



Tumor Mutational Burden (TMB)

Approvato dal Gruppo di Studio sulla Patologia Molecolare

A cura di: Maria Scatolini

Coordinatori: Francia di Celle Paola, Venesio Tiziana

Partecipanti:

Cappia Susanna, Casorzo Laura, Di Benedetto Massimo, Falcone Patrizia Agnese, Giugliano Emilia, Giustetto Doriana, Maffè Antonella, Mariani Sara, Orecchia Sara, Pegoraro Fabiola, Rapa Ida, Saponaro Sara, Scaravaglio Patrizia, Scatolini Maria, Schillaci Francesca, Trisolini Elena, Veggiani Claudia, Verdun Di Cantogno Ludovica



TMB

Tumor Mutational Burden

Maria Scatolini

Direttore Laboratorio
Oncologia Molecolare
Fondazione Edo ed Elvo Tempia



a cura di Maria Scatolini e validato dal GdS di Patologia Molecolare

TMB – Tumor Mutational Burden

La definizione di biomarcatori che predicono la risposta terapeutica al blocco del checkpoint immunitario è un obiettivo importante, dato il profondo impatto che queste nuove immunoterapie hanno avuto nel trattamento di diversi tipi di tumore comuni, tra cui il cancro del polmone e della vescica, e soprattutto nel melanoma metastatico. In caso di successo infatti, il trattamento può raggiungere la remissione o persino una cura, e circa dal 25% al 50% dei pazienti con melanoma metastatico trattati con ipilimumab, che blocca la proteina CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), o anti-PD-1 pembrolizumab anticorpo monoclonale, raggiunge una sopravvivenza libera da progressione prolungata.

L'espressione del ligando di PD-1, (PD-L1, PD-1/programmed death ligand 1), è stata associata a tassi di risposta favorevoli e sopravvivenza in pazienti trattati con inibitori del checkpoint immunitario PD-1 / PD-L1, anche in alcuni pazienti con bassi livelli di espressione.

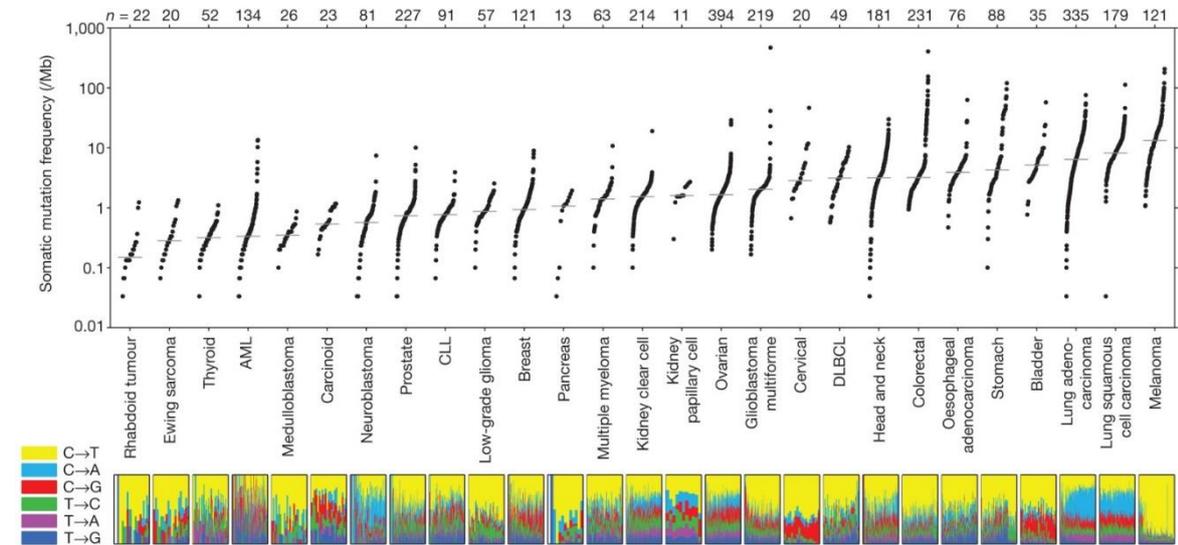
Dato il gran numero di pazienti che non rispondono all'immunoterapia e il rischio di gravi effetti collaterali immuno-correlati, la caccia ad ulteriori biomarcatori di risposta è pressante. Un biomarcatore, che è stato associato alla risposta all'immunoterapia in più tipi di cancro, è il carico mutazionale del tumore o TMB. Un'associazione tra carico mutazionale e

TMB – Tumor Mutational Burden

risposta agli inibitori del checkpoint immunitario è stata osservata per la prima volta negli studi di ipilimumab nel melanoma avanzato, supportando la possibilità che lo stato genetico di un tumore possa influenzare il beneficio clinico fornito dalle immunoterapie, in questo caso di anti CTLA4.

