

PD-L1 IHC beim Bronchialkarzinom, Q1/2017

Jöhrens K^{1,2}, Büttner R³, Dietel M¹, Scheel AH³

Erstlinientherapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Die Zulassungssituation beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) bleibt in Bewegung [Tab.1]: In 10/2016 wurde der PD-1 Inhibitor Pembrolizumab durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) für die Erstlinien-Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen. Dabei wird im Rahmen der companion diagnostic eine immunhistologische Untersuchung zum Nachweis von PD-L1 mittels Dako 22C3 pharmDx Assay gefordert. Der cut-off der PD-L1 positiven Karzinomzellen an der Gesamtheit der Karzinomzellen beträgt $\geq 50\%$ [1, 2].

In 02/2017 wurde Pembrolizumab ebenfalls durch die Europäische Arzneimittelbehörde (EMA) für die Erstlinientherapie des NSCLC zugelassen [3]. Die Zulassung enthält die obligate PD-L1 IHC Testung mit dem $\geq 50\%$ cut-off; die praktische Umsetzung der Testung ist jedoch nicht an einen spezifischen Assay gebunden: "Bei der Bestimmung des PD-L1-Status des Tumors ist es wichtig, eine entsprechend validierte und robuste Methode zu verwenden, um falsch-negative oder falsch-positive Bestimmungen zu minimieren." [3]. Damit folgt die EMA dem bisherigen Zulassungsmodus, der bereits für EGFR- und ALK-Inhibitoren beim NSCLC angewandt wurde: Die Ausgestaltung der Testung liegt in der Hand des Pathologen.

Zweitlinientherapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms

In Europa sind derzeit zwei PD-1 Inhibitoren für die Zweitlinien-Behandlung des NSCLC zugelassen [Tab.1], Nivolumab und Pembrolizumab:

- Die immunhistologische PD-L1 Testung für Nivolumab bei nicht-kleinzelligen, nicht-plattenepithelialen pulmonalen Karzinomen ist optional, um eine zusätzliche Information über den möglichen Therapieerfolg zu erhalten. Hierbei wird die Anzahl der PD-L1 positiven Karzinomzellen bestimmt, und nach den Grenzwerten $\geq 1\%$, $\geq 5\%$ und $\geq 10\%$ bewertet [4]. Die etwas ungewohnte Subgruppe 'nicht-plattenepitheliale' Karzinome ergibt sich aus dem Studienaufbau der zugrunde liegenden Studie 'Checkmate 057' [5].
- Für Pembrolizumab ist der immunhistologische Nachweis von PD-L1 gefordert. Der Grenzwert der PD-L1 positiven Karzinomzellen ist $\geq 1\%$ [6].

Weiterhin wurde der PD-L1 Inhibitor Atezolizumab in 10/2016 durch die FDA für die Zweitlinien-Behandlung des NSCLC ohne vorherige immunhistologische Bestimmung von PD-L1 zugelassen [7]. In Europa wird die Zulassung 2017 erwartet.

Q1/2017	anti-PD-1 / -PD-L1 beim NSCLC	
	1. Therapielinie	2. Therapielinie
Nivolumab		IHC optional (TC: 1%, 5%, 10%)
Pembrolizumab	Obligate IHC (TC $\geq 50\%$)	Obligate IHC (TC $\geq 1\%$)
Atezolizumab		Keine IHC
Durvalumab		
Avelumab		

Tabelle 1: Zulassungen Immuntherapie beim NSCLC, Q1/2017

Die Tabelle zeigt Wirkstoffe gegen PD-1 oder PD-L1, die für das NSCLC getestet werden [8] oder bereits zugelassen sind. Dunkelgrüne Felder sind zugelassene Indikationen in Europa und den USA, hellgrüne Felder sind bislang ausschließlich US-Zulassungen.

