267
			<b>MKI67</b>	-2,926367755	0,01802866
			<b>TOP2A</b>	-2,701310932	0,01802866
			<b>HMBS</b>	-1,701432938	0,0271323
			<b>HERC6</b>	-1,193355253	0,0271323
			<b>S100A8</b>	-1,791063353	0,03244034
			<b>MX1</b>	-1,296626875	0,03244034
			<b>KIAA0101</b>	-2,885954042	0,03502854
			<b>BRCA1</b>	-2,227130711	0,03502854
			<b>IFI6</b>	-0,852226055	0,03502854
			<b>M6PR</b>	-0,767880647	0,03502854
			<b>VTCN1</b>	-4,579422907	0,04059964

<b>Genes diferencialmente expresados en tumores no-CPR postratamiento, según progresión de la enfermedad</b>					
<b>Genes sobreexpresados en progresión</b>			<b>Genes sobreexpresados en no progresión</b>		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
<b>IFI6</b>	2,669649207	0,0003928			
<b>BST2</b>	1,894453803	0,00051422			
<b>OAS1</b>	2,341679195	0,00080681			
<b>CD8B</b>	1,970961447	0,00580313			
<b>ISG15</b>	2,007540797	0,00926957			
<b>HMBS</b>	2,076886564	0,00953034			
<b>AKT1</b>	1,505486602	0,01644042			
<b>OAS3</b>	2,008527956	0,01644042			
<b>IFI27</b>	2,054338201	0,02667714			
<b>KRT7</b>	2,155442166	0,04388333			

Genes diferencialmente expresados post/pre-tratamiento en muestras pareadas de tumores CPR					
Genes sobreexpresados en postratamiento			Genes sobreexpresados en pretratamiento		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
CA4	7,070920157	9,84E-19	MELK	-3,601898044	2,65E-12
JCHAIN	3,559892369	8,12E-09	BUB1	-3,410027908	9,38E-12
CD1C	2,468451828	1,04E-08	CDKN2A	-3,662244823	9,03E-11
CXCR4	2,703881934	1,06E-08	TOP2A	-3,608133284	1,04E-10
HLA-DOB	2,224357879	3,36E-08	CDK1	-2,590293217	1,51E-10
CD52	1,973376137	1,26E-07	FOXM1	-4,558396795	2,27E-08
KLF2	2,093531051	0,00000516	STAT1	-1,860225384	0,00000018
CD79A	2,44480928	0,0000576	CCNB2	-4,840897581	1,83E-07
PTPRC	1,847117348	0,000085	TAP1	-1,658349447	3,34E-07
CD22	1,989323632	0,00010883	TNF	-2,431825127	4,24E-07
ALOX15B	3,501505933	0,00029544	ISG15	-2,359871189	0,00000327
CD27	2,005896951	0,00034784	OAS3	-2,089183713	0,00000579
LAMP3	1,70192927	0,0004569	MKI67	-2,771056773	0,0000076
MRC1	1,927132297	0,00073566	IFIT3	-1,906898778	0,00000903
MS4A1	2,474114407	0,00084495	MIF	-1,616883949	0,0000122
CCL21	3,330465164	0,00095093	CXCL10	-2,47267829	0,0000144
CD69	1,957565045	0,00135668	CXCL11	-2,651254362	0,0000155
IL7R	1,906849336	0,00308732	CDKN3	-2,922942321	0,000038
EGR3	2,003510508	0,00387167	BRCA1	-2,744950244	0,000047
HGF	2,59058562	0,00408428	MX1	-1,896737554	0,0000767
FCRLA	2,043391104	0,00448876	OAS1	-1,86015671	0,0000767
IKZF1	1,594132597	0,00479627	TWIST1	-2,210481458	0,00014247
DMBT1	4,919432678	0,00561243	LEXM	-6,88534285	0,00037061
CD79B	1,566685068	0,02166829	CEACAM1	-1,868995103	0,0004569
XAGE1B	5,067815074	0,02624641	PGF	-2,044847501	0,00075013
CD53	1,654651915	0,03442293	IL17A	-10,58290548	0,00106673
GZMK	1,986489594	0,0469751	GNLY	-2,026753981	0,00230152
			IFI6	-1,717076427	0,00230152
			KIAA0101	-2,870165931	0,00279634
			LCK	-6,252316717	0,00334677
			TNFRSF18	-1,686618063	0,00382356
			IDO1	-1,866681521	0,00407333
			KRT5	-4,097724439	0,00448876
			CXCL9	-1,962826492	0,00562428
			IFNG	-2,168844038	0,0067472
			GZMB	-1,746690067	0,0067472
			CD274	-1,746482744	0,0067472
			IL4	-9,109751024	0,00809326
			TRIM29	-4,034939778	0,00998572
			S100A9	-1,705251011	0,01037733
			BRCA2	-1,701315711	0,01302332
			S100A8	-1,81485857	0,01927204
			MAD2L1	-1,573677256	0,02311526
			FOXP3	-2,734101238	0,02447275
			IL12B	-5,644881185	0,02881055
			CXCL8	-2,193249849	0,02881055
			VTCN1	-3,763841626	0,04396406

<b>Genes diferencialmente expresados post/pre-tratamiento en muestras pareadas de tumores no-CPR</b>					
<b>Genes sobreexpresados en postratamiento</b>			<b>Genes sobreexpresados en pretratamiento</b>		
Gen	log2FoldChange	p-adj	Gen	log2FoldChange	p-adj
<b>JCHAIN</b>	2,915102261	0,02876907	<b>TRIM29</b>	-5,888002814	6,91E-07
<b>DMBT1</b>	3,208984062	0,04007842	<b>IL1A</b>	-5,127832769	0,00820903
			<b>KRT5</b>	-4,077873785	0,02876907
			<b>MMP9</b>	-2,285930275	0,03332438
			<b>S100A9</b>	-2,055721372	0,03575426
			<b>CD44</b>	-3,340697158	0,04303771

# Marta Casarrubios García

c/ Javier de Miguel 9 28018 - Madrid | (+34) 601 400 181 | casarrubios.mc@gmail.com

## Educación

**MÁSTER EN DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES TORÁCICOS | Cursando | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**TÍTULO PROPIO EN ESTADÍSTICA APLICADA A LAS CIENCIAS DE LA SALUD | 2021 | UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA**

- Diploma de Experto Universitario.

**MÁSTER EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA | 2016 | UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

- Nota final 8,99.
- Trabajo de Fin de Máster realizado en el CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) en el grupo de Biología Epitelial Celular de la Dra. Mirna Pérez-Moreno, con el título: "Papel de la interleuquina 24 en la progresión tumoral del cáncer de piel". Nota del TFM: 9,9 (Matrícula de Honor)
- Especialización: Biología molecular del cáncer.

**GRADO EN FARMACIA | 2015 | UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

- Nota final 7,78. Trabajo de Fin de Grado: "Terapia regenerativa en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple".

## Experiencia profesional

- **Mar-2019-Enero-2022. Investigadora predoctoral en FIB Hospital Universitario Puerta de Hierro. Grupo de investigación en cáncer de pulmón: Dr. Mariano Provencio y Dr. Alberto Cruz-Bermúdez.**

- *Especializada en investigación de cáncer de pulmón e inmuno-oncología.*
- *Trabajo en la investigación traslacional del ensayo clínico NADIM.*
- *Experiencia en NGS y análisis de datos.*

- **Ago-2018- Feb-2019. Farmacéutica adjunta en farmacia comunitaria**

- **May-2017-Mar-2019. Medical writer en OncologyPipeline.**

*Actualización de base de datos de ensayos clínicos en oncología: mantenimiento de la plataforma, adición de publicaciones científicas, notas de prensa y abstracts de los*

*mayores congresos de oncología a nivel mundial.*

- *Conocimiento sobre ensayos clínicos en oncología.*
- *Actualización constante del conocimiento de nuevas moléculas en desarrollo.*
- *Experiencia en investigación traslacional y clínica con la capacidad de articular conceptos científicos complejos en la plataforma*

- **Jun-2017-Jul-2018. Ayudante de investigación en el grupo de Tumor-inmunología del Dr. López-Collazo en el IdiPaz (Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz.)**

*Determinación de la relación sistema inmunitario, cáncer y metástasis. Conocimiento en inmunooncología. Experiencia en citometría de flujo: preparación de muestras y análisis en plataforma FlowJo. Ficoll, ELISA. Procesamiento de material biológico derivado de muestras de tumores de pacientes.*

- **Ene-2017- Abr-2017. Erasmus+ Prácticas en el grupo Cancer Genetics and Cellular Stress Responses del Dr. Clemens A. Schmitt en Charité Universitätsmedizin Berlin - Molekulares Krebsforschungszentrum (MKFZ).**

- **May-2016- Nov-2016. Farmacéutica adjunta en farmacia comunitaria.**

- **Nov-2015 - Sept-2016. Prácticas en el CNIO (Spanish National Cancer Centre) en el grupo de la Dra. Mirna Pérez- Moreno: “Papel de la interleuquina 24 en la progresión tumoral del cáncer de piel”**

*Análisis de la expresión de IL24 en diferentes líneas celulares de queratinocitos de ratón (MCA3D, PDV, HaCa4, CarC). Técnicas relacionadas: cultivos celulares, extracción de RNA, DNA y proteínas, análisis por Western-Blot, RT-qPCR, generación de líneas celulares transformadas (sobreexpresión de proteína), transfección de plásmidos en estas líneas. Ensayos in vitro como ensayos de viabilidad, apoptosis, formación de colonias, migración e invasión. Trabajo presentado como tesis de Fin de Máster.*

- **Jul-2015 – Oct-2015. Farmacéutica adjunta en farmacia comunitaria.**

- **Ene-2015 – Jun-2015. Trabajo bibliográfico con la tutela del Dr. Carlos Guillén en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Farmacia de la UCM: “Terapia regenerativa en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple”. Presentado como Trabajo de Fin de Grado.**

*En el trabajo se muestra información sobre el uso y ventajas de las células madre mesenquimales en el tratamiento de la Esclerosis Múltiple debido a sus propiedades inmunomoduladoras y regenerativas.*

· **Ener-2015 – Mar-2015. Prácticas en el servicio de farmacia del Hospital Universitario La Paz**

*Conocimiento y aprendizaje sobre las funciones desempeñadas por los profesionales farmacéuticos en el hospital.*

## Publicaciones

Provencio M, Serna-Blasco R, Nadal E, Insa A, García-Campelo MR, Casal Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Pereira E, Royuela A, Calvo V, Martín-López J, García-García F, Casarrubios M, Franco F, Sánchez-Herrero E, Massuti B, Cruz-Bermúdez A, Romero A. **Overall Survival and Biomarker Analysis of Neoadjuvant Nivolumab Plus Chemotherapy in Operable Stage IIIA Non-Small-Cell Lung Cancer (NADIM phase II trial).** J Clin Oncol. 2022 May 16;JCO2102660. doi: 10.1200/JCO.21.02660. Epub ahead of print. PMID: 35576508.

Serna-Blasco R, Sánchez-Herrero E, Sanz-Moreno S, Rodríguez-Festa A, García-Veros E, Casarrubios M, Sierra-Rodero B, Laza-Briviesca R, Cruz-Bermúdez A, Mielgo-Rubio X, Sánchez-Hernández A, Uribe Larrea EA, Calvo V, Romero A, Provencio M. **KRAS p.G12C mutation occurs in 1% of EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer patients progressing on a first-line treatment with a tyrosine kinase inhibitor.** ESMO Open. 2021 Oct;6(5):100279

Casarrubios M, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Insa A, García Campelo MDR, Lázaro M, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, de Castro-Carpeño J, Cobo M, López-Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Barquín M, Laza-Briviesca R, Sierra-Rodero B, Parra ER, Sanchez-Espiridion B, Rocha P, Kadara H, Wistuba II, Romero A, Calvo V, Provencio M. **Pretreatment Tissue TCR Repertoire Evenness Is Associated with Complete Pathologic Response in Patients with NSCLC Receiving Neoadjuvant Chemoimmunotherapy.** Clin Cancer Res. 2021 Nov 1;27(21):5878-5890

Sierra-Rodero B, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Garitaonaindía Y, Insa A, Mosquera J, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Laza-Briviesca R, Casarrubios M, García-Grande A, Romero A, Franco F, Provencio M. **Clinical and molecular parameters associated to pneumonitis development in non-small-cell lung cancer patients receiving chemoimmunotherapy from NADIM trial.** J Immunother Cancer. 2021 Aug;9(8):e002804

Laza-Briviesca R, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Insa A, García-Campelo MDR, Huidobro G, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Casarrubios M, Sierra-Rodero B, Tarín C, García-Grande A, Haymaker C, Wistuba II, Romero A, Franco F, Provencio M. **Blood biomarkers associated to complete pathological response on NSCLC patients treated with neoadjuvant**



**chemoimmunotherapy included in NADIM clinical trial.** Clin Transl Med. 2021 Jul;11(7):e491

Cruz-Bermúdez A, Laza-Briviesca R, Casarrubios M, Sierra-Rodero B, Provencio M. **The Role of Metabolism in Tumor Immune Evasion: Novel Approaches to Improve Immunotherapy.** Biomedicines. 2021 Mar 31;9(4):361

Provencio M, Nadal E, Insa A, García-Campelo MR, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Pereira E, Royuela A, Casarrubios M, Salas Antón C, Parra ER, Wistuba I, Calvo V, Laza-Briviesca R, Romero A, Massuti B, Cruz-Bermúdez A. **Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial.** Lancet Oncol. 2020 Nov;21(11):1413-1422.

