

Aus dem Zentrum für Pathologie  
der Universität zu Köln  
Institut für Allgemeine Pathologie  
und Pathologische Anatomie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Büttner

# **Optimiertes PD-L1 Scoring beim Magenkarzinom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Jana Nele Eschbach  
Aus Velbert

promoviert am 24. April 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln (2025)

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor D. med. A. Quaas
2. Gutachter: Professor Dr. med. W. Schröder

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Wiebke Jeske  
Herr Prof. Dr. Alexander Quaas

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Quaas und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Jeske durchgeführt worden.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 17.09.2024

Unterschrift:

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. med. Alexander Quaas für seine engagierte wissenschaftliche Begleitung, sein Vertrauen und seine wertvolle Unterstützung während der gesamten Promotionszeit bedanken. Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Wiebke Jeske, die mich als medizinisch-technische Assistentin mit viel Fachkompetenz und Geduld zu Beginn der Arbeit unterstützt hat.

Danke an meine Mutter – meine größte Unterstützerin in Sachen Excel, Zahlen und Formeln und nun mein Stern am Himmel. Meinem Bruder danke ich für seine pragmatischen Perspektiven, Kreativität auf Informatikebene, Marvel und der Macht.

Und natürlich: Danke an meine Freundinnen und Freunde, die mich in die Bib gezerrt und für Kaffee, Gespräche, die Pomodoro Methode, Mensa, viel Ironie und Motivation gesorgt haben. Ihr habt mehr zu dieser Arbeit beigetragen, als euch bewusst ist.

Widmung

Für Mama

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
2.1. Magenkarzinom	8
2.1.1. Epidemiologie	8
2.1.2. Ätiologie und Pathogenese	8
2.1.3. Molekulare Subtypen	9
2.1.4. Diagnostik	11
2.1.5. Tumorklassifikation und Stadieneinteilung	11
2.1.6. Therapie	13
2.1.7. Personalisierte Therapieansätze	17
2.2. PD-1/PD-L1	19
2.2.1. PD-1 und PD-L1-Regulation und Funktion	19
2.2.2. CPS und TPS-Scoring	20
2.2.3. Immuncheckpoint-Inhibitoren	22
2.2.4. PD-L1 und Magenkarzinom	23
2.3. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	25
<b>3. PUBLIKATION</b>	<b>26</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>35</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>38</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>41</b>
6.1. Abbildungsverzeichnis	41
6.2. Tabellenverzeichnis	41

## Abkürzungsverzeichnis

ACRG	Asian Cancer Research Group
APC	Antigen-präsentierenden Zellen
BMI	Body Mass Index
cfDNA	cellfree DNA
CGC	Cardia Gastric Cancer
CIN	Tumore mit chromosomaler Instabilität
CPS	Combined positive score
CTC	circulating tumorcells
ctDNA	circulating tumor DNA
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
dMMR	DNA-Mismatch-Reparatur
EBV	Ebstein Barr Virus
ECF	Epirubicin, Cisplatin, 5-FU
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymale-Transition
FDA	Food and Drug Administration
FLO	Oxaliplatin, 5-FU
FLOT	5-FU + Folinsäure, Docetaxel, Oxaliplatin
FOLFOX	Folinsäure, Fluorouracil, Oxaliplatin
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitoren
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
LB	Liquid Biopsy
MSI	Mikrosatelliteninstabile Tumoren
NCGC	Noncardia Gastric Cancer
OS	Overall survival
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFS	Progressionfree Survival, Progressionsfreiezeit
PLF	Cisplatin, 5-FU
RHOA	Ras homolog family member A
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue Microarray
ToGA	Trastuzumab for Gastric Cancer
TPS	Tumor proportion score
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organisation
XELOX	Capecitabin, Oxaliplatin

## 1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Optimiertes PD-L1 Scoring beim Magenkarzinom" zielt darauf ab, die Methodik zur gewebebasierten Bestimmung der PD-L1-Expression in Magenkarzinomen zu verbessern. Die PD-L1-Expression ist ein zentraler Biomarker für die Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) wie Nivolumab und Pembrolizumab. Diese Medikamente haben das Potenzial, das Überleben von Patientinnen/Patienten mit fortgeschrittenem Magenkrebs signifikant zu verlängern. Bisherige Ansätze zur Bestimmung der PD-L1-Expression basieren häufig auf endoskopischen Biopsien, deren Genauigkeit jedoch aufgrund der Heterogenität der Tumore fraglich ist. Es gab bis dato keinerlei Forschungsdaten / medizinische Untersuchungen, ob Biopsien überhaupt in der Lage sind, realistische Aussagen zum PD-L1-Status eines Gesamttumors zu vermitteln und wie viele Biopsien dazu nötig wären.

Meine Studie berücksichtigte 56 Patienten mit unbehandelten, primär nicht metastasierten operablen Adenokarzinomen des Magens. An den Resektionspräparaten wurde zunächst wie üblich immunhistochemisch der PD-L1-Status des gesamten Tumors ermittelt, um eine "ground-truth" zu etablieren. Anschließend wurden insgesamt 8 Biopsien aus dem Tumor entnommen und in einen Tissue Microarray (TMA) überführt. Die Größe der TMA-Biopsie entspricht dabei der auch üblicherweise endoskopischen Biopsiepartikelgröße. Der TMA berücksichtigte sowohl vier oberflächliche (endoskopisch erreichbare) als auch vier tiefe, nicht-nekrotische Tumorbereiche. Diese TMA-Biopsien wurden dann erneut mittels Immunhistochemie auf PD-L1 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass ausreichend viele oberflächliche Biopsien eine repräsentative und zuverlässige Methode zur Bestimmung des PD-L1-Status darstellen. Ausreichend konnten wir als ein Minimum von vier tumortragenden Biopsien definieren – lagen vier Biopsien vor, konnte der PD-L1-ground-truth-Wert mit einer adäquaten Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden (k-Wert: 0,76). Die tiefen Biopsien erwiesen sich hingegen als weniger sensitiv und repräsentativ.

Die Konsequenzen dieser Studie sind weitreichend für die klinische Praxis. Durch die aus meiner Arbeit abgeleiteten Empfehlung, mindestens vier tumortragende Biopsien zu entnehmen (mehr sind besser), kann die Genauigkeit der PD-L1-Bestimmung verbessert werden. Dies stellt sicher, dass Patienten, die für eine Immuntherapie geeignet sind, korrekt identifiziert und entsprechend behandelt werden. Ein falsch-negatives Ergebnis, das durch unzureichendes Biopsiematerial verursacht wird, könnte Patientinnen/Patienten um eine lebensverlängernde Therapie bringen. Diese Arbeit betont daher die Notwendigkeit einer sorgfältigen und umfassenden Biopsieentnahme und trägt zur Optimierung der personalisierten Therapieansätze bei Magenkarzinomen bei.

## 2. Einleitung

### 2.1. Magenkarzinom

#### 2.1.1. Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist mit ca. einer Million neu diagnostizierter Fälle jährlich die fünfthäufigste Krebserkrankung weltweit und mit ca. 769.000 Todesfällen im Jahr 2020 die vierthäufigste Todesursache.<sup>1</sup> Damit liegt die Inzidenz für das Magenkarzinom bei ca. 19.292.000 weltweit diagnostizierten Krebserkrankungen bei insgesamt 5,6% und die Mortalitätsrate bei 7,7%.<sup>2</sup>

Je nach Region, Alter und Geschlecht spezifizieren sich die Daten. Die globale Verteilung der Inzidenzen weist große Unterschiede auf. Zu den Hochrisiko Gebieten zählen Ostasien (China und Japan), Osteuropa, Zentral- und Südamerika. Zu den Niedrigrisiko Gebieten zählen Südasien, Nord- und Ostafrika, Nordamerika, Australien und Neuseeland. Für Deutschland ist seit Jahren ein Rückgang sowohl der Inzidenzen als auch der Sterberaten zu beobachten. Dies wird auf höhere Hygiene-, und Ernährungsstandards und die frühzeitige Eradikation von *Helicobacter pylori* zurückgeführt, welches zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen gehört.<sup>3</sup>

Von der Erkrankung sind Männer etwa zweimal so häufig betroffen wie Frauen.<sup>1</sup> Auch steigt das Risiko, an einem Magenkarzinom zu erkranken, mit zunehmendem Alter. 2018 erkrankten in Deutschland Männer im Mittel mit 71 Jahren, Frauen mit 76 Jahren. Die relative 5-Jahres Überlebensrate liegt 2018 bei Männern bei 34%, bei Frauen bei 37%.<sup>4</sup> Die Verteilung der UICC-Stadien unterscheidet sich dagegen nur unmerklich zwischen den Geschlechtern. Die Überlebensrate ist gering, da die Erkrankung oft erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt wird. Ca. 40% werden bei Erstdiagnose dem UICC-Stadium IV zugeordnet. Dementsprechend liegt die Überlebensrate im Stadium IV bei nur 4-6%, im Vergleich dazu liegt sie bei Stadium I bei 76-81%.<sup>4</sup>

#### 2.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung des Magenkarzinoms ist multifaktoriell und wird sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren beeinflusst. Dabei kann zwischen exogenen und endogenen Faktoren unterschieden werden. Zu den wichtigsten **exogenen Risikofaktoren** zur Entstehung von Magenkrebs gehören die Infektion mit *Helicobacter pylori*, eine nitratreiche Ernährung, Rauchen, eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus, der sozioökonomische Status und Übergewicht. Zu den **endogenen Risikofaktoren** gehören unter anderem die chronisch-atrophe Gastritis, Magengeschwüre, die Gastroösophageale Refluxkrankheit, hereditäre Faktoren, verschiedene Syndrome, wie das Lynch Syndrom und die Blutgruppe A.

Über viele Jahrzehnte hinweg wurde durch zahlreiche Studien gezeigt, dass die Entstehung und Entwicklung des Magenkarzinoms außerdem durch verschiedene unterschiedliche genetische Veränderungen verursacht wird, wie zum Beispiel Veränderungen der Zellfunktion und -differenzierung, der DNA-Reparaturmechanismen, der Zelladhäsion und weitere.<sup>5</sup> Zu den genetischen Faktoren zählt zum Beispiel in über 50% der Fälle – und damit als wichtigste – die Mutation des TP53 Gens. Außerdem lassen sich weitere Mutationen in den Onkogenen KRAS, CTNBB1 und PIK3CA, sowie den Tumorsuppressorgenen SMAD4 und APC nachweisen.<sup>6</sup>

Die Pathogenese des Magenkarzinoms ist unterteilbar in die beiden verschiedenen **topologischen Subtypen** der **Kardia (CGC)** und der „**Nicht-Kardia**“ (**NCGC**), zu denen die Karzinome des Magenausgangs (Antrum und Pylorus), der kleinen Kurvatur und der restlichen Lokalisationen zählen. Beide Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich der Risikofaktoren, Ätiologie und der geographischen Verteilung. Die große Mehrheit des NCGC ist assoziiert mit der H. pylori Infektion, wohingegen das CGC eher mit Übergewicht und dem Gastroösophagealen Reflux assoziiert ist.<sup>7</sup>

Die chronische Infektion mit Helicobacter pylori zählt dabei zu den wichtigsten bekannten Risikofaktoren des NCGC. Nahezu alle Fälle können darauf zurückgeführt werden.<sup>1</sup> Seit 1994 wird H. pylori von der WHO als Karzinogen anerkannt.<sup>8</sup> Ca. 50% der Weltbevölkerung ist mit dem Bakterium infiziert, jedoch entwickeln nur <5% Krebs. Dies könnte unter anderem an unterschiedlichen genetischen Eigenschaften, sowohl beim Bakterium als auch beim Menschen, sowie an verschiedenen Umwelteinflüssen liegen.<sup>1,9</sup>

Obwohl weltweit bekannt ist, dass H. pylori eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielt, sind die genauen Mechanismen bis heute unklar. Die Infektion führt zu verschiedenen Erscheinungsbildern wie Magengeschwüren, -tumoren und Entzündungen.<sup>5</sup>

Dabei gibt es Hinweise, dass H. pylori sowohl eine Proliferation der Zellen als auch die Apoptose im Entzündungsstadium auslöst. Wohingegen bei der malignen Entstehung die Apoptose gehemmt und die Adhäsion der Epithelzellen beeinträchtigt wird. Außerdem wird zum Beispiel von Fan et. al berichtet, dass die Anwesenheit von H. pylori Zellen die Zellproliferation erhöht.<sup>10</sup>

### **2.1.3. Molekulare Subtypen**

Neben den topologischen Subtypen kann das Magenkarzinom in der klinischen Praxis auch nach verschiedenen Modellen eingeteilt werden, die unterschiedlich Anwendung finden. Zur Unterteilung werden Untersuchungen des Genoms, Transkriptoms, Epigenoms und Proteoms durchgeführt und anschließend klassifiziert.

Die jeweiligen Kategorisierungsparameter zur Unterteilung in Subtypen erfolgt je nach Untersuchungsgegenstand und Zielsetzung. Zwei besonders relevante und anwendbare Modelle sind die des TCGA sowie des ACRG.

Durch das 2005 gestartete Projekt des **TCGA (The Cancer Genome Atlas)** haben sich im Jahr 2014 vier molekulare Subtypen des Magenkarzinoms festlegen lassen. Darunter fallen **(1)** Epstein-Barr-Virus (EBV) positive Tumore, **(2)** mikrosatelliteninstabile Tumoren (MSI), **(3)** Tumore mit chromosomaler Instabilität (CIN) und **(4)** genomisch stabile Tumore (GS).<sup>11</sup>

**(1) EBV** wird in ca. 9% der malignen Epithelzellen beim Magenkarzinom gefunden. Bei Epstein-Barr-Virus-positiven Tumoren finden sich häufiger DNA-Hypermethylierungen als bei allen anderen Tumorentitäten, die im TCGA untersucht wurden. Außerdem finden sich Amplifikationen von JAK2, CD274 (= PD-L1) und PDCD1LG2 (= PD-L2) und rezidivierende PIK3CA-Mutationen.