EMA- und FDA-Zulassung (EU und USA)
 FDA-Zulassung (USA)

PD-L1 IHC Färbung

Mit der erwarteten Erstlinien-Zulassung von Pembrolizumab für das NSCLC wird der Bedarf an PD-L1 Testungen massiv steigen; die PD-L1 IHC wird sich in die Gruppe der obligaten, prädiktiven Biomarker (z.Zt. EGFR-, ALK- und ROS1) einreihen. Was ist aus Sicht der Pathologie zu beachten? Die PD-L1 IHC Färbung sollte mit einem validierten Assay durchgeführt werden. Bei der Interpretation der Färbeergebnisse muss die zu testende Tumorentität hinsichtlich des Grenzwertes berücksichtigt werden. Des Weiteren sind im Rahmen der companion diagnostic die entsprechende Assays zu wählen. Dieses Update beschreibt die Zulassungssituation beim NSCLC in Q1/2017.

1. Assays

- Die klinischen NSCLC-Studien für Pembrolizumab wurden mit dem PD-L1 IHC Assay 'Dako 22C3 pharmDx' durchgeführt [2, 6], entsprechend ist dieser Assay Referenz-Standard für die PD-L1 IHC beim NSCLC für Pembrolizumab .
- Die klinischen NSCLC-Studien mit Nivolumab wurden mit dem PD-L1 IHC Assay 'Dako 28-8 pharmDx' durchgeführt [5], entsprechend ist dieser Assay Referenz-Standard für die PD-L1 IHC beim NSCLC für Nivolumab.
- Interassay-Vergleiche durch die amerikanische Blueprint-Studie [9], die französische PD-L1 Studie [10] sowie die deutsche PD-L1 Studie [11] zeigen bisher, dass die Assays 'Dako 22C3 pharmDx' und 'Dako 28-8 pharmDx' beim NSCLC vergleichbare Färbemuster erzeugen. Weiterhin zeigt der Assay 'Ventana SP263' ein Färbemuster, das denen der beiden Dako Assays sehr ähnlich sind [Abb.1].
- Anderes gilt hingegen für den Assay 'Ventana SP142': Dieser Assay zeigt Färbemuster, die sich von SP263, 22C3 und 28-8 deutlich unterscheiden [Abb.1] [8]. Da der Test ursprünglich für die Immunzellen etabliert wurde, hebt er diese recht kräftig hervor, wohingegen die Tumorzellen im Vergleich zu den anderen Assays schwächer angefärbt werden
- Die FDA hat den PD-L1 IHC Assay 'Ventana SP263' als zweiten Test neben 'Dako 28-8 pharmDx' als optionalen Biomarker für Nivolumab in der NSCLC-Zweilinietherapie zugelassen [12].

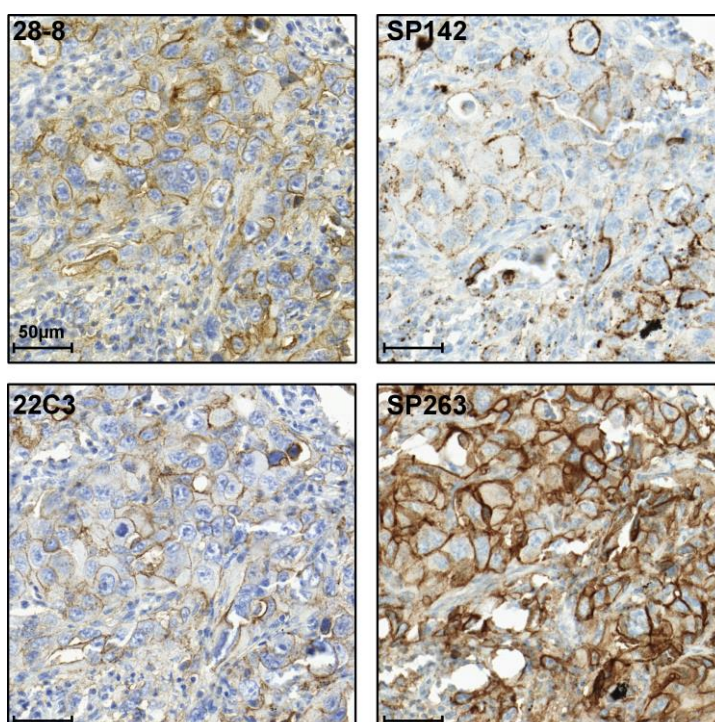


Abbildung 1: Vier PD-L1 IHC Assays beim NSCLC

Konsequente Schnittstufen wurden mit den Assays Dako 22C3 pharmDx, Dako 28-8 pharmDx, Ventana SP142 und Ventana SP263 gefärbt. Die Ausschnitte zeigen dieselbe Region. Während 22C3, 28-8 und SP263 ähnliche Färbemuster aufweisen, zeigt SP142 ein distinktes Muster (aus [8]).

