



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

## Expresión inmunohistoquímica del antígeno PD-L1 en cáncer urotelial.

Estudio de validación.

Egilea /Autor:  
Amaia Ormaechevarria Iturrizaga

Zuzendaria / Director/a:  
Miren Igone Imaz Murga

Leioa, 2018ko apirilaren 13an / Leioa, 13 de Abril de 2018.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN:	
1.1.Generalidades _____	1
1.2.Vigilancia inmunológica antitumoral e inmunoterapia _____	6
1.3. Checkpoints en inmunoterapia _____	8
1.4. Fármacos inhibidores AntiPD-L1 _____	12
1.5.Objetivos _____	15
2. MATERIAL Y MÉTODOS _____	16
2.1 Inmunohistoquímica _____	18
2.2 Criterios de evaluación _____	19
3. RESULTADOS _____	21
4. DISCUSIÓN _____	25
5. CONCLUSIÓN _____	27
6. ANEXOS	
6.1 Nota de prensa laboratorio Roche IMvigor210 _____	30
6.2 Resultados publicados IMvigor210 _____	33
7. REFERENCIAS _____	55
8. AGRADECIMIENTOS _____	58

## 1. INTRODUCCIÓN:

### 1.1 GENERALIDADES:

El cáncer de vejiga es el quinto cáncer más frecuentemente diagnosticado en EEUU. En la CAPV (Comunidad Autónoma del País Vasco), entre 2000-2012, se diagnosticaron 8.733 casos de tumores invasivos de vejiga urinaria, con una media de 672 casos por año. Este tumor supuso el 5,7% del total de todos los tumores malignos diagnosticados, siendo entre los hombres la cuarta neoplasia más frecuente. (20) El factor de riesgo exógeno más conocido es el tabaco; también parece estar relacionado con ciertas actividades profesionales. Presenta una mayor incidencia en varones y en países desarrollados llegando a ser hasta 3 veces más frecuente en estas últimas circunstancias. (1,2,9) En los últimos años se ha observado un incremento significativo (hasta un 4,7% anual) en las mujeres, con un aumento de la mortalidad en un 1,7% entre este último subgrupo. (20)

Más del 90% corresponden al tipo histológico urotelial o de células transicionales provenientes del epitelio transicional del tracto urinario: vejiga, pelvis renal, uréteres y uretra.

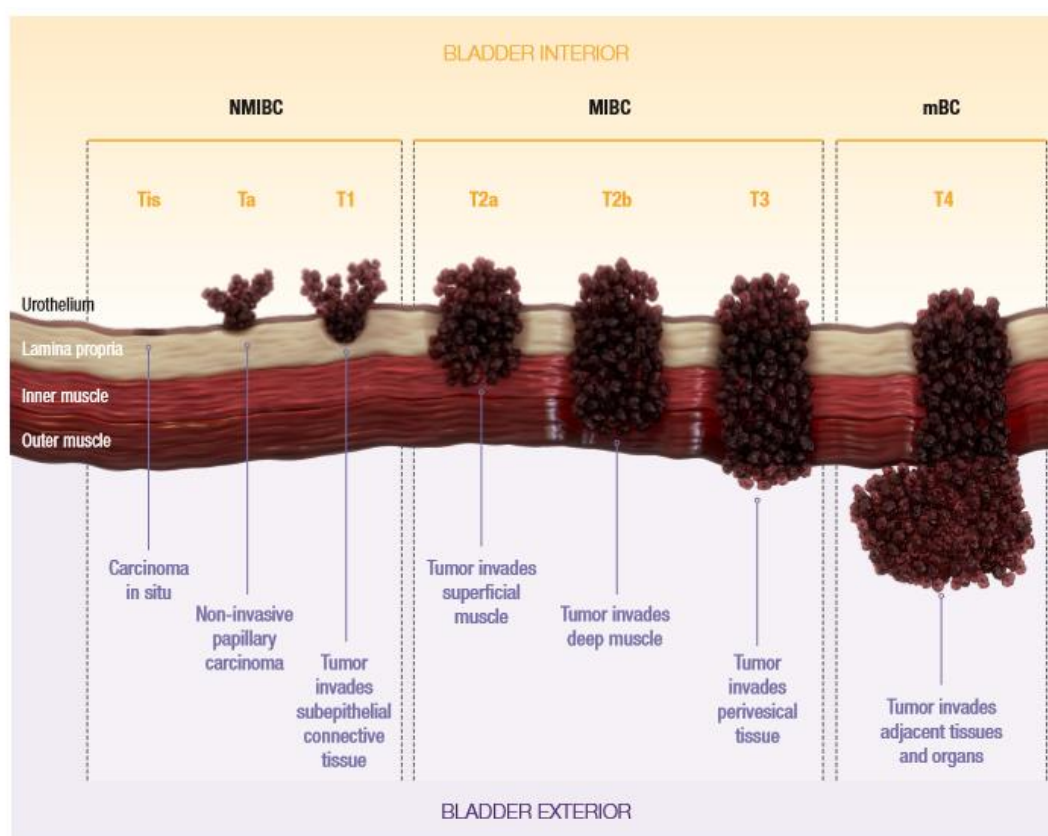
En cuanto al aspecto anatómico-patológico, se distinguen dos formas morfológicas de presentación: el carcinoma papilar y el carcinoma urotelial plano y varios subtipos histológicos, algunos de comportamiento biológico agresivo. El grado histológico se estratifica en bajo y alto grado, con implicaciones pronósticas y terapéuticas.

Tanto los tipos papilares como los no papilares pueden a su vez, infiltrar eventualmente el espesor de la pared vesical, hecho generalmente vinculado a grados histológicos altos. Esta característica de invasión parietal es clave en la orientación terapéutica y pronóstica de los pacientes, y, concretamente, la infiltración de la capa muscular propia. (16,17)

La estadificación clínica y patológica se hace en base al sistema TNM. La **Figura 1** ilustra esta clasificación.

Así podemos distinguir entre tumores superficiales que engloban las proliferaciones tumorales no invasivas del epitelio o con infiltración de la lámina propia, pero sin

afectación de la capa mucular (NMIBC – non muscle invasive bladder cáncer), tumores músculo infiltrantes (MIBC – muscle invasive bladder cáncer), tumores con infiltración transmural hasta el tejido adiposo perivesical con/sin extensión por continuidad a órganos vecinos y por fin, extensión tumoral a distancia (mBC – metastatic bladder cancer). El NMIBC se caracteriza por frecuentes recurrencias y una alta morbilidad pero con baja mortalidad; el MIBC, en cambio, se asocia con mayor tendencia a la progresión y es potencialmente letal en aproximadamente el 50% de los casos. (1,15)



**Figura 1. Estadificación del cáncer de vejiga (1).** Estadificación TNM según la afectación de estructuras de la pared vesical: tumores no invasivos, infiltración de la lámina propia, capa muscular y tejido adiposo y órganos adyacentes. MBC = metastatic bladder cancer; MIBC = muscle-invasive bladder cancer; NMIBC = non-muscle-invasive bladder cancer.

En cuanto a las lesiones papilares, en el momento del diagnóstico, la mayoría de casos son tumores superficiales, de bajo grado histológico, no musculo-infiltrantes. A pesar de los tratamientos locales, estas lesiones se asocian con una alta tasa de recurrencias y la posibilidad eventual de progresión a grados histológicos altos e invasivos. Las lesiones no papilares (lesiones planas), presentan una evolución diferente, en tanto en cuanto las lesiones planas no invasivas (carcinoma “in situ”) se consideran alto grado desde el inicio, y presentan un comportamiento biológico más agresivo, con altas tasas de progresión hacia lesiones invasivas. (16,17)

En el momento del diagnóstico, el 5% de los pacientes se presentan con metástasis a distancia, un 30% con tumores MIBC (de los cuales aproximadamente la mitad acabarán desarrollando metástasis a distancia más adelante), y aproximadamente la mitad se presentan como NMIBC. (1,5)

Globalmente la mortalidad por carcinoma urotelial se correlaciona con las lesiones músculo invasivas, asociadas o no a metástasis a distancia. (1,3)

La supervivencia a los 5 años desciende según el estadio progrese desde un 95.9% entre los pacientes diagnosticados de carcinoma papilar no invasivo, 70.2% con enfermedad localizada, 34.5% con enfermedad regional, hasta solo un 5.2% con metástasis a distancia, siendo una de las más bajas en comparación con otros cánceres. (1,5)

Las recomendaciones de EAU (European Association of Urology), respaldadas por la ASCO (American Society of Clinical Oncology), respecto al manejo clínico del cáncer de vejiga presentan tres aproximaciones según la extensión del tumor. El manejo clínico de los tumores NMIBC se realiza en base a la extirpación de la lesión mediante resección transuretral y quimioterapia local con instilación intravesical de mitomicina o bien inmunoterapia con Bacillo Calmette-Guerin (BCG). Esta terapia ha demostrado descender la probabilidad de recurrencia y progresión de estos tumores. Se podría plantear la cistectomía en los tumores de alto riesgo, recidivantes y en progresión a altos grados histológicos, véase **Figura 2 y 3**. (1,5)

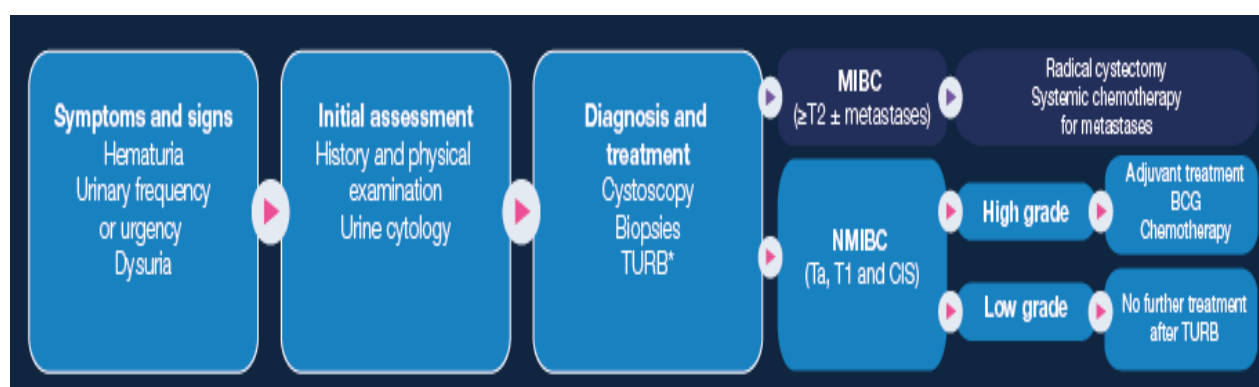
La elección del tratamiento para el cáncer invasivo (MIBC) de vejiga, en cuanto a optar por un tratamiento conservador de la vejiga vs. cistectomía radical, se basa fundamentalmente, en el tamaño, grado histológico y extensión tumoral, la función

vesical, y la capacidad o no de tolerar una cirugía mayor, teniendo en cuenta también opciones de tratamiento oncológico de radioterapia y quimioterapia (especialmente en los pacientes geriátricos), con variaciones individuales. (2,5) En dichos tumores MIBC se sopesan varios regímenes de tratamiento como ilustra la **Figura 2**, desde neoadyuvancia con quimioterapia basada en cisplatino y cistectomía de rescate, a cistectomía y terapia adyuvante, generalmente basada en esquemas de tratamiento que incluyen cisplatino. (1,5)

Otra opción puede ser la quimio-radioterapia como alternativa a la cistectomía en pacientes seleccionados con MIBC y en algunos para los que la cistectomía no es una opción viable. (5)

En pacientes con tumores no resecables (T4b) se aconseja cistectomía paliativa. (5)

En los casos de enfermedad avanzada metastásica (mBC), se pretende prolongar el tiempo y calidad de vida. Pacientes en estos estadios deben ser considerados para terapia sistémica pero no hay un tratamiento estandarizado. La ASCO recomienda la terapia con cisplatino como primera línea que asocia un incremento en la supervivencia media de unos 14-15 meses; sin embargo presenta una tasa de supervivencia a 5 años menor al 15%. En aquellos pacientes no candidatos a cisplatino, se puede optar por una terapia de quimioterapia basada en carboplatino o terapias con agente único pero en estos casos, el pronóstico empeora con una supervivencia media de unos 5-7 meses. (1,2,5) Para los pacientes con enfermedad metastásica mBC que experimenten progresión después de la combinación de quimioterapia basada en cisplatino, la ASCO recomienda la entrada a un ensayo clínico; alternativamente también se pueden ofrecer terapias con agentes como paclitaxel, docetaxel o influnine. (5)



**Figura 2. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de vejiga. (17)** Proceso diagnóstico y tratamiento según estadio TNM. MIBC = muscle invasive bladder cancer, NMIBC = non muscle invasive bladder cancer, CIS = carcinoma in situ. TURB = resección transuretral de vejiga (bladder transurethral resection).

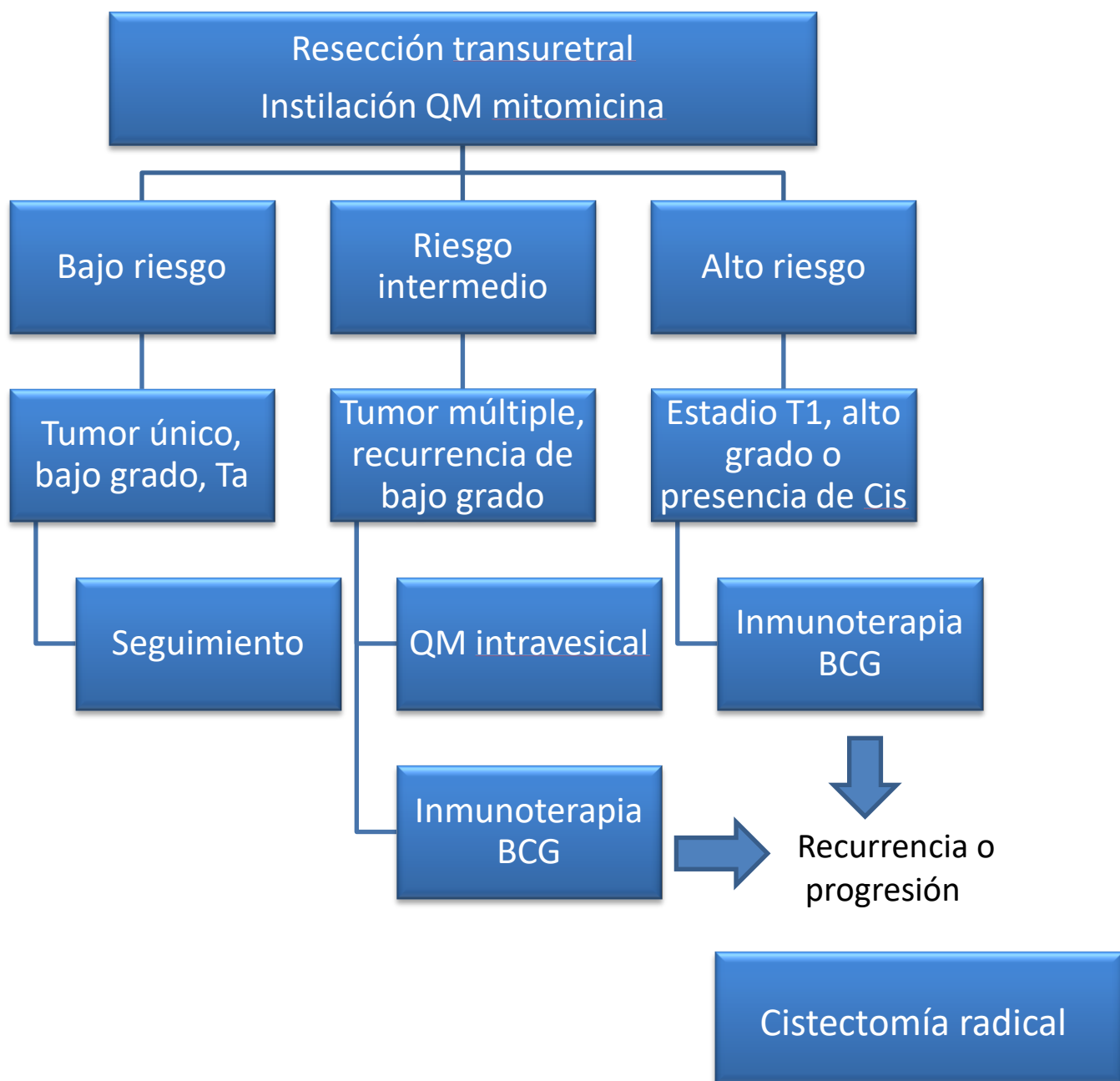


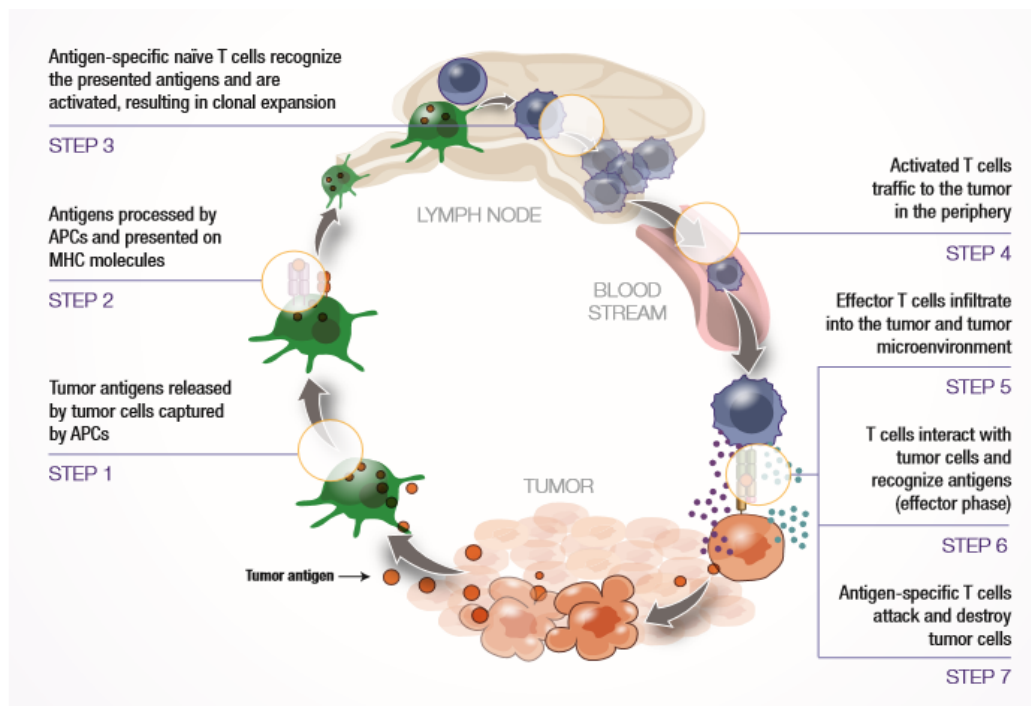
Figura 3. Tratamiento local carcinoma urotelial. Abordajes terapéuticos según resultados de la RTU (resección transuretral)..