Cantero-Cid R, Casas-Martin J, Hernández-Jiménez E, Cubillos-Zapata C, Varela-Serrano A, Avendaño-Ortiz J, Casarrubios M, Montalbán-Hernández K, Villacañas-Gil I, Guerra-Pastrián L, Peinado B, Marcano C, Aguirre LA, López-Collazo E. **PD-L1/PD-1 crosstalk in colorectal cancer: are we targeting the right cells?** BMC Cancer. 2018 Oct 3;18(1):945.

## Congresos, cursos y comunicaciones

Asistencia a congresos relacionados con el **área de la oncología y el cáncer de pulmón:** WCLC 2019, Desafío Oncológico 2019, WCLC 2020, GECP 2020, PIVAC-21, ELCC Virtual 2021, MAP 2021, ELCC 2022, WCLC 2022.

**WCLC 2022.** - *Tumor Bulk-RNA seq identifies patients at high risk of progression in non-complete pathological responders from NADIM trial.* Casarrubios M, Cruz-Bermúdez A, Sierra-Rodero B, Martínez C, Nadal E, Calvo V, Insa A, García Campelo MR, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, del Barco E, Bernabé R, Massuti B, Provencio M – **Presentación oral reconocida con el “Early Career Education Award”**

**ESMO ELCC 2022.** *Immune gene signatures for predicting pathological response of NSCLC patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy.* Casarrubios M, Cruz-Bermúdez A, Sierra-Rodero B, Martínez C, Nadal E, Insa A, García Campelo MR, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Provencio M – **Presentación mini-oral**

**AACR 2021.** *High levels of baseline ctDNA constitute a poor prognostic factor in progression-free survival in patients receiving neo-adjuvant chemo-immunotherapy: Results from NADIM clinical trial.* Provencio M, Serna-Blasco R, Nadal E, Insa A, Garcia-Campelo MR, Pereiro Corbacho D, Domine M, Majem M, Rodriguez-Abreu D, Martinez-Marti A, de Castro J, Cobo M, Lopez-Vivanco G, del Barco E, Bernabe R, Viñolas N, Barneto I, Viteri S, Pereira E, Royuela A, Casarrubios M, Salas C, Parra ER, Wistuba I, Calvo V, Laza-Briviesca R, Massuti B, Cruz-Bermudez A, Romero A

**ESMO ELCC 2021.** *Predictive molecular parameters of pneumonitis development in stage IIIa NSCLC patients treated with neo-adjuvant chemo-immunotherapy from NADIM clinical trial.* Sierra-Rodero B, Garitaonandia Y, Martinez-Cutillas M, Nadal E, Insa A, Garcia Campelo MR, Casal Rubio J, Domine Gomez M, Majem Tarruella M, Rodriguez Abreu D, Martinez-Marti A, De Castro Carpeno J, del Barco E, Viñolas N, Barneto Aranda IC, Massuti Sureda B, Casarrubios M, Laza-Briviesca R, Cruz-Bermudez A, Provencio M

**WCLC 2020.** *TCR repertoire predicts pathological response in NSCLC patients receiving neoadjuvant chemoimmunotherapy from NADIM trial.* Casarrubios M, Nadal E, Cruz-Bermúdez A, Insa A, Laza-Briviesca R, García Campelo R, Sierra-Rodero B, Casal J, Dómine M, Massutí B, Majem Tarruella M, Rodríguez Abreu D, Martínez-Martí A, de Castro J, Cobo M, López Vivanco G, del Barco E, Bernabé R, Viñolas N, Barneto I, Viteri S, Jové M, Franco F, Provencio M.

**WCLC 2020.** *Molecular Insight into NADIM Clinical Trial: Potential Immune Biomarkers of Pathological Response for NSCLC Patients.* Laza Briviesca R, Nadal E, Casarrubios M, Insa A, Sierra-Rodero B, Garcia Campelo MR, Huidobro G, Dómine Gómez M, Massuti B, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martinez-Marti A, De Castro Campeño I, Cobo Dols M, López Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto I, Viteri S, Cruz-Bermudez A, Provencio M

**GECP 2020.** *T-cell receptor repertoire predicts pathological response in non-small cell lung cancer patients receiving neoadjuvant chemoimmunotherapy.* Casarrubios M, Laza-Briviesca R, Sierra-Rodero B, Nadal E, Insa A, García-Campelo R, Casal J, Dómine M, Massutí B, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, de Castro J, Cobo M, López-Vivanco G, del Barco E, Bernabé R, Viñolas N, Barneto I, Viteri S, Jové M, Salas Antón C, Franco F, Calvo V, Cruz- Bermúdez A and Provencio M

**ASCO 2020.** *Peripheral blood T-cell receptor immune repertoire characterization of stage IIIA non-small cell lung cancer patients receiving neo-adjuvant chemo-immunotherapy treatment from NADIM study.* Cruz-Bermúdez A, Casarrubios M, Laza-Briviesca R, Sierra-Rodero B, Barquín M, Romero A, Franco F, Calvo V, Nadal E, Insa A, Garcia-Campelo R, Casal J, Domine M, Massuti B, Majem M, Rodriguez-Abreu D, Martinez-Marti A, De Castro J, Provencio M

**ESMO 2019.** *Immune cell biomarkers on neo-adjuvant chemo-immunotherapy treatment for resectable stage IIIA NSCLC patients.* Laza-Briviesca R, Cruz-Bermudez A, Casarrubios M, Nadal E, Insa Molla A, Garcia-Campelo M-R, Huidobro G, Domine Gomez M, Majem Tarruella M, Rodriguez Abreu D, Martinez-Marti A, De Castro Carpeno J, Cobo Dols M, Lopez Vivanco G, del Barco Morillo E, Bernabe R, Viñolas N, Barneto Aranda IC, Massuti Sureda B, Provencio M

## Conocimientos y habilidades

### Idiomas

- Español nativo.

- First Certificate in English.
- **Alemán nivel A2.**

## **Experiencia en técnicas de laboratorio**

- **Laboratorio de inmuno-oncología de cáncer de pulmón en IDIPHIM.**  
Responsables: Alberto Cruz-Bermúdez, PhD., Mariano Provencio, PhD.
  - Procesamiento de muestras de tumor parafinado y sangre periférica de pacientes.
  - Extracción de RNA y DNA a partir de muestras de tumor (Covaris) y sangre periférica (Maxwell)
  - Desarrollo de tecnología NGS: elaboración de librerías, secuenciación y análisis de la secuenciación.
  - Análisis estadístico con Graphpad y SPSS.
  - Tecnología de RNA-seq: preparación de librerías y análisis de expresión diferencial génica mediante RStudio, y paquetes bioinformáticos DESeq2, GSEA.
  - Manejo de bases de datos.
  - Presentación de trabajos en congresos internacionales.
- **Laboratorio de Tumorinmunología en IdiPaz.** Responsables: Eduardo López-Collazo, PhD., Luis Aguirre, PhD.
  - Conocimiento en **citometría de flujo** multiparamétrica y análisis de datos mediante FlowJo.
  - Preparación de Ficoll a partir de buffies y de muestras de sangre de pacientes. **Procesamiento de material biológico derivado de muestras tumorales de pacientes.**
  - Trabajo con cultivos primarios y con líneas celulares primarias, de cáncer de pulmón (H460, A549) y de cáncer de colon (HCT116, SW280)
  - Ensayos ELISA.
- Prácticas en el **grupo de Biología Celular Epitelial.** Responsable: Prof. Mirna Pérez-Moreno. Experiencia en **cultivos celulares, Western Blot, RT-qPCR, microscopía de fluorescencia.**
  - Cultivos celulares (ensayos de viabilidad y apoptosis, transfecciones, sobreexpresión de proteínas, ensayos de formación de colonias, de migración y de invasión.
  - Trabajo con células de cultivo primario establecidas de queratinocitos de piel de ratón.
  - Trabajo con mRNA, shRNA, RT-qPCR
  - Cuantificación y aislamiento de proteínas, electroforesis e inmunoblotting (Western blot).
  - Transformación en bacteria, aislamiento de DNA.

- Microscopía de fluorescencia, inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.
- Prácticas en Facultad de Farmacia desde Octubre 2013 a Mayo 2014. Caracterización de compuestos por NMR, autonomía en el laboratorio, columna cromatográfica, reacciones orgánicas. Participación en *Jornadas Complutenses* 2014.

## Conocimientos informáticos

Microsoft Office, **GraphPad Prism**, **FlowJo**, ImageJ, Photoshop, RStudio, SPSS.

## Referencias

- **Mariano Provencio MD, PhD.** Jefe de Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Puerta de Hierro.  
e-mail: [mprovenciop@gmail.com](mailto:mprovenciop@gmail.com)
- **Alberto Cruz-Bermúdez, PhD.** Grupo de Inmunooncología. Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Puerta de Hierro.  
e-mail: [alberto.cruz.bermudez@gmail.com](mailto:alberto.cruz.bermudez@gmail.com)
- **Eduardo López-Collazo, PhD.** Grupo de Inmunidad Innata y Tumor-inmunología. Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz.  
Tel: +34 917277576  
e-mail: [elopezc@salud.madrid.org](mailto:elopezc@salud.madrid.org)
- **Luis A. Aguirre, PhD.** Grupo de Inmunidad Innata y Tumor-inmunología. Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz.  
Tel: +34 917277576  
e-mail: [laguirre04@gmail.com](mailto:laguirre04@gmail.com)
- **Mirna Pérez-Moreno, PhD.** Profesora asociada en el Departamento de Biología de la Universidad de Copenhague.  
Tel: +45 35 33 35 40  
e-mail: [mirna.pmoreno@bio.ku.dk](mailto:mirna.pmoreno@bio.ku.dk)

# Pretreatment Tissue TCR Repertoire Evenness Is Associated with Complete Pathologic Response in Patients with NSCLC Receiving Neoadjuvant Chemoimmunotherapy



Marta Casarrubios<sup>1</sup>, Alberto Cruz-Bermudez<sup>1</sup>, Ernest Nadal<sup>2</sup>, Amelia Insa<sup>3</sup>, María del Rosario García Campelo<sup>4</sup>, Martín Lazaro<sup>5</sup>, Manuel Domine<sup>6</sup>, Margarita Majem<sup>7</sup>, Delvys Rodríguez-Abreu<sup>8</sup>, Alex Martínez-Martí<sup>9</sup>, Javier de Castro-Carpeño<sup>10</sup>, Manuel Cobo<sup>11</sup>, Guillermo Lopez-Vivanco<sup>12</sup>, Edel Del Barco<sup>13</sup>, Reyes Bernabe Caro<sup>14</sup>, Nuria Viñolas<sup>15</sup>, Isidoro Barneto Aranda<sup>16</sup>, Santiago Viteri<sup>17</sup>, Bartomeu Massuti<sup>18</sup>, Miguel Barquín<sup>1</sup>, Raquel Laza-Briviesca<sup>1</sup>, Belen Sierra-Rodero<sup>1</sup>, Edwin R. Parra<sup>19</sup>, Beatriz Sanchez-Espiridion<sup>19</sup>, Pedro Rocha<sup>19</sup>, Humam Kadara<sup>19</sup>, Ignacio I. Wistuba<sup>19</sup>, Atocha Romero<sup>1</sup>, Virginia Calvo<sup>1</sup>, and Mariano Provencio<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Purpose:** Characterization of the T-cell receptor (TCR) repertoire may be a promising source for predictive biomarkers of pathologic response to immunotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).

**Experimental Design:** In this study, next-generation TCR sequencing was performed in peripheral blood and tissue samples of 40 patients with NSCLC, before and after neoadjuvant chemoimmunotherapy (NADIM clinical trial, NCT03081689), considering their complete pathologic response (CPR) or non-CPR. Beyond TCR metrics, tissue clones were ranked by their frequency and spatiotemporal evolution of top 1% clones was determined.