**(2) Mikrosatelliteninstabilität (MSI)** ist eine der am längsten bekannten Veränderungen in der Karzinogenese und resultiert in genomischer Instabilität. Als Mangel an DNA-Mismatch-Reparatur definiert, begünstigt sie das Vorhandensein von Replikationsfehlern in einfachen repetitiven Sequenzen. Dabei unterscheidet man zwischen hochfrequent, niedrigfrequent und stabil. Beim Magenkarzinom kommt die MSI in 13-44% (in der TCGA-Kohorte in 21%) der Fälle vor, insbesondere die hochfrequente Variante. Magentumoren mit MSI sind häufiger mit dem intestinalen Typ nach Laurén, einer Lokalisation im Antrum, sowie einer günstigeren Prognose assoziiert.<sup>5</sup>

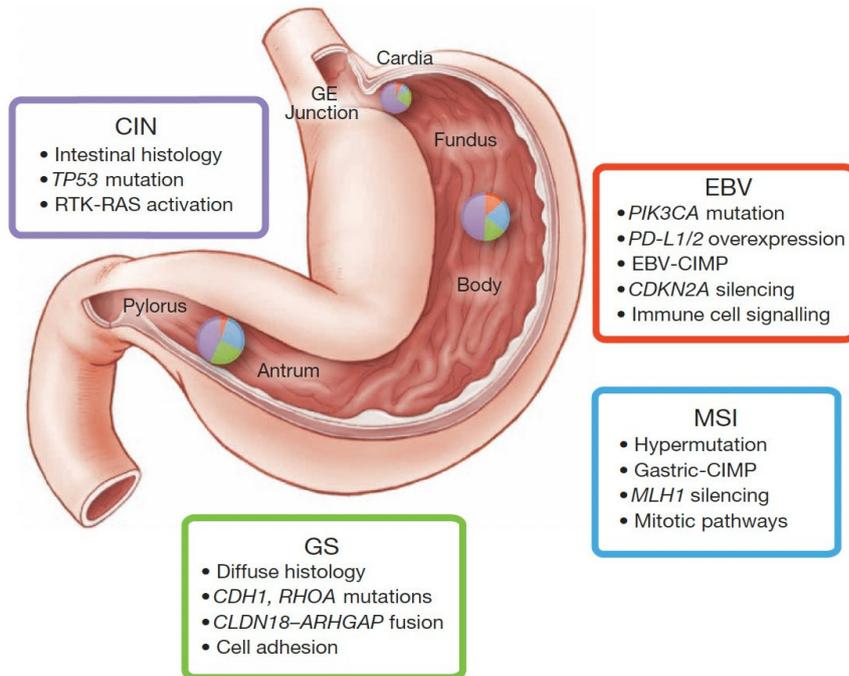
**(3) Tumoren mit chromosomaler Instabilität (CIN)** zeigen Aneuploidie und fokale Amplifikationen von Rezeptor Tyrosinkinase (wie zum Beispiel Her2/neu). Sie werden eher mit dem intestinalen Typ nach Laurén assoziiert, kommen häufiger in der Kardia (CGC) und dem Gastroösophagealen Übergang vor und sind mit ca. 50% die größte Gruppe.

**(4) Genomisch stabile Tumoren (GS)** treten in ca. 20% der Fälle auf, werden mit der diffusen histologischen Variante nach Laurén assoziiert, kommen häufiger im Antrum vor und weisen Mutationen des RHOA oder mit GTPase-aktivierenden Proteinen der RHO-Familie auf. Die Prognose ist in dieser Gruppe am schlechtesten.<sup>5,11,12</sup>

Neben der Einteilung des TCGA für das Magenkarzinom wurden in weiteren Studien andere genetisch-molekulare Klassifikationen aufgestellt, wie zum Beispiel die der Asian Cancer Research Group (ACRG) und der Singapore Group.

Auch die ACRG teilt das Magenkarzinom in vier Subtypen ein. Dabei werden ebenfalls unterschiedliche Kriterien, wie die Mikrosatellitenstabilität, die Aktivität von *TP53* und die epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) betrachtet.

In der Singapore Group (auch Singapore-Duke Klassifikation genannt) werden drei molekulare Subtypen unterschieden: Mesenchymal, Proliferativ und Metabolisch.<sup>12</sup>



**Figure 6 | Key features of gastric cancer subtypes.** This schematic lists some of the salient features associated with each of the four molecular subtypes of gastric cancer. Distribution of molecular subtypes in tumours obtained from distinct regions of the stomach is represented by inset charts.

Abbildung 1: Molekulare Subtypen des Magenkarzinoms<sup>11</sup>

#### 2.1.4. Diagnostik

Zur Primärdiagnostik des Magenkarzinoms erfolgt eine Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) mit Biopsieentnahmen aus allen suspekten Läsionen. Eine Endosonografie ist im Anschluss zur Mitbeurteilung der cTNM-Klassifikation, also der Tumorausdehnung und des Lymphknotenstatus ebenfalls notwendig. Zusätzlich wird für das Staging eine CT-Untersuchung von Thorax, Abdomen und Becken angefertigt, um Fernmetastasen zu detektieren. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren mit unklarem Lymphknotenstatus oder Verdacht auf eine Peritonealkarzinose sollte weiterführend eine Laparoskopie durchgeführt werden.<sup>8</sup>

#### 2.1.5. Tumorklassifikation und Stadieneinteilung

Die TNM-Klassifikation zeigt die anatomische Ausbreitung des Magenkarzinoms an. Dabei werden die Infiltrationstiefe (T1-4), der Lymphknotenstatus (N0-3) und die Fernmetastasierung (M0-1) beurteilt.<sup>8</sup>

<b>T</b>	<b>Infiltrationstiefe des Primärtumor</b>
<b>TX</b>	Kann nicht beurteilt werden

<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: Intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der lamina propria, hochgradige Dysplasie
<b>T1</b>	Tumor infiltriert Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submukosa
<b>T1a</b>	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosae
<b>T1b</b>	Tumor infiltriert Submukosa
<b>T2</b>	Tumor infiltriert Muscularis propria
<b>T3</b>	Tumor infiltriert Subserosa
<b>T4</b>	Tumor perforiert Serosa (viszerales Peritoneum oder infiltriert benachbarte Strukturen)
<b>T4a</b>	Tumor perforiert Serosa
<b>T4b</b>	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Magen, Milz, Colon transversum, Leber, Diaphragma, Pankreas, Nebennieren, Niere, Jejunum, Retroperitoneum, Bauchwand)
<b>N</b>	Regionäre Lymphknoten (LK)
<b>NX</b>	Können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine regionären LK-Metastasen
<b>N1</b>	Metastasen in 1-2 regionären LK
<b>N2</b>	Metastasen in 3-6 regionären LK
<b>N3</b>	Metastasen in $\geq 7$ regionären LK
<b>N3a</b>	Metastasen in 7-15 regionären LK
<b>N3b</b>	Metastasen in $\geq 16$ regionären LK
<b>M</b>	Fernmetastasen
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms<sup>8</sup>

Aus der TNM-Klassifikation lassen sich die klinischen UICC-Stadien (Union for International Cancer Control) ableiten.<sup>8</sup>

<b>UICC-Stadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1, T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T1, T2	N1, N2, N3	M0
<b>IIB</b>	T3, T4a	N0	M0

<b>III</b>	T3, T4a	N1, N2, N3	M0
<b>IV</b>	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: UICC Stadien des Magenkarzinom<sup>8</sup>

Die histologische Klassifikation der WHO (World Health Organisation) aus dem Jahr 2010 ordnet alle Magenkarzinome den folgenden fünf Zelltypen zu:

- Adenokarzinome (> 90%)
  - Papillär
  - Muzinös
  - Tubulär
  - Siegelringzellkarzinom
- Adenosquamöse Karzinome (ca. 5%)
- Plattenepithelkarzinome
- Kleinzellige Karzinome
- Undifferenzierte Karzinome<sup>8,13</sup>

In der klinischen Praxis wird weiterführend die Klassifikation nach Laurén verwendet, welche bereits 1965 von ihrem Namensgeber, dem finnischen Pathologen Heikki Laurén eingeführt wurde und immer noch Gültigkeit hat. Dabei wird sowohl die Histomorphologie als auch die Ausbreitungstendenz des Tumors beurteilt. Anhand dessen kann sie in Verbindung mit anderen Klassifikationen und Biomarkern verwendet werden, um eine umfassendere Charakterisierung von Magentumoren zu ermöglichen und um operativ die Resektionsweite mit Sicherheitsabständen zu berechnen. Unterschieden werden der **Intestinale Typ** (50%) und der **Diffuse Typ** (40%). Der Intestinale Typ zeichnet sich durch klar begrenztes, polypöses, drüsig differenziertes Wachstum aus. Der Diffuse Typ ist eher schlecht begrenzt und infiltrativ in die Magenwand wachsend. In 10% der Fälle sieht man einen Mischtyp.<sup>3,14</sup>

### 2.1.6. Therapie

Nach der histologischen Bestätigung und anschließenden Staging Untersuchungen wird die Therapie anhand der TNM-Klassifikation, der Klassifikation nach Laurén und der UICC-Stadien geplant. Es wird zwischen der operativen und medikamentösen Therapie unterschieden, wobei die operative Therapie momentan die einzig kurative Möglichkeit bietet, sodass diese die Standardtherapie bei potenziell resektablen Tumoren ist.

Magenfrühkarzinome und intraepitheliale Neoplasien bieten die Ausnahme und können endoskopisch en-bloc reseziert werden.

Lokal fortgeschrittene oder nicht resektable Magenkarzinome werden multimodal mithilfe von perioperativer (Radio-)Chemotherapie behandelt, um sie potenziell resektabel zu machen.

Bereits hämatogen metastasierte Karzinome werden üblicherweise mit palliativer Chemotherapie behandelt.

Das chirurgische Standardverfahren ist die radikale Gastrektomie mit D2-Lymphadenektomie. Dabei werden die Lymphknoten entlang der großen und kleinen Krümmung und entlang der A.gastrica sinistra, A.hepatis communis und der A. lienalis, sowie des Truncus coeliacus und solche im Lig. hepatoduodenale entfernt. Die Passage wird mithilfe einer Roux-Y-Anastomose wiederhergestellt. Der Klassifikation nach Laurén folgend müssen je nach Typ Sicherheitsabstände von 5 cm (intestinaler Typ) bzw. 8 cm (diffuser Typ) eingehalten werden. Alternativ kann bei Karzinomen des unteren Magendrittels und Karzinomen vom intestinalen Typ des mittleren Drittels eine subtotale Gastrektomie (4/5-Resektion) mit Lymphadenektomie erfolgen. Dabei ist immer die R0-Resektion das Ziel.

Eine perioperative Therapie wird in Deutschland nach dem FLOT-Schema durchgeführt. Standard hierbei sind 4 Zyklen vor und 4 Zyklen nach der Operation. Verwendet werden Zytostatika wie 5-FU + Folinsäure, Docetaxel und Oxaliplatin.

Beim Nachweis einer HER2-Überexpression wird zusätzlich der monoklonale Antikörper Trastuzumab verabreicht.

Weitere palliative Therapien neben der Chemotherapie bieten Gastroenterostomien, Bestrahlung, Parazentese von Aszites, intraperitoneale Chemotherapie, Peritonektomie bei Peritonealkarzinose und weitere supportive Therapien bei Nebenwirkungen.<sup>8</sup>

Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Pembrolizumab, Nivolumab, Durvalumab, etc. werden in klinischen Studien getestet und eingesetzt.

Derzeit bestehen in Deutschland Zulassungen für Immuncheckpoint-Inhibitoren in folgenden Indikationen:

In erster Linie sind Nivolumab bei einem CPS  $\geq 5$  und Pembrolizumab bei einem CPS  $\geq 1$  zugelassen. In zweiter Linie ist Pembrolizumab bei MSI zugelassen.<sup>15</sup>