## 1.2 VIGILANCIA INMUNOLÓGICA ANTITUMORAL E INMUNOTERAPIA:

Para la mayoría de pacientes con carcinoma urotelial invasivo la cirugía con/sin terapia adyuvante sigue siendo el principal eje del tratamiento. A pesar de que diferentes regímenes de quimioterapia han demostrado alguna eficacia, en las últimas décadas ha habido pocos avances en cuanto a nuevos agentes sistémicos para el cáncer de vejiga. Recientemente, sin embargo, la inmunoterapia ha surgido como un nuevo enfoque para el tratamiento de estos tumores.

Una respuesta inmunológica antitumoral efectiva necesita muchos tipos celulares diferentes con sus correspondientes funciones. Como viene ilustrado en la **Figura 4**, el ciclo se inicia con la liberación de antígenos que son capturados por células presentadoras de antígenos como las células dendríticas; posteriormente, los antígenos son procesados y presentados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie celular. Las células presentadoras de antígenos viajan hasta los ganglios linfáticos y activan a los linfocitos T sensibilizados a esos antígenos. Los linfocitos T activados viajan e interaccionan con el tumor destruyendo células cancerosas. Finalmente otros antígenos asociados al tumor son liberados por las células tumorales y se reinicia el ciclo inmunitario antitumoral, aumentando la profundidad de la respuesta según el ciclo continúa. (1)





**Figura 4. El ciclo inmunológico frente al cáncer.** (1) APC = célula presentadora de antígeno; MHC = complejo mayor de histocompatibilidad.

La composición antigénica de las células malignas es diferente respecto a las células sanas, lo que las hace dianas para el sistema inmune. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado numerosos mecanismos que permiten evadir el reconocimiento del sistema inmune: pueden desregular la expresión de antígenos por parte del tumor en sus superficies celulares para no ser detectadas como extrañas, pueden expresar otras proteínas en la superficie celular que inducen la desactivación del sistema inmune y pueden inducir que células del microambiente tumoral secreten citosinas que supriman la respuesta del sistema inmune promoviendo la proliferación y supervivencia de células tumorales. (2,4)

El cáncer de vejiga está entre los tumores que más carga mutacional presenta, el tercero detrás del cáncer de pulmón y melanoma. El alto índice de mutaciones se correlaciona con la inmunogenicidad del tumor. La habilidad del cáncer de vejiga de evadir los ciclos inmunes antitumorales puede contribuir a ese alto porcentaje de recurrencia y naturaleza agresiva de estos tumores. (1)

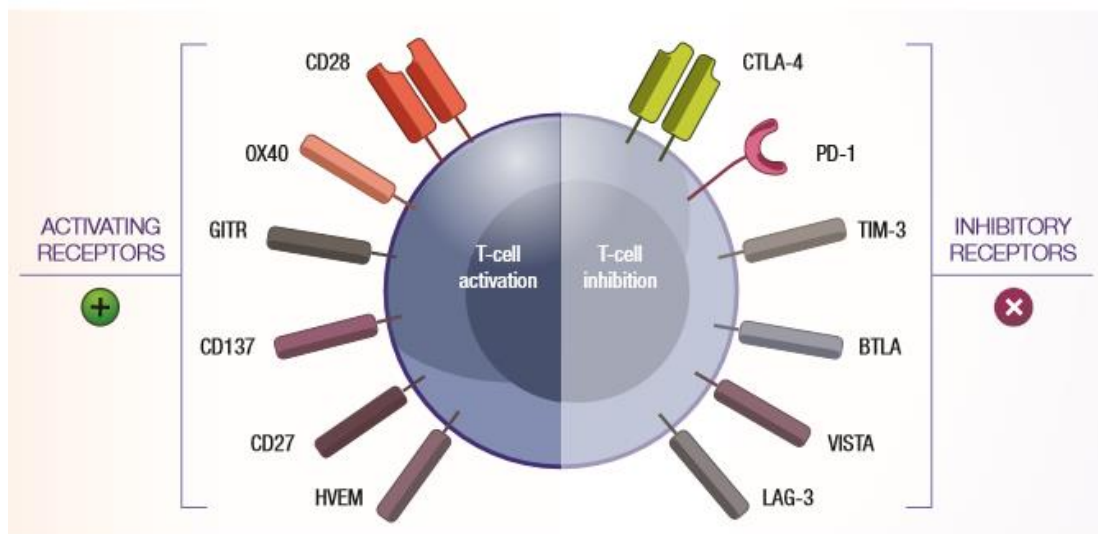
La premisa de la inmunoterapia es ayudar al propio organismo a curarse a sí mismo; esto es, permitiendo o estimulando al sistema inmune para que haga su función: proteger al organismo frente a invasores externos u otras amenazas. Activar el propio sistema inmune del cuerpo contra las células tumorales ha sido un enfoque novedoso en el manejo del cáncer. (2)

El principal papel de las células T es distinguir entre células sanas, patógenas o malignas mediante la activación o desactivación de varios receptores en la superficie de su membrana. Sin embargo, en pacientes con cáncer, como ya se ha comentado previamente, las células malignas pueden escapar de la detección mediante moléculas de superficie celular que interactúan con los receptores de las células T imitando las señales que emiten las células sanas. Esto tiene como resultado un sistema inmune que se mantiene inactivo contra células malignas, permitiendo su proliferación incontrolable. (2)

Las inmunoterapias están diseñadas para superar esta supresión del ciclo inmunitario que el tumor y el microambiente tumoral provocan y para reiniciar un ciclo inmunitario antitumoral eficaz.

### **1.3 CHECKPOINTS EN INMUNOTERAPIA:**

El ciclo normal de funcionamiento del linfocito T sería el siguiente: las células presentadoras de antígeno presentan el neoantígeno a la célula T gracias a la interacción linfocito T – MHC. La célula T debe recibir una señal, o bien de responder a ese antígeno o bien de ignorarlo. Esto se produce por la presentación de ciertos ligandos por parte de las células presentadoras de antígenos o por otras células del entorno que se unen a los receptores de las células T. Estas interacciones ligando-receptor sobre el linfocito T pueden activarlo o inhibirlo según el tipo (véase **Figura 5**), y regular la respuesta de la célula T. A estos receptores situados sobre la membrana de los linfocitos T, se les llama globalmente proteínas “puntos de control” o proteínas “checkpoints”. (1)



**Figura 5. Balance de coestimulación y coinhibición en la respuesta inmune. (1)** Receptores checkpoints activadores e inhibidores situados sobre membrana del linfocito T. BTLA = atenuador de linfocitos B y T; CTLA = antígeno de linfocito T citotóxico; GITR = proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides; HVEM = mediador de entrada de herpes simple; LAG = gen activador de linfocito; PD = proteína de muerte celular programada; VISTA = Ig de dominio-V supresora de la activación del linfocito T.

La interacción entre los ligandos y receptores checkpoint asociados en las células T (en este caso inhibidores), mantienen el sistema inmune “dormido”, impidiendo el funcionamiento inmunológico eficaz; los inhibidores de estas proteínas checkpoint evitan que unan sus ligandos y nos sirven para liberar de esos frenos al sistema inmune y así aumentar la respuesta inmune. (2)

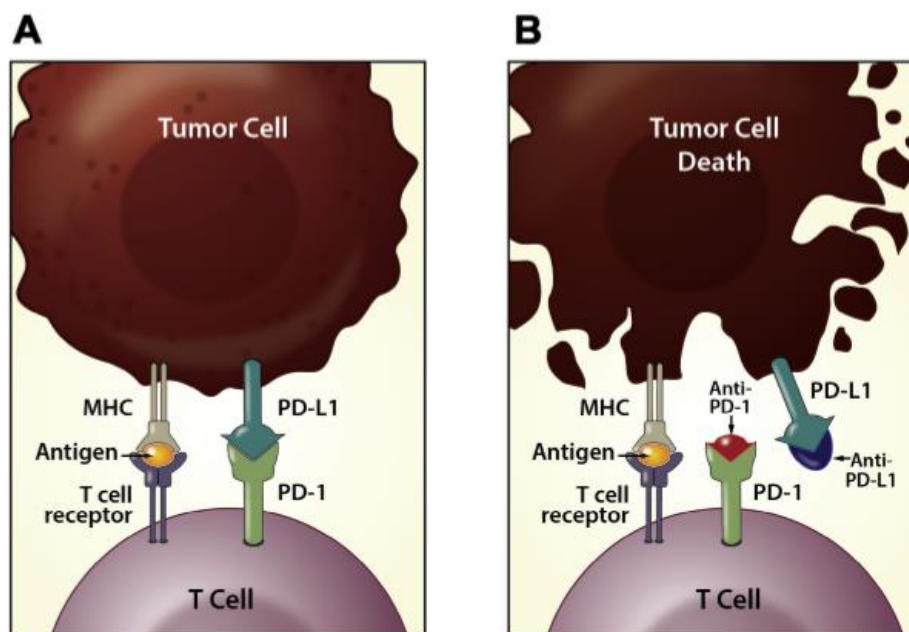
El potencial de la inmunoterapia ha sido ampliamente estudiado, con muchas modalidades terapéuticas algunas bajo investigación. Una de las más prometedoras ha sido el uso de anticuerpos monoclonales para bloquear las moléculas que impiden una respuesta inmune efectiva. El resultado de estos inhibidores de los checkpoints o de sus ligandos, es la revitalización de la actividad antitumoral mediada por células T. Un ejemplo de esta aplicación sería la inhibición de la proteína de muerte celular programada 1 (PD1). (2)

PD1 es un receptor inhibidor situado en la célula T CD4 y CD8 y otras células inmunes como monocitos, células NK, linfocitos B y células dendríticas cuando estas

se encuentran activadas. Cuando cualquiera de sus ligandos PD-L1 o PD-L2 une este receptor, PD1 recibe la señal e inhibe la función del linfocito T. (1,4)

El ligando de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-L1) puede ser expresado en células normales o tumorales. La presencia de PD-L1 en células normales previene del daño tisular propio y de las respuestas autoinmunes, mientras que la presencia de PD-L1 en el tumor le permite a este inhibir la respuesta del linfocito T y su función y evadir de este modo la respuesta inmune. Las células tumorales a menudo secuestran esta vía PD1/PD-L1 para protegerse a sí mismas de las células T que eliminarían el tumor. Además las células del microambiente también pueden expresar PD-L1 e igualmente inhibir las respuestas por parte de los linfocitos T. (1,2)

Todo este conocimiento del funcionamiento del sistema inmune ha dado pie a numerosas líneas de investigación encaminadas a la terapia oncológica. Los inhibidores de los checkpoints del sistema inmune representan el enfoque inmunitario más ampliamente estudiado no solo para el manejo de cáncer de vejiga sino para terapias más amplias y cabe destacar que actualmente hay más de 50 ensayos clínicos en desarrollo investigando acerca de estas moléculas. Hasta la fecha, se han aprobado varios fármacos inhibidores del punto de control anti-PD1 como nivolumab, pembrolizumab para el tratamiento del melanoma avanzado (como primera línea de tratamiento), para carcinoma de células renales (nivolumab como segunda línea de tratamiento) así como atezolizumab, anti-PDL1 para cáncer de pulmón no células pequeñas. El bloqueo inmune de los puntos de control por la vía PD-L1 también ha mostrado ser prometedor en la actividad clínica del cáncer urotelial avanzado. El mecanismo de acción de estos fármacos viene ilustrado en la **Figura 6.** (6)



**Figura 6. Funcionamiento de Igs AntiPD-1 y AntiPD-L1. (2)** Mecanismo de acción de inhibidores PD1 y PD-L1. A) Comportamiento tumoral: PD-L1 une PD1 e inhibe la muerte de la célula tumoral por parte de la célula T. B) Comportamiento farmacológico: bloqueo de PD-L1 o PD1 que permite que la célula T elimine la célula tumoral. MHC = complejo mayor de histocompatibilidad; PD1 = proteína de muerte celular programa 1; PD-L1 = ligando de proteína de muerte celular programada 1.

La introducción de los inhibidores de puntos de control o checkpoints abre nuevas expectativas para los pacientes con cáncer de vejiga que previamente tenían pocas opciones de respuesta duradera, o que hayan experimentado progresión tras terapia de primera línea, incluyendo aquellos pacientes no candidatos a terapias basadas en cisplatino por edad o comorbilidades. El cisplatino es conocido por su potencial nefrotoxicidad, ototoxicidad y emesis; los inhibidores de PD-L1 parecen ser relativamente bien tolerados sin aparente daño renal y por lo tanto se plantean como una alternativa factible para muchos de estos pacientes. (2)

Desde el año 2016, la FDA ha aprobado varios fármacos inhibidores de PD-L1, algunos en modo de “aprobación acelerada”, bien como primera línea tratamiento en cáncer avanzado en pacientes no candidatos a terapia con platino o bien como alternativa en segunda línea tras fracaso de la terapia con platino. Entre ellos se

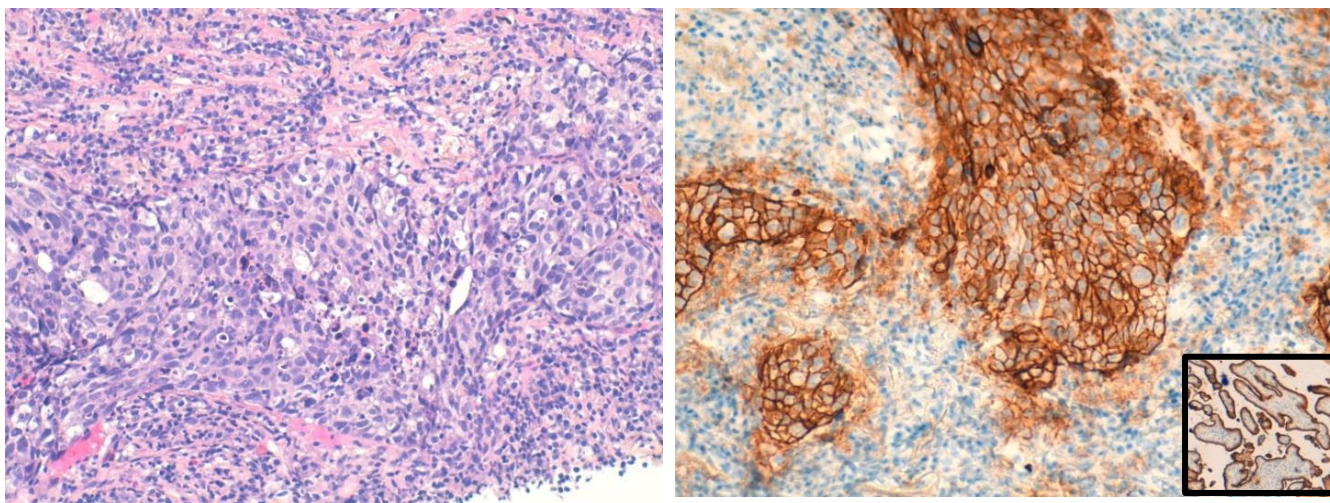
encuentran: **ATEZOLIZUMAB, PEMBROLIZUMAB, AVELUMAB Y DURVALUMAB.**

#### **1.4 FÁRMACOS INHIBIDORES AntiPD-L1:**

Como se ha comentado, PD-L1 es una glucoproteína de superficie celular que funciona como un inhibidor de las células T y cumple un papel esencial en la supresión de la respuesta inmune celular. Está implicado en la resistencia al sistema inmune por parte del tumor induciendo apoptosis a los linfocitos TCD8 activados, afectando a la producción de citosinas como IL-2, IFN gamma, y TNF alfa y disminuyendo la citotoxicidad de los linfocitos T activados. (3,4)

Los fármacos inhibidores de PD-L1 son básicamente, anticuerpos monoclonales diseñados para actuar sobre la proteína PD-L1 expresada en las células tumorales y en las del sistema inmune asociadas al tumor. Su objetivo es bloquear a PD-L1 para así evitar que unan su receptor sobre la superficie de linfocitos T. De esta manera la terapia inmune impide la desactivación de linfocitos T restaurando su capacidad para detectar y atacar de forma eficaz las células tumorales. (2,9)

Uno de estos fármacos inhibidores, el Atezolizumab, está aprobado desde 2016 para cáncer de pulmón no células pequeñas y para melanoma. En el caso del cáncer de pulmón, se plantea como terapia de segunda línea (por el momento), en estadios metastásicos en los que no se ha obtenido respuesta a la terapia previa con cisplatino. Para la selección de pacientes candidatos a esta terapia se requiere de un estudio inmunohistoquímico previo sobre material de biopsia/citología, a fin de evaluar el status de la expresión de PD-L1 (véase **Figura 7**).



**Figura 7. Tinción IHQ con antiPD-L1 en carcinoma de pulmón no células pequeñas.** Izquierda: carcinoma epidermoide con tinción hematoxilina–eosina. X200. Derecha: tinción IHQ positiva antiPD-L1 del mismo tumor. X200. Abajo derecha: control interno con placenta. Criterios de evaluación para casos positivos: muestra válida que incluya una cantidad mínima de 100 células y tinción de membrana completa o incompleta de cualquier intensidad. El resultado se expresa en forma de porcentaje con el número de células positivas respecto al área tumoral total. Anticuerpo utilizado: clon SP263. Roche- Ventana.

En cuanto al cáncer urotelial, Atezolizumab ha sido el primer inhibidor PD-L1 activo en cáncer de vejiga aprobado en mayo de 2016 por la FDA con indicación en pacientes con carcinoma urotelial localmente avanzado o metastásico como segunda línea de tratamiento tras fracaso de terapia basada en cisplatino o para pacientes no candidatos a ésta. Esta indicación ya está en marcha en EEUU, sin embargo todavía está pendiente su aprobación en Europa. Con posterioridad, han aparecidos otros fármacos con indicaciones similares. (2)

Para la aprobación de Atezolizumab como tratamiento en cáncer de vejiga, la FDA se basó en el ensayo en fase 2 IMvigor210 (NCT02108652) llevado a cabo por Rosenberg J. et al. (7,13) en Nueva York, USA. Se trata de un estudio multicéntrico que evaluó la seguridad y eficacia de Atezolizumab en pacientes con cáncer urotelial localmente avanzado o metastásico independientemente del nivel de expresión de PD-L1, aunque sí fueron analizadas las respuestas en ambos subgrupos como objetivo secundario.