La misurazione del carico mutazionale può fungere da biomarcatore per determinare il numero di neoantigeni per tumore e può offrire una potenziale aggiunta all'attuale panorama terapeutico mirato, che può essere combinato con marcatori di espressione di proteine e geni per aiutare i clinici a massimizzare i benefici dell'immunoterapia.

Frequenza delle mutazioni somatiche osservata in 3083 esomi (coppie tumore-normale)



MS Lawrence et al. 2013 Nature

L'analisi di 27 tipi di tumore ha rivelato che la frequenza mediana delle mutazioni non sinonime varia fino a 1000 fold di differenza a seconda del tumore analizzato.

Circa metà delle variazioni nella frequenza di mutazioni può essere spiegata dal tipo di tessuto di origine.

I tumori pediatrici, ad esempio, presentano frequenze di mutazione pari a 0.1/Mb (1 mutazione/esoma), mentre, al contrario, melanomi o adenocarcinomi del polmone arrivano fino a 100/Mb. Le alte frequenze possono essere attribuibili all'esposizioni estensiva a noti carcinogeni

TMB – Tumor Mutational Burden

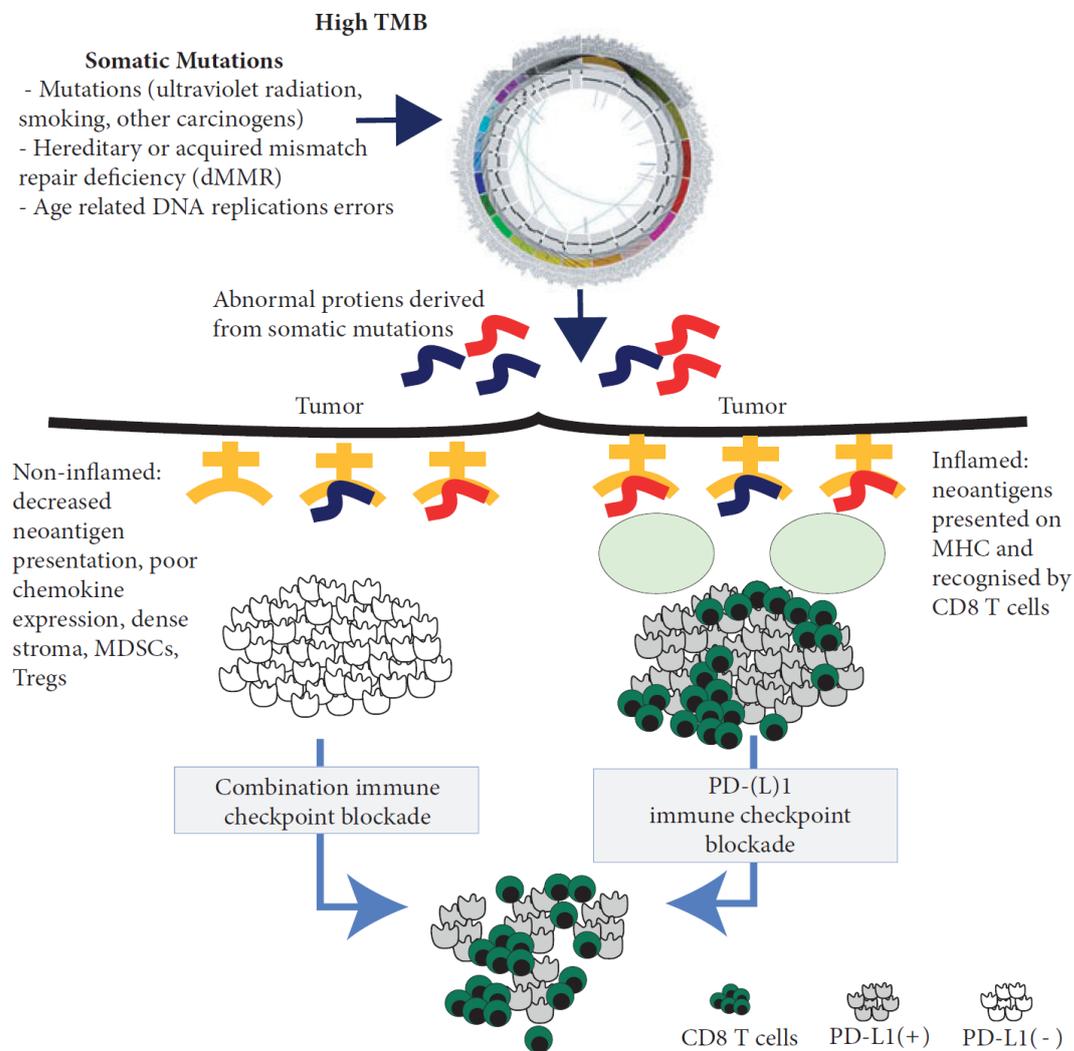
come le radiazioni ultraviolette (melanoma) e il fumo di sigaretta (tumore del polmone).