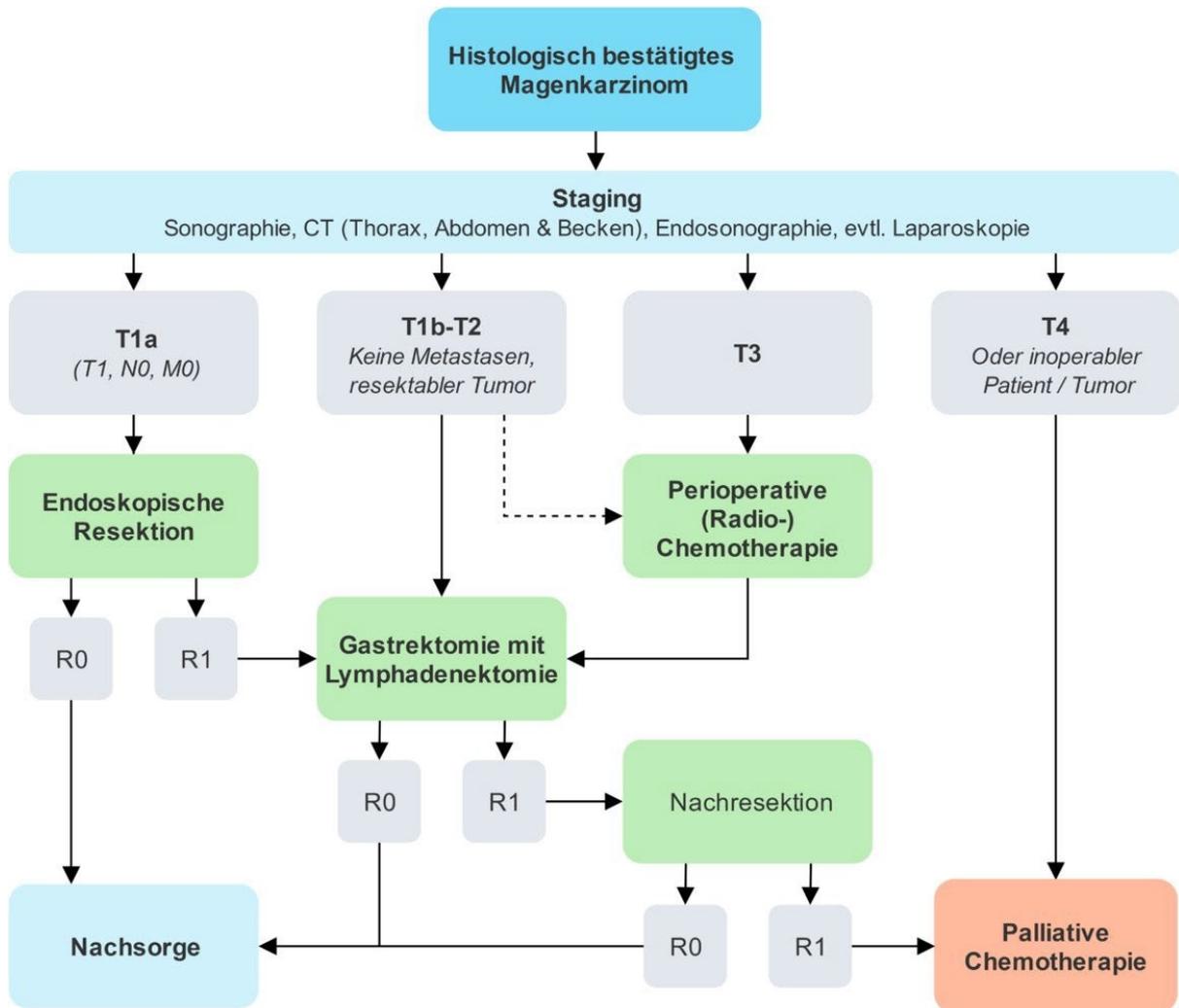
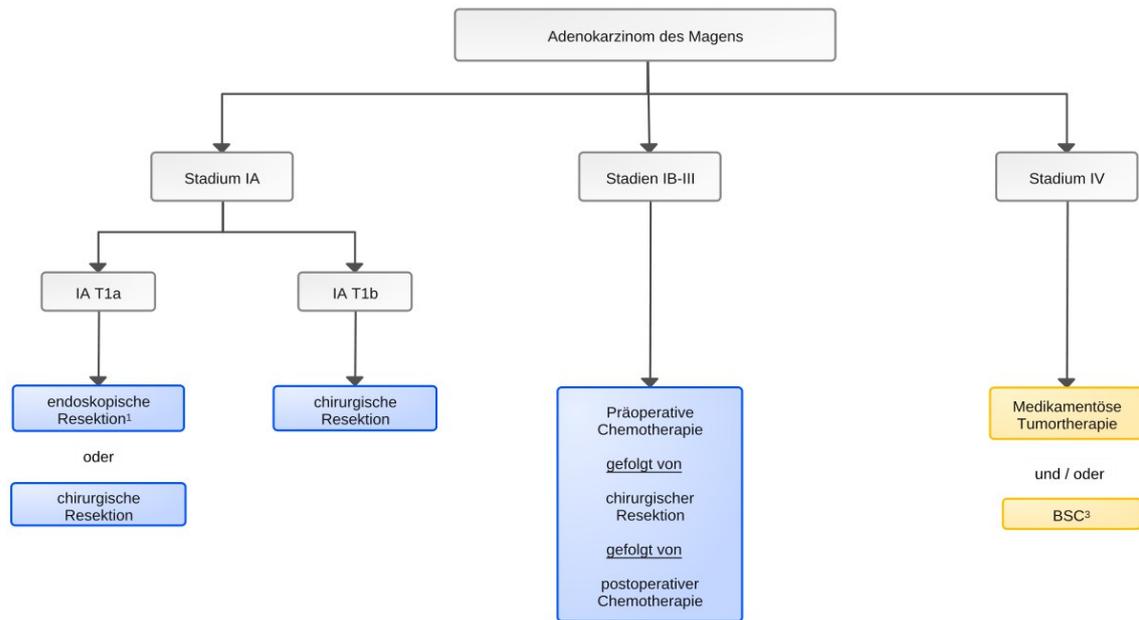


Abbildung 2: Therapie des Magenkarzinoms © AMBOSS GmbH, Berlin und Köln, Germany<sup>16</sup>

## Algorithmus für die Primärtherapie



Legende:

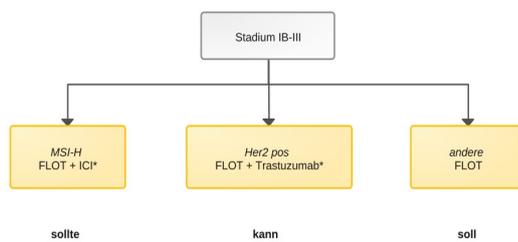
■ kurativ intendierte Therapie; ■ nicht-kurativ intendierte Therapie;

<sup>1</sup> siehe Tabelle 4

<sup>2</sup> Best Supportive Care

Abbildung 3: Algorithmus für die Primärtherapie<sup>17</sup>

### Medikamentöse perioperative Therapie des Magenkarzinoms in den Stadien IB-III

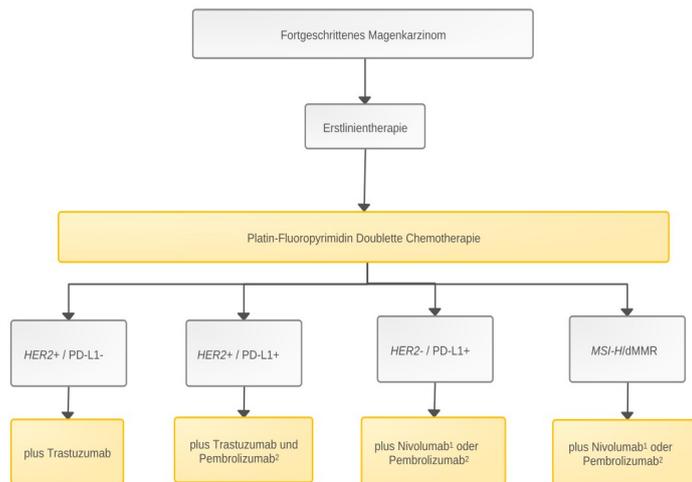


Legende:

ICI: PD-1/PD-L1-Immunchekpointinhibitor, FLOT: 5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin, Docetaxel; MSI-H: hohe Mikrosatelliteninstabilität; \*off-label, vorherige Abklärung mit Kostenträger zu empfehlen

Abbildung 4: Medikamentöse perioperative Therapie des Magenkarzinoms in den Stadien IB-III<sup>17</sup>

## Algorithmus für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms

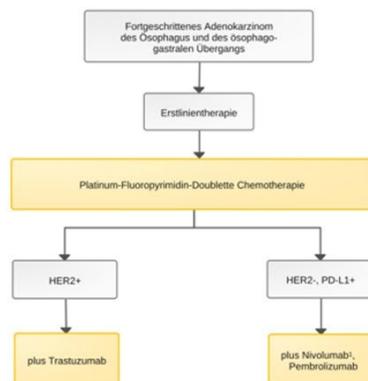


Legende:

<sup>1</sup> Nivolumab in Europa zugelassen bei PD-L1 CPS  $\geq 5$  entsprechend Checkmate-649-Studie; <sup>2</sup> Pembrolizumab in Europa zugelassen bei Adenokarzinomen des Ösophagus bei PD-L1 CPS  $\geq 10$  entsprechend Keynote-590-Studie und bei HER2 negativen und HER2 positiven Adenokarzinomen des Magens und ösophago-gastralen Übergangs bei PD-L1 CPS  $\geq 1$  entsprechend Keynote-859-Studie und Keynote 811-Studie.

Abbildung 5: Algorithmus für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms<sup>17</sup>

## Algorithmus für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Adenokarzinoms des Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs



Legende:

<sup>1</sup> Nivolumab ist in Europa zugelassen bei PD-L1 CPS  $\geq 5$  entsprechend Checkmate-649-Studie; Pembrolizumab ist in Europa zugelassen bei Adenokarzinomen des Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs bei PD-L1 CPS  $\geq 10$  entsprechend Keynote-590-Studie. Positive Phase III-Studienergebnisse bei positivem CPS wurden auch bei Magenkarzinom in Keynote-859 berichtet

Therapie in nicht-kurativer Intention

Abbildung 6: Algorithmus für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Adenokarzinoms des Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs<sup>15</sup>

### 2.1.7. Personalisierte Therapieansätze

Die personalisierte Therapie von Magenkarzinomen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen, da sie es ermöglicht, die Behandlung auf die individuellen genetischen und molekularen Merkmale der Patientinnen/Patienten abzustimmen. Dieser Ansatz kann die Wirksamkeit der Behandlung verbessern und potenziell Nebenwirkungen minimieren.

Zurzeit werden personalisierte Therapieansätze mit z.B. Antikörpern oder die Immuntherapie im Rahmen von klinischen Studien angewendet. Für die Überexpression des HER2-Proteins

bei fortgeschrittenen metastasierten Tumoren wird in den S3 Leitlinien eine ergänzende Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab empfohlen.<sup>8</sup> HER2 ist ein transmembraner Tyrosinkinase Rezeptor und gehört zur Gruppe der EGFRs (epidermal growth factor receptors). Die Überexpression und Amplifikation von HER2 ist seit Jahren Teil vieler Studien und bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen bekannt, zur Zeit vor allem beim Mammakarzinom, aber auch beim Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom, Zervixkarzinom, Ösophagus- und Magenkarzinom. Für Mammakarzinome ist er mittlerweile sowohl als prädiktiver Marker als auch als Prognosefaktor zugelassen. Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper, bindet direkt an den HER2 Rezeptor und zeigt einen signifikanten Überlebensvorteil von Patientinnen/Patienten mit Überexpression/Amplifikation von HER2-positiven Brustkrebs Patientinnen/Patienten.<sup>18</sup>

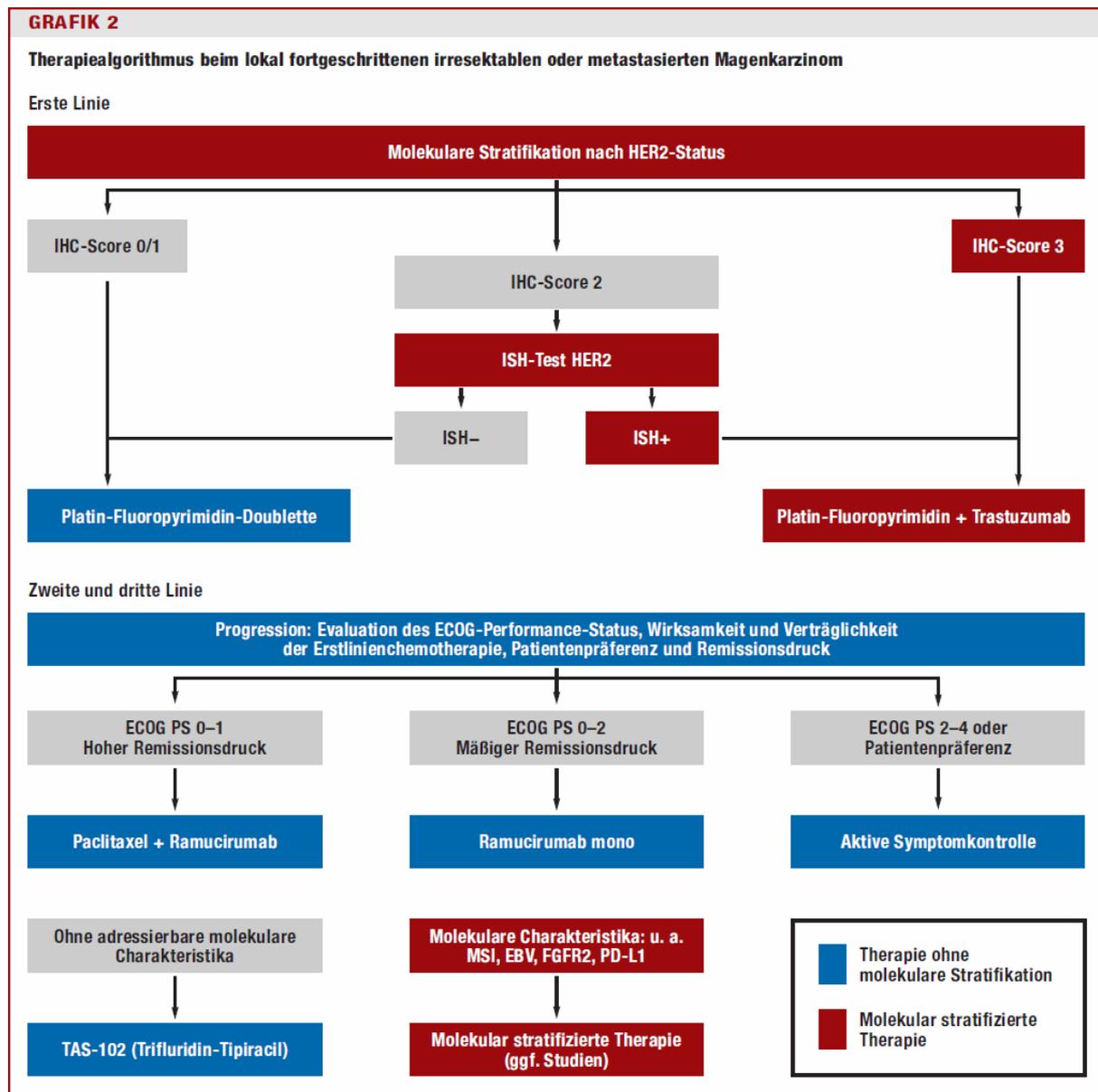
Auch für Patientinnen/Patienten mit Magenkarzinomen oder Karzinomen des Gastroösophagealen Übergangs und HER2-Rezeptor-positiven Status zeigt sich in der **ToGA**-Studie (Trastuzumab for Gastric Cancer, 2009–2014) ein medianer Überlebensvorteil in der Gruppe Herceptin plus Chemotherapie mit Fluoropyrimidin und Cisplatin von 2,7 Monaten im Gegensatz zur Referenzgruppe, die alleinig Chemotherapie mit Fluoruracil und Cisplatin oder Capecitabine und Cisplatin erhielt. Seitdem gehört es zur Erstlinientherapie.<sup>19,20</sup> 22,1% der Patientinnen/Patienten der Studie mit lokal fortgeschrittenen, inoperablen oder metastasierten Tumoren zeigten in der Immunhistochemie einen Score 3+ oder in der Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) eine Überexpression des HER2 Gens oder Amplifikation von HER2. Die höchste Inzidenz wurde beim Intestinalen Subtyp und bei den Tumoren des Gastroösophagealen Übergangs gefunden.