Los datos demostraron que la administración de Atezolizumab conseguía una tasa de respuesta objetiva del 15% (n=49) para todos los pacientes; llegando incluso a una

tasa de respuesta del 26% dentro del subgrupo PD-L1 positivo con expresión media-alta. Resultados del estudio en extensión en anexos 1 y 2. (2,8,9,10)

Actualmente, existen múltiples estudios clínicos en marcha y líneas de investigación en relación a este fármaco. (2,9)

Según el doctor José Luis Pérez García, oncólogo de la Clínica Universitaria de Navarra y uno de los especialistas participantes en el estudio IMvigor 210, “los datos son muy positivos ya que estos primeros resultados dan una respuesta satisfactoria a la prueba de concepto planteada: demuestra que inducir al sistema inmunitario a combatir este tumor es una posibilidad válida en el manejo de una enfermedad que en su fase avanzada está muy necesitada de terapias activas; y además se constata que la inmunoterapia logra un hito: que la respuesta al tratamiento se mantenga durante muchos más meses que la quimioterapia y que lo haga de una manera menos tóxica”. (9)

El MIBC y mBC son tumores de difícil control cuando se extienden más allá de la vejiga. En estos casos la quimioterapia ofrece respuestas de duración limitada. La inmunoterapia podría conseguir, a priori, una prolongación de la respuesta (hasta en un 85-95% de los casos) con impacto en la supervivencia global. (9)

Debe tenerse en cuenta que, en líneas generales, los fármacos antiPD-L1 aprobados en EEUU para una variedad de cánceres, aún con algunas críticas encontradas en la literatura revisada, no requieren para su administración haber realizado previamente una evaluación del status PD-L1 sobre el tumor. Aunque los respectivos ensayos clínicos han demostrado que la eficacia se correlaciona con su expresión, también se han visto respuestas en tumores negativos para PD-L1. Sin embargo hay que destacar que una mayor expresión PD-L1 se asocia a tasas de respuesta más elevadas, por lo que cabe considerar la determinación del status PD-L1 sobre el tejido como criterio de selección más ajustada de los pacientes que posiblemente se vayan a beneficiar de la terapia. (2,8,10)



### **1.5 OBJETIVOS:**

En base a lo anteriormente expuesto, se plantea el estudio inmunohistoquímico sobre muestras de biopsia de carcinoma urotelial con antiPD-L1, con los siguientes objetivos:

- 1.- Comprobar la eficacia técnica del clon SP263 Ventana-Roche, (estandarizado en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Galdakao-Usansolo para carcinoma de pulmón no célula pequeña), sobre biopsias de tumores de vejiga obtenidas mediante RTU con resultado histológico de carcinoma urotelial, todas ellas procedentes de pacientes fallecidos por carcinoma urotelial avanzado en base a datos recogidos en el Hospital de Galdakao-Usansolo en los últimos cinco años y proporcionados por el Servicio de Oncología Médica de dicho hospital.
- 2.- Analizar los resultados inmunohistoquímicos y los criterios para su evaluación.
- 3.- Correlacionar los resultados con parámetros clínico-histológicos establecidos.
- 4.- Contribuir a la selección ajustada de pacientes candidatos a terapia inmune con fármacos antiPD-L1 bien en pacientes con carcinoma urotelial avanzado como segunda línea de tratamiento o bien en pacientes no candidatos a terapia en primera línea con esquemas de tratamiento convencionales.
- 5.- Analizar el posible impacto en el gasto sanitario global en relación a la administración de terapia antiPD-L1 en pacientes seleccionados mediante el estudio propuesto, frente a la administración del fármaco sin tener en cuenta el status PD-L1 sobre el tejido tumoral mediante estudio inmunohistoquímico sobre muestras histológicas, según criterios de evaluación previamente establecidos.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS:

Se ha recogido una serie de 11 casos (n=11) de pacientes fallecidos por carcinoma urotelial avanzado, fallecidos en el Hospital de Galdakao-Usansolo en los últimos cinco años (período 2012-2017). Todos los casos contaban con material de biopsia procedente de RTU. Las muestras analizadas han procedido de material tisular conservado en bloque de parafina en el archivo del laboratorio, tras procesado habitual según protocolos estandarizados de muestras para estudios histológicos, con tinción de Hematoxilina – Eosina (H/E), en cortes histológicos a 4-5 $\mu$ .

Previamente al estudio inmunohistoquímico, se ha reevaluado la totalidad del material de cada caso mediante estudio histológico convencional de microscopía óptica en microscopio multicabezal a fin de valorar la calidad y el estado de las preparaciones histológicas. En los casos que así lo requirieron, se han efectuado nuevas secciones, para una valoración optimizada del tejido. Se ha procedido a la revisión diagnóstica de las muestras recogidas para confirmar el diagnóstico morfológico emitido previamente así como la valoración de la infiltración y grado histológico. Se confirma el diagnóstico inicial de carcinoma de células transicionales alto grado (G3), así como la invasión de la capa muscular en la mayoría de los casos (pT2), salvo un caso con infiltración del estroma prostático (pT4). No se han encontrado discrepancias en la revisión de muestras.

Como dato adicional, se señalan los subtipos histológicos de carcinoma urotelial menos habituales encontrados y la realización o no de cistectomía. Quedaría pendiente para estudios ulteriores el dato recogido de los pacientes que han recibido previamente terapia local con BCG, basada también en la inducción de una respuesta inmune local efectiva. **(Tabla 1)**

**Tabla 1. Base de datos de la muestra seleccionada.** Recogida de datos de la muestra de 11 (n=11) pacientes fallecidos por cáncer urotelial avanzado.

IENTE	EDAD	SEXO	TIPO (SUBTIPO) HISTOLOGICO	GRADO	pT	CR	BCG
1	67	M	Transicional papilar	G3	pT2	NO	NO
2	61	H	Transicional plasmocitoide	G3	pT1	NO	NO
3	71	H	Transicional papilar	G3	pT2	SÍ	NO
4	61	H	Transicional no papilar	G3	pT2	SÍ	NO
5	86	H	Transicional papilar	G3	pT2	SÍ	NO
6	78	H	Transicional papilar	G3	pT2a	NO	SI
7	70	H	Transicional diferenciación escamosa	G3	pT2	NO	NO
8	61	H	Transicional diferenciación escamosa y glandular	G3	pT4a	SÍ	NO
9	67	H	Transicional diferenciación escamosa	G3	pT2	SÍ	NO
10	62	H	Transicional papilar	G3	pT1	SÍ	SI
11	79	H	Transicional papilar	G3	pT2	SÍ	NO

**Tabla 1.** Se recogen datos acerca de sexo, edad y tipo histológico especificando subtipo si procede. Todos los casos fueron de alto grado (G3), en estadio musculoinvasivo (pT2) salvo un caso pT4 (caso 8); también se recoge información acerca de si se les ha realizado cistectomía radical (CR), o si recibieron terapia local BCG previamente a este episodio. M = Mujer, H = Hombre, CDDP = cisplatino, GMZ = gemcitabina, CBDCA = carboplatino, BCG = terapia previa con el Bacilo Calmette-Guerin.

## 2.1 INMUNOHISTOQUÍMICA

Para el estudio inmunohistoquímico se ha utilizado el anticuerpo monoclonal disponible en el laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Galdakao-Usansolo: clon antiPD-L1 SP263 proporcionado por Roche (Ventana) vigente en protocolo cerrado (automatizado) para la evaluación antiPD-L1 en cáncer de pulmón no células pequeñas.

Ventana PD-L1 (SP263) Assay es un ensayo inmunohistoquímico que utiliza un anticuerpo primario monoclonal de conejo antiPD-L1 (anticuerpo VENTANA PD-L1 (SP263)) para reconocer el programmed death-ligand 1 (PD-L1), también conocido como homólogo 1 (B7-H1) o CD274. El procedimiento consiste en añadir este anticuerpo monoclonal de conejo que se une a PD-L1 en cortes de tejido conservados en parafina y previamente fijados con formol tamponado neutro al 10% (NBF) durante un periodo de al menos 6h hasta 72h, a temperatura ambiente (de 15° a 25°C). Todos los casos han contado con control positivo interno sobre tejido placentario. El anticuerpo específico puede visualizarse utilizando OptiView DAB IHC Detection Kit (N.º cat. 760-700 / 06396500001). (21)

Materiales necesarios:

1. OptiView DAB IHC Detection Kit (N.º cat. 760-700 / 06396500001)
2. EZ Prep Concentrate (10X) (N.º cat. 950-102 / 05279771001)
3. Reaction Buffer Concentrate (10X) (N.º cat. 950-300 / 05353955001)
4. LCS (Predilute) (N.º cat. 650-010 / 05264839001)
5. Cell Conditioning Solution (CC1) (N.º cat. 950-124 / 05279801001)
6. Hematoxylin II counterstain (N.º cat. 790-2208 / 05277965001)
7. Bluing Reagent (N.º cat. 760-2037 / 05266769001)

## 2.2 CRITERIOS DE EVALUACIÓN

Para evaluar los resultados, se han seguido los criterios de evaluación proporcionados por Roche–Ventana para el clon SP263 en carcinoma urotelial, según guía obtenida en la dirección web especificada en referencias bibliográficas. (18) Esta guía aún no ha sido aprobada para su utilización clínica en nuestra comunidad, a fecha de la edición de este trabajo, si bien se espera su aprobación en los próximos meses.

Según estos criterios, la expresión de PD-L1 es determinada tanto por el porcentaje de células tumorales positivas que presenten tinción de membrana de cualquier intensidad como por el porcentaje de células inmunes asociadas a tumor (CIAT) que presenten cualquier tipo de tinción ya sea de membrana, citoplasmática o punteada (IC+, immune cells positive).

Para determinar un resultado positivo por el criterio de IC+, primero se debe revisar la cantidad de células inmunes asociadas a tumor presentes en la muestra. Se comparará la presencia de células inmunes con respecto al área tumoral y se calculará el porcentaje de área que ocupan las células inmunes (considerando cualquier tipo de célula inmune, linfocitos, macrófagos, histiocitos, células plasmáticas y neutrófilos).

La evaluación se ha realizado según el algoritmo de puntuación disponible en la guía, que recomienda:

Evaluar con tinción H/E tumor viable y área tumoral (circundada en color con rotulador indeleble). Revisar el área tumoral de las células inmunes (circundada en otro color p ej. negro) a X10 y agregar visualmente las células inmunes a X2 o X4 para determinar ICP.



Revisar el portaobjetos teñido de PD-L1 a X10 o X20 para distinguir la tinción de células inmunes y tumorales.



Revisar las células tumorales a X10 o X20 para evaluar la tinción de membrana a cualquier intensidad.



Revisar las células inmunes a X10 o X20 para evaluar tinción de cualquier intensidad. Agregar visualmente células inmunes de tinción (color negro) y comparar con ICP para calcular IC+.

Una vez se ha considerado qué % de células inmunes asociadas a tumor presenta el tejido, se evaluará qué porcentaje de éstas presentan cualquier tipo de tinción para PD-L1.

Se considera, por tanto, expresión ALTA/POSITIVA para PD-L1 en cualquiera de los siguientes casos:

- $\geq 25\%$  de las células tumorales de la muestra presentan tinción de membrana.
- Células inmunes asociadas a tumor son más del  $> 1\%$  del área tumoral y presentan tinción IC+  $\geq 25\%$  de ellas.
- Células inmunes asociadas a tumor son  $=$  o  $<$  al  $1\%$  del área tumoral y presentan tinción IC+ =  $100\%$ .

En caso contrario y con tinción inferior a los anteriores se considera BAJO/NEGATIVO la expresión PD-L1.

### Problemas en la interpretación:

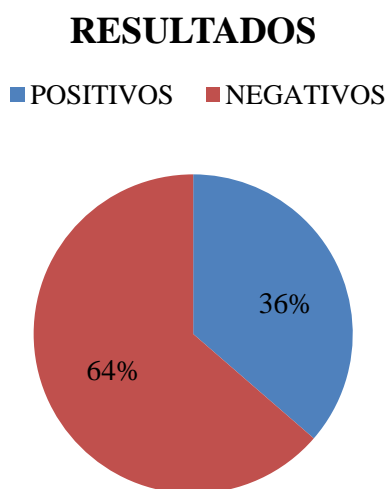
Las muestras obtenidas mediante RTU constan habitualmente de múltiples fragmentos tisulares, con frecuencia asociando artefacto térmico y por tracción debido al procedimiento quirúrgico y, sobre todo en tumores de alto grado, con presencia de necrosis tisular y áreas hemáticas. Se hace necesaria la selección de las zonas de tejido adecuadas para la evaluación tanto para definir el área tumoral a estudio como para definir la presencia de células inmunes asociadas a tumor (IC). Se aconseja en estos casos para evaluar los resultados, realizar la media de los porcentajes de tinción estimados para cada fragmento.

La primera evaluación se ha efectuado por cuatro observadores en microscopio multicabzal; los casos dudosos se han reevaluado por observadores independientes y debatidos posteriormente. Finalmente, se ha procedido a la evaluación definitiva.

### **3. RESULTADOS:**

En cuanto al primer objetivo del trabajo, se constata la eficacia del clon SP263 Roche-Ventana. No ha sido necesario repetir el protocolo en ninguno de los casos analizados, bien por problemas de fondo o por problemas técnicos de otra índole. El control positivo interno utilizado en todos los casos, fue el correcto.

Los resultados cuantitativos de inmunohistoquímica obtenidos, se representan en la **Figura 8**.



**Figura 8. Resultados cuantitativos IHQ.** El 36,36% de la muestra dio resultado positivo para tinción AntiPD-L1. Un total de 4 casos de los 11 pertenecientes a la muestra analizada.

Además en la **Tabla 2** se han recogido los siguientes parámetros: estadio clínico al comienzo de la quimioterapia, modalidad de quimioterapia aplicada en cada caso y resultado inmunohistoquímico obtenido.

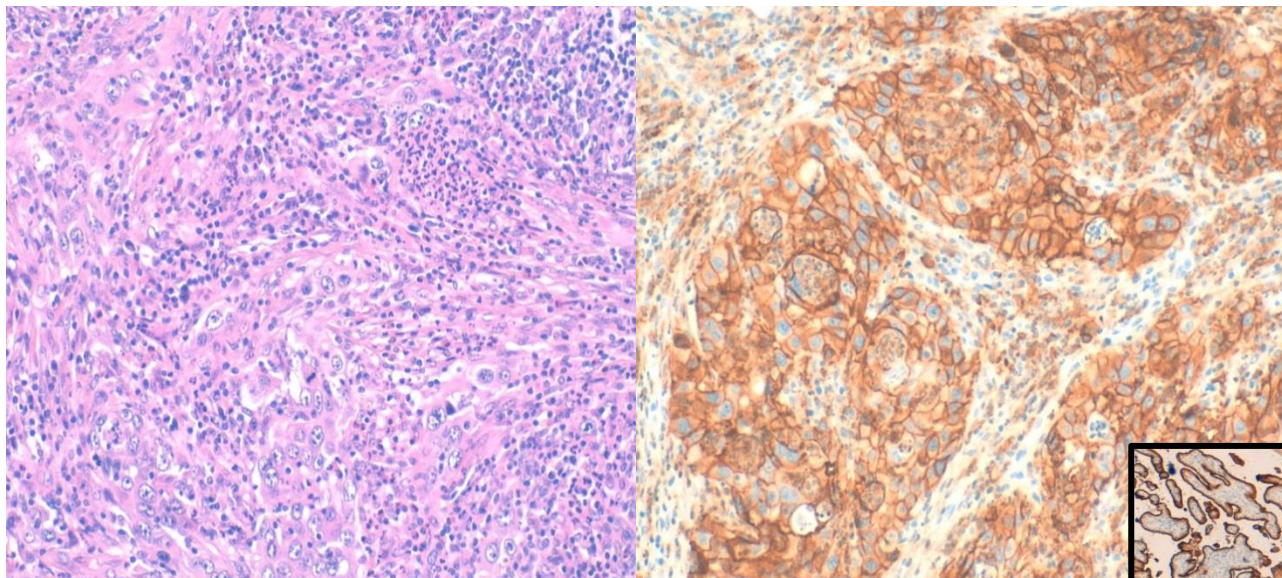
PACIENTE	cTNM	ADYUVANCIA	RESULTADOS
1	cT2N2M1b	CDDP + GMZ + ÁCIDO ZOLEDRÓNICO x6 + VINFLUNINA x3 + PACLITAXEL	BAJO
2	cT4NxM1b	CDDP + GMZ x6 + PACLITAXEL	BAJO
3	cT2N3M1a	GMZ x6 + CBDCA + GMZ x6 + VINFLUNINA x3 + PACLITAXEL	ALTO
4	cT3bN2M0	CDDP + GMZ x3 + VINFLUNINA x6 + PACLITAXEL	ALTO
5	cT4aN3M1b	CBDCA + GMZ x6 + CBDCA + GMZ x4	ALTO
6	cT2NxM1b	CDDP + GMZ x6 + VINFLUNINA x3 + PACLITAXEL	BAJO
7	cT2NxM1b	CBDCA + GMZ x6 + DOCETAXEL x3	BAJO
8	cT4N0M0	CDDP + GMZ x6 + VINFLUNINA x3 + PACLITAXEL	ALTO
9	cT2N3M1a	CBDCA + GMZ x6	BAJO
10	cT1N2M1	CDDP + GMZ x6 + VINFLUNINA x3 + PACLITAXEL	BAJO
11	cT2N0M1	CBDCA + GMZ x4 + PLACITAXEL	BAJO

**Tabla 2. Resultados de IHQ.** Un total de 11 casos (n=11), la mayoría en estadio metastásico ganglionar (M1a) u orgánica (M1b) al diagnóstico; múltiples ciclos y líneas quimioterápicas empleadas. Se observan resultados positivos tinción POSITIVA/ALTA en un total de cuatro casos. CDDP = cisplatino, GMZ = gemcitabina, CBDCA = carboplatino.