**Results:** We have found a positive association between an uneven TCR repertoire in tissue samples at diagnosis and CPR at surgery. Moreover, TCR most frequently ranked clones (top 1%) present in diagnostic biopsies occupied greater frequency in the total clonal

space of CPR patients, achieving an AUC ROC to identify CPR patients of 0.967 (95% confidence interval, 0.897–1.000;  $P < 0.001$ ), and improving the results of PD-L1 tumor proportion score (TPS; AUC  $\frac{1}{4}$  0.767;  $P < 0.026$ ) or tumor mutational burden (TMB; AUC  $\frac{1}{4}$  0.550;  $P < 0.687$ ). Furthermore, tumors with high pretreatment top 1% clonal space showed similar immune cell populations but a higher immune reactive gene expression profile. Finally, the selective expansion of pretreatment tissue top 1% clones in peripheral blood of CPR patients suggests also a peripheral immunosurveillance, which could explain the high survival rate of these patients.

**Conclusions:** We have identified two parameters derived from TCR repertoire analysis that could outperform PD-L1 TPS and TMB as predictive biomarkers of CPR after neoadjuvant chemoimmunotherapy, and unraveled possible mechanisms of CPR involving enhanced tumor immunogenicity and peripheral immunosurveillance.

## Introduction

Lung cancer is one of the main leading causes of death by cancer worldwide. Approximately 85% of cases are non-small cell lung cancer (NSCLC), of which one third are diagnosed at locally advanced or stage III disease. Stage III NSCLC is a heterogeneous

disease that includes patients with potentially resectable tumors that could theoretically be cured.

Recently, in NADIM trial (NCT03081689; ref. 1), we have shown that patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy achieved a progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) rates at 2 years of 77% and 90%, respectively, whereas 63% of patients

<sup>1</sup>Servicio de Oncología Médica, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro-Segovia de Arana (IDIPHISA), Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Fundación INCLIVA, Hospital Clínico Universitario de Valencia, Valencia, Spain. <sup>4</sup>Hospital Universitario A Coruña, A Coruña, Spain. <sup>5</sup>Hospital Universitario de Vigo, Pontevedra, Spain. <sup>6</sup>Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. <sup>7</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. <sup>8</sup>Hospital Insular de Gran Canaria, Las Palmas, Spain. <sup>9</sup>Hospital Universitario e Instituto de Oncología Vall d'Hebron (VHIO), Barcelona, Spain. <sup>10</sup>Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain. <sup>11</sup>Hospital Universitario Regional de Málaga, Málaga, Spain. <sup>12</sup>Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain. <sup>13</sup>Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain. <sup>14</sup>Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain. <sup>15</sup>Hospital Clínic, Barcelona, Spain. <sup>16</sup>Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain. <sup>17</sup>Instituto Oncológico Dr. Rosell, Hospital Universitario Quirón Dexeus, Grupo QuirónSalud, Barcelona, Spain. <sup>18</sup>Hospital General de Alicante, Alicante, Spain. <sup>19</sup>Department of Translational Molecular Pathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

M. Casarrubios and A. Cruz-Bermudez contributed equally to this article.

Corresponding Authors: Alberto Cruz-Bermudez, Servicio de Oncología Médica, Instituto de Investigación, Sanitaria Puerta de Hierro, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid 28222, Spain. E-mail: [alberto.cruz.bermudez@gmail.com](mailto:alberto.cruz.bermudez@gmail.com); and Mariano Provencio, [mprovenciop@gmail.com](mailto:mprovenciop@gmail.com).

Clin Cancer Res 2021;27:5878–90

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-1200

This open access article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 International (CC BY-NC-ND).

© 2021 The Authors; Published by the American Association for Cancer Research

### Translational Relevance

The advance of chemoimmunotherapy in locally advanced stages of lung cancer has positioned complete pathologic responses (CPR) as a new relevant clinical entity, with implications for both the differential biology behind these responses and their possible use as an endpoint for assessing therapy efficacy. In this exploratory analysis of the NADIM trial, two biomarkers [top 1% clonal space and T-cell receptor (TCR) evenness], associated with T-cell repertoire imbalance, outperformed the established biomarkers PD-L1 and TMB, regarding CPR prediction after chemoimmunotherapy. In addition, some mechanistic insights are revealed, which imply a higher immunogenicity of tumors with high top 1% clonal space, as well as the presence of a distinctive peripheral immunosurveillance of pretreatment tissue top 1% clones, in patients achieving CPR. Finally, although these findings have potential clinical impact and are hypothesis generating, they are exploratory and need to be confirmed in additional, larger cohorts.

achieve a complete pathologic response (CPR). In addition, the PFS rate in patients with CPR was higher than in non-CPR patients. Although these are encouraging results, with most patients maintaining no evidence of disease status after surgery, some of them do not achieve complete responses and relapse or eventually die. Similar results from the phase III Checkmate 816 trial reinforce the superiority of chemoimmunotherapy compared with chemotherapy alone in the rate of CPR (2). Thus, the identification of biomarkers of CPR to chemoimmunotherapy induction is therefore a priority in the future scenario of resectable NSCLC.

In the context of immunotherapy, both the determination of PD-L1 and tumor mutational burden (TMB) have been carried out to predict which patients are more likely to respond to treatment (3, 4). However, the results are not consistent (5–7) and their value in the context of neoadjuvant chemoimmunotherapy is limited (1, 2). Thus, it is necessary to explore other biomarkers capable of predicting which patients will benefit most from this treatment (8, 9).

The mechanism by which the adaptive immune system responds to immunotherapy and recognizes tumor antigens relies mainly on the highly polymorphic T-cell receptors (TCR) present in an individual. That is why the characterization of the TCR repertoire in terms of clones, diversity, and antigen specificity by sequencing the CDR3 hypervariable region, seems to be a promising approach (10, 11). Other authors have previously reported that parameters extracted from the TCR repertoire were associated with response to immunotherapy in different patients with cancer (12–15) and in particularly, NSCLC (16–18). However, it has not been demonstrated its predictive value in pathologic response determination in neoadjuvant immunotherapy for patients with NSCLC (19). The mechanisms by which this response to immunotherapy occurs by lymphocytes has not been elucidated either, although some authors hypothesize that peripheral lymphocytes are probably involved in the reinvigoration of the response (19, 20). For these reasons, we propose the study of TCR repertoire and highlight its importance in mediating the response to immunotherapy.

For the first time, we describe longitudinally and spatially the TCR repertoire in patients with NSCLC receiving neoadjuvant chemoimmunotherapy. We also assess its capacity as a possible source for predictive biomarkers of complete pathologic response and its relation

with a proinflammatory state in the tumor microenvironment of CPR patients.

## Materials and Methods

### Study design and sample collection

All the studies presented here regarding TCR repertoire analysis are exploratory in nature and hypothesis generating and therefore will require validation in larger cohorts. Forty-six patients with resectable stage IIIA from NADIM clinical trial (NCT03081689) were treated with three cycles of nivolumab plus chemotherapy prior to surgery. All patients with enough material were included in the study. Patients were classified in two categories according to their tumor pathologic response: CPR patients (i.e., 0% of viable tumor cells in tumor bed or any lymph node analyzed) and non-CPR patients (i.e., patients with any percentage of viable tumor cells in resection specimens). Informed consent for the collection of research samples and study protocol were approved by the clinical research ethics committee of Hospital Puerta de Hierro in accordance with the International Conference on Harmonization Guidelines on Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki. Written informed consent to participate in the study was obtained from all patients.

Up to 125 samples of peripheral blood (n 65) and tissue (n 60) from these 46 patients were prospectively collected and sequenced to determine their TCR repertoire. TCR sequencing was carried out in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples collected before (n 30) and after (n 35) neoadjuvant treatment and in tissue samples obtained at diagnosis (n 22) and at surgery (n 438). RNA was used instead of DNA to decrease material input requirements and maximize valid samples for sequencing. Details of all patients, samples, and techniques used are summarized in Supplementary Table S1. In addition, a summary table with the number of paired samples analyzed for each technique and timepoint is shown in Supplementary Table S2. All molecular techniques were carried out in a blind fashion, only the pre- or posttreatment sample origin was known to the researchers conducting the experiments.

### RNA extraction

PBMCs were isolated from blood samples by gradient density centrifugation using Lymphoprep (Alere Technologies) and cryopreserved until use. RNA from cryopreserved PBMCs was extracted using Maxwell RSC simply RNA Cells Kit (Promega) as per manufacturer's instructions. RNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of biopsy at diagnosis and surgically resected specimens were extracted with the truXTRAC FFPE DNA Kit (Covaris). RNA quantification was carried out using the Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Catalog No. Q10210) on Qubit apparatus.

### TCR library preparation

RNA extracted from PBMCs and FFPE samples was used to prepare the libraries for TCR sequencing. cDNA was obtained from RNA using the SuperScript IV VILO Master Mix (Catalog No. 11756050). RNA input for PBMC-derived libraries was 25 and 100 ng for FFPE-derived libraries. TCR libraries from PBMC samples were done using the Oncomine TCR Beta-LR Assay (Catalog No. A35386). For FFPE-derived RNA samples, TCR libraries were done using the Oncomine TCR Beta-SR Assay (RNA; Catalog No. A39359). For PBMC-derived libraries, equal volumes from 8 samples at 25 pmol/L were pooled for sequencing on an Ion 530 chip. For FFPE-derived libraries, equal volumes from up to 32 samples at 25 pmol/L were combined for sequencing on an Ion 540 chip.

Casarrubios et al.

### TCR sequencing and data analysis

Once the libraries were templated, they were sequenced in the Ion GeneStudio S5 Series (Thermo Fisher Scientific) and analysis was done via Ion Reporter version 5.12 (Thermo Fisher Scientific). TCR convergence is determined as the aggregate frequency of clones, defined as unique TCRB nucleotide sequences, which shared a variable gene and CDR3 amino acid sequence with at least one other clone. Shannon's diversity was calculated using the formula below, in which  $p_i$  is the frequency of clonotype  $i$  for the sample with  $N$  unique clonotypes (21).

$$\text{Shannon Index } H' = -\sum_{i=1}^N p_i \log_2 p_i$$

Evenness describes how evenly distributed is the TCR repertoire, approaching 0 if the repertoire is unbalanced by a reduced number of predominant clones and approaching 1 if the repertoire is balanced, with similar frequencies of all the clones. It is calculated by dividing the Shannon's diversity index by  $\log_2(N)$ , where  $N$  is the total number of detected clones in each sample. Evenness high and low categories were defined using cohort median value ( $\geq 0.9077$ ).

Frequency classifications of the clones in the TCR repertoire were done according to their ranked relative abundance in the total T-cell repertoire, named as total clonal space, for each sample. We divided them into top 1%, top 1–2%, top 2–5%, and top >5% (19). In this way, the top 1% clonal space is defined as the aggregate frequencies of the top 1% most frequent clones. Top 1% high and low categories were defined using cohort median value ( $\geq 0.166115$ ).

When looking at the dynamics, we refer to contracted or expanded clones as those top 1% clones which their clonal frequency in peripheral blood decreases or increases after treatment.

Jaccard's index was calculated as:

$$J_{i,j} = \frac{\text{shared clones}}{\text{clones in A} \cup \text{clones in B}} = \frac{\text{shared clones}}{\text{clones in A} + \text{clones in B} - \text{shared clones}}$$

### Tumor microenvironment lymphocytes and gene expression analysis

Tumor immune cells were identified from FFPE diagnostic biopsies of 11 patients through multiplex immunofluorescence and quantified considering tumor or stroma localization as described previously (1, 22). The immunofluorescence markers used were grouped into two 6-antibody panels and allowed the quantification of: total malignant cells or reactive epithelial cells [CK (AE1/AE3)], malignant cells or reactive epithelial cells PD-L1 (CK, PD-L1), total T cells (CD3), cytotoxic T cells (CD3 CD8), T cells antigen-experienced (CD3 PD-1), cytotoxic T cells antigen-experienced (CD3 CD8 PD-1), T cells PD-L1 (CD3 PD-1), cytotoxic T cells PD-L1 (CD3 CD8 PD-1), T cells antigen-experienced PD-L1 (CD3 PD-1 PD-L1), cytotoxic T cells antigen-experienced PD-L1 (CD3 CD8 PD-1 PD-L1), total macrophages (CD68), macrophages PD-L1 (CD68 PD-L1), cytotoxic T cells activated (CD3 CD8 Granzyme B), memory T cells (CD3 CD45RO), effector/memory cytotoxic T cells (CD3 CD8 CD45RO), regulatory T cells [(CD3 FoxP3)–(CD3 CD8 FoxP3)], and memory/regulatory T cells (CD3 CD45RO FoxP3). Spearman nonparametric test was used for correlations between different cell subpopulations and pretreatment top 1% clonal space.

A single section of FFPE tissue was used to analyze gene expression through the HTG EdgeSeq Precision Immuno-Oncology Panel (HTG

Molecular Diagnostics) following manufacturer's instructions. Ten out of 11 patients sequenced had valid NGS data for further analysis. Using the top 1% clonal space cohort median as threshold ( $\geq 0.166115$ ), patients with NGS data were divided in two groups (high and low pretreatment top 1% clonal space).