Ancora più sorprendentemente, le frequenze di mutazione variano notevolmente tra i diversi pazienti all'interno di uno stesso tipo di cancro.

Nonostante la bassa frequenza mediana nella AML (0,37 / Mb), le frequenze specifiche dei pazienti hanno addirittura coperto tre ordini di grandezza 0,01 - 10 / Mb. La variazione può in alcuni casi essere dovuta a fattori biologici chiave, come melanomi non attribuiti all'esposizione ai raggi UV, per esempio sulla pelle non esposta, o tumori del colon con o senza difetti di MMR, o le mutazioni del gene della polimerasi ϵ (POLE), o tumori della testa-collo con origine virale o non virale.

Il pannello inferiore, invece, mostra le proporzioni relative delle sei diverse possibili sostituzioni di coppie di basi, come indicato nella legenda a sinistra.

Accumulo di mutazioni, neoantigeni e immuno check-point inibitori (ICB)



Chan TA et al. ESMO, Annals of Oncology, 2018

Le mutazioni somatiche possono generare neopeptidi che possono essere presentati dal complesso MHC. Come conseguenza, sia i tumori che presentano una componente infiammatoria, sia quelli in cui è assente, così

TMB – Tumor Mutational Burden

come i tumori PD-L1 positivi o negativi possono rispondere alla terapia con gli inibitori degli immuno check-point.

L'elevato TMB è in grado di selezionare chi può beneficiare della terapia ICB. Nei tumori del polmone, della vescica e testa-collo, attualmente le soglie predittive, per quanto riguarda il TMB, sono di circa 200 mutazioni somatiche non sinonime ottenute mediante sequenziamento dell'intero esoma (WES).

L'espressione PD-L1 influenza la risposta all'ICB nei tumori ad alta TMB con anticorpi PD- (L) 1 a singolo agente; tuttavia, la risposta potrebbe non dipendere dall'espressione di PD-L1 nel contesto della terapia di associazione anti-CTLA4 o anti-PD-1 / CTLA-4.

Le soglie del TMB per un'efficace previsione della risposta in varie altre neoplasie non sono ben stabilite. Il TMB, in accordo con l'espressione di PD-L1, si è dimostrato essere un utile biomarcatore per la selezione alla terapia ICB in alcuni tipi di cancro; tuttavia, sono necessari ulteriori studi di validazione prospettici.

La determinazione del TMB da parte di pannelli mirati selezionati è stata correlata al WES. Per l'utilità clinica e l'allineamento ottimale, sarà necessaria la calibrazione e l'armonizzazione su tutte le piattaforme

TMB – Tumor Mutational Burden

attualmente utilizzate a livello internazionale. Le principali sfide dovranno essere affrontate prima di un uso più ampio in diversi tipi di tumore.

Accumulo di mutazioni, neoantigeni e immuno check-point inibitori (ICB)