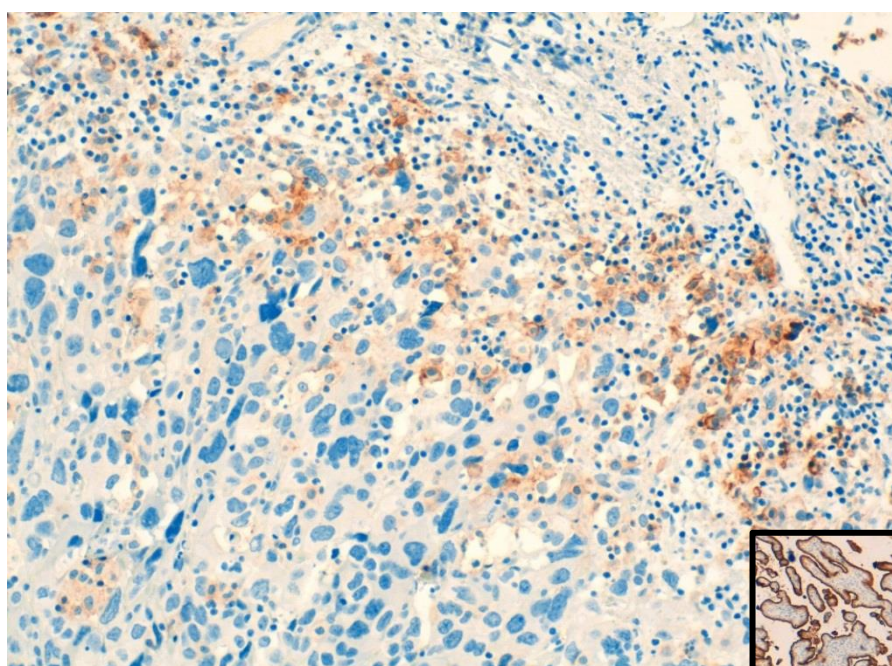
Como se observa en la **Tabla 2** un total de 4 casos fueron positivos para la expresión PD-L1 del total de muestras examinadas (n=11). Esto supone un resultado positivo en más de un tercio (36.36%) de las muestras seleccionadas y testadas para la



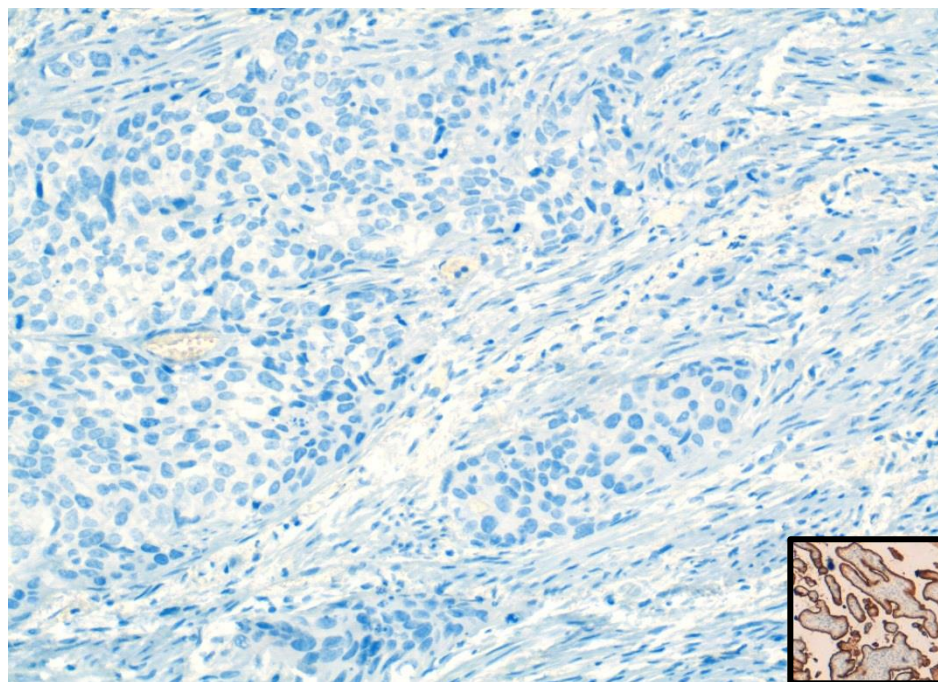
expresión PD-L1, bien en base al criterio de positividad de membrana sobre células tumorales como en base al criterio de positividad de células inmunes asociadas a tumor (CIAT).



**Figura 9. Resultados IHQ de la muestra 8.** Tinción IHQ con antiPD-L1 en carcinoma urotelial. Izquierda: carcinoma urotelial con tinción hematoxilina-eosina. X200. Derecha: tinción IHQ positiva antiPD-L1 del mismo tumor. X200. Abajo derecha: control interno con placenta. Anticuerpo utilizado: clon SP263. Roche-Ventana. Se observa positividad en >25% de las células tumorales que presentan tinción de membrana y más del 1% de células inmunes respecto al área tumoral total presentan tinción positiva en >25% (IC+).



**Figura 10. Resultado IHQ POSITIVO de la muestra 5.** Tinción IHQ con antiPD-L1 en carcinoma urotelial. X200. Abajo derecha: control interno con placenta. Anticuerpo utilizado: clon SP263. Roche-Ventana. Se observa más del 1% de células inmunes respecto al área tumoral total. Presentan tinción positiva en >25% de ellas (IC+).



**Figura 11. Resultado IHQ NEGATIVO de la muestra 9.** Tinción IHQ con antiPD-L1 en carcinoma urotelial musculo-infiltrante. X200. Abajo derecha: control interno con placenta. Anticuerpo utilizado: clon SP263. Roche-Ventana. Se observa tinción negativa tanto para células tumorales como para las escasas células inmunes asociadas a tumor (CIAT).

Se han seguido los criterios de evaluación recomendados en la guía de referencia (18), definiendo en primer lugar el área tumoral y las CIAT. No ha sido necesaria la realización de técnicas adicionales de inmunohistoquímica (CD-3) para definir CIAT.

No se ha objetivado una relación entre subtipo histológico con el status PD-L1:

- El único caso de subtipo histológico definido (carcinoma urotelial variante plasmocitoide), fue negativo para la determinación PD-L1.
- De los tres casos con diferenciación escamosa, uno se consideró positivo (caso 8) y los otros, negativos (casos 7 y 9).
- Las zonas de diferenciación glandular observadas en el caso 8 fueron negativas, mientras que las áreas de tumor alto grado y de diferenciación escamosa, se consideraron positivas.
- Las áreas de arquitectura papilar observadas en algunas de las muestras, fueron reiteradamente negativas.

- Los casos positivos corresponden a patrones de infiltración sólidos, de alto grado histológico.
- Ninguno de los casos positivos había recibido inmunoterapia con BCG.

No ha sido posible analizar el impacto real en el coste de la terapia, por desconocer datos de índole económico-comercial al respecto, hecho que trasciende las posibilidades de este trabajo.

#### **4. DISCUSIÓN:**

Debido al limitado número de pacientes seleccionados en nuestra muestra no se plantea un análisis estadístico riguroso respecto a los resultados obtenidos. Tampoco se pretende extraer conclusiones de efectividad con terapia antiPD-L1 por tratarse de pacientes fallecidos. Sin embargo, cabe destacar la relevancia del status PD-L1 sobre biopsias de carcinoma urotelial mediante tinción inmunohistoquímica.

En base a la literatura revisada, en EEUU los inhibidores PD-L1 se plantean como terapia de segunda línea en pacientes tras fracaso o progresión en la terapia con cisplatino. La FDA ha aprobado esta indicación terapéutica independientemente del resultado PD-L1 positivo o negativo sobre el tejido. Las guías europeas aún no han implementado oficialmente la terapia estandarizada con inhibidores PD-L1 en cáncer urotelial avanzado, si bien se espera su aprobación en breve.

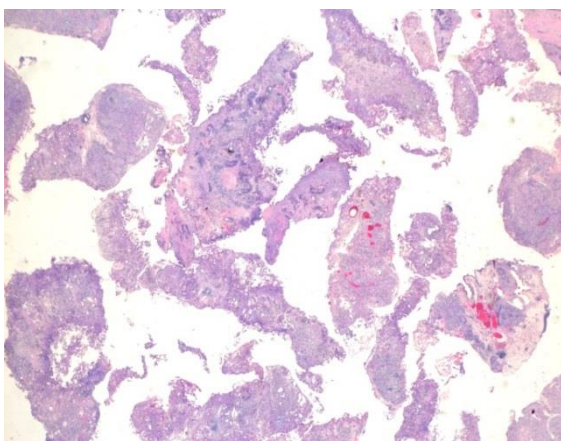
La terapia personalizada del cáncer está universalmente admitida en nuestros días. En este sentido, y al igual que en tumores de otras localizaciones, el estudio inmunohistoquímico previo a la terapia contribuye a una selección más real de pacientes que pueden optar a la terapia. Como se ejemplifica en este trabajo, la inmunohistoquímica con antiPD-L1 sobre tejido es una herramienta útil que nos permite evaluar la expresión por parte del tumor del antígeno diana de nuestro fármaco.

Los resultados obtenidos han sido óptimos en cuanto a criterios de calidad técnica del protocolo utilizado, señalando la importancia en nuestro sistema de trabajo de incluir en todos los casos un control positivo interno sobre tejido placentario.

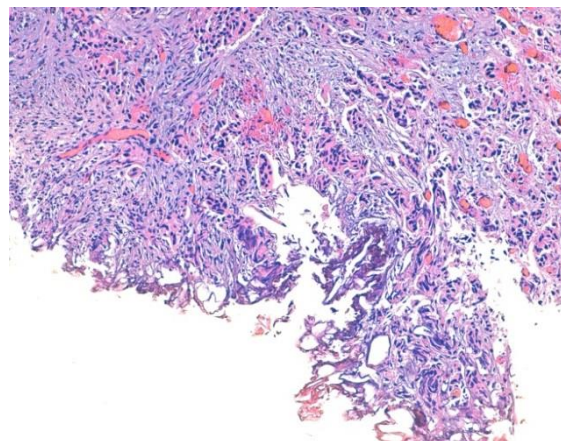
En cuanto a las dificultades en la valoración de resultados, señalar en primer lugar un aspecto propio al material tisular examinado: a diferencia del tipo de muestras estudiadas en otros tumores (biopsia core en cáncer de pulmón, secciones completas tisulares en material obtenido de pieza quirúrgica etc.), las RTU, habitualmente incluyen numerosos fragmentos tisulares (véase **Figura 12**), lo que supone en ocasiones la existencia de múltiples bloques de parafina diferentes y el incremento de cortes histológicos en el estudio.

Por otro lado, con frecuencia este tipo de muestras incluyen áreas de artefacto térmico y por tracción debidas al propio procedimiento quirúrgico (**Figura 13**).

Por último, y, asociado generalmente a altos grados histológicos, es frecuente encontrar áreas de necrosis y hemorragia.



**Figura 12. Muestra histológica de carcinoma urotelial obtenida mediante RTU.** Múltiples fragmentos de tejido a evaluar. X40. Tinción hematoxilina-eosina.



**Figura 13. Artefacto térmico en muestra obtenida mediante RTU.** Para la interpretación de los resultados se deben evitar estas áreas que distorsionan el tejido real. X100. Tinción hematoxilina-eosina.

Según la guía de interpretación utilizada (ROCHE-VENTANA) para el clon SP263 en carcinoma urotelial (18), se aconseja el análisis y recuento de las áreas tumorales estudiadas y finalmente, un cálculo medio de los porcentajes de tinción estimados por cada fragmento, además de evitar las zonas de artefacto y necrosis lo que puede resultar en cierta medida tedioso a la hora de evaluar los casos en el contexto de la práctica asistencial rutinaria. Por otra parte, posibilita la variabilidad interobservador.

Parece necesario, por tanto, al igual que ocurre con cada nuevo protocolo que se instaure, un período de entrenamiento de los patólogos que van a efectuar la evaluación así como el examen de los casos en microscopio multicabestal o a través de evaluaciones individuales con puesta en común posterior, como se ha efectuado en el presente trabajo y, en líneas generales, contar con protocolos sistematizados de trabajo, tanto en la vertiente técnica como en el estudio microscópico posterior.

No obstante, y a pesar de las dificultades encontradas y previsiblemente superables, consideramos el establecimiento del status PD-L1 mediante inmunohistoquímica con el clon SP263 en muestras tisulares, un elemento necesario a tener en cuenta en la selección de pacientes. De este modo, se disminuye el sobretratamiento en pacientes que no obtendrían beneficio clínico y se evitan efectos adversos de la terapia.

Enfocando la terapia oncológica en el contexto de los sistemas sanitarios públicos europeos, se puede constatar que, en general, se trata de terapias caras, con un incremento constante del gasto sanitario. Por analogía con la terapia antiPD-L1 en cáncer de pulmón, entre otras, es previsible que la implementación de fármacos antiPD-L1 en cáncer urotelial sea costosa. Independientemente de otras consideraciones (terapias compasivas, estimación del coste/beneficio, factores comerciales y empresariales etc.), parece por ello que la selección estricta de pacientes candidatos a determinadas terapias, puede contribuir a una gestión más razonable de los recursos económicos del sistema.

## **5. CONCLUSIÓN:**

El cáncer de vejiga representa el 5,7% de todos los cánceres diagnosticados en la CAPV. La mayoría de los casos al momento del diagnóstico son tumores superficiales no musculo-infiltrantes; sin embargo, la mortalidad por enfermedad tumoral avanzada está asociada al cáncer de vejiga músculo invasivo. (1,2,9)

En la últimas décadas, ha habido escasos avances en cuanto a agentes quimioterápicos sistémicos novedosos para carcinoma urotelial avanzado. La inmunoterapia ha surgido de un tiempo a esta parte como un nuevo enfoque para el tratamiento de estos tumores. (1,3)

El empleo de inhibidores PD-L1 en cáncer urotelial es una estrategia terapéutica en vigor actualmente en EEUU, con perspectivas de hacerse hueco también en Europa. Se presenta como terapia alternativa en segunda línea ante casos refractarios a quimioterapia convencional de primera línea o bien para pacientes no candidatos a cisplatino debido a su alta toxicidad. Hasta el momento ha demostrado tener respuestas aceptables además de ser mejor tolerado. (4)

Los inhibidores PD-L1 son anticuerpos monoclonales diseñados para actuar sobre la proteína PD-L1 expresada en las células tumorales y células inmunes asociadas al tumor. Impide la interacción con su receptor checkpoint PD1 y consecuentemente la desactivación de linfocitos T. De ese modo restaura la capacidad de estos linfocitos para detectar y atacar de forma eficaz las células tumorales. (2)

En este sentido, como conclusión, reseñar la importancia de la selección ajustada de pacientes candidatos a terapia antiPD-L1, no sólo en base a criterios exclusivamente clínicos, sino, posiblemente económicos.

Por el momento, no es mucha la literatura existente que incluya grandes series de pacientes para evaluar la eficacia real de los antiPD-L1; no obstante, sí parece constatar una correlación entre respuestas más favorables al fármaco en pacientes con status PD-L1 positivo determinado sobre el tejido, frente a pacientes con respuestas consideradas como aceptables, pero en los que se desconoce el status PD-L1 previo.

El estudio de valoración y selección de pacientes candidatos a terapia mediante el estudio inmunohistoquímico de la expresión del antígeno de superficie PD-L1 sobre material de biopsia (procedente de RTU), entendemos es un protocolo de actuación razonable en el manejo global de la enfermedad. Se deduce de ello que, a futuro, la interpretación de la eficacia de la terapia así como el impacto en la supervivencia, proporcionará datos más reales.

Independientemente de consideraciones ético-asistenciales, permitiría descartar pacientes que no obtendrían beneficio de la terapia en primera instancia, además de ser una herramienta más de colaboración en la gestión racional de recursos económicos de los Sistemas de Salud.

Lo que nuestro trabajo aporta, y sin pretensiones de rigor estadístico debido al reducido tamaño muestral analizado, es que, sobre la muestra seleccionada (n=11) y tras el estudio inmunohistoquímico de la expresión del antígeno de superficie PD-L1, un 36,36% de los pacientes obtuvieron un resultado positivo o mostraron tinción “alta”, y cabrían ser considerados como candidatos al beneficio de terapia con inhibidores PD-L1. Por otro lado, el estudio de validación de la técnica sobre el material de biopsia, se considera satisfactorio.

Se abren así, nuevas expectativas de tratamiento en pacientes que no hayan respondido al esquema de terapia convencional. Queda un largo camino por recorrer, desde la aprobación de inhibidores PD-L1 en Europa para carcinoma urotelial avanzado, hasta su implementación a nivel estatal y autonómico, así como la realización de estudios de eficacia a largo plazo.



## 6. ANEXOS:

### 6.1 NOTA DE PRENSA LABORATORIO ROCHE IMvigor210.

# *ROCHE presenta datos actualizados de Atezolizumab en cáncer de vejiga avanzado*

*Los nuevos datos de la inmunoterapia experimental se presentaron en el Simposio sobre Cáncer Genitourinario de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica.*

**Una mayor expresión del ligando de muerte programada 1(PD-L1) se asociaba a tasas de respuesta más elevadas, pero los niveles bajos de expresión del PD-L1 no eran incompatibles con la presencia de respuesta.**

**En la mayoría de los pacientes, la respuesta se mantenía.**

**Se han observado casos de respuesta completa independientemente del nivel de expresión del PD-L1.**

Basilea, Suiza, 25 enero 2016

Roche ha presentado hoy resultados actualizados del estudio fundamental de fase II **IMvigor 210** que evalúa Atezolizumab (MPDL3280A, un fármaco para la inmunoterapia oncológica, en investigación) en pacientes con cáncer de vejiga localmente avanzado o metastásico.

La mediana de la supervivencia global (SG) en esta población multitratada fue de 11,4 meses (intervalo de confianza del 95 % [IC 95 %]: 9,0-no estimable] en los pacientes con niveles elevados de expresión del PD-L1 y de 7,9 meses [IC 95 %: 6,6-9,3] en el conjunto de la población del estudio. El estudio también mostró que el 84 % (n=38/45) de los pacientes que respondían a Atezolizumab mantenían la respuesta, independientemente de su nivel de expresión del PD-L1, al reevaluar los resultados tras un seguimiento de mayor duración (11,7 meses). La mediana de la duración de la respuesta aún no se ha alcanzado. Atezolizumab se toleraba bien, y los acontecimientos adversos fueron similares a los observados en anteriores actualizaciones. Estos datos se han presentado en el **Simposio sobre Cáncer Genitourinario de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica** (ASCO GU) de 2016<sup>1</sup>.