In der **KEYNOTE-811 Studie** (2018–2024) wird zurzeit zusätzlich der Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab in Kombination mit Trastuzumab+Chemotherapie mit einem Placebo+Trastuzumab+Chemotherapie verglichen. In mehreren Studien der letzten Jahre wurde untersucht, ob Trastuzumab möglicherweise die Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen erhöht.<sup>21</sup>

In der **GATSBY Studie** (2012–2013) wurde dann noch weiterführend eine Zweitlinientherapie für bereits vorbehandelte HER2-positive Patientinnen/Patienten mit Trastuzumab emtansine für fortgeschrittene, nicht resezierbare oder metastasierte Karzinome erforscht. Jedoch gelangte die Studie zu dem Ergebnis, dass der Antikörper keinen Vorteil gegenüber der Therapie mit Taxanen brachte. Zurzeit sind die therapeutischen Optionen dieser Patientinnen-/Patientengruppe stark limitiert.<sup>22</sup>

Die personalisierte Therapie des Magenkarzinoms befindet sich derzeit noch in der Entwicklung und es sind weitere Forschungsarbeiten und klinische Studien erforderlich, um die besten Ansätze und Biomarker zu ermitteln. Es wird erwartet, dass durch die Integration

verschiedener Ansätze in die klinische Praxis in Zukunft eine noch präzisere personalisierte Behandlung ermöglichen wird.



EBV: Epstein-Barr-Virus; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group; FGFR2: „fibroblast growth factor receptor 2“; HER2: „human epidermal growth factor receptor 2“; IHC: „immunohistochemistry“; ISH: In-situ-Hybridisierung; PD-L1: „programmed cell death ligand 1“; PS: Performance-Status

Abbildung 7: Therapiealgorithmus beim lokal fortgeschrittenen irresektablen oder metastasierten Magenkarzinom<sup>23</sup>

## 2.2. PD-1/PD-L1

### 2.2.1. PD-1 und PD-L1-Regulation und Funktion

**PD-1** (programmed cell death protein 1), ist ein transmembraner Rezeptor, welcher hauptsächlich auf aktivierten CD8-positiven T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) vorkommt und zur Gruppe der B7/CD28-Superfamilie gehört. Es spielt bei der Regulation

des Immunsystems eine wichtige Rolle und verhindert die Aktivierung von T-Zellen, indem es die Apoptose auslöst.

**PD-L1** (programmed death-ligand 1), ebenfalls ein Mitglied der B7-Familie, ist ein Oberflächenprotein und ebenfalls an der Modulation des Immunsystems beteiligt. Man findet es auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), Dendritischen Zellen und Makrophagen. Außerdem findet man PD-L1 auf einer Vielzahl von Tumorzellen.<sup>21,24,25</sup>

Die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1 ist einer der bedeutsamsten Mechanismen der Immunmodulation, da sie die Funktion von T-Zellen unterdrückt, indem sie die T-Zell-Erschöpfung induziert und so die Immuntoleranz fördert. Unter physiologischen Bedingungen kommt es bei der Bindung von PD-1 und PD-L1 zu einem inhibierenden Signal, welches den Körper vor der Entstehung einer Autoimmunkrankheit schützt. Diese Bindung trägt dazu bei, übermäßige, entzündliche Ausbreitungen zu unterbinden, indem sie Gewebeschäden auf den betroffenen Bereich lokalisiert.<sup>26</sup>

Krebszellen nutzen dieses System, um die durch T-Zellen induzierten apoptotischen Effekte zu umgehen. Dies nennt man Immunevasion. Die Überexpression von PD-L1 verursacht bei verschiedenen Krebsarten eine immunsuppressive Mikroumgebung des Tumors.<sup>12</sup> Antitumor-T-Zellen sind spezialisierte Immunzellen, die kontinuierlich, während der gesamten Karzinogenese bis hin zur Bildung von Metastasen, tumorassoziierte Antigene in der Mikroumgebung erkennen. Das Binden von PD-L1 an PD-1 inhibiert die Proliferation von tumorspezifischen T-Zellen, induziert die Apoptose, indem proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden, darunter Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Zytotoxine. Interessanterweise bewirkt die Freisetzung von IFN- $\gamma$  eine verstärkte Expression von PD-L1 in der Mikroumgebung, wodurch wiederum Tumorzellen vermehrt PD-L1 exprimieren. Durch das Verständnis dieser Mechanismen wird PD-1 und PD-L1 ein zunehmendes therapeutisches Ziel für die Immuntherapie.<sup>21,24,26,27</sup>

### 2.2.2. CPS und TPS-Scoring

Zur pathologischen Diagnostik der PD-L1 Expression bei Tumoren gehört die Immunhistochemie (IHC). Dabei werden sowohl PD-L1 auf dem Tumor selbst als auch die Tumordinfiltrierenden-Immunzellen, wie Makrophagen, und Lymphozyten beurteilt.<sup>28</sup>

Zurzeit werden zwei Scores zur Beurteilung des PD-L1 Status verwendet, der TPS (tumor proportion score) und der CPS (combined positive score).

Der **TPS** wird durch das prozentuale Verhältnis der PD-L1 präsentierenden Tumorzellen, bezogen auf alle vitalen Tumorzellen angegeben. Die Immunzellen der tumordinfiltrierenden Umgebung werden hierbei nicht berücksichtigt.<sup>12</sup>

Der **CPS** wird durch die Summe aller PD-L1 positiv-gefärbten Zellen, inklusive Tumorzellen, Makrophagen und Lymphozyten gebildet, dann durch die Gesamtanzahl der vitalen

Tumorzellen dividiert und zum Schluss mit 100 multipliziert. Der maximale Score liegt bei 100.<sup>12,28</sup>

Beide Scores werden ebenfalls als prädiktive Biomarker zur Verlaufsdiagnostik unter Immuntherapie verwendet. Der TPS wird zum Beispiel im Rahmen der immunhistochemischen Diagnostik beim Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) angewendet.<sup>29</sup> Der neuere CPS wird in der Diagnostik des Magenkarzinoms und des Gastroösophagealen Übergangs verwendet und hat den Vorteil, die Tumoringfiltrierenden-Immunzellen mitzubeurteilen. Dies wurde beispielsweise in der KEYNOTE-859 Studie bestätigt, in der Patientinnen/Patienten mit Magenkarzinom oder Karzinomen des Gastroösophagealen Übergangs und positiver PD-L1 Expression (CPS >1) von der Behandlung mit dem ICI Pembrolizumab profitierten, welche durch die Beurteilung mit dem TPS, durch einen niedrigeren Cut-Off Wert, nicht detektiert worden wären.<sup>29,30</sup>

Eine systematische Überprüfung und Meta-Analyse von 17 Phase-III-Studien, veröffentlicht in *JAMA Oncology* (Oktober 2022), untersuchte den Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression und dem Nutzen von Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) bei fortgeschrittenem gastroösophagealem Krebs. Die Ergebnisse zeigten, dass die PD-L1-Expression im Tumorgewebe der stärkste prädiktive Biomarker für den Überlebensvorteil durch ICI-Therapie bei Plattenepithelkarzinomen war. Bei Adenokarzinomen war PD-L1 der zweitstärkste Prädiktor nach MSI-Hochstatus.

Die Studie ergab, dass ein hoher PD-L1-Tumor-Proportion-Score (TPS) mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert war. Bei Adenokarzinomen war MSI-H der stärkste Prädiktor, während ein hoher Combined Positive Score (CPS) ebenfalls einen signifikanten Überlebensvorteil zeigte.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der PD-L1-Bestimmung im Tumorgewebe als prädiktiver Marker für die Effektivität von ICI-Therapien und belegen ihre Überlegenheit gegenüber anderen variablen Faktoren, mit Ausnahme von MSI-H bei Adenokarzinomen.<sup>31</sup>

Einige Medikamente haben sogenannte „Cut-Off“ Scores bezüglich der Zulassung.

In der Checkmate 649-Studie wurde die Kombination aus Nivolumab und Chemotherapie als Erstlinientherapie für Patientinnen/Patienten mit fortgeschrittenem Magenkrebs und gastroösophagealem Übergangskarzinom untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Überlebensvorteil insbesondere bei Patientinnen/Patienten mit einem PD-L1 Combined Positive Score (CPS)  $\geq 5$  signifikant war. In der Keynote 859-Studie wurde Pembrolizumab in Kombination mit Chemotherapie bei Patientinnen/Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Magenkrebs und gastroösophagealem Übergangskarzinom getestet. Die Studie verwendete einen PD-L1 CPS-Cut-Off von 1, 10 und 50. Der größte Überlebensvorteil wurde bei Patientinnen/Patienten mit einem CPS von 10 oder höher beobachtet. In diesen

Gruppen war Pembrolizumab besonders effektiv und führte zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate und des Ansprechens auf die Behandlung.<sup>29,30,32</sup>

### **2.2.3. Immuncheckpoint-Inhibitoren**

Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) gelten seit ihrer Entdeckung durch James Allison und Tasuku Honjo als Revolution der Krebstherapie und als großer „Durchbruch“ in der Onkologie.<sup>33</sup> ICIs werden derzeit unter anderem zur Behandlung des Melanoms, des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, des Urothelkarzinoms, des Hodgkin-Lymphoms und des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich eingesetzt.<sup>34-36</sup>

Für die oben genannten und eine Vielzahl weiterer Krebsarten wie Hepatozellulären- und Mammakarzinomen, dem kolorektalen Karzinom, dem Zervixkarzinom, dem Magenkarzinom und weiteren laufen derzeit verschiedene Studien, in denen unterschiedliche ICIs getestet, beziehungsweise bereits zugelassen wurden.<sup>25,26</sup> Zu den derzeit zugelassenen Checkpoint-Inhibitoren gehören zwei monoklonale Antikörper gegen PD-1 (Nivolumab und Pembrolizumab) und drei gegen PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab), sowie zwei ICIs gegen CTLA-4 (Tremelimumab und Ipilimumab).<sup>37</sup>

In einigen der Studien werden erfolgreiche Ergebnisse mit Langzeitüberleben präsentiert, die eine Tumorregression unter ICIs zeigen, teils in Monotherapien, teils in Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika, Strahlentherapie oder anderen Checkpointinhibitoren.<sup>25</sup>

In anderen Fällen zeigen sich die Grenzen der Therapie und niedrige Ansprechraten, die auf verschiedene Faktoren wie den einzelnen Tumortypen, das Fehlen bestimmter Biomarker, angeborene und erworbene Resistenzen und das Auftreten von Nebenwirkungen zurückzuführen sind.<sup>25,26,28</sup> Bisher liegt die klinische Ansprechrate bei der PD-1/PD-L1-Blockade bei nur 40%.<sup>38</sup> Diese Faktoren zu limitieren würde große Auswirkungen auf die Wirkung der PD-1/PD-L1 blockierenden Immuncheckpoint-Inhibitoren haben und die Überlebensraten der Patientinnen/Patienten erheblich steigern können.<sup>26</sup>

## Checkpoint-Inhibitoren - Wirkung und Zulassungsindikationen

Status	Wirkstoff	Zielstruktur	Indikation	Bemerkungen	Antibody-dependent cytotoxicity (ADCC)	Halbwertszeit (circa)
in der EU zugelassen	Ipilimumab	CTLA-4	Melanom	humanes IgG1	ja	15 Tage
	Nivolumab	PD-1	Melanom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, klassisches Hodgkin-Lymphom, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs, Urothelkarzinom	humanes IgG4	reduziert	25 Tage
	Pembrolizumab	PD-1	Melanom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, klassisches Hodgkin-Lymphom, Urothelkarzinom	humanisiertes IgG4	reduziert	26 Tage
	Avelumab	PD-L1	Merkelzellkarzinom	humanes IgG1	ja	6 Tage
	Atezolizumab	PD-L1	Urothelkarzinom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	engineered humanes IgG1	keine	27 Tage
in den USA zugelassen	Durvalumab	PD-L1	Lungenkrebs, Blasenkrebs, (Kopf-Hals-Tumoren)	engineered humanes IgG1	keine	18 Tage
	Cemiplimab (REGN2810)	PD-1	Plattenepithelkarzinom	humanes IgG4	reduziert	19 Tage
(noch) nicht zugelassen	Tremelimumab	CTLA-4	Melanom, Pleuramesotheliom	humanes IgG2		
	Urelumab, PF-2566	CD137/4-1BB	Glioblastom, Lymphom	humanisiertes IgG4, humanes IgG2		
	Relatlimab BMS-986016	LAG-3	Melanom, Glioblastom, Pankreaskarzinom, Lymphome	humanisiertes IgG4		
	Lirilumab	NK	Leukämie, Plattenepithelkarzinom	humanisiertes IgG4		
	AMG228, TRX518, MK-4166	GITR	solide Tumore	z. B. humanisiertes IgG1		

CTLA-4: „cytotoxic T-lymphocyte antigen-4“; GITR: „glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related protein“; IgG: Immunglobulin G; LAG-3: „lymphocyte activation gene 3“; NK: „natural killer“; PD-1: „programmed death 1“; PD-L1: „programmed death-ligand 1“

Abbildung 8: Checkpoint Inhibitoren-Wirkung und Zulassungsindikationen<sup>39</sup>

## 2.2.4. PD-L1 und Magenkarzinom

In den letzten zehn Jahren hat die Immuntherapie die onkologische Behandlung von Krebserkrankungen in allen Formen, einschließlich Magenkrebs, revolutioniert. Der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab hat bei bestimmten Patientinnen-/Patientengruppen mit fortgeschrittenem Magenkrebs dauerhafte Ansprechraten und Überlebensvorteile gezeigt. Im Jahr 2017 wurde die Monotherapie mit Pembrolizumab von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung von refraktärem metastasierendem Magenkrebs mit überexprimiertem PD-L1, sowie für refraktäre fortgeschrittene Tumoren mit defekter DNA-Mismatch-Reparatur/mikrosatelliteninstabiler (dMMR/MSI) oder hoher Tumor-Mutationslast (TMB) zugelassen. Allerdings haben mehrere Studien ohne Biomarker-Auswahl nur von einer begrenzten Wirksamkeit der Einzelimmuntherapie berichtet.<sup>40</sup>

In der **CheckMate 649 Studie** wurde Nivolumab plus Chemotherapie (XELOX/FOLFOX) vs. Chemotherapie als Erstlinientherapie bei fortgeschrittenem, HER2-negativem Magenkarzinom/Karzinom des Gastroösophagealen Übergangs/Ösophaguskarzinom, unabhängig vom PD-L1 Status getestet. Das Ergebnis zeigte zum ersten Mal eine längere

Progressionsfreiezeit (PFS) und ein erhöhtes Gesamtüberleben (OS) unter dem PD-1 Inhibitor Nivolumab in Kombination mit einem Chemotherapeutikum bei unbehandelten Patientinnen/Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom/Karzinom des Gastroösophagealen Übergangs/Ösophaguskarzinom.<sup>32</sup>

Derzeit bestehen in Deutschland Zulassungen für Immuncheckpoint-Inhibitoren in folgenden Indikationen:

1. Nivolumab in Kombination mit einer Fluoropyrimidin- und platinbasierten Kombinationschemotherapie zur Erstlinientherapie von HER2-negativen fortgeschrittenen oder metastasierten Adenokarzinomen des Magens und des Ösophagogastralen-Übergangs. Diese Therapie ist für Patientinnen/Patienten indiziert, deren Tumoren eine Expression von PD-L1 (Combined Positive Score [CPS]  $\geq 5$ ) aufweisen.
2. Pembrolizumab in Kombination mit einer Platin- und Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapie zur Erstlinientherapie des lokal fortgeschrittenen, nicht resezierbaren, oder metastasierenden HER2-negativen Adenokarzinoms des Ösophagogastralen-Übergangs bei erwachsenen Patientinnen/Patienten mit Tumoren, die PD-L1 (CPS  $\geq 10$ ) exprimieren.
3. Pembrolizumab als Monotherapie für die Behandlung von Magenkarzinomen bei erwachsenen Patientinnen/Patienten mit hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) oder einer defekten DNA-Mismatch-Reparatur (dMMR) nach mindestens einer vorherigen Therapie.