The Bioconductor DESeq2 packages (version4; ref. 23) was used to perform the differential analysis expression, screening the differential expressed genes (DEGs) between high top 1% and low top 1%. To remove those low expressed genes, we applied an expression filter on row count data, selecting genes with, at least, five counts. A hierarchical clustering heatmap was performed using pheatmap package in R.

A selection of genes with threshold of absolute fold-change  $\geq 1$  and  $P < 0.05$  were recruited to perform the gene ontology (GO) enrichment analysis to identify significant biological processes among those genes. To analyze the processes involved on each group (high top 1% and low top 1%), two groups were established according to their fold-change values: those values  $\geq 1$  (upregulated on high top 1% group) and values  $\leq 1$  (upregulated on low top 1%). The significant processes were ordered according to their  $P$  value, selecting the 25 most significant processes for each group. This analysis was performed with R package boboRNASeq (24).

### PD-L1 tumor proportion score and TMB assessment

As previously reported, the baseline TMB of FFPE tumor diagnostic samples was assessed using an Ion S5 Sequencer (Thermo Fisher Scientific) with the OncoPrint Tumor Mutation Load Assay (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The commercially available PD-L1 IHC assay PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako) was used to assess PD-L1 tumor proportion score (TPS) in FFPE tumor diagnostic samples (1).

### Statistical analysis

Graphs were drawn using GraphPad PRISM v.6. and SPSS Statistics v25 was used to analyze the data and determine the statistical significance, considered by an overall  $P$  value  $< 0.05$ . Statistical significance was adjusted for multiple testing by Bonferroni correction when appropriate and was indicated in figure caption. Two-tailed, nonparametric Mann–Whitney  $U$  test was performed to compare CPR versus non-CPR groups. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was adopted to make comparisons between pre- and post-neoadjuvant treatment in paired samples. Spearman rank nonparametric test was used for variable correlations. High and low pretreatment top 1% clonal space patient groups were defined using the pretreatment TCR cohort median ( $n=22$ ). Contingency table analysis when comparing top 1% high and low patients with clinicopathologic features was done using Fisher exact test or Chi-square test. The ROC curve analysis was done to determine the association of the variables studied with therapy pathologic response. Regarding gene expression analysis, a multiple testing correction was performed to reduce the number of false positives, using Benjamini–Hochberg procedure and an adjusted  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### Availability of data

The datasets supporting this study are available from the corresponding authors upon request. Raw sequencing data are not freely available due to lack of specific authorization, regarding potential relevant germline information release, present in the original consent form signed by the patients during trial enrollment. However, raw data are available upon request and complete TCR clone lists identified in pretreatment or posttreatment samples can be found in Supplementary Files S1 and S2, respectively.

## Results

### Pretreatment tissue TCR evenness is associated with pathologic response to neoadjuvant chemoimmunotherapy

Forty-six patients with resectable stage IIIA were treated with three cycles of nivolumab plus chemotherapy prior to surgery; 41 of them underwent surgical resection. The clinicopathologic characteristics of the patients analyzed are shown in Table 1. PBMC samples collected before (pre-) and after (post-) neoadjuvant treatment and tumor samples obtained at diagnosis (pre-) and at surgery (post-) were subjected to TCR sequencing (Supplementary Table S1). From 77 tissue samples collected, we obtained valid TCR data for 60 (78%); three samples did not have sufficient tissue for RNA extraction and 14 did not yield enough RNA quantity for further analysis, however, all samples with enough RNA quantity generated valid NGS data. On the contrary, from 65 blood samples collected, we were able to obtain valid TCR data in all cases (100%).

As a first approach, TCR repertoire-derived metrics were analyzed. Regarding blood, there were no differences between CPR and non-CPR patients in both pre- or posttreatment PBMC samples in terms of clones sequenced, convergence, evenness, and diversity (Fig. 1A). Also, there were no differences between pre- and posttreatment PBMC samples in all patients nor stratifying by pathological response for these parameters (Fig. 1A).

However, when comparing tissue samples at diagnosis, we found that CPR patients had significantly lower TCR evenness in the TCR repertoire than non-CPR patients ( $P=0.010$ ), reflecting a skewed repertoire in complete pathologic responders (Fig. 1B). No differences were found in the other TCR metrics. In contrast, there were no differences in evenness in surgery samples. Focusing on the effect of

neoadjuvant treatment, an increase in evenness ( $P=0.028$ ), and a decrease in number of clones ( $P=0.037$ ), between pre- and post-treatment samples seems to be observed in patients who had CPR, that were not considered statistically significant after Bonferroni's correction (Fig. 1B).

Extensive analysis to define which ranges of clones were responsible for CPR and non-CPR TCR evenness differences was done. The top 1% most common clones occupied higher clonal space, with respect to the total repertoire, in CPR patients than in non-CPR patients ( $P=0.00015$ ; Fig. 1C). Opposite results were found for clones below the top 5% most common clones ( $P=0.001$ ; Fig. 1C). However, these differences were lost in surgery samples, presenting CPR and non-CPR patients similar clonal space values for all clonal ranges. Evaluating treatment effect, although a decrease in the clonal space occupied by the top 1% seems to occur in posttreatment compared with pretreatment samples, this was not statistically significant ( $P=0.043$ ; Fig. 1C).

### Pretreatment tissue TCR evenness and top 1% outperform TMB and PD-L1 identifying patients who achieve CPR

The ability of these two potential tissue biomarkers to potentially predict the pathologic response of these patients was analyzed. The AUC ROC for TCR evenness to distinguish between CPR and non-CPR was 0.844 [95% confidence interval (CI), 0.667–1.000;  $P=0.011$ ]. An evenness value lower than 0.863 showed 50% sensitivity and 100% specificity identifying patients that will achieve CPR, and therefore, will be potentially free of disease at the time of surgery (Fig. 2A). Determination of top 1% clonal space categorizes CPR and non-CPR patients with more accuracy than evenness, showing an AUC of 0.967 (95% CI, 0.897–1.000;  $P=0.001$ ; Fig. 2A). Top 1% clonal space higher

Table 1. Clinicopathologic characteristics of patients and their association with pretreatment tissue top 1% clonal space.

Clinicopathologic characteristics	Complete molecular cohort (n = 44)	Pretreatment TCR analysis cohort (n = 22)	Top 1% clonal space high (n = 11)	Top 1% clonal space low (n = 11)	P value (top 1% clonal space high vs. low)
Age (years)					0.428 <sup>a</sup>
Median (IQR)	62 (58.5–70)	65 (59–71)	68 (59–71)	64 (56–71)	
Sex					0.586 <sup>b</sup>
Male	32 (72.73)	18 (81.81)	8 (72.73)	10 (90.91)	
Female	12 (27.27)	4 (18.18)	3 (27.27)	1 (9.09)	
Smoking status					1.000 <sup>b</sup>
Former Smoker	23 (52.27)	10 (45.45)	5 (45.45)	5 (45.45)	
Smoker	21 (47.73)	12 (54.55)	6 (54.55)	6 (54.55)	
Histology					0.475 <sup>c</sup>
Squamous	15 (34.09)	10 (45.45)	4 (36.36)	6 (54.55)	
Adenocarcinoma NOS	25 (56.82)	11 (50.00)	6 (54.55)	5 (45.45)	
NOS	4 (9.09)	1 (4.55)	1 (9.09)	0 (0)	
Nodal stage					0.338 <sup>b</sup>
N0	9 (20.45)	6 (27.27)	4 (36.36)	2 (18.18)	
N1	3 (6.82)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
N2	32 (72.73)	16 (72.73)	7 (63.64)	9 (81.82)	
Path response					0.006 <sup>c</sup>
CPR	25 (56.82)	10 (45.45)	9 (81.82)	1 (9.09)	
MPR	8 (18.18)	3 (13.64)	0 (0)	3 (27.27)	
IPR	7 (15.91)	6 (27.27)	1 (9.09)	5 (45.45)	
Non-resected	4 (9.09)	3 (13.64)	1 (9.09)	2 (18.18)	

Note: The data shown correspond to number and (%) or median and (IQR). Complete molecular cohort consisted in all patients from who at least one molecular analysis was done (TMB, PD-L1, TILs, HTG, or TCR determination). Pretreatment TCR cohort was composed of all patients from whom TCR metrics were determined in pretreatment tissue sample. Patients with TCR determination in pretreatment tissue were classified as top 1% high or low according to cohort median (0.166115). Abbreviations: IPR, minor pathologic response; IQR, interquartile range; MPR, major pathologic response; NOS, not otherwise specified.

<sup>a</sup>P value was calculated using the Mann-Whitney U test.

<sup>b</sup>P value was calculated using Fisher exact test.

<sup>c</sup>P value was calculated using Chi-square test.



Casarrubios et al.

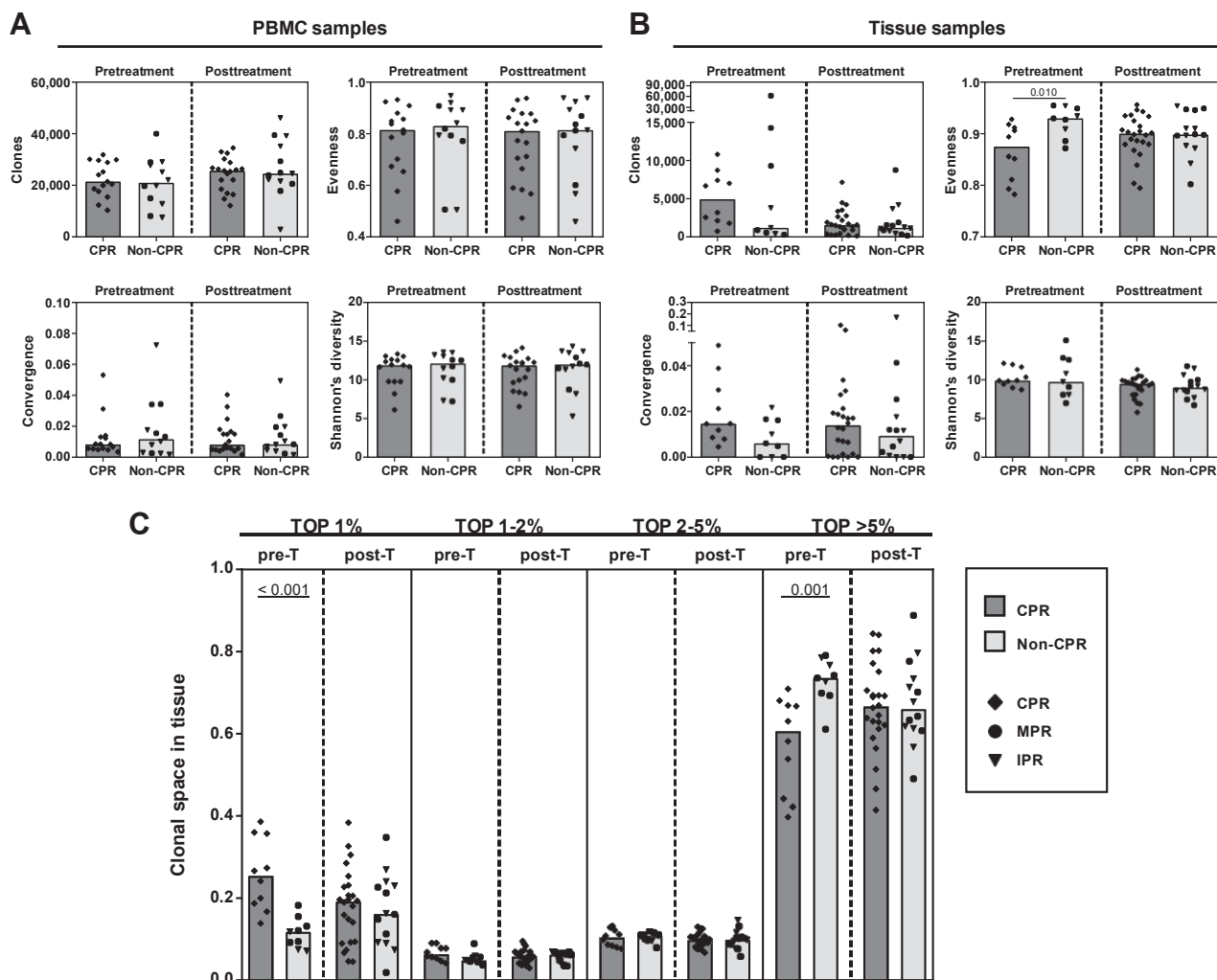


Figure 1.