«Es alentador comprobar que, en la mayoría de los pacientes con cáncer de vejiga avanzado que respondieron a Atezolizumab, la respuesta se mantenía tras un seguimiento de mayor duración—explica Sandra Horning, directora médica y de Desarrollo Internacional de Productos de Roche—. Estamos impacientes por compartir estos resultados con la FDA estadounidense y otras autoridades sanitarias, con la esperanza de poder poner a disposición de médicos y pacientes Atezolizumab lo antes posible».

Roche prevé presentar de forma inminente estos datos ante autoridades sanitarias de todo el mundo, entre ellas la FDA estadounidense, para solicitar la designación de avance terapéutico decisivo. Dicha designación permite acelerar el desarrollo y la evaluación de los medicamentos que puedan suponer una mejora sustancial con respecto a tratamientos existentes de enfermedades graves.

#### **Acerca del estudio IMvigor 210**

**IMvigor 210** es un estudio multicéntrico de fase II con un solo grupo y sin enmascaramiento que evaluó la seguridad y la eficacia de Atezolizumab en pacientes con cáncer urotelial localmente avanzado o metastásico, independientemente del nivel de expresión del PD-L1. Los participantes se clasificaron en dos cohortes. La cohorte 1 comprendía a aquellos pacientes que no habían recibido ningún tratamiento anterior para el cáncer



urotelial localmente avanzado o metastásico, pero que no eran aptos para un tratamiento de primera línea derivado del cisplatino. No se dispone aún de los datos definitivos relativos a esa cohorte. La cohorte 2, cuyos resultados actualizados se han dado a conocer hoy, incluía a los pacientes cuya enfermedad había avanzado durante un tratamiento previo con quimioterapia derivada del platino o después de dicho tratamiento (pacientes que previamente habían recibido múltiples tratamientos). El 41 % de los participantes en el estudio recibían 2 o más tratamientos debido a que presentaban metástasis. Los pacientes recibieron una dosis de 1200 mg de Atezolizumab por vía intravenosa en el día 1 de cada ciclo de 21 días hasta la progresión de la enfermedad (cohorte 1) o hasta la pérdida del beneficio clínico (cohorte 2).

Las dos variables principales de valoración del estudio fueron la tasa de respuesta objetiva (TRO) según los criterios RECIST v1.1 y evaluada por un centro de revisión independiente, y la TRO según los criterios RECIST modificados y evaluada por el investigador. Las variables secundarias de valoración fueron la duración de la respuesta, la supervivencia global, la supervivencia sin progresión de la enfermedad (SSP) y la seguridad. Se seleccionó a los pacientes en función de los resultados histológicos, las líneas de tratamiento previas y la expresión del PD-L1 en las células inmunitarias infiltrantes del tumor (CI), evaluada mediante una prueba inmunohistoquímica en investigación que está siendo desarrollada por Roche Tissue Diagnostics.

#### Resultados de la cohorte 2 del estudio IMvigor 210 (mediana del seguimiento de 11,7 meses: 0,2+-15,2 meses)

Expresión medible en el grupo del estudio	CI 2/3 (expresión media o alta)	CI 1/2/3 (cualquier grado de expresión)	ITD (intención de tratar), todos los pacientes
Número de pacientes	100	207	310
TRO* (variable principal de valoración)			
TRO, % TRO confirmada según los criterios RECIST v.1.1 y evaluada por el centro de revisión independiente	26 (IC: 18-36)	18 (IC: 13-24)	15 (IC: 11-19)
Respuesta completa	11 %	6 %	5 %
Duración de la respuesta (evaluada por el centro de revisión independiente; criterios RECIST v1.1; variable secundaria de valoración)			
Mediana de la duración de la respuesta (meses)	No se ha alcanzado en ninguno de los subgrupos relativos al PD-L1 (2,0*-13,7* meses, *valores censurados)		
SSP (evaluada por el centro de revisión independiente; criterios RECIST v1.1; variable secundaria de valoración)			
Mediana de la SSP, meses (IC 95 %)	2,1 (IC: 2,1-4,1)	2,1 (IC: 2,0-2,1)	2,1 (IC: 2,1-2,1)
SSP a los 6 meses	30 % (IC: 21-39)	23 % (IC: 18-29)	21 % (IC: 17-26)
SG (variable secundaria de valoración)			
Mediana de la SG, meses	11,4 (IC: 9,0-no estimable)	8,8 (IC: 7,1-10,6)	7,9 (IC: 6,6-9,3)
SG a los 12 meses	48 % (IC: 38-58)	39 % (IC: 32-46)	36 % (IC: 30-41)
Seguridad (n=310)			

Atezolizumab se toleró bien: no se produjo ningún fallecimiento asociado al tratamiento, la tasa de casos de toxicidad de grado 3-4 asociados al tratamiento fue reducida, y no hubo toxicidad renal asociada al tratamiento ni acontecimientos adversos (AA) de grado 5 asociados.

El 16 % de los pacientes presentaron AA de grado 3-4 asociados al tratamiento, y el 5 % presentaron un AA de grado 3-4 de tipo inmunitario.

De los AA de grado 3-4 asociados al tratamiento, los más frecuentes fueron cansancio (2 %), pérdida de apetito, anemia, neumonitis, hipertensión e hipotensión, colitis, artralgia, disnea y niveles elevados de la enzima ALT en sangre (todos 1 %).

\*Un centro de revisión independiente, según los criterios RECIST v1.1, y los propios investigadores, según los criterios RECIST modificados, valoraron la TRO (ambas evaluaciones fueron variables principales de valoración). CI: célula inmunitaria infiltrante del tumor; ITD: intención de tratar; TRO: tasa de respuesta objetiva; IC: intervalo de confianza; SSP: supervivencia sin progresión de la enfermedad; SG: supervivencia global; AA: acontecimiento adverso

Además del estudio **IMvigor 210**, Roche está llevando a cabo un estudio aleatorizado de fase III, **IMvigor 211**, en el que se compara Atezolizumab con un tratamiento quimioterápico de referencia en pacientes con cáncer de vejiga metastásico que han empeorado tras el tratamiento inicial. Todos los estudios incluyen la evaluación de una prueba diagnóstica desarrollada por Roche Tissue Diagnostics para determinar el grado de expresión del PD-L1.

### **Acerca del cáncer de vejiga**

El cáncer de vejiga metastásico tiene mal pronóstico y cuenta con opciones de tratamiento limitadas. Es una enfermedad en la que no se han producido avances importantes en casi 30 años. Se trata del noveno tipo de cáncer más frecuente en todo el mundo: en 2012 se diagnosticaron 430 000 nuevos casos, y anualmente provoca unas 145 000 muertes. Los varones tienen una probabilidad tres veces mayor de padecer cáncer de vejiga que las mujeres, y es tres veces más frecuente en los países desarrollados que en los menos desarrollados.

### **Acerca de Atezolizumab**

Atezolizumab (también conocido como MPDL3280A) es un anticuerpo monoclonal en investigación diseñado para actuar sobre una proteína llamada PD-L1, a la que se une. La proteína PD-L1 se expresa en los linfocitos T y en las CI. El PD-L1 interactúa con PD-1 y B7.1, dos proteínas de la superficie de los linfocitos T, causando la inhibición de estas. Al bloquear dicha interacción, Atezolizumab permite la activación de los linfocitos T que recuperan así su capacidad de detectar y atacar eficazmente las células tumorales.

### **Acerca de Roche en inmunoterapia oncológica**

Roche lleva más de 30 años desarrollando medicamentos con el objetivo de redefinir los tratamientos oncológicos. Actualmente estamos invirtiendo más que nunca en nuestro esfuerzo para proporcionar opciones terapéuticas innovadoras destinadas a ayudar al sistema inmunitario del propio paciente a combatir el cáncer.

### **Acerca de la inmunoterapia oncológica personalizada**

El objetivo de la inmunoterapia oncológica personalizada es proporcionar a cada paciente una opción terapéutica adaptada a sus necesidades específicas. Nuestro programa de investigación y desarrollo en inmunoterapia oncológica personalizada incluye más de 20 sustancias candidatas, ocho de las cuales están siendo objeto de estudios clínicos. Todos los estudios incluyen la evaluación prospectiva de biomarcadores para determinar quiénes pueden ser los candidatos idóneos para recibir nuestros medicamentos. En el caso de Atezolizumab (también conocido como MPDL3280A), la inmunoterapia oncológica personalizada comienza con la prueba inmunohistoquímica para el PD-L1 basada en el anticuerpo SP142 y desarrollada por Roche Tissue Diagnostics. El objetivo de emplear el PD-L1 como biomarcador es identificar qué pacientes presentan mayor probabilidad de obtener un beneficio clínico al ser tratados con Atezolizumab en monoterapia y cuáles pueden ser candidatos idóneos para recibir una terapia combinada. La finalidad no es excluir a determinados pacientes del tratamiento con Atezolizumab, sino permitir el diseño de combinaciones que proporcionen la máxima probabilidad de transformar la atención a los pacientes. La capacidad de combinar Atezolizumab con diferentes tratamientos quimioterápicos podría proporcionar nuevas opciones terapéuticas a pacientes afectados por diferentes tipos de tumores independientemente del nivel de expresión del PD-L1.

Más información acerca de Roche en oncología en:

[www.roche.com/research\\_and\\_development/what\\_we\\_are\\_working\\_on/oncology.htm](http://www.roche.com/research_and_development/what_we_are_working_on/oncology.htm)

---

### **References**

1. Hoffman-Censits J., et al. **IMvigor 210**, a phase 2 trial of atezolizumab (MPDL3280A) in platinum-treated locally-advanced or metastatic urothelial carcinoma (mUC) #355. Friday, 8 January 2016, [0755-0930], San Francisco, CA, USA.

## 6.2 RESULTADOS PUBLICADOS IMvigor210



## HHS Public Access

Author manuscript

*Lancet*. Author manuscript; available in PMC 2017 June 22.

Published in final edited form as:

*Lancet*. 2016 May 07; 387(10031): 1909–1920. doi:10.1016/S0140-6736(16)00561-4.

## Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single arm, phase 2 trial

Jonathan E. Rosenberg, M.D.<sup>1</sup>, Jean Hoffman-Censits, M.D.<sup>2</sup>, Tom Powles, M.D.<sup>3</sup>, Michiel S. van der Heijden, M.D., Ph.D.<sup>4</sup>, Arjun V. Balar, M.D.<sup>5</sup>, Andrea Necchi, M.D.<sup>6</sup>, Nancy Dawson, M.D.<sup>7</sup>, Peter H. O'Donnell, M.D.<sup>8</sup>, Ani Balmanoukian, M.D.<sup>9</sup>, Yohann Loriot, M.D., Ph.D.<sup>10</sup>, Sandy Srinivas, M.D.<sup>11</sup>, Margitta M. Retz, M.D., Ph.D.<sup>12</sup>, Petros Grivas, M.D., Ph.D.<sup>13</sup>, Richard W. Joseph, M.D.<sup>14</sup>, Matthew D. Galsky, M.D.<sup>15</sup>, Mark T. Fleming, M.D.<sup>16</sup>, Daniel P. Petrylak, M.D.<sup>17</sup>, Jose Luis Perez-Gracia, M.D., Ph.D.<sup>18</sup>, Howard A. Burris, M.D.<sup>19</sup>, Daniel Castellano, M.D.<sup>20</sup>, Christina Canil, M.D.<sup>21</sup>, Joaquim Bellmunt, M.D., Ph.D.<sup>22</sup>, Dean Bajorin, M.D.<sup>1</sup>, Dorothee Nickles, Ph.D.<sup>23</sup>, Richard Bourgon, Ph.D.<sup>23</sup>, Garrett M. Frampton, Ph.D.<sup>24</sup>, Na Cui, Ph.D.<sup>23</sup>, Sanjeev Mariathasan, Ph.D.<sup>23</sup>, Oyewale Abidoye, M.D.<sup>23</sup>, Gregg D. Fine, M.D.<sup>23</sup>, and Robert Dreicer, M.D.<sup>25</sup>

<sup>1</sup>Genitourinary Oncology Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA <sup>2</sup>Kimmel Cancer Center Thomas Jefferson University, Philadelphia,

Corresponding Author: Jonathan E. Rosenberg, Genitourinary Oncology Service, Department of Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA., Phone: 646-422-4461, rosenbj1@mskcc.org.

### Contributors

JER, TP, DPP, DB, NC, OA, GDF, and RD contributed to study design. JER, JH-C, TP, MSvdH, AN, PHO, PG, RWJ, MDG, JLP-G, HAB, JB, DB, GMF, SM, and RD contributed to data collection. RB and DN contributed to preprocessing and analysis of gene expression data (including assignment of subtype) as well as all statistical analyses related to gene expression, CD8 IHC and mutation load exploratory biomarkers. GMF contributed to analysis method development. SM contributed to data analysis, data interpretation, and writing with regards to biomarkers. OA was the medical monitor for the study and responsible for the database lock, data analysis and interpretation. JER and GDF contributed to editing the manuscript and oversight of author review of the manuscript. JER, GDF, RB, and SM contributed to the design of the manuscript figures. All authors were involved in data analysis and interpretation, the manuscript drafting, review, and approval, and the decision to submit for publication.

### Declaration of interests

JER has received non-financial support from Roche Genentech and consulting fees for Agensys, Eli Lilly, Sanofi, and Oncogenex. JH-C has received consulting fees from Roche Genentech. TP has received honoraria from Roche, Bristol Myers Squibb, and Merck and research funding from Roche and AstraZeneca. MSvdH has advisory board agreements with Roche Genentech, Astellas, and AstraZeneca and received grants from Astellas. AVB has received consulting fees from Roche Genentech. AN has received consulting fees from Roche and consulting fees and grants from Merck Sharp & Dohme. ND has no declarations to disclose. PHO has received honoraria from Genentech, Novartis, Algeta ASA, Bayer and research support from Boehringer Ingelheim. AB has received consulting fees from Bristol Myers Squibb, and Merck. YL has received consulting fees from Roche, Sanofi, Astellas, Janssen, Ipsen, and Bristol Myers Squibb, and received a grant from Sanofi. SS has no declarations to disclose. MMR has no declarations to disclose. PG has consulting agreements with Genentech, Dendreon, Bayer, Myriad Genetics and received grants from Genmab; fees were paid to his institution of Cleveland Clinic Foundation from Merck, Mirati, and Oncogenex. RWJ has consulting and advisory board agreements for BMS, Merck, Nektar, Eisai, Novartis, and Cerulean. MDG has advisory board agreements for Genentech, Merck, Astellas, and Novartis, received consulting fees from BioMotiv, and grants from Novartis, Bristol Myers Squibb, and Celgene. MTF has no declarations to disclose. DPP received grants and consulting fees from Genentech during the conduct of the study, and grants and personal fees from Merck, AstraZeneca, Novartis, Pfizer, and Agensys. JLP-G has received grants from Roche. HAB has no declarations to disclose. DC has no declarations to disclose. CC has speaker and advisory board agreements with Sanofi, Janssen, and Astellas, advisory board agreements with Amgen and Bristol Myers Squibb and received congress travel grants from Sanofi and Novartis. JB has received consulting fees from Genentech. DB has an advisory board agreement with Roche Genentech. GMF is an employee and shareholder of Foundation Medicine. DN, RB, NC, SM, OA, and GDF: are employees and shareholders of Genentech. RD has received consulting fees from Genentech and Merck.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

PA, USA <sup>3</sup>Barts Cancer Institute ECMC, Barts Health and the Royal Free NHS Trust, Queen Mary University of London, London EC1A 7BE, UK <sup>4</sup>Department of Medical Oncology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands <sup>5</sup>Genitourinary Cancers Program, Perlmutter Cancer Center, NYU Langone Medical Center, New York, NY, USA <sup>6</sup>Department of Medical Oncology, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy <sup>7</sup>Medstar Georgetown University Hospital, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington, DC, USA <sup>8</sup>Section of Hematology/Oncology, Department of Medicine, University of Chicago, Chicago, IL, USA <sup>9</sup>The Angeles Clinic and Research Institute, Los Angeles, CA, USA <sup>10</sup>Department of Cancer Medicine, Gustave-Roussy Cancer Campus, Villejuif, University of Paris Sud, France <sup>11</sup>Division of Oncology/Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA <sup>12</sup>Department of Urology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany <sup>13</sup>Department of Hematology and Oncology, Taussig Cancer Institute. Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA <sup>14</sup>Department of Hematology/Oncology, Mayo Clinic, Jacksonville, FL, USA <sup>15</sup>Division of Hematology/Oncology, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine. New York, NY, USA <sup>16</sup>Virginia Oncology Associates, US Oncology Research. Norfolk, VA, USA <sup>17</sup>Smilow Cancer Center, Yale University, New Haven, CT, USA <sup>18</sup>Department of Oncology, Clínica Universidad de Navarra, University of Navarra, Pamplona, Navarre, Spain <sup>19</sup>Sarah Cannon Research Institute, Nashville, TN, USA and Tennessee Oncology, Nashville, TN, USA <sup>20</sup>Medical Oncology Department, Genitourinary Oncology Unit, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain <sup>21</sup>Division of Medical Oncology, Department of Medicine, University of Ottawa, The Ottawa Hospital Research Institute, The Ottawa Hospital Cancer Centre, Ottawa, ON, Canada <sup>22</sup>Lank Center for Genitourinary Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA <sup>23</sup>Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA, USA <sup>24</sup>Foundation Medicine, Inc. Cambridge, MA, USA <sup>25</sup>Division Hematology/Oncology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, USA

## Summary

**Background**—Patients with metastatic urothelial carcinoma have limited treatment options after failure of platinum-based chemotherapy. This multicenter, single-arm phase 2 trial evaluated atezolizumab, an engineered humanized IgG1 monoclonal antibody that binds selectively to programmed death–ligand 1 (PD-L1), in this population.

**Methods**—Three hundred and ten patients received atezolizumab (1200 mg, every 3 weeks). PD-L1 expression on tumor-infiltrating immune cells (IC) was prospectively assessed by immunohistochemistry. The co-primary endpoints were the objective response rate by RECIST v1.1 and immune modified RECIST. A hierarchical testing procedure was used to test whether the objective response rate was significantly higher than the historical control of 10% at alpha level of 0.05. Exploratory analyses included assessing the association between The Cancer Genome Atlas (TCGA) molecular subtypes, CD8+ T cell infiltration, mutation load, and clinical outcomes.

