

## APPENDICES

### APPENDIX I. SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary table 1. TNM7 classification and staging (Goldstraw et al., 2007).

Occult Carcinoma	Tx	N0	M0
Stage 0	Tis	N0	M0
Stage IA	T1a,b	N0	M0
Stage IB	T2a	N0	M0
Stage IIA	T1a,b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stage IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stage IIIB	T4	N2	M0
	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1a,b

*T: Tumour size; N: lymph node involvement; M: metastasis.*

Supplementary Table 2. Patient characteristics description.

Total		N 201	% 100
Age	Median Range	65 26-85	
Sex	Female Male	29 172	14,4 85,6
Smoking Status	Current Former Never	96 83 24	47,3 40,9 11,8
Performance Status (PS)	0 1 2	135 68 1	66,2 33,3 0,5
Tumour size	< 3cm 3 - 5cm 5 - 7cm > 7cm	87 67 29 18	43,3 33,3 14,4 9
Lymph node involvement	Yes No	52 149	25,9 74,1
Stage	1-A 1-B 2-A 2-B 3-A	43 61 35 22 40	21,4 30,3 17,4 10,9 19,9
Histology	SCC ADC Others	93 88 20	46,3 43,8 10
Differentiation degree	Poor Moderate Well NS	48 83 34 36	29,1 50,3 20,6
EGFR Mutational Status	Mutated Wild-type NS	12 89 100	11,9 88,1
KRAS Mutational Status	Mutated Wild-type NS	22 146 33	13,1 86,9
Adjuvant chemotherapy (post-surgery)	Yes No NS	73 123 5	37,2 62,8
Relapse	Yes No	84 117	41,8 58,2
Exitus	Yes No	114 87	56,7 43,3

\*SCC: Squamous cell carcinoma ADC: Adenocarcinomas, NS: Not specified

Supplementary Table 3. Gene correlation analysis results.

		PD-L1	PD-L2	CD200	CD5	CD6	ICOS-LG	IDO-1	IDO-2
PD-L1	Coeficiente de correlación	1	,502(**)	,330(**)	,496(**)	,482(**)	,372(**)	,150(*)	,312(**)
	Sig. (bilateral)	.	0	0	0	0	0	0,038	0
	N	198	198	198	197	198	197	190	197
PD-L2	Coeficiente de correlación	,502(**)	1	,599(**)	,600(**)	,665(**)	,554(**)	,242(**)	,549(**)
	Sig. (bilateral)	0	.	0	0	0	0	0,001	0
	N	198	200	200	199	200	199	192	199
CD200	Coeficiente de correlación	,330(**)	,599(**)	1	,531(**)	,560(**)	,617(**)	-0,027	,396(**)
	Sig. (bilateral)	0	0	.	0	0	0	0,708	0
	N	198	200	200	199	200	199	192	199
CD5	Coeficiente de correlación	,496(**)	,600(**)	,531(**)	1	,901(**)	,541(**)	,207(**)	,654(**)
	Sig. (bilateral)	0	0	0	.	0	0	0,004	0
	N	197	199	199	199	199	198	191	198
CD6	Coeficiente de correlación	,482(**)	,665(**)	,560(**)	,901(**)	1	,621(**)	,184(*)	,636(**)
	Sig. (bilateral)	0	0	0	0	.	0	0,011	0
	N	198	200	200	199	200	199	192	199
ICOS-LG	Coeficiente de correlación	,372(**)	,554(**)	,617(**)	,541(**)	,621(**)	1	-0,061	,438(**)
	Sig. (bilateral)	0	0	0	0	0	.	0,404	0
	N	197	199	199	198	199	199	191	198
IDO-1	Coeficiente de correlación	,150(*)	,242(**)	-0,027	,207(**)	,184(*)	-0,061	1	,396(**)
	Sig. (bilateral)	0,038	0,001	0,708	0,004	0,011	0,404	.	0
	N	190	192	192	191	192	191	192	191
IDO-2	Coeficiente de correlación	,312(**)	,549(**)	,396(**)	,654(**)	,636(**)	,438(**)	,396(**)	1
	Sig. (bilateral)	0	0	0	0	0	0	0	.
	N	197	199	199	198	199	198	191	199

\*\* Correlation is significant at 0,01 level (bilateral). \* Correlation is significant at 0,05 level (bilateral).