Diese Zulassungen basieren auf klinischen Studien und haben das Ziel, die Therapieoptionen für Patientinnen/Patienten mit diesen spezifischen Krebsarten zu erweitern.<sup>30,41-44</sup>

Bezogen auf die molekulare Klassifikation der TCGA erkennt man, dass PD-L1 besonders bei den Magenkarzinomen mit Epstein-Barr-Virus (EBV)-Positivität und Mikrosatelliteninstabilität (MSI) überexprimiert wird.<sup>45</sup> Ca. 8% der Magenkarzinome sind EBV-positiv, davon weisen aufgrund der entzündlichen Tumorumgebung mit einer hohen Dichte an CD8+ Lymphozyten und IFN $\gamma$ - ca. 50% der Tumorzellen und ca. 94% der umliegenden Immunzellen eine hohe PD-L1 Expression auf. Sie zeigen somit ein hohes Potential für Immuncheckpoint-Inhibitoren.<sup>40,46</sup> Die **KEYNOTE-61 Studie** lieferte beispielsweise klinische Evidenz, zur Bedeutung der EBV-Positivität als wichtigen Biomarker für die Wirksamkeit der Immuntherapie. In der Studie erzielten sämtliche Patientinnen/Patienten mit EBV-positivem Magenkarzinom, die Pembrolizumab erhielten, eine komplette oder partielle Remission. Angesichts dessen könnte EBV als prädiktiver Biomarker für die Therapie mit ICIs betrachtet werden.<sup>44</sup>

### **2.3. Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob der an endoskopisch gewonnenem Biopsiematerial bestimmte PD-L1-Status geeignet ist, den tatsächlichen PD-L1-Status des gesamten Tumors vorherzusagen.

Dabei haben wir uns folgende Fragen gestellt:

- Wie ist die räumliche Verteilung von PD-L1 innerhalb des Tumors?
- Sind die PD-L1-positiven Zellen möglicherweise so heterogen verteilt oder in tiefen Tumoranteilen akzentuiert (z.B. Invasionszone), die mit einer endoskopischen Biopsie nicht erreicht werden kann, sodass endoskopische Biopsien gar nicht in der Lage wären, die tatsächliche PD-L1-Expression des Gesamttumors wiedergeben zu können?
- Wie viele Biopsien sollten entnommen werden, um einen aussagekräftigen PD-L1 Status zu erheben?

### **3. Publikation**

„*Optimized PD-L1 scoring of gastric cancer*“, veröffentlicht am 05. Mai 2021 im Journal „Gastric Cancer“ (IF 7.4).



## Optimized PD-L1 scoring of gastric cancer

Birgid Schoemig-Markiefka<sup>2</sup> · Jana Eschbach<sup>2</sup> · Andreas H. Scheel<sup>2</sup> · Aylin Pamuk<sup>1</sup> · Josef Rueschoff<sup>4,5</sup> · Thomas Zander<sup>3</sup> · Reinhard Buettner<sup>2,5</sup> · Wolfgang Schroeder<sup>1</sup> · Christiane J. Bruns<sup>1</sup> · Heike Loeser<sup>2</sup> · Hakan Alakus<sup>1</sup> · Alexander Quaas<sup>2</sup>

Received: 8 February 2021 / Accepted: 26 April 2021  
© The Author(s) 2021

### Abstract

**Background** PD-1/PD-L1-Immunotherapy has been approved for gastric carcinoma. PD-L1 assessment by immunohistochemistry is the principle biomarker. Are biopsies able to map the actual PD-L1 status of the entire tumor?

**Methods** Whole tumor slides of 56 gastric carcinoma were analyzed to determine the distribution of PD-L1 positive cells in the entire tumor areas. Tissue micro arrays with four cores of the tumor surface, which represents the endoscopically accessible biopsy zone, were built from the same tumors. The PD-L1 CPS value was determined separately for each core. Preoperative diagnostic biopsies were available for 22 of the tumors. PD-L1 prevalence, sensitivity and specificity were analyzed using the whole tumor slides as reference scores. Molecular subtyping was performed and related to the PD-L1 status.

**Results** 27.3% of cases were PD-L1 negative (CPS < 1), 43.6% showed low PD-L1 expression (CPS ≥ 1 to < 5), 12.7% moderate (CPS ≥ 5 to < 10) and 16.4% strong expression (CPS ≥ 10).

The biopsies showed best test characteristics if four surface biopsies were analyzed combined, i.e., the CPS was calculated across all four biopsies. The prevalence showed a distribution similar to the resection specimens, sensitivity was 0.73 and specificity 1.0. Using fewer surface biopsies decreased sensitivity and specificity and caused false-negative classifications. Compared to the TMAs, the preoperative biopsies showed reduced sensitivity (0.412).

**Conclusions** This is the first comprehensive study to optimize PD-L1 assessment in gastric cancer using endoscopically available tissue. The obtained PD-L1 prevalence is consistent with data of current clinical studies. Calculation of the test characteristics shows that surface biopsies can be indicative of the true PD-L1 status based on the resection specimen. However, an adequate number of biopsies is required. In this study,  $n = 4$  biopsies yielded best results.

**Keywords** PD-L1 · Biomarker · Checkpoint inhibition · Gastric cancer · Endoscopically obtained · Biopsies

Birgid Schoemig-Markiefka, Jana Eschbach, Hakan Alakus and Alexander Quaas contributed equally.

✉ Alexander Quaas  
alexander.quaas@uk-koeln.de

<sup>1</sup> Department of General, Visceral, Cancer and Transplantation Surgery, University Hospital Cologne, Cologne, Germany

<sup>2</sup> Institute of Pathology, University Hospital Cologne, Kerpener Str. 62, 50937 Cologne, Germany

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Center for Integrated Oncology Aachen Bonn Cologne Duesseldorf, Gastrointestinal Cancer Group Cologne GCGC, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>4</sup> Institute of Pathology Nordhessen, Kassel, Germany

<sup>5</sup> Targos Molecular Pathology GmbH, Kassel, Germany

### Introduction

Immune checkpoint inhibition plays a decisive role in modern oncology. The PD-1 (programmed cell death 1) receptor and its ligand PD-L1 are physiologically involved in immunomodulation [1]. Many malignant tumors show aberrant PD-L1 expression on the carcinoma cells and/or tumor-associated immune cells [2]. PD-L1 overexpression is associated with interferon gamma signaling in the stroma [3], WNT/β-catenin and PIK3CA/PTEN signaling [4], Epstein-Barr Virus infection [5] and microsatellite instability (MSI) [2]. Clinical trials on PD-1 inhibition in gastric cancer (GC) were successful (CheckMate 649; Keynote-61) and anti-PD-1 antibodies have been approved for gastric adenocarcinoma [6] and esophageal squamous cell carcinoma. [7], [8] PD-L1 immunohistochemistry (IHC) is currently the

principle biomarker for immunotherapy and is predictive for both anti-PD-1 and anti-PD-L1 treatments. More biomarkers such as tumor mutational burden (TMB) and RNA-based expression analysis are investigated but not yet clinically employed [2, 4].

In GC, the EBV-positive and the MSI molecular subtypes are characterized by strong overexpression of PD-L1 in tumor, stromal and immune cells [9, 10]. Tumors with overexpression of PD-L1 were associated with a better prognosis analyzed in a group of Western patients while former studies with Asian patients showed a worse prognostic effect. The prognostic difference has been related to different genetic signatures [11].

A growing number of studies have been conducted to investigate immunotherapy-options for gastric cancer patients. Some studies tested single agent regimes, some ongoing trials evaluate combination approaches with chemotherapy and/or molecular targeted agents in different disease settings. Most studies test PD-L1 IHC as predictive biomarker, e.g., [12–14]. The most common type of interpretation is the IHC combined positive score (CPS) [15] which evaluates PD-L1 expression on carcinoma cells and tumor-associated immune cells. Different cut-off values are investigated (CPS 1, 5, 10). Generally speaking, a higher cut-off reduces the number of positive cases but increases clinical benefit.

GC is usually diagnosed by small endoscopic biopsies. IHC for Her2 and PD-L1 is often performed on the biopsy specimens, in particular in the neoadjuvant setting. PD-L1 expression shows spatial heterogeneity in most GC cases, yet little is known about the validity of PD-L1 scoring on GC biopsies. The aim of this study was to optimize PD-L1 assessment in GC. Four superficial and four deep biopsies were compared to matched resection specimens. Estimated prevalence, sensitivity and specificity were calculated for different conditions and an optimal procedure was determined.

## Methods

### Patients' samples

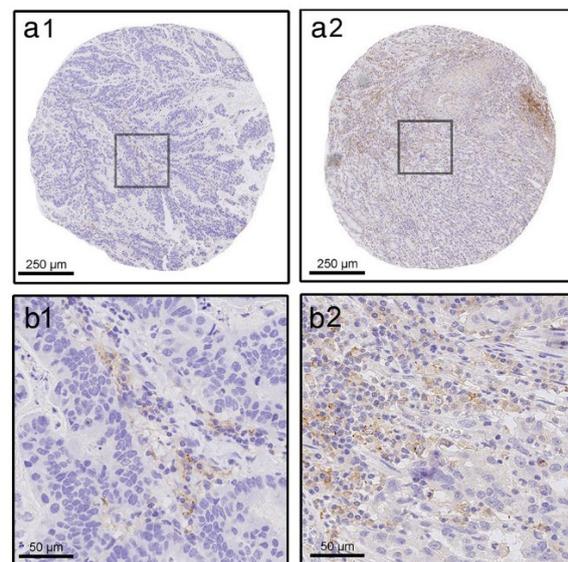
Formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) tissue from  $n = 56$  patients with gastric adenocarcinoma was analyzed including 56 resection specimens and 22 preoperative biopsies. Biomaterials and clinical data were used in agreement with the guidelines of the local ethics committee. The usage of the FFPE materials was consented. Patients were treated with primary surgical resection between 2016 and 2018 at the Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Germany.

### Tissue microarray construction

Tissue microarrays (TMAs) of the  $n = 56$  gastric adenocarcinoma were constructed as previously described [16, 17]. Two intratumoral regions per case were identified on H&E stained slides. Each region was sampled by four TMA cores with a diameter of 1.2 mm and an area of 1.13 mm<sup>2</sup>. (Supplementary Information (SI Fig. 1). The surface region represents the superficial, endoscopically accessible biopsy zone. The deep region represents the invasive front of the carcinoma, which is endoscopically unreachable. The regions were selected to contain viable tumor-cell formations and their adjacent stroma. Areas with alterations that are known to interfere with IHC were excluded, i.e., necrotic areas, fibrinous exsudate, detritus and areas with artificial fragmentation. TMA cores containing tonsil tissue were included as internal control and for spatial orientation. Example photomicrographs show representative TMA cores (Fig. 1) and one TMA slide (SI Fig. 2).

### Determination of molecular tumor subtypes according to TCGA

Molecular subtyping was performed according to the current WHO recommendations of 2019. The EBV subtype was determined using the specific RNA in-situ test “EBER” (PB0589, Leica, Germany). The MSI subtype was



**Fig. 1** PD-L1 immunohistochemistry. Examples of two tissue-microarray cores with PD-L1 immunohistochemistry (IHC) showing focal expression in tumor-associated immune cells (a) and widespread expression (b). Overview of the cores (1), magnified detail (2)

determined by IHC for mismatch repair deficiency (MMR) as recommended (mouse monoclonal primary antibodies: MLH1 clone M1, MSH2 clone G219-1129, PMS2 clone A16-4; rabbit monoclonal antibody: MSH6, clone SP93. All clones by Roche Diagnostics, Switzerland). IHC results indicative of MMR deficiency (d-MMR) were confirmed by PCR using the Bethesda panel. All d-MMR tumors were highly microsatellite-unstable (MSI-H).

The GS and CIN subtype, on the other hand, are less clearly definable. In the following, we refer to the GS subtype as “diffuse/CDH-type” if these tumors show a poorly cohesive and/or signet-ring cell growth pattern (= diffuse type according to Lauren). The IHC loss of E-cadherin (mouse monoclonal antibody, clone NCH-38, Dako/Agilent, USA) with a concomitant diffuse growth pattern and the absence of MSI or EBV were further arguments for the assignment to this subtype. The CIN subtype corresponded to all tumors that could not be assigned to the defined other subgroups (EBV, MSI, “diffuse/CDH-type”). These tumors typically showed the following characteristics: intestinal (glandular) morphology, TP53 alteration as determined by immunohistochemistry (mouse monoclonal antibody, clone DO-7, Dako/Agilent, USA) and more frequent Her2 alteration as determined by immunohistochemistry (rabbit monoclonal antibody, clone 4B5, Roche, Switzerland) and fluorescence in-situ hybridization for Her2/neu (Zytolight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Probe Kit; Zytomed Systems GmbH, Germany). In the following, we therefore refer to this subtype as the “intestinal type”.