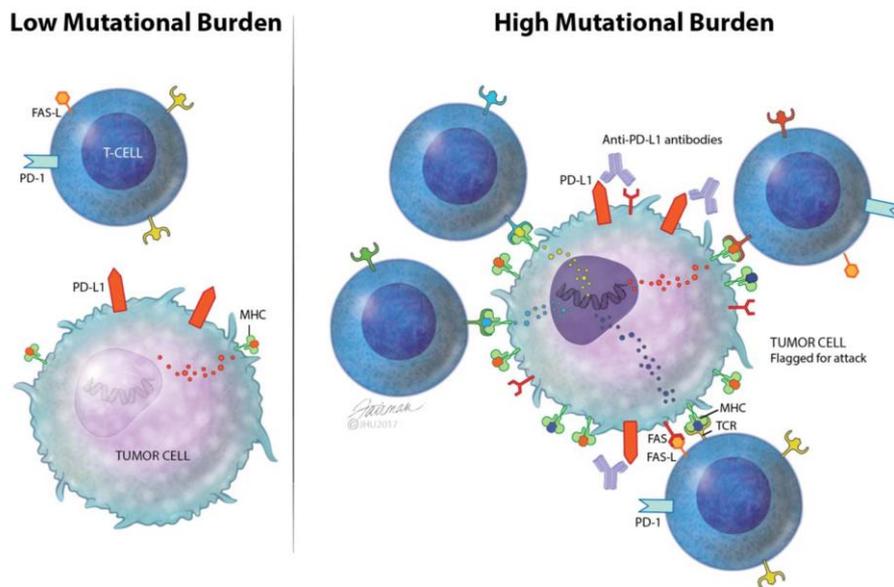


Figure 2. Schematic diagram of tumor cell with high mutational burden and enhanced immune cell recognition compared with tumor cell with low mutational burden.
Abbreviations: FAS-L, Fas ligand; MHC, major histocompatibility complex; PD-1, programmed cell death protein 1; TCR, T-cell receptor.

Sharabi et al The Oncologist 2017

L'immunoterapia è uno standard emergente di cura per diversi tipi di malattia. Gli anticorpi monoclonali che colpiscono i checkpoint immunitari, comprese le molecole immunoregulatorie chiave come CTLA-4) e PD-L1, sono ora approvati dalla FDA per diverse patologie. Ad esempio, gli anticorpi inibitori del checkpoint che colpiscono l'asse PD-1 / PD-L1 hanno indicazioni nel melanoma, nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, nel carcinoma renale, nel carcinoma uroteliale, nel linfoma di Hodgkin e nei

TMB – Tumor Mutational Burden

tumori testa-collo. PD-1 è una proteina che è altamente espressa sulle cellule T attivate e su altre cellule. Il PD-L1 è normalmente espresso a bassi livelli su varie cellule ematopoietiche e non ematopoietiche, ma è iperespresso da varie cellule tumorali solide e da cellule presentanti l'antigene. Un'espressione elevata di PD-L1 protegge le cellule tumorali dalla risposta antitumorale endogena smorzando le cellule T specifiche del tumore, sviluppando resistenza alla morte mediata da cellule T CD8 + e apoptosi associata a Fas-ligando e creando un sottoinsieme di cellule T regolatorie.

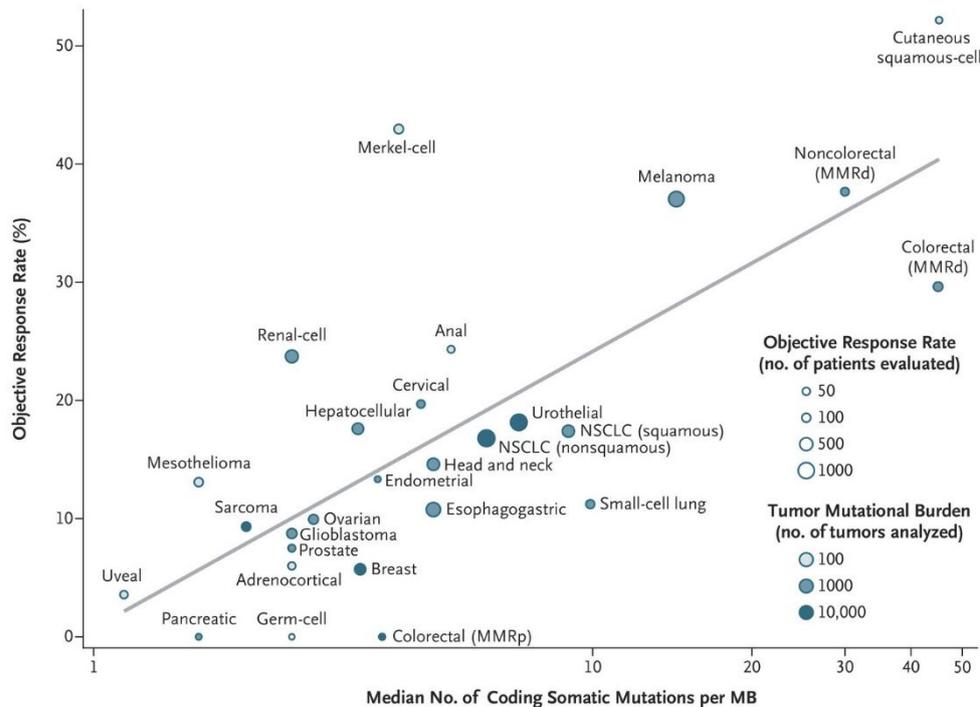
L'espressione di PD-L1 è stata studiata come biomarcatore predittivo e, tra i tipi di tumore e gli agenti anti-PD-1 / PD-L1, i tumori PD-L1-negativi hanno tassi di risposta che variavano dallo 0% al 17%, mentre quelli PD-L1 positivi hanno tassi di risposta dal 36% al 100%.