**Findings**—By independent review, objective response rates were 26% (95% CI 18 to 36) in the IC2/3 group, 18% (95% CI 13 to 24) in the IC1/2/3 group and 15% (95% CI 11 to 19) in all patients. With a median follow-up of 11.7 months, ongoing responses were observed in 84% of responders. The median duration of response was not reached (range 2.0\*, 13.7\* months,

Rosenberg et al.

\*censored). The median overall survival was 11·4 months (95% CI 9·0 to not estimable) in the IC2/3 group, 8·8 months (95% CI 7·1 to 10·6) in the IC1/2/3, and 7·9 months (95% CI 6·6 to 9·3) in all patients. Grade 3–4 related treatment-related adverse events occurred in 16% and grade 3–4 immune-mediated adverse events occurred in 5% of treated patients. Exploratory analyses showed TCGA subtypes and mutation load to be independently predictive for response to atezolizumab.

**Interpretation**—Atezolizumab demonstrated durable activity and good tolerability in this population. PD-L1 expression on immune cells was associated with response. This is the first report to show the association of TCGA subtypes with response to immune checkpoint inhibition and demonstrate the importance of mutation load as a biomarker of response to this class of agents in advanced urothelial carcinoma.

**Funding**—F. Hoffmann-La Roche Ltd.

## Introduction

Urothelial carcinoma kills over 165,000 patients annually worldwide and is the ninth most common cancer overall.<sup>1,2</sup> The efficacy of immunotherapy in non-muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder was first established in 1976 with Bacillus Calmette-Guerin, but no immunotherapy has been approved for the treatment of advanced disease.<sup>3</sup> Platinum-based chemotherapy is the standard of care in treatment-naïve patients with metastatic urothelial carcinoma, and is associated with an overall survival of approximately 9–15 months.<sup>4,5</sup> The prognosis for patients who relapse after platinum-based therapy is dismal, with median survival ranging from five to seven months and no known life-prolonging treatments.<sup>6</sup> Novel approaches are needed to break this therapeutic stalemate.

Programmed death ligand 1 (PD-L1) is an immune checkpoint that negatively regulates T cell function by binding to its receptors programmed death-1 (PD-1) or B7-1 on activated T lymphocytes and other immune cells. Because T lymphocytes play a central role in mediating acquired antitumoral immunity, expression of PD-L1 in the tumor microenvironment endows tumors with a mechanism to evade eradication by the host immune system.<sup>7–9</sup> PD-L1 is broadly expressed across a wide range of malignancies, including urothelial carcinoma, and blockade of the PD-L1/PD-1 pathway has been shown to produce overall survival benefits in non-small cell lung cancer, melanoma and renal cell carcinoma.<sup>7,10–15</sup>

Recent data has suggested that immune checkpoint inhibitors are more active in tumors with high mutation rates.<sup>11,16–22</sup> Emerging data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) indicated that urothelial carcinoma carried the third highest mutation rate and that gene expression signatures could be used to separate the disease into luminal and basal subtypes.<sup>23,24</sup> Additional mechanisms such as increased prevalence of non-synonymous mutations, higher neoantigen load, higher antigen binding affinity, and select T effector signatures, have all been identified as factors that may predict for durable clinical benefit in patients treated with immune checkpoint inhibitors consistent with the hypothesis that mutations may create neoantigens that are recognized by anti-tumor T cells.<sup>25–29</sup> Taken together, these observations provided a rationale for the clinical investigation of anti-PD-L1 immunotherapy in metastatic urothelial cancer.

Atezolizumab is an engineered humanized monoclonal immunoglobulin-G1 antibody that binds selectively to PD-L1 and prevents its interaction with PD-1 and B7.1 while sparing the interaction between PD-L2 and PD-1.<sup>30,31</sup> Atezolizumab has demonstrated durable responses in a cohort of metastatic bladder cancer patients in a phase 1 study with higher response rates observed in patients with higher levels of PD-L1 expression on tumor infiltrating immune cells.<sup>32</sup>

To confirm the antitumor activity of atezolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma whose disease had progressed after prior platinum-based chemotherapy, we conducted a phase 2, global, multicenter, single-arm trial to evaluate the efficacy and safety of atezolizumab. Prospective evaluation of the association of PD-L1 expression with response was a co-primary endpoint. In addition, exploratory translational studies were conducted to address the scientific hypotheses associated with checkpoint inhibition in metastatic urothelial carcinoma.

## Methods

### Study Oversight and Conduct

The study (ClinicalTrials.gov number, NCT02108652) was designed, conducted, and analyzed by employees of F. Hoffmann-La Roche Ltd, the Sponsor, in collaboration with the study investigators. The study was approved by the independent review board at each participating site and was conducted in full conformance of the provisions of the Declaration of Helsinki and the Good Clinical Practice Guidelines. An independent Data Monitoring Committee reviewed the available safety data every 6 months after the first patient enrolled. The sponsor and the authors conducted data analyses and manuscript writing.

### Study Design and Treatment

This was a phase 2, global, multicenter, single-arm two-cohort trial (figure 1, appendix). Cohort 1 consisted of patients who were treatment-naïve in the metastatic setting and considered to be cisplatin-ineligible and are not described in this report. Cohort 2 which consisted of patients with inoperable locally advanced or metastatic urothelial carcinoma whose disease had progressed after prior platinum-based chemotherapy received a fixed dose of 1200 mg intravenous atezolizumab administered on Day 1 of each 21-day cycle. Dose interruptions were allowed, but dose reductions were not permitted. Patients were informed of the potential for pseudoprogression as part of the consent process, and advised to discuss treatment beyond progression with their study physician. Patients were permitted to continue atezolizumab treatment after RECIST v1.1 criteria for progressive disease if they met pre-specified criteria for clinical benefit to allow for identification of non-conventional responses.

The primary endpoint of this study was objective response rate based upon two distinct methods: independent review facility (IRF)-assessed per RECIST version 1.1, and investigator-assessed per immune modified RECIST criteria to better evaluate atypical response kinetics observed with immunotherapy (see Study Protocol).<sup>33,34</sup> Co-primary endpoints were chosen due to the emerging recognition that RECIST v1.1 may be

Rosenberg et al.

inadequate to fully capture the benefit of the unique patterns of response from immunotherapeutic agents.<sup>35</sup>

Secondary endpoints included: duration of response and progression-free survival by both IRF per RECIST v1.1 and investigator assessed per immune modified RECIST, overall survival, 12-month overall survival, and safety. Exploratory analyses included the association between gene expression profiling, CD8+ T cell infiltration, and mutation load with IRF-assessed objective response.

### Patients

Patients were eligible for enrollment in the study if they had histologically or cytologically documented locally advanced (T4b, any N; or any T, N 2–3) or metastatic (M1, Stage IV) urothelial carcinoma (including renal pelvis, ureter, urinary bladder, or urethra). Eligible patients had an Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) of 0 or 1; measurable disease defined by RECIST v1.1; adequate hematologic and end-organ function; and no autoimmune disease or active infections. Formalin-fixed paraffin-embedded tumor specimens with sufficient viable tumor content were required prior to study enrollment.

### Study Assessments

Measurable and evaluable lesions were assessed and documented prior to treatment. Patients underwent tumor assessments every 9 weeks for the first 12 months following Cycle 1, Day 1. After 12 months, tumor assessments were performed every 12 weeks. Safety assessments were performed according to National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE), Version 4.0. A sample of archived tumor tissues, as well as serum and plasma samples, was collected for exploratory biomarker assessments.

### PD-L1 Immunohistochemistry

Patient tumor samples were prospectively and centrally assessed for PD-L1 expression by immunohistochemistry using the Ventana SP142 assay.<sup>36</sup> The PD-L1 tumor-infiltrating immune cell (IC) status was defined by the percentage of PD-L1 positive ICs: IC0 (<1%); IC1 (≥1% but <5%); and IC2/3 (≥5%). Areas of BCG inflammatory response were excluded from the assessment of PD-L1 IC status. An analysis of PD-L1 expression on tumor cells and CD8+ infiltration by immunohistochemistry was also performed.<sup>30</sup> (See the Supplementary Appendix for additional details).

### Exploratory Biomarker Analyses

Gene expression levels were quantified by Illumina TruSeq RNA Access RNA-seq.<sup>37–39</sup> Molecular subtypes were assigned following TCGA, with some modifications to adapt for the use of RNA Access RNA-seq platform for FFPE tissues from our study.<sup>23</sup> Mutation detection and mutation load assessment as estimated by targeted genomic profiling were performed by Foundation Medicine.<sup>40</sup> These analyses were performed on tumor tissue collected during screening (see the appendix for additional details).

## Statistical Analysis

Efficacy analyses were based on the intent to treat population. Objective response rate was determined on the objective response-evaluable population, defined as intent to treat patients who had measurable disease per RECIST v1.1 at baseline, and duration of response analyses were performed on the subset of patients who achieved an objective response. The exact binomial test was used to test the binary endpoints of objective response rate. The time-to-event outcomes, including duration of response, progression free survival and overall survival were estimated using the Kaplan-Meier method.<sup>41</sup> The 95% CIs for median duration of response, progression free survival and overall survival were computed using a robust nonparametric Brookmeyer and Crowley method.<sup>42</sup>

For the primary endpoint of objective response rate, a hierarchical fixed-sequence testing procedure was used to compare the objective response rate between the treatment arm and a historical control for three pre-specified populations in the following order: objective response-evaluable patients with a PD-L1 IHC score of IC2/3, followed by IC1/2/3, followed by all objective response-evaluable patients (table 1, appendix). The hypothesis tests on these three populations were sequentially performed on the basis of IRF-assessed objective response rate according to RECIST v1.1 followed by the investigator-assessed objective response rate according to immune modified RECIST at a specific two-sided  $\alpha$  level of 0.05 for each test, while controlling the overall Type I error at the same  $\alpha$  level. If no statistical significance was detected at a particular level in the hierarchy, then no further hypothesis testing occurred. The study was designed to estimate the objective response rate in patients receiving atezolizumab and to detect an improvement in the objective response rate compared to 10%. No formal alternative objective response rate hypothesis was chosen. The study had a variable range of statistical power at different alternative objective response rates. We planned to enroll a minimum of approximately 100 IC2/3 patients resulting in an overall sample size of approximately 300 patients based upon an estimated 30% prevalence for the IC2/3 population. The 95% CI using the Clopper-Pearson method for an observed objective response rate of 40% was 30% to 50%, and the study would have 100% power to detect a 30% increase in objective response rate from 10% to 40%.<sup>43</sup> Alternatively, the 95% CI using the Clopper-Pearson method for an observed objective response rate of 20% was 13% to 29%, and the study would have 85% power to detect a 10% increase from 10% to 20%. The primary analysis was triggered by a minimum of 24-weeks of follow-up from the last patient enrolled. This report used a later data cutoff of September 14, 2015 to explore duration of response.

Safety analyses were performed on all treated patients, defined as enrolled patients who received any amount of the study drug. We performed analyses of objective response rate in pre-specified subgroups based on known baseline prognostic factors and reported descriptively. No formal hypothesis testing was planned. Additional biomarker analyses beyond PD-L1 IC were exploratory only and not pre-specified. The biomarker evaluable population was based upon the objective response-evaluable population who had available associated gene expression and mutational load data.



## Role of the funding source

The funder of the study was involved in the study design, data collection, data analysis, data interpretation, and writing of the report and gave approval to submit. The corresponding author and co-authors were involved in the study design, data interpretation, had full access to all the data in the study, the writing of the report, and had final responsibility for the decision to submit for publication.

## Results

A total of 486 patients were screened and 315 patients were enrolled on the study in Cohort 2 between May 2014 and November 2014 (figure 1 and figure 1, appendix). Three hundred and ten patients received at least one dose of atezolizumab and were evaluable for efficacy and safety. At the time of the data cutoff on September 14, 2015, 202 patients (65%) had discontinued treatment (193 patients had died, 8 due to withdrawal by patient and 1 due to other reasons).

Table 1 summarizes the baseline characteristics of the patients. Forty one percent of patients had received two or more prior systemic regimens for metastatic disease. Many patients had adverse prognostic risk factors, including, visceral and/or liver metastasis at study entry (78% and 31%, respectively), and baseline hemoglobin <10 g/dL (22%).

Tissue for PD-L1 immunohistochemistry analysis consisted of surgical resection specimens (n=215), biopsies (i.e., core needle or forceps) from primary lesions (n=23) or metastatic sites (n=41), transurethral resection of bladder tumor (TURBT) samples (n=29) and biopsy from unknown lesion (n=2). PD-L1 IC2/3 prevalence was higher in resection and TURBT specimens versus biopsies from primary lesions or metastatic sites (39% and 34% versus 17% and 8%, respectively). PD-L1 IC2/3 prevalence in primary tumor samples (regardless of specimen type) was 33%, (n=233) while PD-L1 IC2/3 prevalence in metastatic tumor samples was 28% (n=78). Patients were evenly distributed between the PD-L1 IC groups; IC0 (33%), IC1 (35%), and IC2/3 (32%). Baseline characteristics were well balanced between the IC2/3 group, IC1/2/3 group, and the intent to treat population (table 1).

The primary analysis demonstrated that treatment with atezolizumab resulted in a significantly improved RECIST v1.1 objective response rate for each pre-specified IC group [IC2/3, 27% (95% CI 19 to 37), p<0.0001; IC1/2/3, 18% (95% CI 13 to 24), p=0.0004; and all patients, 15% (95% CI, 11 to 20), p=0.0058] compared to a historical control overall response rate of 10% (table 2, appendix). The updated analysis of efficacy described herein was later conducted to assess the durability of response (table 2). By independent radiological review (RECIST v1.1), the updated analysis of efficacy showed an objective response rate of 26% (95% CI 18 to 36) in the IC2/3 group, including 11% of patients who achieved a complete response. In the IC1/2/3 group, the objective response rate was 18% (95% CI 13 to 24), with complete response observed in 13 patients (6%). For all evaluable patients, the objective response rate was 15% (95% CI 11 to 19); with complete response observed in 15 patients (5%) (figure 2, appendix). Investigator-assessed response rates (per immune modified RECIST) were similar to the RECIST v1.1 results (table 2). With a

median follow-up of 11·7 months, the median duration of response was not yet reached in any of the PD-L1 immunohistochemistry groups (range, 2·0\*, 13·7\* months, \*censored values) (data for IC2/3 group is shown in figure 2A–C; IC0 and IC1 groups shown in figure 3, appendix). At the time of the data cut-off, ongoing responses were observed in 38 of the 45 responding patients (84%). The median time to response was 2·1 months (95% CI 2·0 to 2·2).

To account for the occurrence of pseudoprogression, patients were allowed to continue treatment beyond IRF RECIST v1.1 progression. One hundred and twenty one patients were treated beyond progression for a median of 7·8 weeks, and of these, 21 (17%) subsequently experienced target lesion reduction of at least 30% from their baseline scans (figure 4, appendix).

Durable responses observed included patients with upper tract disease and patients with poor prognostic features. While the presence of liver metastasis in patients resulted in a lower objective response rate compared to patients with no liver metastases (5% vs 19%, table 3, appendix), these responses were durable with the median duration of response not reached at the time of the data cut-off (95% CI not estimable). A similar trend was observed in patients with visceral metastases (10% vs 31% for patients with no visceral metastases) and ECOG PS 1 (8% vs 25% for patients with ECOG PS 0). The absence of visceral metastasis (i.e., lymph-node only disease) at baseline was associated with the highest complete response rate. The median duration of response was not yet reached across any subgroup analyzed.

With a median survival follow-up of approximately 11·7 months (range, 0·2\* to 15·2; \*denotes a censored value) the median progression-free survival (RECIST v1.1) was 2·1 months among all patients (95% CI 2·1 to 2·1) and similar across all IC groups. The investigator-assessed median progression-free survival by immune modified RECIST criteria was 4·0 months (95% CI 2·6 to 5·9) in the IC2/3 group compared to 2·9 months (95% CI 2·1 to 4·1) in the IC1/2/3 group and 2·7 months (95% CI 2·1 to 3·9) in all patients.

The median overall survival was 11·4 months (95% CI 9·0 to not estimable) for the IC2/3 group, 8·8 months (95% CI 7·1 to 10·6) in the IC1/2/3 group, and 7·9 months (95% CI 6·6 to 9·3) for the entire cohort of patients, (figure 2D). The 12-month landmark overall survival rate was 48% in the IC2/3 (95% CI 38 to 58) group, 39% in the IC1/2/3 (95% CI 32 to 46) group and 36% (95% CI 30 to 41) in the intent to treat population. In patients who received only one prior line of therapy (n=124) in the metastatic setting and no prior adjuvant/neoadjuvant therapy, the median overall survival was not estimable (95% CI 9·3 to not estimable) for the IC2/3 group, 10·3 months (95% CI 7·5 to 12·7) in the IC1/2/3 group, and 9·0 months (95% CI 7·1 to 10·9) for the entire second-line population.

The median duration of treatment was 12 weeks (range, 0 to 66). All cause, any grade adverse events were reported in 97% of patients, with 55% of patients experiencing a grade 3–4 event (table 4, appendix). Sixty-nine percent of patients had a treatment-related adverse event of any grade, and 16% of patients had a grade 3–4 related adverse event. Treatment-related serious adverse events were observed in 11% of patients. There were no treatment-related deaths reported on study. The majority of treatment-related adverse events were mild

to moderate in nature, with fatigue (30%), nausea (14%), decreased appetite (12%) pruritus (10%), pyrexia (9%), diarrhea (8%), rash (7%) and arthralgia (7%) among the most common any grade events (table 3). The incidence of grade 3–4 treatment-related adverse events was low, with fatigue the most commonly occurring at 2% (table 3). There were no reports of febrile neutropenia.

Seven percent of patients had an immune-mediated adverse event of any grade, with pneumonitis (2%), increased aspartate aminotransferase (1%), increased alanine aminotransferase (1%), rash (1%) and dyspnea (1%) being the most common adverse events. Five percent had a grade 3–4 immune-mediated adverse event (all cause). No immune-mediated renal toxicity was observed. Thirty percent of patients had an adverse event leading to dose interruption. Four percent of patients experienced an adverse event that lead to treatment withdrawal. Twenty-two percent (69/310) of patients had an adverse event requiring systemic steroid use.