### PD-L1 immunohistochemistry and scoring

PD-L1 immunohistochemistry was performed by a laboratory developed test (LDT) using primary antibody clone E1L3N (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) at 1:400 dilution on the Leica Bond Max staining platform (Leica Biotechnologies, Wetzlar, Germany). Antigen-retrieval was achieved by heat-induced antigen-retrieval with citrate buffer. Detection was done by the Bond Polymer Refine system (Leica Biotechnologies). The PD-L1 LDT was calibrated to match the staining patterns of the Agilent/Dako 22C3 pharmDx assay and validated by external quality assessment (QuIP GmbH, Berlin, Germany). Tonsil tissue was used as on-slide control on all PD-L1 IHC stainings. All samples in this study (resection specimens, diagnostic biopsies and TMAs) were stained using the same IHC protocol.

Scoring was done according to the Agilent/Dako 22C3 pharmDx assay for gastric cancer guidelines (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and the CPS was quantified as described by the manufacturer. Samples were independently scored by four board-certified and PD-L1 IHC trained pathologists and a consensus-score was calculated for each sample. Interobserver concordance was quantified

by Cohen’s weighted kappa coefficient (SI Table 1). Pairwise comparisons yielded kappa values of 0.42–0.74 for the biopsies (‘substantial’ according to the interpretation by Landis and Koch) [18] and 0.3–0.67 for the resection specimens (‘moderate’). The consensus scores showed kappa values of 0.54–0.84 for the biopsies and 0.56–0.74 for the resection specimens (‘substantial’).

### Statistical analyses

Data analyses were performed using Microsoft Excel version 2016 and ‘R’ statistical programming language version 3.6.2. ‘R’ package ‘psy’ was used for interobserver concordance analyses.

PD-L1 IHC scores of the resection specimens were considered as representative of the true PD-L1 status of respective tumors. The scores of the resection specimens were used as reference values in subsequent calculations of specificity and sensitivity.

The four superficial and the four deep tissue samples were integrated by calculating the average CPS value using the arithmetic mean. Integration using the maximum CPS value was tested, i.e., the highest CPS value of any of the four samples was used to classify the respective case. For comparisons of PD-L1 expression in the samples and resection specimens, the CPS was categorized into a four-step score (0–3) based on clinical relevant thresholds: 0 (CPS < 1), 1 (CPS 1–4), 2 (CPS 5–9), 3 (CPS ≥ 10). In the analyses of one, two or three biopsies per case, all possible permutations were incorporated.

## Results

### Tumor- und patient characteristics

The PD-L1 status was determined by immunohistochemistry using the combined-positive-score (CPS). First, whole tumor slides in  $n = 56$  patients with gastric adenocarcinoma were tested. In  $n = 22$  patients, preoperative diagnostic biopsies were available and also tested. The patients were treated with primary surgery without neoadjuvant chemotherapy. Second, corresponding TMAs of the same cases were tested that mimic tumor biopsies in size and location (Fig. 1, SI Figs. 2, 3) 58.9% of the patients were men and 91.1% were over 50 years old at the time of surgery. The majority of tumors were located proximally or in the gastric corpus (71.4%). The molecular tumor subtypes according to TCGA were dominated by the “intestinal type” (80.4%), followed by “diffuse/CDH-type” (10.7%), microsatellite unstable (MSI, 5.4%) and Epstein-Barr virus-associated subtype (EBV, 3.6%) (Table 1).

**Table 1** Patients' characteristics

		<i>n</i>	%
Sex	Male	33	58.9
	Female	23	41.1
Age	< = 50	5	8.9
	> 50	51	91.1
Localisation	Proximal	24	42.9
	Corpus	18	32.1
	Distal	12	21.4
	Stump	2	3.6
pT	pT1	14	25.9
	pT2	4	7.4
	pT3	21	38.9
	pT4	15	27.8
	Missing	2	
pN	pN0	20	36.4
	pN1	6	10.9
	pN2	12	21.8
	pN3	17	30.9
	Missing	1	
UICC	UICC 1	15	27.3
	UICC 2	10	18.2
	UICC 3	24	43.6
	UICC 4	6	10.9
	Missing		
TCGA	CIN	45	80.4
	GS	6	10.7
	MSI	3	5.4
	EBV	2	3.6

### Whole tumor areas

The PD-L1 scores of the resection specimens were regarded as true PD-L1 status of the cases and used as reference scores in the subsequent analyses. The resection specimens showed a roughly quartered PD-L1 distribution: About one quarter of cases was negative (CPS < 1; 27.3%), half of the cases showed low PD-L1 expression (CPS ≥ 1, < 5; 43.6%) and one quarter showed moderate to strong expression (CPS ≥ 5, < 10; 12.7% and CPS ≥ 10; 16.4%) (Fig. 2a, SI –Fig. 2).

### Molecular subtypes and PD-L1 expression

The distribution of PD-L1 expression differed among the molecular subtypes. As expected, all MSI type tumors were PD-L1 positive (3/3, 100%). One out of two EBV-associated tumors were PD-L1 positive (CPS 5), one negative (CPS < 1).

### Preoperative diagnostic biopsies

In *n* = 22 cases, preoperative diagnostic biopsies were available. The biopsies contained 1–8 tissue particles (mean 3.5, standard deviation 1.9). Twelve cases contained less < 4 tissue particles. On average, 70% of the particles contained carcinoma cells (SI Fig. 4). More than half of the cases was PD-L1 negative (CPS < 1; 59.1%), 22.7% showed low PD-L1 expression (CPS ≥ 1, < 5) and about 9% showed moderate to strong expression (SI Fig. 5). Compared to the matched resection specimens, sensitivity was reduced to 0.412. Ten out of 22 preoperative biopsies are false negative.

### Results of TMAs/biopsies

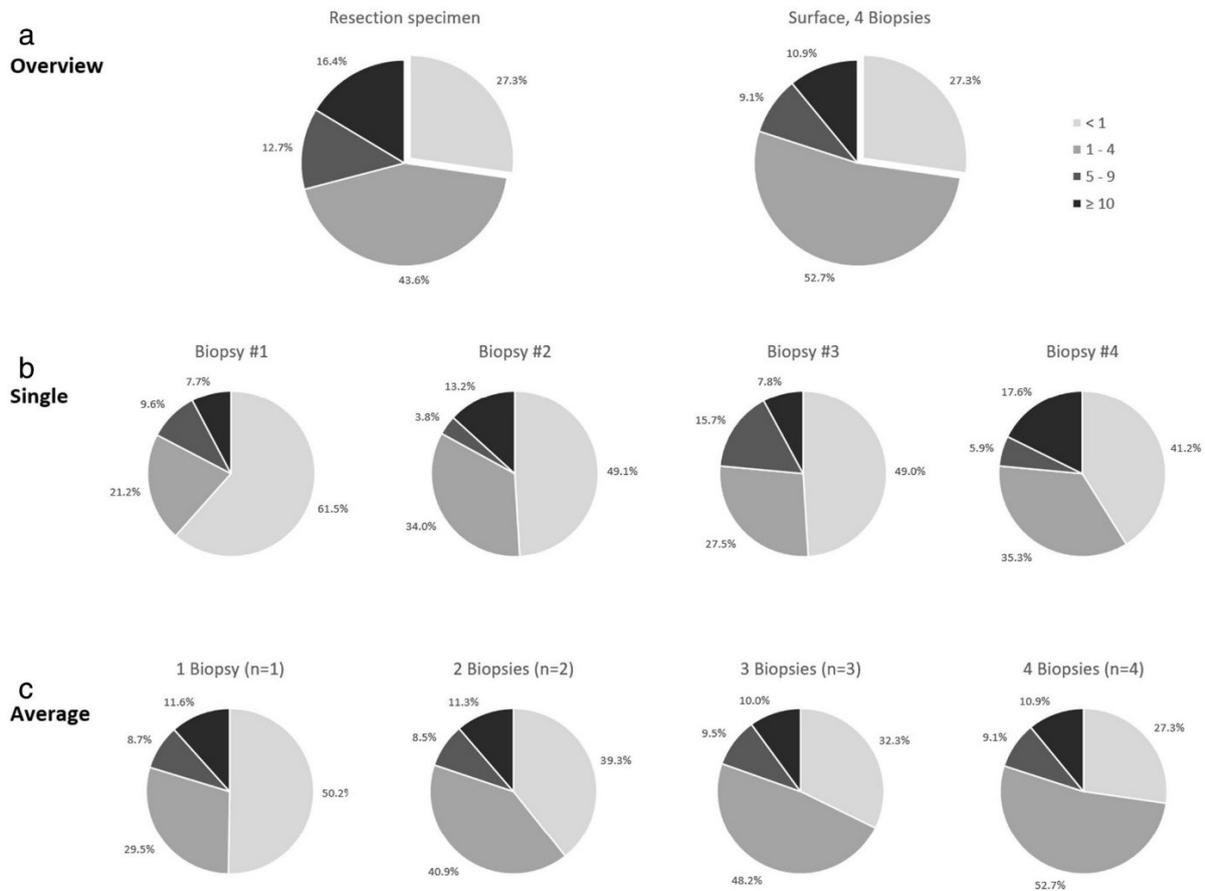
Analyses of the TMAs/substitute-biopsies showed PD-L1 expression mostly in tumor-associated immune cells and marked heterogeneity in the majority of cases (Figs. 1, 2; SI Figs. 2, 3). About two-thirds of positive cases showed low expression levels (CPS ≥ 1, < 5), which was unevenly distributed among the four biopsies. More widespread expression was detected in the surface biopsies (Fig. 2) compared to the deep biopsies (SI Fig. 3).

If only one surface biopsy is analyzed per case, the prevalence of PD-L1 expression is reduced compared to the resection specimen: About one third of cases is PD-L1 positive (CPS ≥ 1) compared to three quarters (Fig. 2b). Sensitivity (0.57) is low while the specificity is high (0.9).

If several biopsies are analyzed, different approaches to interpretation are possible. Here, two ways were investigated: maximum CPS value and average CPS value.

- In the maximum value analysis, the highest CPS value of any of the four samples is used to classify the respective case. The resulting prevalence data strongly deviated from the reference scores and indicated frequent overestimation (data not shown). Thus, this approach was rejected.
- In the average CPS analysis, the arithmetic mean of the four samples is used to classify the sample. The four biopsies are thus evaluated combined. This approach showed good agreement with the scores of the resection specimens (Fig. 2).

Analysis of multiple surface biopsies increases the prevalence of PD-L1 positive cases as well as sensitivity and specificity (Fig. 2c). One, two, three and four biopsies per case were compared. Using four biopsies yielded best results: The prevalence showed a distribution similar to the resection specimens (Fig. 2a). In detail, the number of cases with CPS ≥ 1 was virtually similar; moderately and strongly positive cases were slightly reduced. Accordingly, sensitivity



**Fig. 2** Distribution of PD-L1 expression in resection specimens and surface biopsies. **a:** Resection specimens vs. four biopsies (integrated by average score). **b:** Surface biopsies, single (one plot per biopsy). **c:** Surface biopsies, average of 1, 2, 3 and 4 biopsies

was 0.73 and specificity 1.0. If only two or three biopsies were used, the sensitivity dropped to 0.7 while the number of false-negative cases increased, including cases that were now classified as  $CPS < 1$ .

Deep biopsies of the invasion zone were less representative of the true PD-L1 status. Even four deep biopsies per case combined yielded only 46.5% positive cases ( $CPS \geq 1$ ) compared about three quarters if surface biopsies are used. Sensitivity was 0.5 and specificity 0.92 (SI Fig. 3).

## Discussion

PD-L1 immunohistochemistry is currently the only clinically approved predictive biomarker for immunotherapy. PD-L1 testing is performed by pathology laboratories using IHC assays and interpretation criteria defined in the approval documents of the respective therapeutic agents. In gastric cancer, most current studies assess PD-L1 with the 22C3

IHC-assay and combined positive score (CPS) interpretation. The PD-L1 CP-score correlates with an increased probability of a clinical benefit from PD-1 inhibition. In gastric cancer, CP-scores of  $\geq 1$  and  $\geq 5$  are associated with an increased probability of response to the PD-1 inhibitor Nivolumab (CheckMate 649 study, ESMO 2020).

The PD-L1 prevalence of the cases in this study are consistent with observations made in CheckMate 649 study concerning  $CPS \geq 1$ : (72.7% our finding, vs. 82% CheckMate), although significantly fewer tumors with moderate or high PD-L1 positivity were found ( $CPS \geq 5$ : 29.1% our finding vs. 60% CheckMate). Patient characteristics and molecular subtypes according to TCGA largely correspond to the expected distribution of a Western European patient population (Table 1). The proportion of microsatellite-unstable and EBV-positive tumors is slightly below the expected value (4.2% EBV and 10.5% MSI versus 9% and 22% in TCGA-collective) [19,20] Molecular subtype and PD-L1 prevalence were related and all MSI tumor were PD-L1 positive. One

out of two EBV-associated carcinoma was also PD-L1 positive (CPS 5).

In this study, a PD-L1 LDT using antibody clone E1L3N was used. The LDT was calibrated to match the staining patterns of the 22C3 pharmDx assay. Several PD-L1 harmonization studies have demonstrated that E1L3N can be used to set-up 22C3 pharmDx-equivalent LDTs [21–23]. All PD-L1 assessors in this study were specifically trained for PD-L1 CP-scoring.

The modalities of PD-L1 assessment were not uniform among the different clinical trials (e.g., CheckMate 649 or Keynote 61 study). The PD-L1 status was determined either on therapy-naïve biopsies or on surgical specimens after neoadjuvant treatment. In some cases, biopsies of hematogenous metastases in different organs were tested. The proportion of available vital tumor tissue also varies from case to case. Thus, it is unclear how many tumor-bearing biopsies are necessary for reliable PD-L1 determination.