Anche le risposte all'immunoterapia sono generalmente più elevate in presenza di alcune alterazioni genomiche. Ad esempio, i tumori del colon-retto che presentano alterazioni del MMR (mismatch repair system), e sono quindi accompagnati da un elevato carico mutazionale del tumore, hanno una risposta significativamente migliore agli agenti anti-PD-1 rispetto ai pazienti senza difetti a carico del MMR. Prove emergenti suggeriscono che il carico mutazionale del tumore può essere un

TMB – Tumor Mutational Burden

importante fattore predittivo per la risposta al blocco del checkpoint in diversi tipi di patologia.

TMB come marcatore predittivo di risposta all'immunoterapia



Yarchoan M et al. N ENGL J MED, 2017

Per valutare la relazione tra il carico mutazionale del tumore e il tasso di risposta obiettiva, Yarchoan e colleghi hanno tracciato il tasso di risposta obiettiva per la terapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 rispetto al corrispondente carico mutazionale del tumore mediano tra più tipi di cancro.

Attraverso una vasta ricerca bibliografica eseguita sui più estesi studi pubblicati, hanno identificato 27 tipi o sottotipi di tumore per i quali sono disponibili dati riguardanti il tasso di risposta obiettiva.

TMB – Tumor Mutational Burden

Hanno incluso solo studi di monoterapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 che avevano arruolato almeno 10 pazienti non selezionati per l'espressione del tumore PD-L1. Il carico mutazionale mediano del tumore per ciascun tipo di neoplasia è stato ottenuto da un test validato di profilatura genomica completo, eseguito e fornito da Foundation Medicine. Yarchoan e colleghi hanno osservato una correlazione significativa tra il carico mutazionale del tumore e il tasso di risposta obiettiva ($P < 0,001$). Il coefficiente di correlazione di 0,74 suggerisce che il 55% delle differenze nel tasso di risposta obiettiva tra i tipi di cancro può essere spiegato dal carico mutazionale del tumore. Alcuni sottotipi di cancro hanno una risposta alla terapia migliore di quanto sarebbe previsto dal carico mutazionale del tumore (ad es. Carcinoma a cellule di Merkel), e alcuni hanno una risposta peggiore di quanto si potrebbe prevedere (ad es. Carcinoma del colon-retto con danno al MMR). Le percentuali di risposta obiettiva più elevate del previsto per il carcinoma a cellule di Merkel e alcuni altri tumori associati a virus suggeriscono che la presentazione di antigeni virali su alcuni tipi di tumore può conferire un tasso di risposta maggiore alla terapia anti-PD-1.

Una limitazione della loro analisi è che i campioni di tumore sequenziati non erano probabilmente gli stessi per i quali sono state valutate le

TMB – Tumor Mutational Burden

risposte cliniche. Molti fattori diversi modulano la risposta clinica a un inibitore del checkpoint immunitario, ma i loro risultati evidenziano la forte relazione tra il carico mutazionale del tumore e l'attività delle terapie anti-PD-1 su diversi tumori.

Può il TMB essere inserito nella routine clinica?

Come valutare il TMB:

- I primi studi sono stati effettuati con WES (Whole Exome Sequencing) su DNA tumorale confrontato con DNA germinale
- Il miglior modo per calcolare TMB è la WES
- WES non può essere usata in clinica per l'alto costo e complessità
- Sono stati validati dei **Targeted NGS panels** per valutare il TMB in clinica

TMB – Tumor Mutational Burden

Pannelli NGS TMB approvati FDA

Parameter	WES	FM NGS (F1CDx)	MSKCC NGS (MSK-IMPACT)
No. of genes	~22 000 gene coding regions	324 cancer-related genes	468 cancer-related genes
Types of mutations captured	Coding missense mutations in tumor genome	Coding, missense, and indel mutations per Mb of tumor genome	Coding missense mutations per Mb of tumor genome
Germline mutations	Subtracted using patient-matched normal samples	Estimated via bioinformatics algorithms and subtracted	Subtracted using patient-matched blood samples
Capture region (tumor DNA)	~30 Mb	0.8 Mb	1.22 Mb
TMB definition	No. of somatic, missense mutations in the sequenced tumor genome	No. of somatic, coding mutations (synonymous and non-synonymous), short indels per Mb of tumor genome	No. of somatic, missense mutations per Mb of tumor genome

WES, whole exome sequencing; FM, Foundation Medicine; NGS, next generation sequencing; Mb, megabase.