2. Laborbasierte Protokolle (lab developed test, LDTs)

- Die französische PD-L1 Studie [10] und die deutsche PD-L1 Studie [Scheel et al, Manuskript eingereicht] konnten zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, einen LDT zu etablieren, der Färbemuster ähnlich der beiden Dako-Assays erzeugt. Allerdings ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass in beiden Studien nur ca. 50% der LDT ein akzeptables PD-L1 Färbemuster ergaben (14 von 27 (F), 6 von 11 (D)). Dies bedeutet, dass jedes Labor, das einen LTD einsetzt, diesen sorgfältig austesten und die Testung dokumentieren sollte.
- Als primäre Antikörper sind die Klone 28-8 (Abcam), SP263, SP142 (Roche Diagnostics) und 22C3 (Dako) aus den Studienassays auch als Einzelreagenzien kommerziell erhältlich. Weiterhin gibt es weitere PD-L1 Antikörpern, die nicht in klinischen Studien erprobt wurden. Im QuIP RV wurden in einzelnen Laboratorien ferner die Antikörper E1L3N (Cell Signaling), QR1 (Quartett Biotechnologie) und CAL10 (Zytomed Systems) erfolgreich eingesetzt.
- Die Tonsille ist als Kontrollgewebe am besten geeignet [Abb.2]. Das Tonsillengewebe enthält zwei Typen PD-L1 positiver Zellen: Stark positive Zellen in den Krypten und die schwach positiven Makrophagen in den Follikeln. Beide Zelltypen müssen in der PD-L1 Färbung erkennbar sein. Die Tonsille ist insbesondere als On-Slide Kontrolle bei jeder Färbung geeignet.

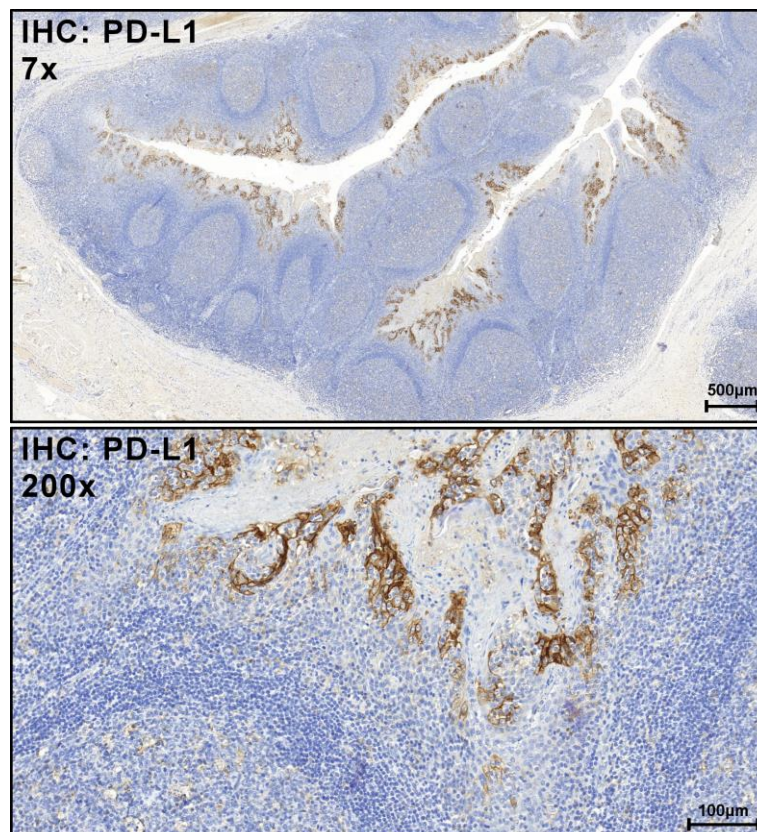


Abbildung 2: Kontrollgewebe Tonsille

In der PD-L1 IHC zeigt Tonsillengewebe zwei PD-L1 positive Zelltypen: Im Bereich des Deckepithels zeigen sich kräftig positive Zellen; in den Follikeln zeigen sich schwach positive Zellen, die nur bei starker Vergrößerung (40x Objektiv) sicher zu erkennen sind. Beide Zellpopulationen müssen eindeutig als PD-L1 positiv erkennbar sein.