This is the first study systematically addressing the clinically relevant question of whether PD-L1 status assessed on endoscopically obtained biopsy material is indicative of the actual PD-L1 status of the entire tumor. The following question needed to be addressed:

- How is the spatial distribution of PD-L1 within a given tumor? Are PD-L1 positive cells possibly so heterogeneously distributed that biopsy material may not be able to represent the actual PD-L1 expression?
- If several biopsies are available, how should the interpretation be performed?

A homogenous patient cohort was tested that included only non-pretreated and primarily non-metastatic adenocarcinoma of the stomach.

The available preoperative diagnostic biopsies showed a reduced PD-L1 prevalence compared to the resection specimens and a reduced sensitivity.

TMA of the resection specimen were constructed. Four TMA cores/biopsies were obtained from superficial, endoscopically accessible, non-necrotic tumor areas. TMA cores with a diameter of 1.2 mm correspond to the typical tumor cell content of an endoscopically obtained tumor biopsy. We assume that the chosen procedure reproduces a realistic clinical setting. To investigate spatial heterogeneity of PD-L1 expression, four additional biopsies were taken from the tumor depth, i.e., the level of deepest tumor infiltration. This area would not be reachable by endoscopic biopsies.

Comparisons of the CP-scores of the resection specimens and the TMA cores clearly demonstrate that surface biopsies are suitable to determine the true PD-L1 status. Surprisingly, TMA cores of the invasive front of the carcinoma were not representative and showed reduced sensitivity. However, an adequate number of surface biopsies is required to achieve

valid results. Here, the combined analysis of four surface biopsies yielded a PD-L1 distribution similar to the resection specimen and best test characteristics with a sensitivity of 0.733. Using fewer biopsies reduced sensitivity and would result in false-negative results in a clinical setting. If just one tumor-bearing biopsy was analyzed, the proportion of positive cases (CPS  $\geq 1$ ) would drop to 49.8% while the sensitivity would be 0.566. The proportion of false-negative samples would increase to 30.8% compared to 18.1% for four biopsies. The preoperative biopsies also showed reduced PD-L1 prevalence and sensitivity, which is likely related to the limited number of tissue particles per case.

Biopsies from endoscopically accessible tumor areas are thus able to provide a largely realistic picture of the overall PD-L1 status if at least four tumor-bearing biopsies are available for analysis. Presumably, however, a higher tumor biopsy number is reasonable. The results are a clear plea for the requirement of a minimum number of four tumor-bearing, endoscopically obtained biopsies for the determination of therapy-relevant biomarkers. For the second therapy-relevant biomarker of gastric carcinoma, Her2/neu, a minimum of five tumor-bearing biopsies is also required for reasons of heterogeneous distribution of Her2/neu within the tumor. It is also stated that the risk of false-negative tumors increases if the number of tumor-bearing biopsies falls below five [24–26].

The results of this study should be verified in studies using larger patient's cohorts, more than four biopsies and clinical response data. Here we used the PD-L1 scores of the resection specimens as true PD-L1 scores. However, the goal of PD-L1 IHC is prediction of response. Future studies should test the PD-L1 status of surface biopsies against the clinical benefit from PD-1 inhibition. Given the results of the present study, we would assume that more biopsies will improve the predictive value of PD-L1 testing in gastric cancer.

## Conclusion

Endoscopically obtained biopsies of gastric cancer can be indicative of the true PD-L1 status if sufficient material is sampled. In this first comprehensive study on PD-L1 assessment in gastric biopsies, an optimized procedure could be determined: If at least four biopsies with a total area of about 4.5 mm<sup>2</sup> are sampled and analyzed combined, results similar to resection specimens may be obtained. The positivity rate is virtually similar with a specificity of 1.0; the number of highly positive cases (CPS  $\geq 10$ ) is slightly reduced, 10.9% vs. 16.4%; the overall sensitivity is 0.73.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10120-021-01195-4>.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exper Med*. 2000;192(7):1027–34. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027> (PubMed PMID: 11015443; PubMed Central PMCID: PMC2193311).
- Huang RSP, Haberberger J, Severson E, Duncan DL, Hemmerich A, Edgerly C, et al. A pan-cancer analysis of PD-L1 immunohistochemistry and gene amplification, tumor mutation burden and microsatellite instability in 48,782 cases. *Modern Pathol Official J Academy Pathol*. 2021;34(2):252–63. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00664-y> (PubMed PMID: 32884129).
- Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, McMiller TL, Wei P, Pardoll DM, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):305. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0770-2> (PubMed PMID: 31730010; PubMed Central PMCID: PMC6858680).
- Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature Rev Cancer*. 2016;16(5):275–87. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36> (PubMed PMID: 27079802; PubMed Central PMCID: PMC5381938).
- Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, Iizasa H, Yoshiyama H, Yanagihara M, et al. EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer Official J Internat Gastric Cancer Assoc Japanese Gastric*. 2019;22(3):486–96. <https://doi.org/10.1007/s10120-018-0880-4> (PubMed PMID: 30264329).
- <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/getFile.cfm?setid=9333c79b-d487-4538-a9f0-71b91a02b287&type=pdf>
- <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/getFile.cfm?setid=f570b9c4-6846-4de2-abfa-4d0a4ae4e394&type=pdf>
- Akyala AI, Verhaar AP, Peppelenbosch MP. Immune checkpoint inhibition in gastric cancer: a systematic review. *J Cell Immunotherapy*. 2018;4(2):49–55. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2018.05.001>.
- Böger C, Behrens HM, Mathiak M, Krüger S, Kalthoff H, Röcken C. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. *Oncotarget*. 2016;7(17):24269–83 (PubMed PMID: 27009855; PubMed Central PMCID: PMC5029700).
- Derks S, Liao X, Chiaravalli AM, Xu X, Camargo MC, Solcia E, et al. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr virus-infected gastric cancers. *Oncotarget*. 2016;7(22):32925–32. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9076> (PubMed PMID: 27147580; PubMed Central PMCID: PMC5078063).
- Lin SJ, Gagnon-Bartsch JA, Tan IB, Earle S, Ruff L, Pettinger K, et al. Signatures of tumour immunity distinguish Asian and non-Asian gastric adenocarcinomas. *Gut*. 2015;64(11):1721–31. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308252> (PubMed PMID: 25385008; PubMed Central PMCID: PMC4680172).
- Li J, Zhang X-H, Bei S-H, Feng L. PD-1/PD-L1 antagonists in gastric cancer: current studies and perspectives. *World J Meta-Analy*. 2019;7:101–9. <https://doi.org/10.13105/wjma.v7.i3.101>.
- Stein A, Thuss-Patience P. Immunotherapy in esophagogastric adenocarcinoma. *Visceral Med*. 2019;35(1):12–6. <https://doi.org/10.1159/000497292> (PubMed PMID: 31312645; PubMed Central PMCID: PMC6597905).
- Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim KM, Odegaard JI, Kim K, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med*. 2018;24(9):1449–58. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0101-z> (PubMed PMID: 30013197).
- <https://www.agilent.com/en-us/pd-1-ihc-22c3-pharmdx-overview#intended>
- Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Methods Mol Med*. 2005;114:257–68. <https://doi.org/10.1385/1-59259-923-0-257> (PubMed PMID: 16156109).
- Helbig D, Ihle MA, Putz K, Tancheva-Poor I, Mauch C, Buttner R, et al. Oncogene and therapeutic target analyses in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas. *Oncotarget*. 2016;7(16):21763–74. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7845> (PubMed PMID: 26943575; PubMed Central PMCID: PMC5008321).
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74 (Epub 1977/03/01 PubMed PMID: 843571).
- Kohlruess M, Grosser B, Krenauer M, Slotta-Huspenina J, Jesinghaus M, Blank S, et al. Prognostic implication of molecular subtypes and response to neoadjuvant chemotherapy in 760 gastric carcinomas: role of Epstein-Barr virus infection and high- and low-microsatellite instability. *J Pathol Clin Res*. 2019;5(4):227–39. <https://doi.org/10.1002/cjp.2.137> (PubMed PMID: 31206244; PubMed Central PMCID: PMC6817827).
- Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*. 2014;513(7517):202–9. <https://doi.org/10.1038/nature13480> (PubMed PMID: 25079317; PubMed Central PMCID: PMC504170219).
- Adam J, Le Stang N, Rouquette I, Cazes A, Badoual C, Pinot-Roussel H, et al. Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Official J European Soc Med Oncol*. 2018;29(4):953–8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy014> (PubMed PMID: 29351573).
- Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, et al. A prospective, multi-institutional, pathologist-based assessment of 4 immunohistochemistry assays for PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(8):1051–8. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0013> (PubMed PMID: 28278348; PubMed Central PMCID: PMC5650234).
- Scheel AH, Baenfer G, Baretton G, Dietel M, Diezko R, Henkel T, et al. Interlaboratory concordance of PD-L1 immunohistochemistry for non-small-cell lung cancer. *Histopathology*. 2018;72(3):449–59. <https://doi.org/10.1111/his.13375> (PubMed PMID: 28851100).
- Lordick F, Al-Batran SE, Dietel M, Gaiser T, Hofheinz RD, Kirchner T, et al. HER2 testing in gastric cancer: results of a German expert meeting. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(5):835–41. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2374-x> (PubMed PMID: 28285403; PubMed Central PMCID: PMC5384945).

25. Tominaga N, Gotoda T, Hara M, Hale MD, Tsuchiya T, Matsubayashi J, et al. Five biopsy specimens from the proximal part of the tumor reliably determine HER2 protein expression status in gastric cancer. *Gastric Cancer Off J Internat Gastric Cancer Assoc Japn Gastric Cancer Assoc*. 2016;19(2):553–60. <https://doi.org/10.1007/s10120-015-0502-3> (**PubMed PMID: 25987463**; **PubMed Central PMCID: PMC4824804**). 2015;3(2):E165–70. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1391359> (**PubMed PMID: 26135662**; **PubMed Central PMCID: PMC4477016**).
26. Gullo I, Grillo F, Molinaro L, Fassan M, De Silvestri A, Tinelli C, et al. Minimum biopsy set for HER2 evaluation in gastric and gastro-esophageal junction cancer. *Endoscopy internat Open*.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 4. Diskussion

In den letzten zehn Jahren hat die Immuntherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren, die gegen PD1-PD-L1 gerichtet sind, einen enormen Fortschritt in der Behandlung unterschiedlicher Krebsarten erfahren. Eine entscheidende Komponente bei der Auswahl der Patientinnen/Patienten für diese Therapie ist die Bewertung des Oberflächenproteins PD-L1 im Tumorgewebe. Dieser Biomarker spielt eine zentrale Rolle bei der Vorhersage der therapeutischen Effektivität und ist Zulassungsvoraussetzung von Immuncheckpoint-Inhibitoren wie Nivolumab oder Pembrolizumab, auch bei Patientinnen/Patienten mit Magenkarzinomen. Mit Ausnahme der hohen Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), für die es in der zweiten Therapielinie eine Zulassung für Pembrolizumab gibt, ist die Ermittlung von PD-L1 im Tumorgewebe der entscheidende Biomarker. So ist in der Erstlinie Nivolumab durch die EMA ab einem CPS-Score ab 5 und Pembrolizumab ab einem CPS-Score von 1 zugelassen worden.<sup>15</sup> In den USA oder Japan gilt diese Biomarker-basierte Zulassung nicht. Die ICI-Therapeutika können dort unabhängig von PD-L1 Status appliziert werden. Eines der wesentlichen Gründe für die EMA-Entscheidung ist die in praktisch allen Studien nachweisbare Beziehung zum PD-L1-Gehalt und zur ICI-Therapieeffizienz, die sich zusammenfassen lässt mit den Worten: ‚viel PD-L1 im Tumor, viel Ansprechen‘. Es ist somit von entscheidender Bedeutung, dass das Tumormaterial, an dem dieser Biomarker bestimmt wird, in der Lage ist, ein realistisches Bild von der tatsächlichen biologischen Situation des Tumors zu vermitteln. Die Bestimmung eines falsch negativen Ergebnisses (der Tumor wäre aufgrund seines PD-L1-Gehaltes eigentlich sensibel auf eine ICI-Therapie, wird aber als PD-L1 negativ klassifiziert aufgrund insuffizienten Tumormaterials, das zur Testung zur Verfügung stand) würde die Patientinnen/Patienten um eine potenziell lebensverlängernde Therapie bringen. Die Bestimmung des PD-L1-Status basiert entweder auf der Auswertung von Operationspräparaten, was eine Operabilität der Patientinnen/Patienten voraussetzt, oder (häufiger) auf endoskopisch gewonnenem Biopsiematerial. Jedoch ist die aktuelle Datenlage hinsichtlich der Aussagekraft der Proben noch ungenau und verschiedene Fragestellungen bezüglich der Anzahl der Biopsieproben, der Auswertung, der Heterogenität innerhalb des Tumors und viele weitere machen die genaue Erfassung des PD-L1-Status zur Herausforderung. Es ist aber völlig unklar, ob endoskopisch gewonnenes Material in der Lage ist, ein realistisches Bild zu vermitteln. Unsere primäre Hypothese lautet demnach auch, dass Biopsiematerial dazu nicht in der Lage sei. Biopsien können nur oberflächliche Tumorareale erreichen; die tiefe Infiltrationszone, die häufig besonders entzündet ist, wird üblicherweise nicht erreicht. Wenn Biopsien das aber doch könnten, wie viele Biopsien sind dann dafür nötig? Reicht z.B. eine tumortragende Biopsie aus?

Wir analysierten eine homogene Patientinnen-/Patientenkohorte (n=56), bestehend aus unbehandelten und primär nicht hämatogen-metastasierten Adenokarzinomen des Magens. An den Resektionspräparaten wurde der PD-L1-Status des Gesamttumors erhoben (unsere „ground-truth“), in einem zweiten Schritt wurde ein Tissue Microarray (TMA) erstellt. Es wurden jeweils vier oberflächliche, endoskopisch zugängliche und nicht-nekrotische Tumorbereiche sowie zusätzlich vier tiefe, nicht endoskopisch zugängliche Biopsien mit einem Durchmesser von 1,2 mm aus dem Resektat entnommen und der PD-L1 Status erneut an diesem Biopsie-like Material erhoben. Die erneute Bestimmung des PD-L1 Wertes erfolgte verblindet zu den Ergebnissen der „ground-truth“.