Chan TA et al. ESMO, Annals of Oncology, 2018

Il carico mutazionale tumorale può essere determinato mediante sequenziamento dell'intero esoma, ma questo metodo non è realistico su larga scala in un contesto clinico, a causa dell'elevato costo e dell'uso delle risorse. Gli studi dimostrano che il peso mutazionale dell'intero genoma può essere dedotto dal sequenziamento di un pannello molto più piccolo di poche centinaia di geni. È stato sviluppato un test di sequenziamento di nuova generazione e convalidato, che ha come target circa 1,1 megabase di genoma codificante, e si correla con il sequenziamento dell'intero esoma per valutare accuratamente il carico mutazionale del tumore. La piattaforma di sequenziamento specifica può identificare sostituzioni di base, brevi inserimenti ed eliminazioni, alterazioni del numero di copie e fusioni selezionate in oltre 300 geni correlati al cancro. Sono state identificate soglie di mutazione affidabili per distinguere i campioni con

TMB – Tumor Mutational Burden

alta percentuale di mutazioni da quelli a bassa per consentire la previsione della risposta alle immunoterapie.

L'esoma clinico è presente nelle linee guida approvate dal CLA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) e lo sviluppo attivo per portare questi test in clinica è in corso.

Recenti studi hanno iniziato a convalidare i pannelli NGS mirati rispetto ai dati WES in quanto questi pannelli sono già utilizzati abitualmente in clinica per il rilevamento di mutazioni oncogeniche.

Con l'approccio NGS di Foundation Medicine (FM) (F1CDx), il TMB è stato definito come il numero di sostituzioni di base (comprese le mutazioni sinonime) nella regione codificante dei geni bersaglio.

Il DNA germinale non è stato sequenziato, ma il filtro sia per gli eventi driven e le varianti costituzionali è stato effettuato utilizzando database varianti pubblici e privati.

Il calcolo delle mutazioni / megabase totali (mut / Mb) ha incluso mutazioni sia sinonime che non sinonime che richiedono una formula per la conversione in numero di mutazioni missenso come determinato da WES.

TMB – Tumor Mutational Burden

L'approccio del MSKCC NGS (MSK-IMPACT) ha utilizzato mutazioni non sinonime usando dati di sequenziamento sia da DNA tumorale che germinale (per la chiamata delle varianti).

La versione più recente di questo pannello contiene 468 geni che coprono 1,22 Mb. È stato dimostrato che i grandi pannelli mirati sono sufficientemente precisi per la stima del TMB e i pannelli testati finora (F1CDx e MSK-IMPACT), hanno dimostrato la loro capacità predittiva di risposta agli ICB. Sia F1CDx che MSK-IMPACT sono stati approvati dalla FDA degli Stati Uniti.

Qui di seguito, l'elenco dei pannelli NGS mirati commerciali disponibili per l'implementazione dell'analisi del TMB nel proprio laboratorio, a differenza di quelli precedenti che vengono centralizzati (FoundationOne).

PANNELLO	CHIMICA	GENI	Mb	SOGLIA	RISULTATI	PUBBLICAZIONI
CGP+ - Agilent SureSelect XT Caris Molecular Intelligence	Hybrid-capture NGS based	592	1,4	SI	HIGH= ≥ 17 MUT/Mb LOW = < 17 MUT/Mb	Gatalica Z <i>Eur Journal Canc 2018</i> Vandervalde A <i>Cancer Med 2018</i>
TruSight Tumor 170 ILLUMINA	Hybrid-capture NGS based	170	0,524 Mb	NO	Mut/Mb	
Oncomine™ Tumor Mutation Load Assay ThermoFisher Scientific	Amplicon based NGS	409	1,7 Mb	NO	Mut/Mb	

TMB – Tumor Mutational Burden

Fattori che influenzano il TMB

Fattori analitici

- Grandezza del pannello (coverage)
- Profondità di sequenziamento/ Lunghezza delle reads
- Algoritmi di analisi
- Cut-off frequenza delle varianti alleliche (0.5-10%)
- Confronto DNA germinale

Fattori preanalitici

- La fissazione del campione per l'inclusione in paraffina influenza il grado di artefatti (FFPE-induced deamination artifacts, C/T transition)

Aumentano la conta del TMB

Fattori relativi al campione

- Input di materiale (quantità e qualità)
- Bassa % di cellule tumorali

TMB – Tumor Mutational Burden

- Elevato tumor microenvironment

Riducono la sensibilità dell'analisi TMB

L'uso di pannelli ridotti può sovra o sotto stimare il TMB, mentre eseguire in parallelo all'analisi quella del DNA germinale ridurrebbe in maniera importante le chiamate per Falsi Positivi. In assenza di tale confronto si possono utilizzare “database germinali” per identificare le varianti germinali.