Pretreatment tissue TCR evenness is associated with pathologic response to neoadjuvant chemotherapy. A, Differences in metrics derived from TCR repertoire analysis (such as number of clones, evenness, convergence, and Shannon's diversity index) in peripheral blood samples between CPR and non-CPR patients at pre- and post-neoadjuvant treatment. Pretreatment (pre-T) CPR patients,  $n = 15$ ; pre-T non-CPR patients,  $n = 12$ ; posttreatment (post-T) CPR patients,  $n = 19$ ; post-T non-CPR patients,  $n = 13$ . B, Differences in metrics in tissue samples between CPR and non-CPR patients. Pre-T CPR patients,  $n = 10$ ; pre-T non-CPR patients,  $n = 9$ ; post-T CPR patients,  $n = 24$ ; post-T non-CPR patients,  $n = 14$ . Comparisons were done between CPR and non-CPR patients and between pre- and posttreatment timepoints. C, Clonal space occupied by each of the percentage rank (top 1%, top 1–2%, top 2–5%, and top >5%) of the total repertoire in tissue samples. Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown for each rank. Pre-T CPR patients,  $n = 10$ ; pre-T non-CPR patients,  $n = 9$ ; post-T CPR patients,  $n = 24$ ; post-T non-CPR patients,  $n = 14$ . Each patient is represented by a black symbol.  $P < 0.0125$  was considered statistically significant after Bonferroni's correction for multiple tests. Only significant differences after Bonferroni's correction are shown.

than 0.1842 showed 80% sensitivity and 100% specificity identifying patients that will achieve CPR after chemotherapy. Out of the 19 total patients from our cohort with valid data, we were able to classify correctly 8/10 of those with CPR using this cut-off. No association between pretreatment tissue top 1% clonal space using the cohort median as threshold with age, sex, smoking status, histology, or nodal stage at diagnosis was found (Table 1).

We next compared the ability of TCR evenness and top 1% clones with PD-L1 TPS and TMB to potentially predict CPR patients. The AUC ROCs for PD-L1 TPS and TMB to distinguish CPR and non-CPR patients were 0.767 (95% CI, 0.578–0.955;  $P = 0.026$ ) and 0.550 (95% CI, 0.308–0.792;  $P = 0.687$ ), respectively (Fig. 2A). These results indicate that both evenness and top 1% showed better sensitivity and

specificity to classify patients achieving CPR after neoadjuvant chemotherapy than the commonly used PD-L1 and TMB.

Regarding survival, although the number of patients is limited and due to the efficacy of the therapy the number of events is small, patients with high pretreatment tissue top 1% clonal space seem to show a better prognosis both in their PFS ( $P = 0.053$ ) and OS ( $P = 0.059$ ; Fig. 2B). Thus, in the low top 1% group 5 patients have progressed and 3 of them have died, whereas in the high top 1% group only 1 patient has progressed without any death. These patterns are not observed for evenness, PD-L1, or TMB using median values as thresholds (Supplementary Fig. S1A).

We also assessed the relationships between TCR evenness, top 1%, PD-L1 TPS, and TMB analyzing the correlations between them.

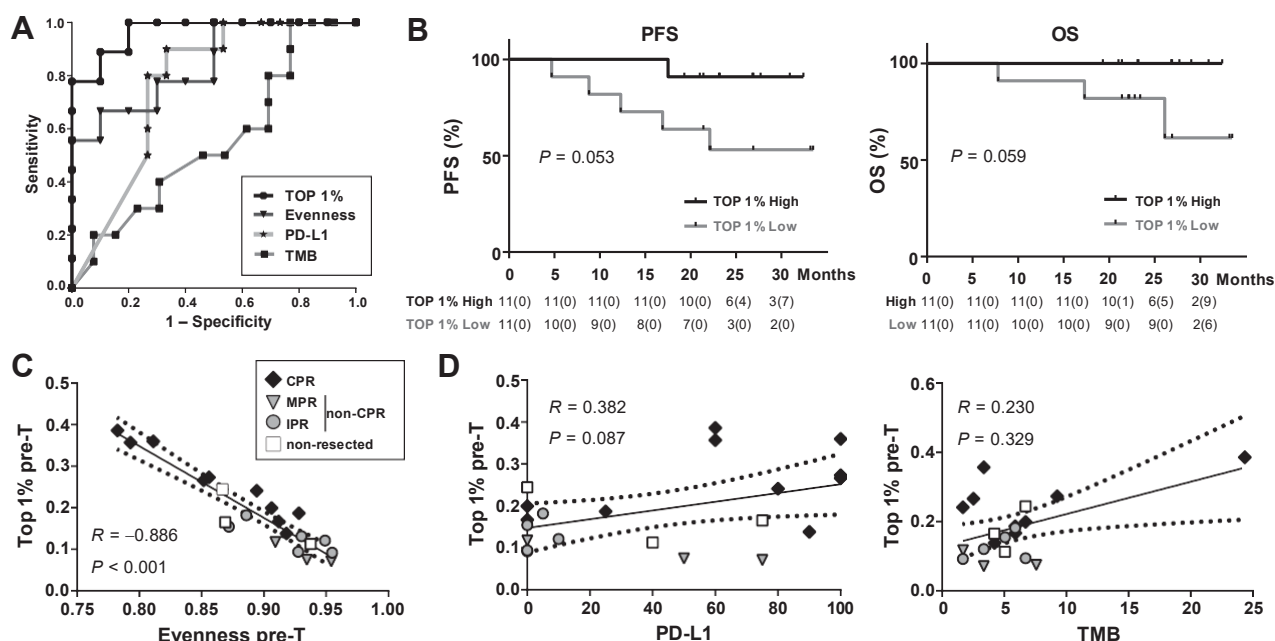


Figure 2.

Pretreatment tissue TCR evenness and top 1% could be better predictors of pathologic response than TMB and PD-L1 (A), PFS and OS percent survival stratified by pretreatment top 1% clones and evenness in pretreatment tumorsamples (B), correlation between clonal space occupied by the top 1% clones and evenness in pretreatment tumorsamples (C), correlation between clonal space occupied by the top 1% clones and PD-L1 in pre-T tissuesamples (D), correlation between frequency of the top 1% clones and TMB in pretreatment tissue samples (D). Each patient is represented by a dark gray (CPR), light gray (non-CPR), or white (nonresected) symbol. The black line indicates the linear regression line, and the dotted lines indicate the upper and lower boundaries of the 95% CI.

Evenness and top 1% clonal space were strongly negatively correlated ( $R = -0.886$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 2C). However, there was no correlation between top 1% clonal space and PD-L1 or TMB ( $R = 0.382$ ,  $P = 0.087$ ;  $R = 0.230$ ,  $P = 0.329$ ; Fig. 2D) nor between evenness and PD-L1 or TMB ( $R = 0.359$ ,  $P = 0.109$ ;  $R = 0.241$ ,  $P = 0.306$ ; Supplementary Fig. S1B), strengthening the independent value of these biomarkers.

The presence of any mutations of potential clinical relevance, specifically *KEAP1* ( $n = 3$ ), *EGFR* ( $n = 1$ ), *TP53* ( $n = 9$ ), *KRAS* ( $n = 3$ ), and *HNF1A* ( $n = 4$ ) in this cohort, was not associated with changes in tumor top 1% clonal space levels (Supplementary Fig. S1C; Supplementary Tables S1 and S3).

#### Tissue TCR evenness and top 1% clonal space are independent of main technical parameters

To assess the robustness of tissue TCR repertoire evenness and top 1% clonal space parameters, we tested whether different common technical factors (i.e. read depth, identified clones, tissue origin, and library preparation) could influence these putative biomarkers.

No correlation between reported read count and evenness ( $R = 0.079$ ;  $P = 0.748$ ) or tissue top 1% clonal space ( $R = 0.384$ ;  $P = 0.104$ ) was observed (Supplementary Fig. S2A). In addition, there were no differences in read counts between samples of CPR and non-CPR patients at diagnosis ( $P = 0.182$ ) or surgery ( $P = 0.777$ ; Supplementary Fig. S2B). Also, no correlation was found between the number of clones detected and evenness ( $R = 0.149$ ;  $P = 0.542$ ) or top 1% clonal space ( $R = 0.193$ ;  $P = 0.429$ ; Supplementary Fig. S2C).

Furthermore, these biomarkers were not strongly influenced by biopsy's origin. No differences were found between tumor or lymph

node biopsies, for both evenness or top 1% clonal space (Supplementary Fig. S2D). Also, the differences seen in the frequency of the top 1% were maintained regardless of the origin of the sample. Patients with CPR have a higher frequency of the top 1% than non-CPR patients in both tumor tissue samples ( $P = 0.030$ ) and in lymph node samples ( $P = 0.029$ ; data not shown). Finally, we also checked that these metrics and the clonal reproducibility did not significantly vary between different libraries made from the same sample or within technical sequencing replicates from the same library. TCR evenness and top 1% were stable across technical replicates (Supplementary Fig. S3A). Clonal reproducibility was almost perfect between sequencing replicates, reaching a Jaccard's index near 1 for all clonal ranges. However, the clonal reproducibility between libraries was only maintained for top 1% and top 1% to 2%, decreasing for top 2% to 5% and being almost gone for clones below the 5% most common clones (Supplementary Fig. S3B).

#### CPR patients showed a selective expansion of pretreatment tissue top 1% clones in peripheral blood

In view of the importance of the top 1% frequency-ranked clones present in pretreatment tissue samples, we studied the relevance of this top 1% in the different compartments, deepening in the study of their individual dynamics in peripheral blood and tissue considering whether they were expanded or contracted during neoadjuvant treatment.

As a first approach in blood, we found no statistically significant differences between CPR and non-CPR patients in the clonal space occupied by the top 1% clones of diagnostic tissue in pre- or post-treatment PBMC samples (pretreatment,  $P = 0.234$ ; posttreatment,

Casarrubios et al.

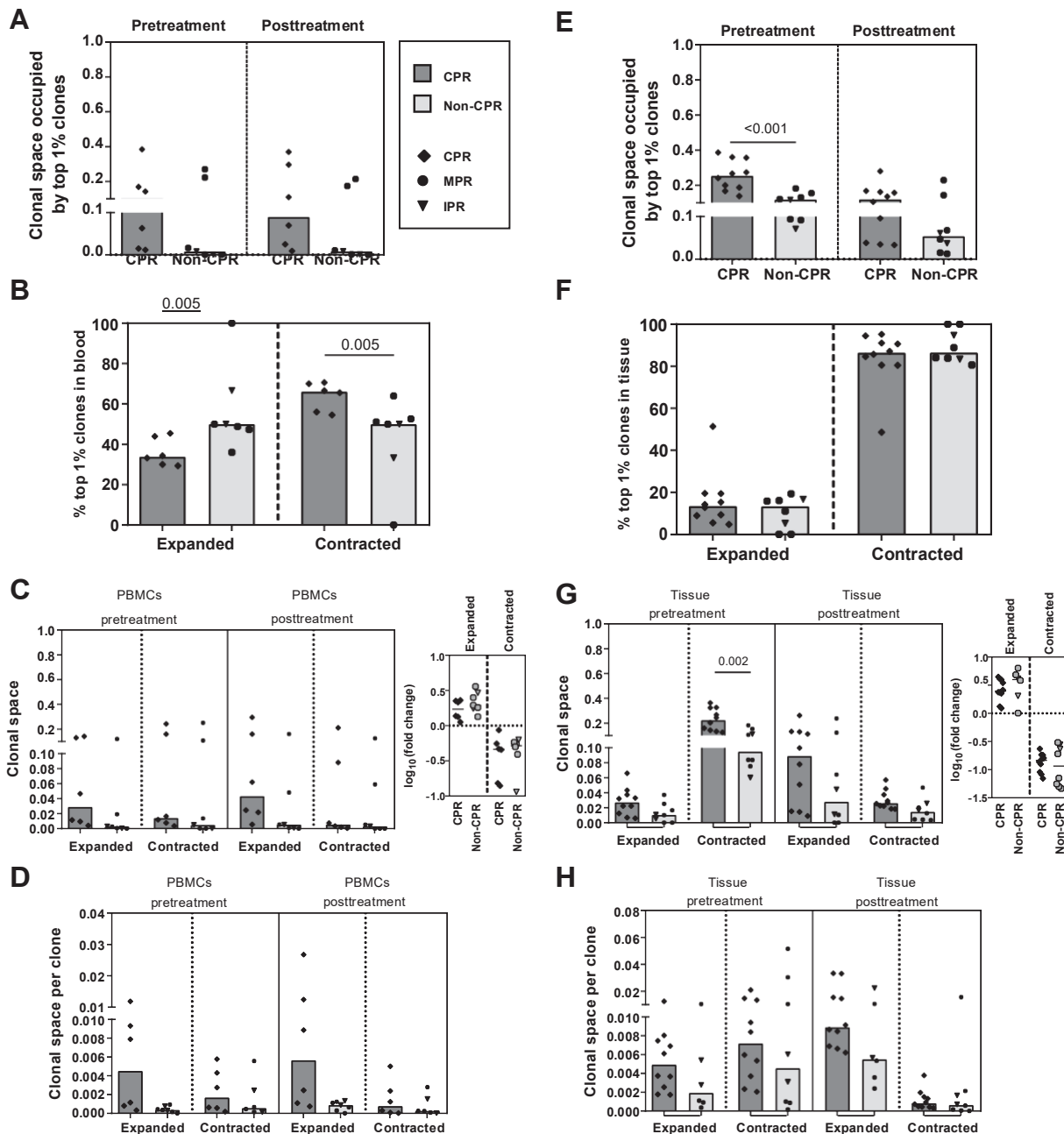


Figure 3.