Entgegen unserer Primärhypothese konnten wir zeigen, dass Oberflächenbiopsien eine geeignete Methode zur Bestimmung des tatsächlichen PD-L1-Status darstellen. Überraschenderweise erwiesen sich die tiefen TMA-Biopsien als nicht-repräsentativ und wiesen eine geringere Sensitivität auf.

Die kombinierte Analyse von vier Oberflächenbiopsien ergab eine PD-L1-Verteilung, die mit derjenigen der Resektionsprobe korrelierte. Diese Anzahl (n=4) zeigte die besten Testeigenschaften mit einer hohen Sensitivität. Die Reduktion der Anzahl von Biopsien führte zu einem Absinken der Sensitivität und zu falsch-negativen Ergebnissen.

Die zusätzlich verfügbaren präoperativen diagnostischen Biopsien (n=22; echte endoskopisch gewonnene Biopsien) wiesen nach PD-L1 Färbung und CPS-Bestimmung im Vergleich zu den Resektionspräparaten eine niedrigere PD-L1-Prävalenz und Sensitivität auf: Es hatte an dem echten Biopsiematerial durchschnittlich lediglich 3 tumortragende Biopsien zur Verfügung, was sehr gut zu den vorliegenden Ergebnissen passt.<sup>45</sup>

Hiermit können die Fragen bezüglich der repräsentativen Heterogenität und der benötigten Biopsieanzahl weitestgehend beantwortet werden: Der tatsächliche, tumorbiologisch relevante PD-L1-Wert ist über endoskopische Biopsien bestimmbar. Es sind dafür aber mindestens 4 tumortragende Biopsien nötig.

Als Limitation unserer Studie können wir anführen, dass die TMA-Stanzgröße nur bedingt mit der Größe der endoskopischen Biopsie korreliert. Ein Vorteil dieses Vorgehens ist, dass die TMA-Stanzen nur aus nicht-nekrotischen, tumorzellreichen Arealen entnommen wurden, so dass möglichst viele Tumorzellen und intertumorale Entzündungszellen zur PD-L1 Messung zur Verfügung standen. Dies ist eine Situation, die nicht der endoskopischen Realität entspricht, die häufig von nekrotischen Tumoranteilen oder spärlich erfassten Karzinomzellen geprägt ist. Die aktuelle deutsche S3-Leitlinie empfiehlt gleichermaßen die Entnahme von 10 Biopsien aus einem Tumor.<sup>8</sup>

Ein kurzer und in Zukunft möglicherweise alternativer Ansatz zur nicht-invasiven Bestimmung von PD-L1:

Die Liquid Biopsy (LB) ist eine vielversprechende, nicht-invasive diagnostische Methode zur Erkennung genetischer Veränderungen und spezifischer Tumor-Marker im Blut, die es ermöglicht, Tumorerkrankungen frühzeitig zu identifizieren, Therapien zu personalisieren und den Krankheitsverlauf zu überwachen, ohne invasive Gewebeentnahmen durchzuführen. Sie basiert auf der Analyse zellfreier DNA (cfDNA), zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA), zellfreier RNA, zirkulierenden Krebszellen (CTC), oder anderer molekularer Bestandteile im Blut.<sup>47,48</sup>

Die neuesten Studien zu Liquid Biopsy bei Magenkarzinomen haben gezeigt, dass die Analyse von PD-L1 im Blutplasma ein vielversprechender Biomarker für die Vorhersage des Ansprechens auf Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) sein kann. In einer Studie wurde festgestellt, dass zirkulierendes PD-L1 (bsPD-L1) in Kombination mit Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Plasma verwendet werden kann, um die Prognose von Patientinnen/Patienten mit Magenkrebs vorherzusagen. Hohe bsPD-L1- und MMP13-Spiegel waren mit einer schlechten Prognose verbunden, während niedrige MMP13-Spiegel in Verbindung mit bsPD-L1 eine bessere Prognose anzeigten. Zusätzlich wurde festgestellt, dass bsPD-L1-Expression stark mit den IFN- $\gamma$ -Spiegeln und der T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe korreliert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Analyse von bsPD-L1 nicht nur als Indikator für die Tumormasse, sondern auch für die Immunantwort dienen kann. Die dynamischen Veränderungen der bsPD-L1-Spiegel während der Behandlung könnten somit wertvolle Informationen über das Ansprechen auf ICIs liefern und zur Verbesserung der personalisierten Therapieansätze beitragen.<sup>49</sup>

PD-L1 wird üblicherweise an endoskopisch gewonnenen Tumorbiopsien ermittelt, wobei die Höhe des PD-L1-Wertes eine entscheidende Voraussetzung für die Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) darstellt. Diese Therapie kann das Leben der Patientinnen und Patienten verlängern, wie in den Studien Keynote 859 und Checkmate 649 gezeigt wurde. In der vorliegenden Arbeit ist untersucht worden, wie viele Biopsien erforderlich sind, um eine realistische Darstellung der tatsächlichen PD-L1-Expression des gesamten Tumors zu gewährleisten. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Minimum von vier tumortragenden Biopsien notwendig ist, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Sollte die Anzahl der entnommenen Biopsien unter diesem Minimum liegen und das PD-L1-Ergebnis negativ ausfallen, basiert dieses Ergebnis möglicherweise auf nicht-repräsentativem Material und es sind zusätzliche Biopsien erforderlich. Diese Erkenntnisse unterstreichen, dass die PD-L1-Bestimmung am Tumorgewebe der zentrale Schlüssel zur erfolgreichen Anwendung der ICI-Therapie ist.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; **71**(3): 209-49.
2. International Agency for Research on Cancer WHO. Global Cancer Observatory 2020, Cancer Fact Sheets. 2020, December.
3. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R, Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018; **10**: 239-48.
4. Krebsregisterdaten Zf. Zentrum für Krebsregisterdaten, Magenkrebs (Magenkarzinom), 2021, November 29. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Magenkrebs/magenkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Magenkrebs/magenkrebs_node.html) (zuletzt abgerufen am 10.11.2023).
5. Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer* 2004; **7**(2): 61-77.
6. Grad C, Grad S, Fărcaș RA, Popa S, Dumitrașcu DL. Changing trends in the epidemiology of gastric cancer. *Med Pharm Rep* 2023; **96**(3): 229-34.
7. Arnold M, Abnet CC, Neale RE, et al. Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterology* 2020; **159**(1): 335-49.e15.
8. Leitlinie S. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, 2019 AWMF Registernummer: 032/009OL. August 2019. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/magenkarzinom/> (zuletzt abgerufen am: 12.12.2023).
9. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 2017; **153**(2): 420-9.
10. Fan XG, Kelleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW. Helicobacter pylori increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut* 1996; **38**(1): 19-22.
11. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014; **513**(7517): 202-9.
12. Kim M, Seo AN. Molecular Pathology of Gastric Cancer. *J Gastric Cancer* 2022; **22**(4): 273-305.
13. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* 2020; **76**(2): 182-8.
14. Chen YC, Fang WL, Wang RF, et al. Clinicopathological Variation of Lauren Classification in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res* 2016; **22**(1): 197-202.
15. Florian Lordick S-EA-B, Dirk Arnold, Markus Borner, Christiane J. Bruns, Wolfgang Eisterer, Gerhard Faber, Ines Gockel, Dieter Köberle, Sylvie Lorenzen, Markus Möhler, Ron Pritzkeleit, Michael Stahl, Peter Thuss-Patience, Ewald Wöll, Thomas Zander. Onkopedia Leitlinie Magenkarzinom. 2024. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/magenkarzinom/@@guideline/html/ind ex.html> (zuletzt abgerufen am 03.06.2024).
16. © AMBOSS GmbH BuK, Germany. Therapie des Magenkarzinoms <https://next.amboss.com/de/article/-g0DB2?q=magenkarzinom&m=Z6YZjJ> (zuletzt abgerufen am 27.06.2024).
17. Onkopedia. Magenkarzinom, 03/2024. <https://www.onkopedia.com/s/Y3W7AR>, (zuletzt abgerufen am 03.06.2024).
18. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; **19**(9): 1523-9.
19. Van Cutsem E, Bang YJ, Feng-Yi F, et al. HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer* 2015; **18**(3): 476-84.
20. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or

- gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010; **376**(9742): 687-97.
21. Chaganty BKR, Qiu S, Gest A, et al. Trastuzumab upregulates PD-L1 as a potential mechanism of trastuzumab resistance through engagement of immune effector cells and stimulation of IFN $\gamma$  secretion. *Cancer Lett* 2018; **430**: 47-56.
  22. Thuss-Patience PC, Shah MA, Ohtsu A, et al. Trastuzumab emtansine versus taxane use for previously treated HER2-positive locally advanced or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (GATSBY): an international randomised, open-label, adaptive, phase 2/3 study. *The Lancet Oncology* 2017; **18**(5): 640-53.
  23. Ärzteblatt D. Dtsch Arztebl 2020; 117(33-34): [4]; DOI: 10.3238/PersOnko.2020.08.17.01
- SUPPLEMENT: Perspektiven der Onkologie.  
<https://www.aerzteblatt.de/callback/image.asp?id=108194> (zuletzt abgerufen am 17.01.2024).
24. Li J, Zhang X-H, Bei S-H, Feng L. PD-1/PD-L1 antagonists in gastric cancer: current studies and perspectives. *World J Meta-Anal* 2019; **7**(3): 101-9.
  25. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer* 2021; **12**(9): 2735-46.
  26. Wu M, Huang Q, Xie Y, et al. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J Hematol Oncol* 2022; **15**(1): 24.
  27. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer* 2019; **7**(1): 305.
  28. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2021; **18**(6): 345-62.
  29. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, et al. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2018; **143**(3): 330-7.
  30. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA Oncol* 2018; **4**(5): e180013.
  31. Yoon HH, Jin Z, Kour O, et al. Association of PD-L1 Expression and Other Variables With Benefit From Immune Checkpoint Inhibition in Advanced Gastroesophageal Cancer: Systematic Review and Meta-analysis of 17 Phase 3 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 2022; **8**(10): 1456-65.
  32. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021; **398**(10294): 27-40.
  33. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007; **19**(7): 813-24.
  34. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; **348**(6230): 56-61.
  35. Chen L, Wang L, Li X, Zhang G, Li Z, Wang Y. Clinic-Pathological Characteristics and Prognostic Value of PD-L1 and HER2 in Gastric Cancer. *DNA Cell Biol* 2021; **40**(2): 405-13.
  36. Zander H, Müller-Egert S, Zwiewka M, Groß S, van Zandbergen G, Engelbergs J. [Checkpoint inhibitors for cancer therapy]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2020; **63**(11): 1322-30.
  37. Vranic S, Gatalica Z. PD-L1 testing by immunohistochemistry in immuno-oncology. *Biomol Biomed* 2023; **23**(1): 15-25.
  38. Pitt JM, Vetizou M, Daille R, et al. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* 2016; **44**(6): 1255-69.
  39. Ärzteblatt D. Checkpoint-Inhibitoren, Dtsch Arztebl Int 2019; 116: 119-26; DOI: 10.3238/arztebl.2019.0119. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/205623> (zuletzt abgerufen am 17.01.2024).

40. Masetti M, Lindinger M, Lorenzen S. Programmed Cell Death Protein 1 Blockade Elicits Ongoing Remission in 2 Cases of Refractory Epstein-Barr Virus-Associated Metastatic Gastric Carcinoma. *Oncology Research and Treatment* 2022; **45**(6): 375-9.
41. Kang YK, Chen LT, Ryu MH, et al. Nivolumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in patients with HER2-negative, untreated, unresectable advanced or recurrent gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ATTRACTION-4): a randomised, multicentre, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2022; **23**(2): 234-47.
42. Brown J, Liepa AM, Bapat B, et al. Clinical management patterns of advanced and metastatic gastro-oesophageal carcinoma after fluoropyrimidine/platinum treatment in France, Germany, Spain and the United Kingdom. *European Journal of Cancer Care* 2020; **29**(2): e13213.
43. Chung HC, Bang YJ, C SF, et al. First-line pembrolizumab/placebo plus trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive advanced gastric cancer: KEYNOTE-811. *Future Oncol* 2021; **17**(5): 491-501.
44. Chao J, Fuchs CS, Shitara K, et al. Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability-High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials. *JAMA Oncol* 2021; **7**(6): 895-902.
45. Schoemig-Markiefka B, Eschbach J, Scheel AH, et al. Optimized PD-L1 scoring of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2021; **24**(5): 1115-22.
46. Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, et al. EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer* 2019; **22**(3): 486-96.
47. Lengyel CG, Hussain S, Trapani D, et al. The Emerging Role of Liquid Biopsy in Gastric Cancer. *Journal of Clinical Medicine* 2021; **10**(10): 2108.
48. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol* 2022; **15**(1): 131.
49. Ando F, Kashiwada T, Kuroda S, et al. Combination of plasma MMPs and PD-1-binding soluble PD-L1 predicts recurrence in gastric cancer and the efficacy of immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Front Pharmacol* 2024; **15**: 1384731.

## **6. Anhang**

### **6.1. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Molekulare Subtypen des Magenkarzinoms<sup>11</sup>

Abbildung 2: Therapie des Magenkarzinoms © AMBOSS GmbH, Berlin und Köln, Germany<sup>16</sup>

Abbildung 3: Algorithmus für die Primärtherapie<sup>17</sup>

Abbildung 4: Medikamentöse perioperative Therapie des Magenkarzinoms in den Stadien IB-III<sup>17</sup>

Abbildung 5: Algorithmus für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms<sup>17</sup>

Abbildung 6: Algorithmus für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Adenokarzinoms des Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs<sup>15</sup>

Abbildung 7: Therapiealgorithmus beim lokal fortgeschrittenen irresektablen oder metastasierten Magenkarzinom<sup>23</sup>

Abbildung 8: Checkpoint Inhibitoren-Wirkung und Zulassungsindikationen<sup>39</sup>

### **6.2. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms<sup>8</sup>

Tabelle 4: UICC-Stadien des Magenkarzinoms<sup>8</sup>