## APPENDIX II. COMMUNICATIONS DERIVED FROM THIS STUDY

### Abstract SEOM 2017 (Submitted)

#### ESTABLECIMIENTO DE UNA FIRMA DE GENES INMUNOREGULADORES CON VALOR PRONÓSTICO EN ESTADIOS TEMPRANOS DE ADENOCARCINOMAS DE PULMÓN.

Andrea Moreno Manuel<sup>1</sup>, Eloisa Jantus Lewintre<sup>1, 2, 3</sup>, Alejandro Herreros Pomares<sup>1</sup>, Susana Torres Martinez<sup>1</sup>, Silvia Calabuig-Fariñas<sup>1, 2, 4</sup>, Rafael Sirera<sup>2, 3</sup>, Ana Blasco<sup>2, 5</sup>, Carlos Camps<sup>1, 2, 5, 6</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Oncología Molecular, Fundación Investigación Hospital General Universitario de Valencia; <sup>2</sup> CIBERONC; <sup>3</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia; <sup>4</sup> Departamento de Patología, Universitat de València; <sup>5</sup> Servicio de Oncología Médica, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia; <sup>6</sup> Departamento de Medicina, Universitat de València

#### Introducción y objetivos

El adenocarcinoma (ADC) es uno de los subtipos de cáncer de pulmón más frecuente. El estudio de la evasión de la vigilancia inmune en el microambiente tumoral ha dado lugar al desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Este trabajo se centra en el análisis de genes inmunoreguladores como posibles biomarcadores pronóstico.

#### Materiales y métodos

Se utilizó una cohorte de 88 pacientes con ADC en estadios resecables. Se analizó la expresión de 8 genes relacionados con la regulación inmune (*PD-L1*, *PD-L2*, *IDO-1*, *IDO-2*, *ICOS-LG*, *CD5*, *CD6* y *CD200*) mediante RTqPCR en muestras pareadas de tejido normal y tumoral, y se calculó la expresión relativa utilizando la fórmula de Pfaffl. La supervivencia se determinó mediante análisis de regresión de Cox. Se consideraron significativos aquellos análisis en que  $p < 0,05$ , y se representaron mediante curvas Kaplan-Meier (test log-rango) tras dicotomizar los datos tomando la mediana como valor de corte.

#### Resultados

La cohorte de pacientes se caracterizó por una mediana de edad de 65 años y buen estado funcional (PS=0) en un 77% de los pacientes. Se observó una tendencia de mejor supervivencia global (SG) y mejor supervivencia libre de enfermedad (SLE) en aquellos pacientes con altos niveles de expresión de *PD-L1*, *IDO-1* e *IDO-2*. Se creó una firma de expresión basada en la expresión matemática:  $0.179 * PD-L1 + 0.173 * IDO-1 + 0.097 * IDO-2$ . Los pacientes con altos niveles de expresión de la firma presentaban mejor SG (29,83 vs NA meses;  $p=0.0002$ ) y SLE (17,867 vs NA meses;  $p=0.001$ ). El análisis multivariante confirmó que la firma es un biomarcador pronóstico independiente para SG (HR=0,267 [0,113-0,630];  $p=0.003$ ) y SLE (HR=0,274 [0,126-0,593];  $p=0,001$ ).

#### Conclusión

El análisis del perfil inmunológico de muestras resecadas de ADC ha permitido establecer una firma de genes reguladores como biomarcador pronóstico independiente para SG y SLE en estadios tempranos de ADC de cáncer de pulmón no microcítico.