- Eine weitere Möglichkeit sind Tissue-Mikroarrays (TMAs) mit PD-L1 positiven Zell-Linien [Abb.3]. Solche TMAs sind kommerziell als Schnittstufen oder ganze Blöcke erhältlich. Die enthaltenen Zell-Linien sind Malignome mit intrinsischer PD-L1 Expression [13] oder Zell-Linien mit gentechnischer erzeugter, definierter Expression [14]. Ein typischer Zell-Linien TMA enthält 4 oder mehr Zell-Linien, die eine feine Abstufung der PD-L1 Expression aufweisen. Hiermit lassen sich LDT und Referenzfärbung optimal vergleichen [Abb.3].

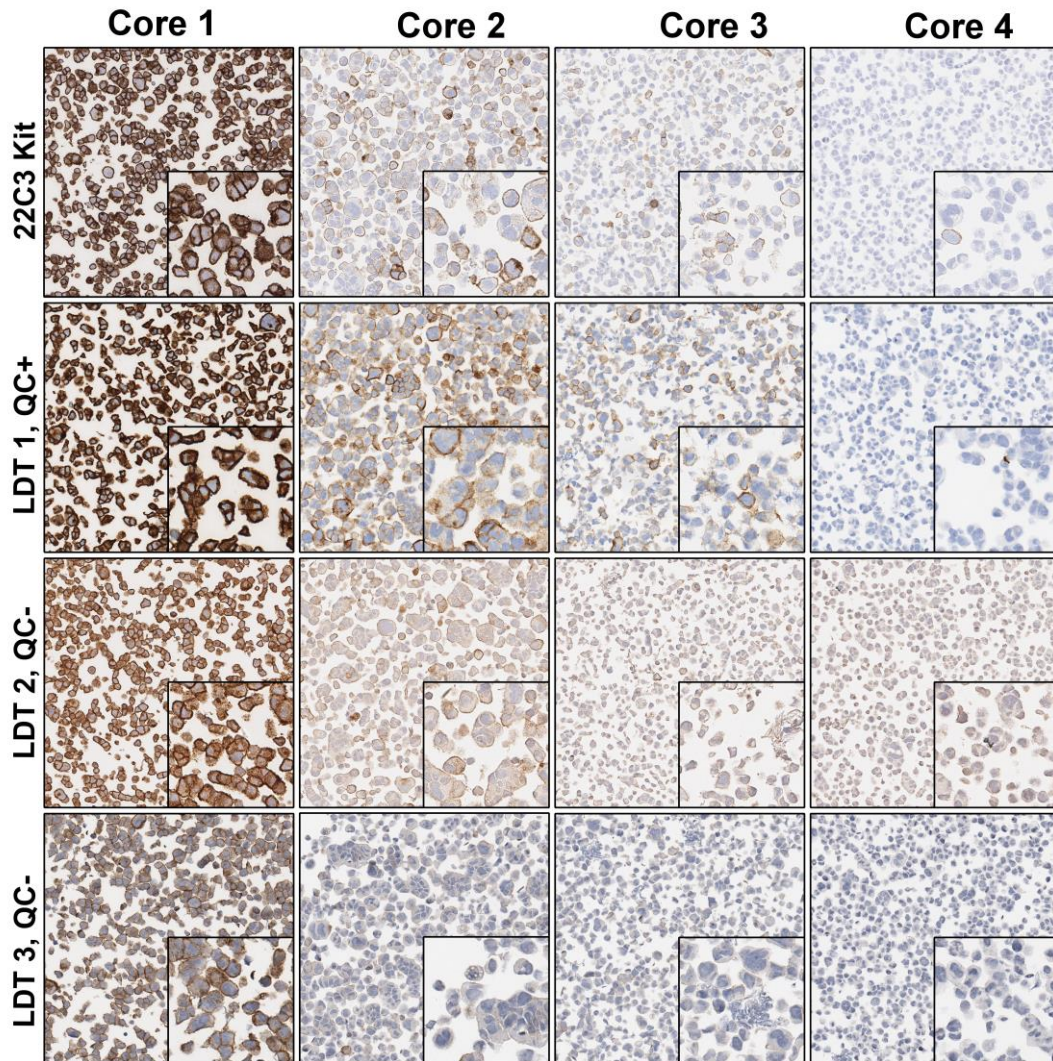


Abbildung 3: Überprüfung von laborbasierten PD-L1 Protokollen

Ein Werkzeug zur Überprüfung eines laborbasierten PD-L1 Protokolls ("LDT") sind Tissue-Mikroarrays mit PD-L1 positiven Zell-Linien. Solche TMAs sind kommerziell erhältlich und enthalten 4 oder mehr Cores mit verschiedenen Abstufungen von PD-L1 Expression. Hier dargestellt ist PD-L1 IHC mit dem 22C3 pharmDx Kit. **LDT 1** zeigt ein analoges Färbemuster; Cores 1 - 3 sind klar als positiv zu erkennen, der Hintergrund ist gering und in Core 4 finden sich einzelne, positive Zellen. **LDTs 2 und 3** sind Beispiele für IHC Färbungen, die nicht dem 22C3 Assay entsprechen: LDT 2 zeigt eine blasse Färbung und deutlichen DAB-Hintergrund. Core 2 ist hierdurch bereits eingeschränkt beurteilbar, in Core 3 kann die membranäre Färbung nicht vom zytoplasmatischen Hintergrund abgrenzt werden, so dieser Core als negativ beurteilt würde. LDT 3 zeigt eine sehr blasse DAB-Färbung bei gleichzeitig kräftiger Hämatoxylin-Gegenfärbung. Hier ist es bereits in Core 2 schwierig, eine membranäre Färbung zu erkennen.

PD-L1 IHC Auswertung