CPR patients showed a selective expansion of tissue top 1% clones in peripheral blood. A, Clonal space occupied by the top 1% tissue pre-T clones in pre- and posttreatment PBMC samples. Comparisons between CPR and non-CPR patients in pre- and posttreatment timepoints are shown ( $n = 13$ ; CPR,  $n = 6$ ; non-CPR,  $n = 7$ ). B, Percentage of top 1% tissue pre-T clones that were peripherally expanded or contracted (known as dynamic clones). Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown ( $n = 13$ ; CPR,  $n = 6$ ; non-CPR,  $n = 7$ ). C, Clonal space occupied by dynamic clones in peripheral repertoire: PBMCs pre-T and PBMCs post-T. Expressed as frequency of clonal space occupied by the top 1% tissue pre-T clones and fold change between pre- and posttreatment timepoints. Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown ( $n = 13$ ; CPR,  $n = 6$ ; non-CPR,  $n = 7$ ). D, Median contribution of peripherally expanded ( $n = 13$ ; CPR,  $n = 6$ ; non-CPR,  $n = 7$ ) or contracted clones ( $n = 12$ ; CPR,  $n = 6$ ; non-CPR,  $n = 6$ ) in pre- and posttreatment peripheral blood. Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown. E, Clonal space occupied by the top 1% tissue pre-T in pre- and posttreatment tissue samples. Comparisons between CPR and non-CPR patients in pre- and posttreatment timepoints are shown ( $n = 18$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 8$ ). F, Percentage of top 1% tissue pre-T clones that were intratumorally expanded or contracted. Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown ( $n = 18$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 8$ ). G, Clonal space occupied by top 1% dynamic clones in tissue: tissue pre-T and tissue post-T. Expressed as frequency of clonal space occupied and fold change between pre- and post-treatment. Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown ( $n = 18$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 8$ ). H, Median contribution of intratumorally expanded ( $n = 16$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 6$ ) or contracted clones ( $n = 18$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 8$ ) in pre- and posttreatment peripheral blood. Comparisons between CPR and non-CPR patients are shown. Each patient is represented by a symbol.  $P < 0.0125$  was considered statistically significant after Bonferroni's correction for multiple tests. Only significant differences after Bonferroni's correction are shown.

$P = 0.059$ ). Similarly, there was also no significant changes after treatment in the clonal space of this pretreatment tissue top 1% clones in blood for both CPR and non-CPR patients (Fig. 3A).

We also evaluated the percentage of peripherally expanded or contracted pretreatment tissue top 1% clones. Patients achieving CPR showed statistically significant lower percentage of expanded clones and consequently, higher percentage of contracted clones compared with non-CPR patients ( $P = 0.005$ ; Fig. 3B). However, there were no differences in the clonal space occupied by expanded or contracted pretreatment tissue top 1% clones between pathologic response groups in pre- or posttreatment PBMC samples nor in their fold changes associated (Fig. 3C).

Because the percentage of expanded clones in CPR patients was lower than in non-CPR, but the clonal space remained similar, we decided to evaluate the individual contribution of those clones to the clonal space. To do this, we normalized the clonal space by the number of clones that were expanded or contracted, thus comparing the average clonal space per clone between CPR and non-CPR patients. The tissue top 1% clones that were expanded in the blood of CPR patients seems to have larger average size per clone than their non-CPR counterparts; both in the pre- ( $R = 0.022$ ) or post- ( $R = 0.051$ ) PBMCs' clonal space (Fig. 3D).

Concerning their implication in tissue, the clonal space occupied by the pretreatment top 1% clones in tissue samples was significantly reduced after treatment for all patients ( $P = 0.005$ ). However, stratifying by pathological response, only CPR patients showed a decrease (CPR patients,  $P = 0.013$ ; non-CPR patients,  $P = 0.208$ ; Fig. 3E). In addition, the space occupied by the pretreatment top 1% tissue clones seems to be higher in CPR patients compared with non-CPR patients after treatment, although no statistically significant differences were seen ( $P = 0.237$ ).

When looking at their intratumoral dynamics, we observed that more than 80% of them were contracted in post-neoadjuvant treatment tissue. Unlike blood, no differences were observed in tissue top 1% dynamics between CPR and non-CPR patients (Fig. 3F). Same as previously shown with PBMC samples, the clonal space occupied by expanded clones nor the fold change between pre- and posttreatment tissue, showed differences between CPR and non-CPR patients (Fig. 3G). In addition, there was a higher clonal space occupied by contracted clones in tissue pretreatment in CPR patients compared with non-CPR ( $P = 0.002$ ; Fig. 3G). However, no differences were seen in the average clonal space occupied by each clone in pre- and posttreatment tissue, in CPR or non-CPR patients (Fig. 3H).

#### Tumors with high pretreatment top 1% clonal space showed an immune reactive gene expression profile

To understand what characterizes the tumors with high or low top 1% clonal space, we analyzed the relationship of this biomarker with the pretreatment tumor immune infiltrate and the gene expression profile.

In terms of immune cell content, no association was found between top 1% clonal space and tumor, stroma, or total levels of any immune cell subpopulations analyzed (data not shown). Only a weak correlation was found between T lymphocytes infiltrating the tumor (CD3<sup>+</sup> cells) and the clonal space of the top 1% ( $R = 0.609$ ,  $P = 0.047$ ) that was not considered statistically significant after multiple comparisons correction (Fig. 4A). However, stratifying between high and low top 1% clonal space tumors, using cohort median as cutoff, no differences were found in CD3<sup>+</sup> levels (Fig. 4A).

Despite the low number of cases analyzed, the RNA sequencing (RNA-seq) results showed a differential gene expression profile for tumors with high or low top 1% clonal space, as shown in the hierarchical heatmap (Fig. 4B). Nearly 200 genes were differentially expressed in high compared with low top 1% tumors (Fig. 4C). Specifically, 139 genes were upregulated, including *IFNG* (Log2FC 1.14, adjusted  $P$  value  $1/4 = 0.022$ ), *IL2* (Log2FC 1.78, adjusted  $P$  value  $< 0.001$ ), and *IL13* (Log2FC 2.16, adjusted  $P$  value  $< 0.001$ ). Conversely, 53 genes were downregulated, including *VEGFC* (Log2FC 1.39, adjusted  $P$  value  $1/4 = 0.008$ ), *MAPK1* (Log2FC 1.30, adjusted  $P$  value  $1/4 = 0.008$ ), or *IGF1R* (Log2FC 1.31, adjusted  $P$  value  $< 0.001$ ). A complete list of differentially expressed genes can be found at Supplementary Table S4.

Finally, to identify the main biological processes of differentially expressed genes in tumors with high pretreatment top 1% clonal space, GO enrichment analysis was carried out (Supplementary Table S5). Top 25 terms for upregulated genes include processes such as: positive regulation of immune effector process (GO:0002699), positive regulation of cell killing (GO:0031343), or regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT (GO:0046425). On the other hand, top 25 terms for downregulated genes include processes such as: epithelial cell proliferation (GO:0050673), cell-cycle arrest (GO:0007050), positive regulation of angiogenesis (GO:0045766), negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001237), or positive regulation of protein serine/threonine kinase activity (GO:0071902; Fig. 4D).

#### Shared and newly emergent posttreatment top 1% clones are not informative of patient response

To reveal possible response mechanisms, we decided to analyze also the role of the clones belonging to the top 1% posttreatment tissue according to whether they belong to the pretreatment top 1%, pretreatment non-top 1%, or were newly emerging clones (NEC; i.e., not detected in pretreatment tissue).

Posttreatment tissue top 1% clonal space analysis showed no statistically significant differences between these categories ( $P = 0.073$ ), however the median clonal space of non-top 1% pretreatment clones doubles the clonal space of NEC in posttreatment tissue ( $P = 0.09$ ; Fig. 5A). Anyhow, no differences between CPR and non-CPR were observed in the relative space of these clone subgroups (Fig. 5B).

To determine the specific relevance of the pretreatment top 1% clones, their clonal space was compared with the rest of the clones (i.e., the sum of the non-top 1% and NEC clones), showing the latter category larger values, occupying near 70% of the posttreatment top 1% clonal space ( $P = 0.010$ ; Fig. 5C).

Regarding NEC, their clonal space was compared with that occupied by pretreatment shared clones. The clonal space of shared clones was higher than that of NEC, occupying near 80% of the posttreatment top 1% clonal space ( $P = 0.020$ ; Fig. 5D).

To analyze in blood the dynamics of the top 1% clones of posttreatment samples, we selected those patients from whom we had paired samples of the four compartments (tissue and blood at the pre- and posttreatment timepoints,  $n = 42$ ). Clonal space of tissue shared clones were not altered in blood after treatment (Supplementary Fig. S4A), being this behavior similar between CPR and non-CPR patients (Supplementary Fig. S4B). Concerning NEC, an increase in their clonal space in blood after treatment was observed ( $P = 0.018$ ; Supplementary Fig. S4C). Analyzing it by response, it seems that this increase is mostly produced in non-CPR patients, showing a trend for higher NEC clonal space in posttreatment blood compared with CPR patients ( $P = 0.020$ ; Supplementary Fig. S4D).

Casarrubios et al.

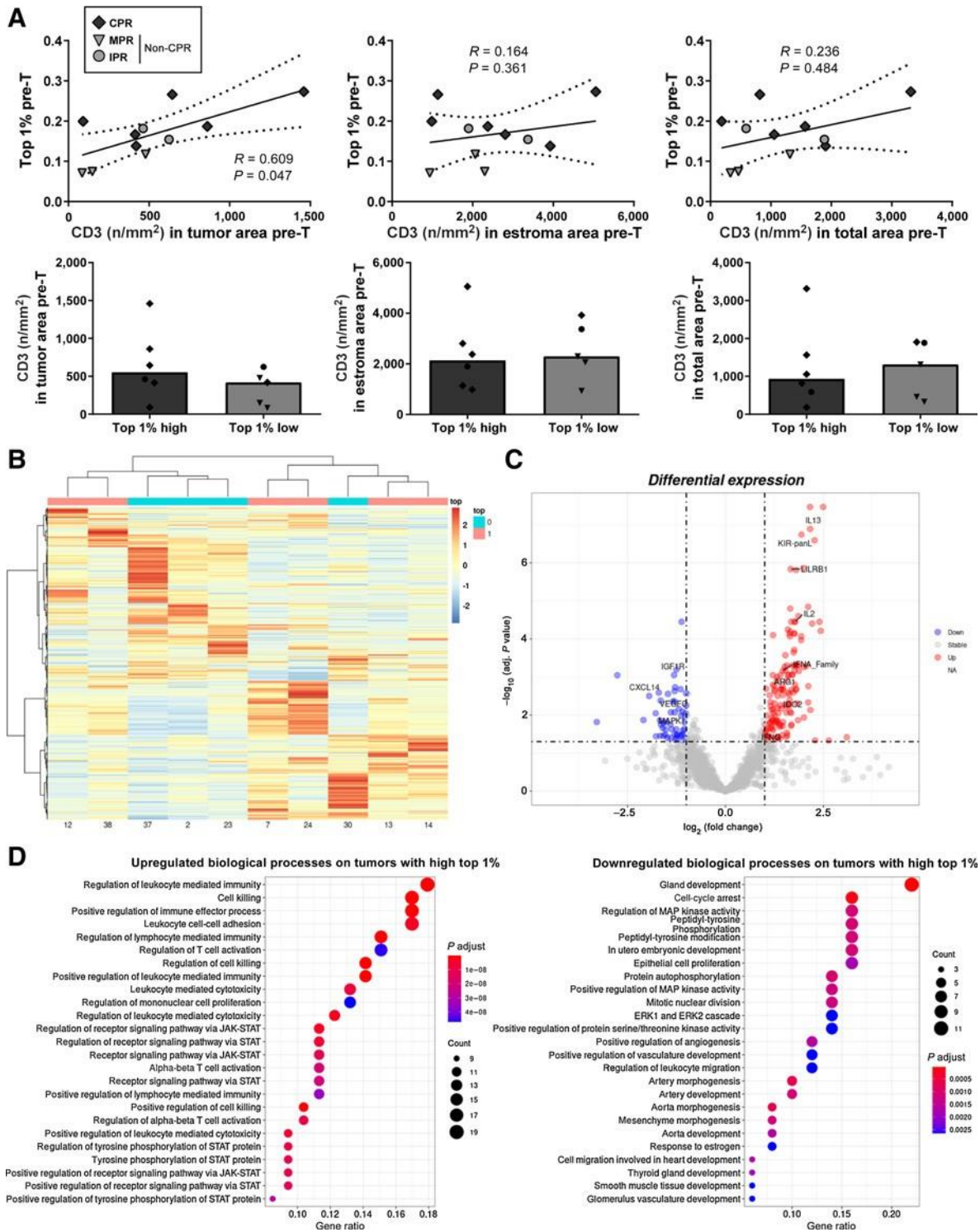


Figure 4.