Exploratory translational analyses showed that PD-L1 immunohistochemistry expression on tumor infiltrating immune cells (IC) was associated with expression of genes in a CD8 T effector set ( $T_{eff}$ ) (figure 3A; figure 5A, appendix). Among genes in the  $T_{eff}$  set, responses to atezolizumab were most closely associated with high expression of two interferon- $\gamma$ -inducible T helper 1 ( $T_H1$ )-type chemokines, CXCL9 ( $p=0.0057$ ) and CXCL10 ( $p=0.0079$ , figure 3B). A similar, though less pronounced, trend was also seen with respect to other genes in the set (figure 5B, appendix). Consistent with increased T-cell trafficking chemokine expression, tumor center CD8+ T cell infiltration was also associated with both PD-L1 IC ( $p<0.0001$ , figure 3C) and response to atezolizumab ( $p=0.0265$ , figure 3D).

After adapting the TCGA classification approach for use with our expression assay, gene expression analysis ( $n=195$ ) was used to classify patients into luminal ( $n=73$ ) and basal ( $n=122$ ) subtypes as defined by TCGA (figure 6, appendix). PD-L1 IC prevalence was highly enriched in the basal subtype versus the luminal subtype (60% vs 23%,  $p<0.0001$ , figure 3E) with IC2/3 expression of 15% in the papillary-like luminal cluster I, 34% in the cluster II, 68% in the squamous-like basal cluster III and 50% in the basal cluster IV subtype. Elevated PD-L1 tumor cell expression was almost exclusively seen in the basal subtype (39% in basal vs 4% in luminal,  $p<0.0001$ , figure 3F) and did not correlate with objective response rate. Consistent with PD-L1 IC2/3 expression, CD8 T-effector gene expression was elevated in luminal cluster II and basal cluster III/IV and not in luminal cluster I (figure 6, appendix). Response to atezolizumab occurred in all TCGA subtypes but was significantly higher in the luminal cluster II subtype than in other subtypes, which demonstrated an objective response rate of 34% ( $p=0.0017$ , figure 3G).

Mutation load was estimated in 150 patients by examining a representative panel of 315 cancer-related genes. The median mutation load was significantly increased in responders (12.4/Mb) compared to non-responders (6.4/Mb) ( $p<0.0001$ , figure 3H). The relationship between mutation load and response was unrelated to TCGA subtype ( $p=0.2200$ , figure 3H) or IC subgroup (figure 7, appendix). A subgroup analysis of only those patients with bladder primary tumors, (figure 8, appendix), produced essentially equivalent results. Finally,

smoking status did not correlate with mutation load ( $p=0.2454$ ) or with response ( $p=0.5373$ ) to atezolizumab.

## Discussion

Since the development of combination treatment with methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin chemotherapy thirty years ago, there have been no major improvements in the treatment outcomes for patients with urothelial carcinoma.<sup>44</sup> The results of this large single arm phase 2 study show that atezolizumab induced durable anti-tumor responses in patients with advanced urothelial carcinoma whose tumors have progressed during or after platinum-based chemotherapy. This trial included heavily pre-treated patients and notably, the median duration of response had not been reached despite a median follow-up of 11.7 months. The low incidence of clinically relevant treatment-related adverse events makes atezolizumab widely applicable in this patient population who often has multiple co-morbidities and/or renal impairment. This durable efficacy and tolerability is striking in comparison to outcomes observed with currently available second-line chemotherapy for urothelial carcinoma.<sup>6,45,46</sup>

The 12-month overall survival rate in the entire cohort that included approximately 41% of patients treated in the third- or later-line was 48% (95% CI 38 to 58) in the IC2/3 group, 39% in the IC1/2/3 (95% CI 32 to 46) group and 36% (95% CI 30 to 41) in the ITT population. These overall survival results compare favorably to a landmark 12-month survival rate of 20% (95% CI 17 to 24) from a pooled analysis of ten phase 2 trials that evaluated 646 patients who received second-line chemotherapy or biologics.<sup>47</sup>

Currently, the prognostic value of PD-L1 IC expression is unknown, with conflicting reports in the literature, although it does not appear to be associated with validated adverse risk factors in this data set.<sup>48,49</sup> Therefore, it appears likely that the improved survival in this patient population is related to atezolizumab treatment. The results of ongoing randomized studies (NCT02302807) are needed to appropriately assess the prognostic and predictive value of the Ventana SP142 immunohistochemistry assay, and to better understand which patients derive clinical benefit.

Responses to atezolizumab were associated with both conventional RECIST as well as atypical response kinetics, with an additional 17% of patients treated beyond progression having shrinkage (at least 30% reduction) of target lesions following RECIST v1.1 progression. The median progression-free survival was similar across the immunohistochemistry subsets with RECIST v1.1; however, it increased when immune modified RECIST criteria were utilized to account for the non-classical responses that may be observed with cancer immunotherapy. In this study, a disconnect between progression-free survival and overall survival was observed, similar to other immune checkpoint agents in other diseases, further suggesting that modifications of RECIST v1.1 are needed to better capture the benefit of immunotherapy treatment.

This study required a tumor specimen to be submitted during screening for prospective PD-L1 testing using the Ventana SP142 assay. In a pre-specified analysis, higher levels of PD-

Author Manuscript

LI immunohistochemistry expression on immune cells were associated with a higher response rate to atezolizumab and longer overall survival. In contrast, the frequency of PD-L1 expression on tumor cells was low and did not show an association with objective response, lending further support to the importance of adaptive immunity in driving clinical benefit to immune checkpoint inhibitors.

Author Manuscript

Similarly, the association of immune activation gene subsets (e.g., CXCL9, and CD8A) and other immune checkpoint genes (PD-L1, CTLA-4, TIGIT, data not shown) with IC PD-L1 expression suggests that the IC PD-L1 expression represents adaptive immune regulation and the presence of a pre-existing (but suppressed) immune response in urothelial carcinoma tumors.<sup>30</sup> The presence of other negative regulators (e.g., TIGIT) further suggests that combination immunotherapeutic approaches may further enhance responses.

Author Manuscript

In addition to PD-L1 immunohistochemistry expression on immune cells, response to atezolizumab was strongly correlated with mutation load. This association was independent of the association between TCGA subtype or PD-L1 IC score and response (figure 9, appendix). This study employed a novel approach to interrogating the FoundationOne panel that covers ~3% of the exome to estimate mutation load. Although this targeted approach interrogated a much smaller fraction of the exome than typically used for mutation load estimation, a re-analysis of TCGA bladder urothelial carcinoma mutation data showed that whole-exome results were well-correlated with those obtained from only the FoundationOne regions (figure 10, appendix). Moreover, the correlation of mutational load and response to atezolizumab is consistent with the pattern observed in other malignancies, and reinforces the concept that the multiple mutations that occur in cancer create novel epitopes against which protective T cell responses are directed.<sup>25</sup>

Author Manuscript

Interestingly, the molecular subtypes identified by the TCGA analysis were also associated with response to atezolizumab, suggesting that in addition to PD-L1 expression, subtypes differed in underlying immune biology. While responses were observed across all TCGA subtypes, significantly higher response rates were observed in the luminal cluster II subtype, which was characterized by transcriptional signatures associated with the presence of activated T effector cells. In contrast, luminal cluster I was associated with low expression of CD8+ effector genes, lower PD-L1 IC/TC expression and lower responses to atezolizumab, consistent with a landscape often devoid of pre-existing immune activity. Basal clusters III and IV were also associated with increased PD-L1 IC expression as well as CD8+ effector genes. However, unlike luminal cluster II, basal clusters III/IV also exhibited high PD-L1 TC expression. The reduced response rates in the basal subtypes compared to luminal cluster II strongly suggests that other immunosuppressive factors exist in the basal subtypes that prevent effective T cell activation with inhibition of the PD-L1/PD-1 pathway. The differences in the immune landscape of luminal versus basal subtypes highlight the need to further understand the underlying immune biology to develop future rational combination or sequential treatment strategies.

Author Manuscript

While PD-L1 IC status clearly is associated with atezolizumab response, incorporation of TCGA gene expression subtype, mutation load, or both of these novel biomarkers into a model based on PD-L1 IC staining significantly improved the association with response

(figure 9, appendix). Thus, disease subtype and mutation load do not simply recapitulate the information already provided by PD-L1 expression in immune cells, but rather, they provide independent and complementary information. Additional data and larger sample sizes are required to allow the formal construction of a multi-marker classifier, and continued consideration of all three biomarkers is warranted in next generation companion diagnostics.

In conclusion, we report that targeting PD-L1 with atezolizumab is effective in heavily pretreated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma patients, and that responses are more common in patients with higher levels of PD-L1 expression on immune cells. The efficacy appears to be driven by underlying genomic, molecular and immunologic factors.

## Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

## Acknowledgments

We thank the patients and their families who participated in the study. We would also like to thank all of the investigators and their staff. We thank Mark Kockx at Histogenix for technical assistance; Fatema LeGrand, Xiaodong Shen, and AnnChristine Thåström at Genentech for contributions to the study; Shi Li at Genentech for contributions to the primary data analysis; Priti Hegde at Genentech for input on biomarker strategy and the manuscript; Zach Boyd at Genentech for contributions to the biomarker analysis; and Cathleen Ahearn and Daniel Chen at Genentech for input into the study design and the manuscript. Medical writing assistance for this manuscript was provided by Peter Flanagan associated with Eolas Communications, and paid for by F. Hoffmann-La Roche Ltd.

## References

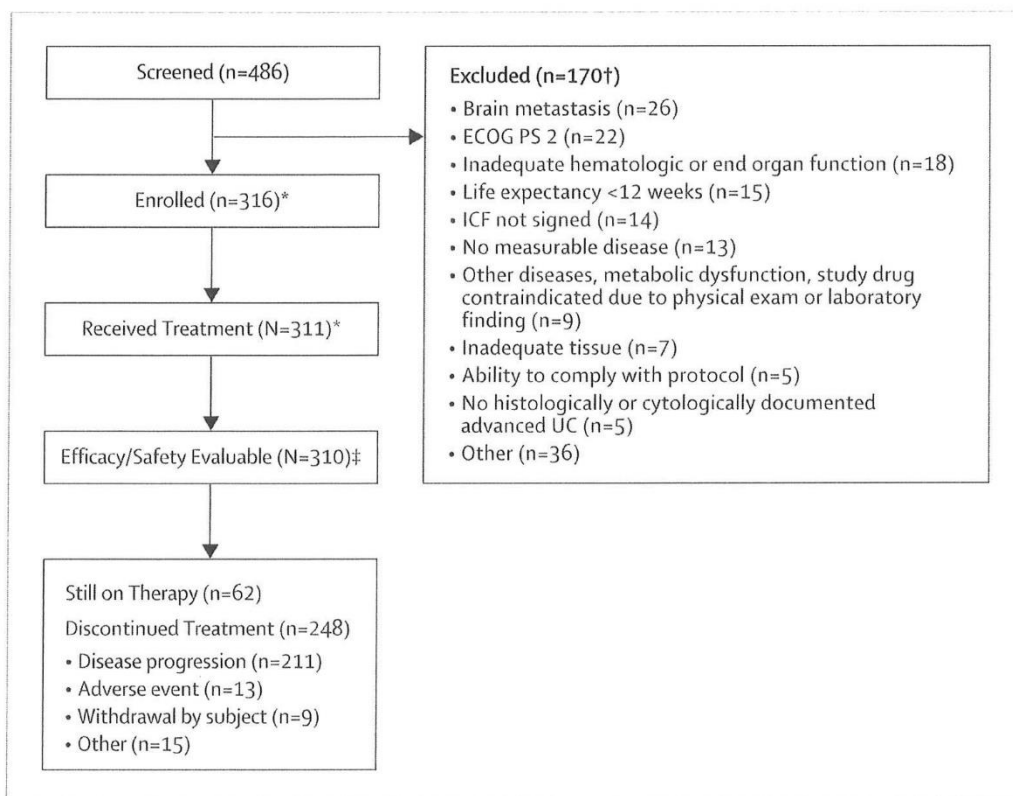
1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136:E359–86. [PubMed: 25220842]
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65:87–108. [PubMed: 25651787]
3. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976; 116:180–3. [PubMed: 820877]
4. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23:4602–8. [PubMed: 16034041]
5. De Santis M, Bellmunt J, Mead G, et al. Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986. *J Clin Oncol*. 2012; 30:191–9. [PubMed: 22162575]
6. Bellmunt J, Théodore C, Demkov T, et al. Phase III trial of vinflunine plus best supportive care compared with best supportive care alone after a platinum-containing regimen in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *J Clin Oncol*. 2009; 27:4454–61. [PubMed: 19687335]
7. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002; 8:793–800. [PubMed: 12091876]
8. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: Molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 2000; 74:181–273. [PubMed: 10605607]

9. Iwai Y, Ishida M, Tanaka 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 USA*. 2002; 99:12293–7. [PubMed: 12218188]
10. Inman BA, Sebo TJ, Frigola X, et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer*. 2007; 109:1499–505. [PubMed: 17340590]
11. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 372:2018–28. [PubMed: 25891174]
12. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *N Engl J Med*. 2015; 372:320–30. [PubMed: 25399552]
13. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2015; 373:1803–13. [PubMed: 26406148]
14. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 2003; 170:1257–66. [PubMed: 12538684]
15. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001; 2:261–8. [PubMed: 11224527]
16. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373:123–35. [PubMed: 26028407]
17. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015; 372:2006–17. [PubMed: 25891304]
18. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015; 373:23–34. [PubMed: 26027431]
19. Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2015; 372:2521–32. [PubMed: 25891173]
20. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013; 369:122–33. [PubMed: 23724867]
21. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (Anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*. 2013; 369:134–44. [PubMed: 23724846]
22. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015; 372:2509–20. [PubMed: 26028255]
23. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014; 507:315–22. [PubMed: 24476821]
24. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111:3110–5. [PubMed: 24520177]
25. Yadav M, Jhunjhunwala S, Phung QT, et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*. 2014; 515:572–6. [PubMed: 25428506]
26. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015; 348:124–8. [PubMed: 25765070]
27. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014; 371:2189–99. [PubMed: 25409260]
28. Van Allen EM, Miao D, Schilling B, et al. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*. 2015; 350:207–11. [PubMed: 26359337]
29. Peng D, Kryczek I, Nagarsheth N, et al. Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature*. 2015; 527:249–53. [PubMed: 26503055]
30. Herbst RS, Soria JC, Kowanzetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014; 515:563–7. [PubMed: 25428504]
31. Chen DS, Irving BA, Hodi FS. Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:6580–7. [PubMed: 23087408]

Rosenberg et al.

32. Petrylak DP, Powles T, Bellmunt J, et al. A phase Ia study of MPDL3280A (anti-PDL1): Updated response and survival data in urothelial bladder cancer (UBC). *J Clin Oncol*. 2015; 33(suppl; abstr 4501)
33. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009; 45:228–47. [PubMed: 19097774]
34. Nishino M, Tirumani SH, Ramaiya NH, Hodi FS. Cancer immunotherapy and immune-related response assessment: The role of radiologists in the new arena of cancer treatment. *Eur J Radiol*. 2015; 84:1259–68. [PubMed: 25937524]
35. Chiou VL, Burotto M. Pseudoprogression and immune-related response in solid tumors. *J Clin Oncol*. 2015; 33:3541–3. [PubMed: 26261262]
36. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014; 515:558–62. [PubMed: 25428503]
37. Wu TD, Nacu S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*. 2010; 26:873–81. [PubMed: 20147302]
38. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014; 15:R29. [PubMed: 24485249]
39. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43:e47. [PubMed: 25605792]
40. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2013; 31:1023–31. [PubMed: 24142049]
41. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assn*. 1958; 53:457–81.
42. Brookmeyer R, Crowley J. A confidence interval for the median survival time. *Biometrics*. 1982; 38:29–41.
43. Clopper C, Pearson ES. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*. 1934; 26:404–13.
44. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al. Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Urol*. 1985; 133:403–7. [PubMed: 4038749]
45. Choueiri TK, Ross RW, Jacobus S, et al. Double-blind, randomized trial of docetaxel plus vandetanib versus docetaxel plus placebo in platinum-pretreated metastatic urothelial cancer. *J Clin Oncol*. 2012; 30:507–12. [PubMed: 22184381]
46. Bambury RM, Benjamin DJ, Chaim JL, et al. The safety and efficacy of single-agent pemetrexed in platinum-resistant advanced urothelial carcinoma: a large single-institution experience. *Oncologist*. 2015; 20:508–15. [PubMed: 25845990]
47. Agarwal N, Bellmunt J, Maughan BL, et al. Six-month progression-free survival as the primary endpoint to evaluate the activity of new agents as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2014; 12:130–7. [PubMed: 24220220]
48. Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, et al. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:4800–8. [PubMed: 18676751]
49. Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol*. 2015; 26:812–7. [PubMed: 25600565]





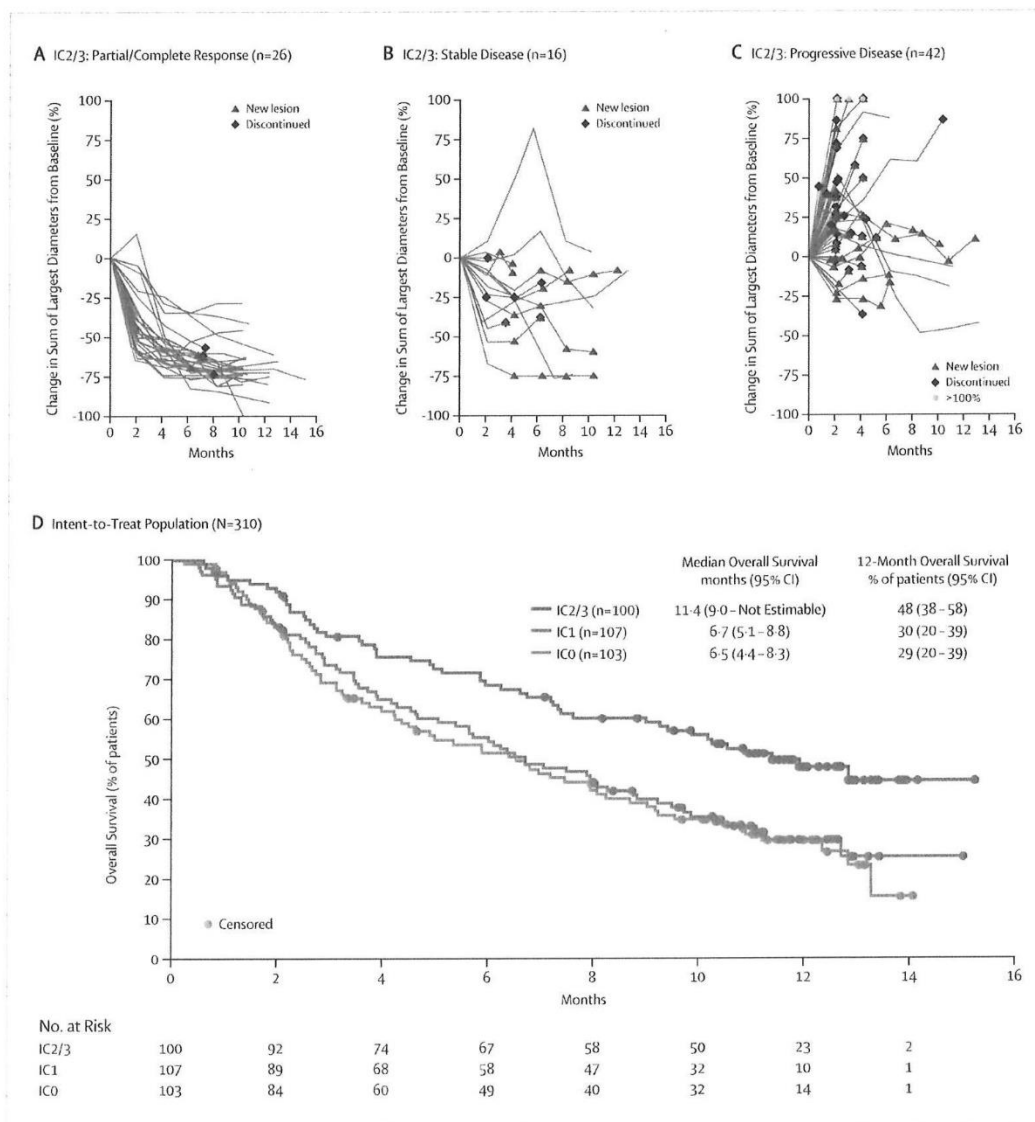
**Figure 1. Trial profile for Cohort 2**

\*Based on May 5, 2015 data cut. Two Cohort 2 patients and one Cohort 1 patient were re-assigned to the alternate cohort based on eligibility reassessments between the May 5 and September 14, 2015 data cuts (enrolled and treated n's based on September data cut are 315 and 310, respectively).