Die Auswertung der PD-L1 Färbungen für Nivolumab und Pembrolizumab ist ähnlich, lediglich die Grenzwerte sind verschieden [8]:

- Die Testung sollte am Biopsie- oder Resektatmaterial erfolgen, da es für zytologische Präparate derzeit noch keine klinischen Studien zum prädiktiven Wert gibt.
- Bewertet wird der relative Anteil PD-L1 positiver Karzinomzellen bezogen auf die Gesamtheit aller Karzinomzellen.
- Dabei muss der gesamte Schnitt ausgewertet und alle Karzinomzellen einbezogen werden.
- Eine Karzinomzelle ist positiv, wenn sie eine membranäre Färbung aufweist, die partiell oder zirkulär sein kann.
- Jede Färbung, auch schwach positive, wird berücksichtigt.
- Es müssen mindestens 100 auswertbare Karzinomzellen vorhanden sein.
- Tumorassoziierte "Immunzellen" (Makrophagen/Monozyten, Lymphozyten, dendritische Zellen, ...) werden nicht mit einbezogen. Gerade Makrophagen sind häufig PD-L1 positiv, und können als intrinsische Kontrolle (cave Verwechslung mit Tumorzellen) herangezogen werden.

Berichten des PD-L1 Status

Da sich die Definition von "PD-L1 positiv" beim NSCLC je nach Wirkstoff und Therapielinie ändert, muss der PD-L1 Status detailliert formuliert werden. Die empfohlenen Herangehensweise ist, die Anzahl der positiven Karzinomzellen zu berichten. Hierbei kann wahlweise der Prozentwert angegeben ("Immunhistologisch sind 13% der Karzinomzellen PD-L1 positiv") oder das kategoriale System verwendet werden ("... sind $\geq 1\%$, $< 50\%$ der Karzinomzellen positiv") [Tab.2] [11]. Weiterhin sollten der Primärantikörper und die Färbepattform angegeben werden. Der behandelnde Arzt kann dann je nach Therapie-Linie und Behandlungsoptionen den PD-L1 Status interpretieren.