Immune cells and gene expression analysis of tumors with high or low top 1% clonal space. A, Correlation between CD3 tumor-infiltrating lymphocytes (cells per mm<sup>2</sup>) and top 1% clonal space in pretreatment tissue. Comparisons between high top 1% and low top 1% patients are shown.  $P < 0.001$  was considered statistically significant after Bonferroni's correction for multiple tests. B, Hierarchical clustered heatmap showing the expression patterns of all genes analyzed across tumors with high (pink) and low (cyan) top 1% clonal space. The red boxes indicate the upregulated genes, and the blue boxes indicate downregulated genes. C, Volcano plot showing the  $\log_{10}$  of adjusted  $P$  value and  $\log_2$  fold change of all genes studied. Red (upregulated) and blue (downregulated) dots represent genes with  $\log_2$  fold change  $>|1|$  and statistically significant (adjusted  $P$  value  $<0.05$ ). D, Dot plots of top 25 enriched GO pathways for downregulated and upregulated genes in tumor with high top 1% clonal space versus tumors with low top 1% clonal space.

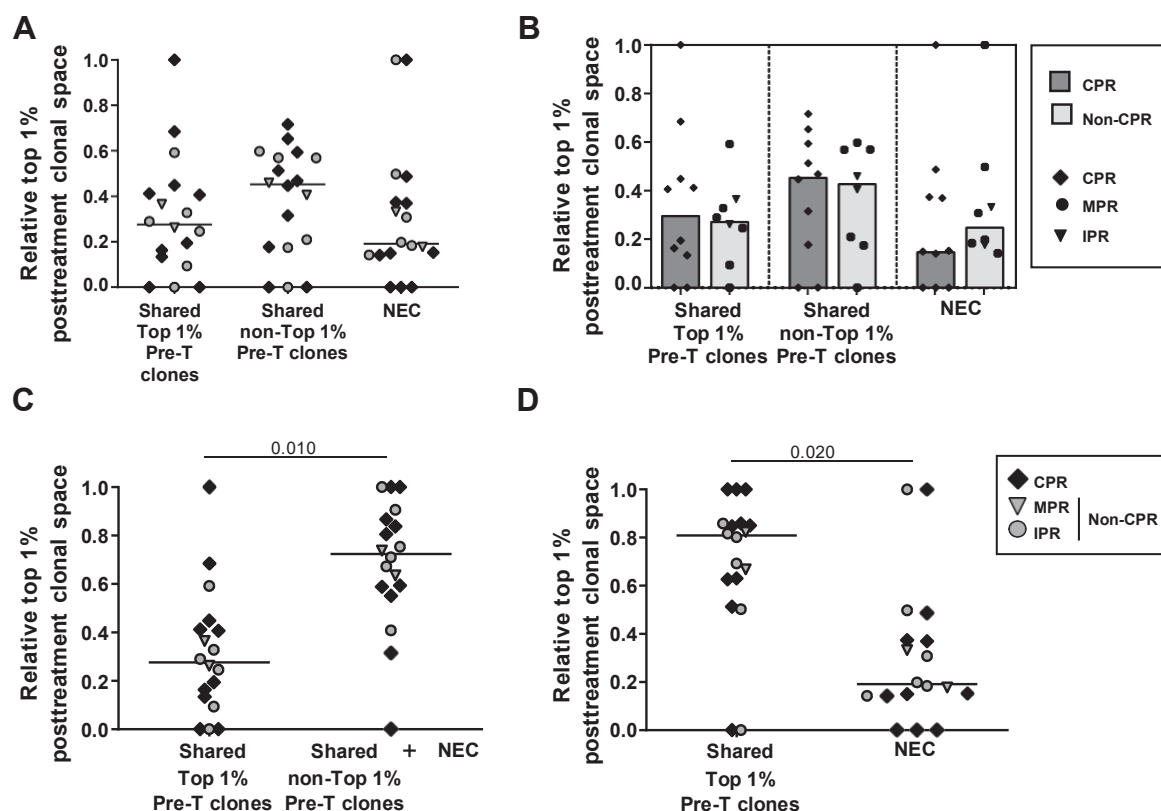


Figure 5.

Composition of top 1% clones of surgical specimens. A, Relative top 1% posttreatment clonal space occupied by clones shared between pre- and posttreatment, belonging to the top 1% pre-T tissue or non-top 1%, and by NEC ( $n = 18$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 8$ ). Comparisons between shared top 1% pre-T clones, shared non-top 1% pre-T clones, and NEC were done. B, Relative top 1% posttreatment clonal space occupied by clones shared between pre- and posttreatment, belonging to the top 1% pre-T tissue or non-top 1%, and by NEC stratified by response ( $n = 18$ ; CPR,  $n = 10$ ; non-CPR,  $n = 8$ ). Comparisons between CPR and non-CPR patients were done. C, Comparison of the relative top 1% posttreatment clonal space occupied between shared top 1% clones and non-top 1% plus NEC ( $n = 18$ ). D, Comparison of the relative top 1% posttreatment clonal space occupied between total shared clones and NEC ( $n = 18$ ). Each patient is represented by a symbol.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Only significant differences are shown.

## Discussion

There is a need for predictive biomarkers since neither PD-L1 nor TMB are capable of accurately predicting the response to chemoimmunotherapy in patients with advanced NSCLC (5–7), or neoadjuvant chemoimmunotherapy in locally advanced patients (1, 2). In this study, we performed TCR sequencing in peripheral blood and tissue samples from patients enrolled in NADIM trial (NCT03081689), at both pre- and post-neoadjuvant treatment timepoints. With this approach, we have shown for the first time a relationship between an uneven TCR repertoire in tissue samples at diagnosis and the complete pathologic response in NSCLC patients treated with chemoimmunotherapy.

We hypothesized that this uneven repertoire in CPR patients could be caused by a small number of dominating clones in the total repertoire. When looking to the most frequently ranked clones, we saw that the top 1% clones occupied higher clonal space in complete responder patients than in non-complete responders. Altogether, we have demonstrated that these two novel biomarkers derived from the TCR repertoire analysis could predict, with higher accuracy than PD-L1 and TMB, patients that will be free of disease at time of surgery due to their association with CPR after neoadjuvant chemoimmunotherapy.

In this way, the study of the pretreatment tissue top 1% clonal space as potential biomarker is encouraging; it reflects tumor immunogenicity and is strongly associated with tumor response being technically robust (21) and affordable considering turn-around times and costs. Thus, if its value is confirmed in larger cohorts with longer follow-ups for survival analysis, we believe that the analysis of the top 1% clonal space could be implemented in the clinic. This could allow the personalization of the follow-up and treatment of patients with low top 1% clonal space, who would presumably not achieve CPR, as well as would enable studies to determine the value of surgery in patients that will achieve CPR, that likely would present high top 1% clonal space at diagnosis. However, limitations similar to those of TMB, such as standardization between platforms and laboratories, as well as democratization of NGS access, would have to be solved for an effective application in clinical practice. The role of the most frequent clones as biomarkers was also assessed in other studies, in which a higher frequency of these top-ranked clones in peripheral blood was associated with higher PFS rates at 9 months in patients treated with immunotherapy (12) and that a higher frequency of the top 1% clones present at resection was associated with MPR (19). However, this is the first time that baseline TCR parameters showed an association with CPR after chemoimmunotherapy.

Casarrubios et al.

We have shown that tumors with higher top 1% clonal space presented—despite having similar levels of PD-L1, TMB, or TIL populations—a higher pro-inflammatory profile reflected by upregulation of biological processes such as leukocyte-mediated immunity, cell killing, and T-cell activation among others. This stronger immunogenic profile could explain the repertoire imbalance and greater pathologic responses, since in such a permissive microenvironment the specific activation and clonal expansion after antigen recognition of some antitumoral T-cell clones would be more easily allowed (25, 26). In turn, it seems that this repertoire imbalance does not depend exclusively on the TMB of these tumors, but existing modifying elements between the mutations and their ability to elicit an immune response [i.e., neoantigen presentation (27, 28), or immunosuppressive microenvironment factors (29)], that the study of TCR repertoire would consider, but TMB alone would not.

Concerning the mechanism and involvement of pretreatment tissue top 1% clones in the response, there are different options that are compatible with each other.

On the one hand, it is possible that these clones were not involved in the response. Thus, new clones or clones belonging to the non-top 1% category would participate in the response, as would support: the increase of tissue NEC in blood posttreatment, the loss of clonal space of top 1% pretreatment clones in posttreatment tissue, and the rise of clonal space of pretreatment non-top 1% clones and NEC in top 1% clonal space of posttreatment tissue (which combined account for more clonal space than that of the pretreatment top 1% clones). However, NEC in the top 1% posttreatment tissue seem to occupy half of the space that pretreatment non-top 1% clones do, indicating a greater importance of reinvigoration of preexisting tumor clones below the top 1% than of the emergence of new clones. In any case, the fact that no differential behavior is observed between responses, reinforces that the NEC and non-top 1% clones do not seem to have a specific role to achieve CPR, however it does not rule out their possible participation in responses.

On the other hand, we have shown how this top 1% remained in tissue posttreatment and was also present in the blood. Thus, the possible role of these clones in the response may be exerted through tissue or peripheral mechanisms. In terms of tissue mechanisms, despite this drop of pretreatment tissue top 1% clones, they still account for 10% to 20% of the total posttreatment clonal space (showing a tendency to be more relevant in CPR patients) and occupy near 30% of the posttreatment top 1% clonal space. Furthermore, this role may have been underestimated given that, at the time of surgery, there was a reduction of T cells probably related to tumor clearance (1). Thus, we cannot rule out the importance of reinvigoration of top 1% in tumor elimination (30). Regarding the role of pretreatment tissue top 1% clones in the peripheral response, we have seen that in our patients the clones identified in tissue are found in blood and are maintained after treatment. Furthermore, CPR patients showed a selective expansion of pretreatment tissue top 1% clones in peripheral blood compared with non-CPR patients. This could indicate peripheral immunosurveillance, responsible for eliminating possible relapses at systemic level, which could explain the high survival rate of patients with CPR (1) and the absence of deaths in the high top 1% group. In this regard, other authors have previously described the clonal changes in the peripheral TCR repertoire after immunotherapy, and identified clones that expanded or contracted peripherally after treatment (12, 15, 19, 20).

Finally, further studies are needed to overcome the limitations of our study, including but not limited to: the number of patients, the lack

of in-between samples (19), the lack of a control group and a validation cohort, and the phenotype and antigen specificity of the sequenced T cells (31).

## Conclusions

In conclusion, baseline tissue TCR evenness and top 1% clonal space are associated with complete pathologic response to neo-adjuvant chemoimmunotherapy. In addition, although we cannot rule out the role of new clones and the tissue reinvigoration of pretreatment clones, we describe the relevance of the peripheral selective expansion of tissue top 1% clones to achieve complete pathological response. Future studies are warranted in larger cohorts overcoming our limitations to validate the relevance of the TCR repertoire analysis.