‡Excludes 1 patient with unknown site.

† Includes rescreened patients.

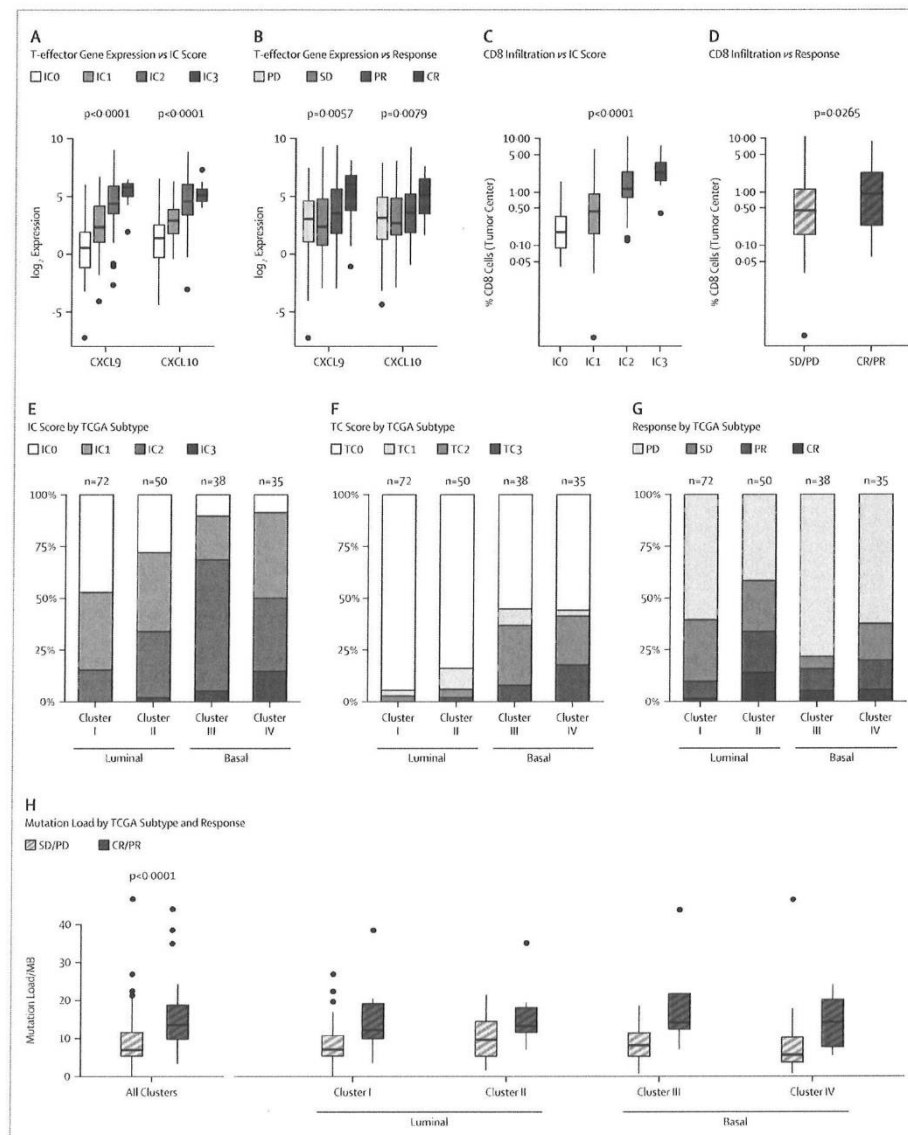
ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; ICF, informed consent form; UC, urothelial carcinoma.



**Figure 2. Change in sum of longest diameters over time by best response in the PD-L1 IC2/3 group and comparison of overall survival among PD-L1 IC groups**

Percent change in the sum of longest diameters (SLD) by independent review assessed RECIST v1.1 in the IC2/3 group by (A) responders; (B) stable disease; (C) progressive disease. Patients without a measurable baseline tumor assessment or without post-baseline tumor measurements were not included. (D) Kaplan-Meier overall survival curves for the IC0, IC1, and IC2/3 groups.

IC, immune cell; CI, confidence interval.



**Figure 3. Association of response and PD-L1 IHC status with gene expression profiling and mutation load**

(A) Association of PD-L1 IHC IC with gene expression for CXCL9 and CXCL10, two representatives of a CD8 T effector gene set. For each gene, expression increased linearly with IC score ( $p<0.0001$  and  $p<0.0001$ , respectively). The other genes in an eight-gene CD8 T effector gene set behaved similarly (figure 6A, appendix). (B) CXCL9 and CXCL10 were significantly associated with response ( $p=0.0057$  and  $p=0.0079$ , respectively). The other genes in the set did not achieve statistical significance individually, likely due to lower RNA-seq read counts, but they exhibited behavior qualitatively similar to that of CXCL9 and

Rosenberg et al.

CXCL10 (figure 6B, appendix). (C) Tumor CD8+ T cell infiltration in the tumor center was significantly associated with PD-L1 IC ( $p < 0.0001$ ). (D) Response was significantly associated with increased CD8+ IHC staining in the tumor center ( $p = 0.0265$ ). (E) IC score distribution by TCGA subtype. IC2/3 was significantly more common in the basal subtypes (III and IV,  $p < 0.0001$ ), though IC2 was present in all subtypes. (F) TC score distributions by TCGA subtype. TC2/3 was almost exclusively seen in basal subtypes ( $p < 0.0001$ ). (G) Objective response rate by TCGA subtype. Response was significantly associated with TCGA subtype: 10% for subtype I, 34% for II, 16% for III, and 20% for IV ( $p = 0.0102$ ). (H) Estimated mutation load per megabase (Mb) vs patient response, overall ( $n = 150$ ) and also disaggregated by TCGA subtype. Mutation load was strongly associated with response ( $p < 0.0001$ ), but to a similar degree in all TCGA subtypes. IC, immune cell; TC, tumor cell; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Table 1

Baseline patient characteristics and prior therapy

Characteristic	IC2/3 n=100	IC1/2/3 n=207	All Patients N=310
Age, Median, years (range)	66 (41–84)	67 (32–91)	66 (32–91)
Sex, male, n (%)	78 (78)	160 (77)	241 (78)
Race, Caucasian, n (%)	87 (87)	184 (89)	282 (91)
Site of primary tumor, n (%)			
Bladder	79 (79)	159 (77)	230 (74)
Renal pelvis	11 (11)	27 (13)	42 (14)
Ureter	5 (5)	12 (6)	23 (7)
Urethra	3 (3)	5 (2)	5 (2)
Other	2 (2)	4 (2)	10 (3)
Baseline creatinine clearance, <60 mL/min, n (%)	40 (40)	69 (33)	110 (36)
ECOG PS, n (%)			
0	42 (42)	83 (40)	117 (38)
1	58 (58)	124 (60)	193 (62)
Hemoglobin, <10 g/dL, n (%)	24 (24)	50 (24)	69 (22)
Tobacco use, n (%)			
Current	6 (6)	19 (9)	35 (11)
Never	34 (34)	72 (35)	107 (35)
Previous	60 (60)	116 (56)	168 (54)
Bellmunt risk factors, number, n (%)			
0	31 (31)	61 (30)	83 (27)
1	35 (35)	72 (35)	117 (38)
2	28 (28)	59 (29)	89 (29)
3	6 (6)	15 (7)	21 (7)
Metastatic sites at baseline, n (%)			
Visceral <sup>a</sup>	66 (66)	152 (73)	243 (78)
Liver	27 (27)	61 (30)	96 (31)
Lymph node only	24 (24)	39 (19)	43 (14)
Prior cystectomy, yes, n (%)	44 (44)	83 (40)	115 (37)
Time from prior chemotherapy ≤3 months, n (%)	43 (43)	87 (42)	121 (39)
Prior therapy with platinum-based regimen, n (%)			
Cisplatin-based	83 (83)	161 (78)	227 (73)
Carboplatin-based	17 (17)	43 (21)	80 (26)
Other platinum combination	0	3 (1)	3 (1)
Prior neoadjuvant or adjuvant chemotherapy, with first progression ≤12 months, n (%)	24 (24)	42 (20)	57 (18)
Number of prior systemic regimens in the metastatic setting, %			
0	24 (24)	42 (20)	59 (19)

Rosenberg et al.

Characteristic	IC2/3 n=100	IC1/2/3 n=207	All Patients N=310
1	36 (36)	83 (40)	124 (40)
2	19 (19)	41 (20)	64 (21)
3	11 (11)	24 (12)	39 (13)
≥4	10 (10)	17 (8)	24 (8)
Intravesical bacillus Calmette–Guérin administered, n (%)	15 (15)	46 (22)	73 (24)

IC, immune cell; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

<sup>a</sup>Visceral metastasis defined as liver, lung, bone, any non-lymph node or soft tissue metastasis.

Data cutoff: September 14, 2015.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Table 2

Objective response rate by PD-L1 IC score

PD-L1 Subgroup	N	ORR, n (%) (95% CI)	CR, n (%)	PR, n (%)	SD, n (%)	PD, n (%)
<b>RECIST version 1.1 Criteria by Independent Review</b>						
IC2/3	100	26 (26) (18, 36)	11 (11)	15 (15)	16 (16)	44 (44)
IC1/2/3	207	37 (18) (13, 24)	13 (6)	24 (12)	34 (16)	107 (52)
All	310	45 (15) (11, 19)	15 (5)	30 (10)	59 (19)	159 (51)
IC1	107	11 (10) (5, 18)	2 (2)	9 (8)	18 (17)	63 (59)
IC0	103	8 (8) (3, 15)	2 (2)	6 (6)	25 (24)	52 (50)
<b>Modified RECIST Criteria by Investigator Review</b>						
IC2/3	100	27 (27) (19, 37)	8 (8)	19 (19)	31 (31)	28 (28)
IC1/2/3	207	45 (22) (16, 28)	14 (7)	31 (15)	58 (28)	74 (36)
All	310	58 (19) (15, 24)	16 (5)	42 (14)	92 (30)	110 (35)
IC1	107	18 (17) (10, 25)	6 (6)	12 (11)	27 (25)	46 (43)
IC0	103	13 (13) (7, 21)	2 (2)	11 (11)	34 (33)	36 (35)

IC, immune cell; CI, confidence interval; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease.

Objective response evaluable population. Data cutoff: September 14, 2015.

**Table 3**

Treatment-related adverse events in the 310 patients receiving atezolizumab

Event	All Grade n (%)	Grade 3-4 n (%)
Any AE	215 (69)	50 (16)
Fatigue	93 (30)	5 (2)
Nausea	42 (14)	0 (0)
Decreased Appetite	36 (12)	2 (1)
Pruritis	31 (10)	1 (<1)
Pyrexia	28 (9)	1 (<1)
Diarrhea	24 (8)	1 (<1)
Rash	23 (7)	1 (<1)
Arthralgia	21 (7)	2 (1)
Vomiting	18 (6)	1 (<1)
Dyspnea	10 (3)	2 (1)
Anemia	9 (3)	3 (1)
Aspartate aminotransferase increased	10 (3)	2 (1)
Pneumonitis	7 (2)	2 (1)
Hypotension	5 (2)	2 (1)
Hypertension	3 (1)	3 (1)
Colitis	3 (1)	2 (1)

Data cutoff: September 14, 2015.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript



## 6. REFERENCIAS:

1. New Understanding in Bladder Cancer and the Role of the Immune System. Immune-Based Approaches to Disease Management. Astra Zeneca. 2016 Oct: 3283302.
2. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang N. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treatment Reviews*. 2017;54:58-67.
3. Faraj S, Munari E, Guner G, Taube J, Anders R, Hicks J et al. Assessment of Tumoral PD-L1 Expression and Intratumoral CD8+ T Cells in Urothelial Carcinoma. *Urology*. 2015;85(3):703.e1-703.e6.
4. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and Therapy*. 2016;Volume 9:5023-5039.
5. Milowsky M, Rumble R, Booth C, Gilligan T, Eapen L, Hauke R et al. Guideline on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer (European Association of Urology Guideline): American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(16):1945-1952.
6. Massard C, Gordon M, Sharma S, Rafii S, Wainberg Z, Luke J et al. Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(26):3119-3125.
7. Hoffman-Censits J, Grivas P, Van Der Heijden M, Dreicer R, Loriot Y, Retz M et al. IMvigor 210, a phase II trial of atezolizumab (MPDL3280A) in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (mUC). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(2\_suppl):355-355.
8. ROCHE presenta datos actualizados de Atezolizumab en cáncer de vejiga avanzado [Internet]. Roche.es. 2016 [cited 2 March 2018]. Available from:

[http://www.roche.es/Sala\\_de\\_Prensa/2016/ROCHE\\_presenta\\_datos\\_actualizados\\_de\\_Atezolizumab\\_en\\_cancer\\_de\\_vejiga\\_avanzado.html](http://www.roche.es/Sala_de_Prensa/2016/ROCHE_presenta_datos_actualizados_de_Atezolizumab_en_cancer_de_vejiga_avanzado.html)

9. Atezolizumab redujo el tamaño de los tumores en Pacientes con cáncer de vejiga avanzado [Internet]. Roche.es. 2016 [cited 2 March 2018]. Available from:  
[http://www.roche.es/Sala\\_de\\_Prensa/2016/Atezolizumab\\_redujo\\_el\\_tamano\\_de\\_los\\_tumores\\_en\\_Pacientes\\_con\\_cancer\\_de\\_vejiga\\_avanzado.html](http://www.roche.es/Sala_de_Prensa/2016/Atezolizumab_redujo_el_tamano_de_los_tumores_en_Pacientes_con_cancer_de_vejiga_avanzado.html)
10. Drake C, Bivalacqua T, Hahn N. Programmed Cell Death Ligand-1 Blockade in Urothelial Bladder Cancer: To Select or Not to Select. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(26):3115-3116.
11. Gupta S, Gill D, Poole A, Agarwal N. Systemic Immunotherapy for Urothelial Cancer: Current Trends and Future Directions. *Cancers*. 2017;9(2):15.
12. Montironi R, Santoni M, Tartari F, Lopez-Beltran A, Cheng L, Berardi R et al. Testing PD-1/PD-L1 Expression in Cancer Therapy: Pathologic Insights and Economic Sustainability. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2016;140(6):501-502.
13. Rosenberg J, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden M, Balar A, Necchi A et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2016;387(10031):1909-1920.
14. Moch H. WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.
15. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 8th ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2017.
16. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins basic pathology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2018.

17. Rosai J, Ackerman L. Rosai and Ackerman's surgical pathology. 11th ed. Edinburgh: Mosby Elsevier; 2011.
18. VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Staining in Urothelial Carcinoma Interpretation Guide [Internet]. Usinfo.roche.com. 2018 [cited 2 March 2018]. Available from: <https://usinfo.roche.com/rs/975-FPO-828/images/PD-L1SP263IG>
19. Amin, M. and Edge, S. (n.d.). AJCC Cancer staging manual. 8th ed. Chicago: Springer; 2017.
20. Gobierno Vasco. Registros de cáncer - Registros epidemiológicos - Vigilancia epidemiológica - Departamento de Salud - Euskadi.eus [Internet]. Euskadi.eus. 2018 [cited 30 March 2018]. Available from: <http://www.euskadi.eus/informacion/registros-de-cancer/web01-a3regepi/es/>
21. Ventana Product Document Library [Internet]. Productlibrary.ventana.com. 2018 [cited 10 April 2018]. Available from: [http://productlibrary.ventana.com/ventana\\_portal/executeSearch.do](http://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/executeSearch.do)
22. Gerace C, Montorsi F, Tambaro R, Cartenì G, De Luca S, Tucci M et al. Cost of illness of urothelial bladder cancer in Italy. ClinicoEconomics and Outcomes Research. 2017;Volume 9:433-442.
23. [Internet]. Proyectoneon.com. 2018 [cited 15 April 2018]. Available from: [http://www.proyectoneon.com/wp-content/uploads/2017/01/Resumen\\_Decisores\\_WEB.pdf](http://www.proyectoneon.com/wp-content/uploads/2017/01/Resumen_Decisores_WEB.pdf)

*En agradecimiento a la Dra. Josefa Ferreiro Quintana del servicio de Oncología Médica y al departamento de Anatomía Patológica del hospital de Galdakao-Usansolo; en especial a Gontzal Yáñez, técnico de laboratorio, y a mi tutora, Dra. Miren Igone Imaz Murga por su colaboración y dedicación.*