Financiado con fondos FEDER, PI12-02838 y PI15-00753 del ISCIII.

## Abstract ESMO 2017 (Submitted)

### **ANALYSIS OF IMMUNOREGULATORY BIOMARKERS IN EARLY STAGES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

Moreno Manuel<sup>1</sup>, S. Calabuig Fariñas<sup>2,3</sup>, A. Herreros Pomares<sup>1</sup>, S. Gallach Garcia<sup>2</sup>, F. Aranda<sup>4</sup>, A. Blasco<sup>5</sup>, E. Carreras<sup>4</sup>, F. Lozano<sup>4,6,7</sup>, A. Cunquero Tomas<sup>8</sup>, M. Martorell<sup>9,10</sup>, E. Jantus-Lewintre<sup>2,11</sup>, C. Camps Herrero<sup>1,5,12</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Oncología Molecular, Fundación para la Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, ES; <sup>2</sup>Laboratorio de Oncología Molecular, Fundación para la Investigación, Hospital General Universitario de Valencia - CIBERONC; <sup>3</sup> Departamento de Patología, Universitat de València, Valencia, ES; <sup>4</sup>Immunoreceptors of the Innate and Adaptive System, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i sunyer, Barcelona, ES; <sup>5</sup>Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario de Valencia-CIBERONC, Valencia, ES; <sup>6</sup>Servei d'Immunologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, ES; <sup>7</sup> Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, ES; <sup>8</sup>Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, ES; <sup>9</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital General Universitario de Valencia; Valencia, ES; <sup>10</sup> Departamento de Patología, Universidad de Valencia, Valencia, ES; <sup>11</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, ES; <sup>12</sup> Departamento de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, ES

**Introduction:** The study of the tumour microenvironment is leading to a better understanding of the evasion of immune surveillance and the development of new therapies. This research focuses on the analysis of immunoregulatory genes as potential prognostic biomarkers in resectable non-small cell lung cancer (NSCLC).

**Materials and methods:** The expression of 8 genes involved in immune-regulation (*PD-L1*, *PD-L2*, *IDO-1*, *IDO-2*, *ICOS-LG*, *CD5*, *CD6* and *CD200*) was analysed by RTqPCR in 257 paired fresh frozen tumour and normal tissue samples of resected NSCLC. Relative expression was calculated by Pfaffli formulae using *ACTB*, *CDKN1B* and *GUSB* as endogenous controls. Non-parametric tests were used for correlations between clinico-pathological and analytical variables and survival was assessed by Kaplan-Meier curves (long rank-test), considering significant  $p < 0.05$ .

**Results:** Patient's median age was 64 years, 82% were males, 88% were former or current smokers, 47% were adenocarcinomas (ADC). Patients with higher expression of *CD5* and *IDO-2* had a significant increase in overall survival (OS, 53.3 vs NR months,  $p=0.032$ ; 51.9 vs NR months,  $p=0.049$ , respectively). A signature combining the expression of *CD5* and *IDO-2* was able to better prognosticate survival (40.4 vs NR months,  $p=0.028$ ). The multivariate analysis (including clinico-pathological and analytical variables) showed that this signature has independent prognostic information OS (HR=0.553 [0.344-0.887],  $p=0.016$ ).

Moreover, in the subgroup of ADC increased expression of *CD5* and *IDO-2* was associated with longer OS as well as increased relapse-free survival (RFS, 19.1 vs NR months,  $p=0.045$ ; 18.8 and 67.0 months,  $p=0.029$ , respectively). The multivariate analysis established this gene signature as an independent prognostic biomarker for OS (HR=0.380 [0.166-0.872];  $p=0.026$ ) and RFS (HR=0.288 [0.139-0.597];  $p=0.002$ ).

**Conclusion:** The analyses revealed the prognostic value of *CD5* and *IDO-2*, being their combination an independent prognostic marker in resectable NSCLC.

Supported by grants from FEDER and PI12-02838 and PI15-00753 from ISCIII.