I diversi algoritmi possono includere o escludere inserzioni e delezioni (indels) e /o sostituzioni sinonime o non sinonime dei nucleotidi.

TMB e correlazione con la risposta all'immunoterapia

- TMB non rimpiazzerà altri biomarkers come PD-L1 (IHC), ma probabilmente si aggiungerà come saggio diagnostico
- Dati consistenti indicano che **TMB** e **PD-L1** sono marcatori predittivi indipendenti e non correlano fra loro
- E' stato dimostrato che TMB low è un predittore negativo di beneficio dell'immunoterapia (anti-PD1, anti-PD-L1)
- TMB predittivo anche di >PFS e OS in pazienti melanoma trattati con **adoptive T cell transfer therapy**

Facciamo un po' di conti...

- Sebbene la maggioranza dei pazienti con tumori MSI-H abbia anche un elevato TMB, solo il **16%** dei pazienti con TMB-high sono MSI-H.
- In un tumore MSI-H, il numero medio di mutazioni è nell'ordine delle **migliaia**; mentre in un tumore MSS è in genere di **200**.
- La soglia minima di mutazione calcolata con il TMB necessaria per avere un beneficio con ICB è intorno alle **200** mutazioni missenso (*equivalenti a 10mut/Mb per Foundation Medicine o circa 7mut/Mb per MSK-IMPACT panel*).

In conclusione..

- Alcuni pannelli NGS hanno già identificato una soglia di mutazione per TMB-high in determinate applicazioni
- Per tutti gli altri è richiesta una **standardizzazione** e **armonizzazione** fra pannelli che devono ancora essere validati.
- Manca uniformità (campioni standard? Modalità di refertazione)
- I pannelli «in-house» richiedono: implementazione di strumentazione, aumento dei costi, spazi dedicati ma soprattutto **personale formato ed esperto in analisi NGS**.

TMB – Tumor Mutational Burden



Dear EMQN Colleague,

Tumor Mutation Burden (TMB) - pilot EQA scheme

IQNPath, with the endorsement of ESMO, is conducting a project on tumour mutation burden (TMB) testing. EMQN is a partner in this project.

The primary aim of this project is to organize a pilot External Quality Assessment (EQA) scheme for TMB assessment. We are currently working to identify appropriate reference materials which will then be validated by a cohort of laboratories.

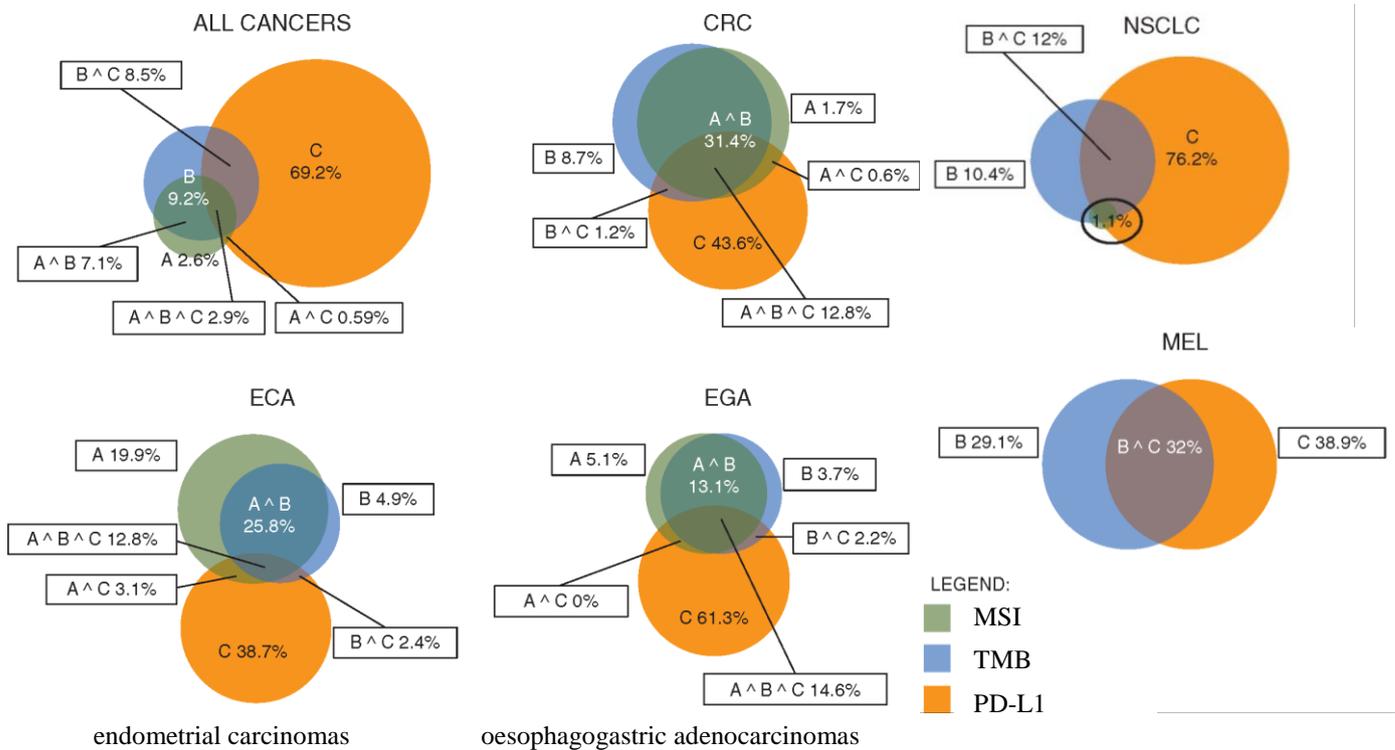
We are recruiting 30 laboratories to participate in the pilot EQA scheme. If you are interested in participating, please complete our short survey by visiting the link below.