## Authors' Disclosures

A. Cruz-Bermudez reports non-financial support from Thermo Fisher Scientific during the conduct of the study. E. Nadal reports grants, personal fees, and non-financial support from Bristol-Myers Squibb, Roche, and Pfizer; personal fees and non-financial support from Merck Sharp & Dohme, Takeda, AstraZeneca, Lilly, and Boehringer Ingelheim; grants and personal fees from Merck Serono; and personal fees from Amgen and Bayer outside the submitted work. A. Insa reports personal fees from Bristol, Boehringer Ingelheim, Roche, MSD-Merck, Amgen, and Takeda outside the submitted work. M.R. Garcia Campelo reports personal fees from BMS during the conduct of the study, as well as personal fees from MSD, Roche, AstraZeneca, Takeda, Pfizer, Janssen, Novartis, and Lilly outside the submitted work. M. Lazaro reports personal fees from BMS, Roche, and MSD outside the submitted work. M. Domine reports personal fees from AstraZeneca, BMS, Boehringer Ingelheim, MSD, Pfizer, Roche, and Takeda outside the submitted work. M. Majem reports personal fees from BMS, MSD, Roche, Sanofi, AstraZeneca, and Boehringer Ingelheim outside the submitted work. D. Rodriguez-Abreu reports personal fees from Bristol Myers Squibb, Novartis, MSD, Eli Lilly, Pfizer, Roche, and AstraZeneca outside the submitted work. A. Martínez-Martí reports personal fees and other support from Bristol Myers Squibb, F. Hoffmann-La Roche, Merck Sharp & Dohme, Pfizer, Boehringer Ingelheim, MSD Oncology, and AstraZeneca outside the submitted work. J. de Castro-Capeño reports grants and personal fees from AstraZeneca, Bristol Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme, and F. Hoffmann-La Roche, as well as personal fees from Boehringer Ingelheim, Amgen, Bayer, Lilly, Janssen-Cilag, Takeda, Novartis, and Pfizer outside the submitted work. R. Bernabe Caro reports other support from Bristol Myers Squibb and AstraZeneca, as well as grants from Roche outside the submitted work. S. Viteri reports personal fees from BMS, Puma, AstraZeneca, Reddy Pharma, Takeda, and Janssen, as well as personal fees and non-financial support from MSD, Merck, Roche, and OSE Immunotherapeutics outside the submitted work. B. Massuti reports grants from Spanish Lung Cancer Group during the conduct of the study, as well as advisory board travel expenses from Bristol Myers Squibb. H. Kadara reports grants from Johnson & Johnson outside the submitted work. I.I. Wistuba reports grants and personal fees from Genentech/Roche, Bayer, Bristol Myers Squibb, AstraZeneca/Medimmune, Pfizer, HTG Molecular, Merck, Guardant Health, and Novartis; personal fees from GlaxoSmithKline, Oncocyte, MSD, and Daiichi Sankyo; and grants from Adaptive, 4D, Takeda, Karus, Adaptimmune, EMD Serono, Iovance, Johnson & Johnson, Amgen, and Akoya outside the submitted work. A. Romero reports personal fees from Boehringer Ingelheim outside the submitted work. V. Calvo reports personal fees from Roche, BMS, MSD, AstraZeneca, and Boehringer Ingelheim outside the submitted work. M. Provencio reports grants from BMS during the conduct of the study; M. Provencio also reports grants and non-financial support from Roche, as well as grants from AstraZeneca, Takeda, and MSD outside the submitted work. No disclosures were reported by the other authors.

## Authors' Contributions

M. Casarrubios: Formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing—original draft. A. Cruz-Bermudez: Conceptualization, resources, data curation, formal analysis, supervision, funding acquisition, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing. E. Nadal: Resources, data curation, investigation, writing—review and editing. A. Insa: Resources, data curation, investigation, writing—review and editing. M.R. Garcia Campelo: Resources, data curation, investigation, writing—review and editing. M. Lazaro: Resources, data curation, investigation, writing—review and editing.

M. Domine: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. M. Majem: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. D. Rodríguez-Abreu: Resources, data curation, writing–review and editing. A. Martínez-Martí: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. J. de Castro-Carpeño: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. M. Cobo: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. G. Lopez-Vivanco: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. E. Del Barco: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. R. Bernabe Caro: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. N. Vitolas: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. I. Barneto Aranda: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. S. Viteri: Resources, data curation, investigation, project administration, writing–review and editing. B. Massuti: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. M. Barquín: Data curation, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing–review and editing. R. Laza-Briviesca: Data curation, investigation, methodology, writing–review and editing. B. Sierra-Rodero: Data curation, investigation, methodology, writing–review and editing. E.R. Parra: Investigation, writing–review and editing. B. Sanchez-Espiridion: Investigation, project administration, writing–review and editing. P. Rocha: Investigation, writing–review and editing. H. Kadara: Investigation, writing–review and editing. I.I. Wistuba: Resources, writing–review and editing. A. Romero: Data curation, investigation, writing–review and editing. V. Calvo: Resources, data curation, investigation, writing–review and editing. M. Provencio: Conceptualization, resources, data curation, supervision, funding acquisition, investigation, writing–original draft, project administration, writing–review and editing.

## Acknowledgments

Work in the authors' laboratories was supported by Bristol-Myers Squibb; "Instituto de Salud Carlos III" (ISCIII) PI19/01652 grant cofunded by European Regional Development Fund (ERDF); Ministry of Science and Innovation RTC2017–6502–1 "INmunoSIGHT" and RTC2019–007359–1 "BLI-O"; and European Union's Horizon 2020 research and innovation programme CLARIFY 875160 grant, to M. Provencio. Thermo Fisher Scientific provided reagents for TCR sequencing. A. Cruz-Bermudez received a Spanish Lung Cancer Group (SLCG) grant and is supported by a ISCIII–"Sara Borrell" contract CD19/00170. M. Casarrubios was supported by PEJD-2019-PRE/BMD-17006 contract granted to A. Cruz-Bermudez. M. Barquín was supported by an i-PFIS predoctoral fellowship (grant no. IF18/00051) from ISCIII granted to M. Provencio. R. Laza-Briviesca was supported by PEJ16/MED/AI-1972 and PEJD-2018-PRE/SAL-8641 from European Social Fund (ESF) and Comunidad de Madrid, both granted to M. Provencio. We thank the patients, their families, all the participating clinical teams, and all the Spanish Lung Cancer Group, BMS, and Thermo Fisher Scientific staff, for making this study possible. We also would like to give thanks to Maria del Rocio Moreno Villa and Auriole Tamegnon for their technical assistance.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 31, 2021; revised June 1, 2021; accepted August 3, 2021; published first August 10, 2021.

## References

1. Provencio M, Nadal E, Insa A, Garcia-Campelo MR, Casal-Rubio J, Domine M, et al. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2020;21:1413–22.
2. Forde P, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad M, et al. Abstract CT003 - Nivolumab (NIVO)  $\beta$  platinum-doublet chemotherapy (chemo) vs chemo as neoadjuvant treatment (tx) for resectable (IB-IIIa) non-small cell lung cancer (NSCLC) in the phase 3 CheckMate 816 trial. In: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2021 Apr 10–15; Philadelphia (PA).
3. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D, et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol* 2018;36:633–41.
4. Ready N, Hellmann MD, Awad MM, Otterson GA, Gutierrez M, Gainer JF, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in advanced non-small-cell lung cancer (CheckMate 568): Outcomes by programmed death ligand 1 and tumor mutational burden as biomarkers. *J Clin Oncol* 2019;37:992–1000.
5. Borghaei H, Hellmann MD, Paz-Ares LG, Ramalingam SS, Reck M, O'Byrne KJ, et al. Nivolumab (Nivo)  $\beta$  platinum-doublet chemotherapy (Chemo) vs chemo as first-line (1L) treatment (Tx) for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with <1% tumor PD-L1 expression: Results from CheckMate 227. *J Clin Oncol* 2018;36:9001.
6. Borghaei H, Langer CJ, Paz-Ares L, Rodríguez-Abreu D, Halmos B, Garassino MC, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with advanced non-small cell lung cancer without tumor PD-L1 expression: A pooled analysis of 3 randomized controlled trials. *Cancer* 2020;126:4867–77.
7. Garassino M, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, Speranza G, et al. OA04.06 evaluation of TMB in KEYNOTE-189: pembrolizumab plus chemotherapy vs placebo plus chemotherapy for nonsquamous NSCLC. *J Thorac Oncol* 2019;14:S216–7.
8. Voong KR, Feliciano J, Becker D, Levy B. Beyond PD-L1 testing-emerging biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med* 2017;5:376.
9. Li S, Zhang C, Pang G, Wang P. Emerging blood-based biomarkers for predicting response to checkpoint immunotherapy in non-small-cell lung cancer. *Front Immunol* 2020;11:1–11.
10. Robins HS, Campregher PV, Srivastava SK, Wachter A, Turtle CJ, Khsai O, et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor  $\beta$ -chain diversity in *ab* T cells. *Blood* 2009;114:4099–107.
11. Kidman J, Principe N, Watson M, Lassmann T, Holt RA, Nowak AK, et al. Characteristics of TCR repertoire associated with successful immune checkpoint therapy responses. *Front Immunol* 2020;11:1–11.
12. Poran A, Scherer J, Bushway ME, Besada R, Balogh KN, Wanamaker A, et al. Combined TCR repertoire profiles and blood cell phenotypes predict melanoma patient response to personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1. *Cell Reports Med* 2020;1:100141.
13. Cham J, Zhang L, Kwek S, Paciorek A, He T, Fong G, et al. Combination immunotherapy induces distinct T-cell repertoire responses when administered to patients with different malignancies. *J Immunother Cancer* 2020;8:1–10.
14. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, et al. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med* 2014;6:238ra70.
15. Wu TD, Madireddi S, de Almeida PE, Banchereau R, Chen YJ, Chitre AS, et al. Peripheral T cell expansion predicts tumour infiltration and clinical response. *Nature* 2020;579:274–8.
16. Reuben A, Zhang J, Chiou S-H, Gittelman RM, Li J, Lee W-C, et al. Comprehensive T cell repertoire characterization of non-small cell lung cancer. *Nat Commun* 2020;11:603.
17. Anagnostou V, Forde PM, White JR, Niknafs N, Hruban C, Naidoo J, et al. Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2019;79:1214–25.
18. Han J, Duan J, Bai H, Wang Y, Wan R, Wang X, et al. TCR repertoire diversity of peripheral PD-1  $\beta$  CD8  $\beta$  T cells predicts clinical outcomes after immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Res* 2020;8:146–54.
19. Zhang J, Ji Z, Caushi JX, El Asmar M, Anagnostou V, Cottrell TR, et al. Compartmental analysis of T-cell clonal dynamics as a function of pathologic response to neoadjuvant PD-1 blockade in resectable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26:1327–37.
20. Vroman H, Balzaretto G, Belderbos RA, Klarenbeek PL, Van Nimwegen M, Bezemer K, et al. T cell receptor repertoire characteristics both before and following immunotherapy correlate with clinical response in mesothelioma. *J Immunother Cancer* 2020;8:1–7.
21. Looney TJ, Topacio-Hall D, Lowman G, Conroy J, Morrison C, Oh D, et al. TCR convergence in individuals treated with immune checkpoint inhibition for cancer. *Front Immunol* 2020;10.
22. Parra ER, Uraoka N, Jiang M, Cook P, Gibbons D, Forget MA, et al. Validation of multiplex immunofluorescence panels using multispectral microscopy for immune-profiling of formalin-fixed and paraffin-embedded human tumor tissues. *Sci Rep* 2017;7:1–11.



Casarrubios et al.

23. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
24. Steinbaugh MJ, Pantano L, Kirchner RD, Barrera V, Chapman BA, Piper ME, et al. BcbioRNAseq: R package for bcbio RNA-seq analysis [version 2; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research*. F1000 Research 2018;7:1976.
25. Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* 1999;162:5212–23.
26. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* 2018;24:541–50.
27. Goodman AM, Castro A, Pyke RM, Okamura R, Kato S, Riviere P, et al. MHC-I genotype and tumor mutational burden predict response to immunotherapy. *Genome Med* 2020;12:45.
28. Shim JH, Kim HS, Cha H, Kim S, Kim TM, Anagnostou V, et al. HLA-corrected tumor mutation burden and homologous recombination deficiency for the prediction of response to PD-(L)1 blockade in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 2020;31: 902–11.
29. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16:151–67.
30. Joshi K, de Massy MR, Ismail M, Reading JL, Uddin I, Woolston A, et al. Spatial heterogeneity of the T cell receptor repertoire reflects the mutational landscape in lung cancer. *Nat Med* 2019;25:1549–59.
31. Danilova L, Anagnostou V, Caushi JX, Sidhom J-W, Guo H, Chan HY, et al. The mutation-associated neoantigen functional expansion of specific T cells (MANAFEST) assay: a sensitive platform for monitoring antitumor immunity. *Cancer Immunol Res* 2018;6:888–99.

# Clinical Cancer Research

## Pretreatment Tissue TCR Repertoire Evenness Is Associated with Complete Pathologic Response in Patients with NSCLC Receiving Neoadjuvant Chemoimmunotherapy

Marta Casarrubios, Alberto Cruz-Bermúdez, Ernest Nadal, et al.

*Clin Cancer Res* 2021;27:5878-5890. Published OnlineFirst August 10, 2021.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/1078-0432.CCR-21-1200](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-1200)

**Supplementary Material** Access the most recent supplemental material at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2021/08/07/1078-0432.CCR-21-1200.DC1>

**Cited articles** This article cites 28 articles, 7 of which you can access for free at:  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/27/21/5878.full#ref-list-1>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, use this link  
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/27/21/5878>.  
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.