A	Assay	Negativ	Low/Weak	Medium	High/Strong
Nivolumab	Dako 28-8	<1%	1-4%	5-9%	$\geq 10\%$
Pembrolizumab	Dako 22C3	<1%	1-49%		$\geq 50\%$

B		Negativ					
6-stufiger Proportion-Score	Kategorie:	0	1	2	3	4	5
	Cut-Off:	< 1%	$\geq 1\%$	$\geq 5\%$	$\geq 10\%$	$\geq 25\%$	$\geq 50\%$
	Intervall:	<1%	1% - 4%	5% - 9%	10% - 24%	25% - 49%	$\geq 50\%$

Tabelle 2: Grenzwerte und 6-stufiger Score

Bei der PD-L1 Testung für Nivolumab und Pembrolizumab beim NSCLC wird die relative Anzahl der PD-L1 positiven Karzinomzellen ermittelt. (A) zeigt die zugelassenen Grenzwerte der jeweiligen Assays, (B) zeigt eine Zusammenfassung aller derzeit getesteten Grenzwerte in einen 6-stufigen, kategorialen Score (0 - 5).

Qualitätssicherung

In 09/2016 wurde durch die Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP GmbH) ein erster Workshop zur PD-L1 IHC beim NSCLC in Berlin durchgeführt, an dem 70 Kolleginnen und Kollegen teilnahmen. Darauf folgte in 11/2016 ein erster Ringversuch zu PD-L1 beim NSCLC, an dem 83 Pathologien teilnahmen. Weitere Ringversuche sind in Vorbereitung.

Ausblick

Die PD-L1 Harmonisierungsstudien konnten zeigen, dass reproduzierbare Färbungen mit unterschiedlichen Primärantikörpern auf unterschiedlichen Plattformen möglich sind. Die Interobserver-Reproduzierbarkeit ist gut. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass eine sorgfältige Vorbereitung, ggf. mit entsprechendem on-slide-Training und dokumentierter technischer Qualitätssicherung dringend empfohlen werden.

Kontaktinformationen

1. PD Dr. med. Korinna Jöhrens; Prof. Dr. med. Manfred Dietel
Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie QuIP GmbH
Robert-Koch-Platz 9, 10115 Berlin
Telefon +49 30 4004 2405, Telefax +49 30 25760 729
Internet: www.quip-ringversuche.de, E-Mail: info@quip-ringversuche.de
2. Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pathologie
Charitéplatz 1, 10117 Berlin
E-Mail: korinna.joehrens@charite.de
3. Dr. med. Andreas Scheel; Prof. Dr. med. Reinhard Büttner
Universitätsklinik Köln, Institut für Pathologie
Kerpener Str. 62, 50937 Köln
E-Mail: andreas.scheel@uk-koeln.de; reinhard.buettner@uk-koeln.de

Referenzen:

1. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm526430.htm>
2. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG et al: Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 2016. 10;375(19):1823-1833.
3. Keytruda Fachinformationen; abgerufen 06.02.2017:
http://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/keytruda_loesung.pdf
4. Produktinformationen Dako 28-8 pharmDx Assay, abgerufen 16.01.2017:
<http://www.agilent.com/en/products/pharmdx/pd-l1-ihc-28-8-overview>
5. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L et al: Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 2015;373:1627-39.
6. Herbst RS, Baas P, Kim DW et al: Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. Lancet 2016;387:1540-50.
7. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm525780.htm>
8. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC et al: [Predictive PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer : Current state of the art and experiences of the first German harmonization study]. Pathologe 2016. 37(6):557-567.
9. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D et al: PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the "Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project". J Thorac Oncol 2016. pii: S1556-0864(16)33536-5 [Epub ahead of print].
10. Adam J, Rouquette I, Damotte D et al: Multicentric French harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small cell lung cancer. IASLC 17th world conference on lung cancer, Vienna, Austria, 2016. PL04.04a.
11. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC et al: Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. Mod Pathol 2016. 29:1165-72.
12. Ventana SP263 Produktinformationen, Reference-Nummer 741-4905, abgerufen 16.01.2017;
http://productlibrary.ventana.com/ventana_portal/OpenOverlayServlet?launchIndex=1&objectId=741-49051014258DE
13. Produktinformationen PD-L1 Analyt Kontrolle, Firma Medac Diagnostika,
http://www.medac-diagnostika.de/index.php?id_product=9358&controller=product&id_lang=2
14. Produktinformationen PD-L1 Zellkultur TMA, Firma Horizon Discovery,
<https://www.horizondiscovery.com/reference-standards/ihc/pd-l1-reference-standards>