[TMB Survey](#)

The closing date is 10th May 2019.

È possibile iscriversi al controllo di qualità europeo pilot per l'analisi del TMB, implementato dalla rete europea per la qualità nella genetica molecolare (EMQN).

Relazioni tra TMB, MSI e PD-L1.



Luchini C et al. ESMO, Annals of Oncology 2019

Utilizzando i dati estraibili dai manoscritti selezionati e anche quelli derivati dai diagrammi di Venn, Luchini e colleghi hanno confrontato studi di associazione che coinvolgono un'espressione elevata di TMB, MSI e PD-L1 sulle cellule tumorali per l'asse PD-1 / PD-L1 (in quanto l'espressione PD-L1 era la unica variabile con dati adeguati per questa analisi).

Complessivamente, 4186 pazienti sono risultati positivi per almeno uno dei biomarcatori analizzati. In particolare, la presenza simultanea di TMB-high,

TMB – Tumor Mutational Burden

MSI-high e PD-L1 è stata osservata nel 2,9% di tutti i tumori (intesi quei tumori che facevano parte dei manoscritti selezionati) e in percentuali significativamente più alte ($P < 0,05$) in adenocarcinomi coloretali (12,8%) ed esofagogastrici (dove le neoplasie esofagee non erano tumori a cellule squamose ma adenocarcinomi, correlati alla metaplasia di Barrett) (14,6%). Se consideriamo TMB-high e / o MSIhigh, la percentuale di associazione con l'espressione di PD-L1 diventa più elevata soprattutto nelle categorie di "tutti i tumori", NSCLC e melanomi, passando dal 2,9% all'11,9%, dallo 0,5% al 12,7% e dallo 0,0% al 32,0%, rispettivamente. Ciò era dovuto alle basse percentuali di casi MSI-alti, contemporaneamente PD-L1 positivi, in "tutti i tumori" (3,4%) e NSCLC (0,7%) rispetto agli adenocarcinomi coloretali (13,4%) e esofagogastrici (14,6%) ($P < 0,05$ per tutte queste differenze) o alla mancanza di casi MSI-alti osservati nei melanomi. Infine, sono state osservate alte percentuali di concordanza di TMBhigh e MSI-high nei tumori del colon-retto (44,2%), negli adenocarcinomi esofagogastrici (27,7%) e nei tumori endometriali (31,0%) rispetto al gruppo "tutti i tumori", melanomi e NSCLC ($P < 0,05$ per tutte queste differenze).

Il sequenziamento di nuova generazione, associato all'analisi dell'MSI e della TMB, può rappresentare uno strumento decisivo per selezionare i pazienti per l'immunoterapia, per i tumori comuni o rari che non

TMB – Tumor Mutational Burden

appartengono allo spettro della sindrome di Lynch (accordo molto forte).

Le relazioni tra espressione di MSI, TMB e PD-1 / PD-L1 sono complesse e differiscono a seconda del tipo di tumore.