

---

*REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT*

**Strategii pentru  
optimizarea utilizării  
terapiei biologice în  
practica clinică în  
carcinoamele  
bronhopulmonare și  
impactul pandemiei  
COVID-19**

---

*Doctorand: Alexandra-Cristina PREDA*

---

*Conducător de doctorat: Prof. Dr. Tudor-Eliade CIULEANU*

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

**INTRODUCERE**.....

**STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**.....

*1. Carcinoamele bronhopulmonare: noțiuni de epidemiologie, istorie naturală, management „într-o coajă de nucă”. Impactul pandemiei COVID-19 asupra managementului cancerului pulmonar*..... 7

*1.1. Date epidemiologice*..... 7

*1.2. Clasificarea histopatologică*..... 8

*1.3. Istoria naturală*..... 9

*1.4. Screeningul carcinoamelor pulmonare*..... 9

*1.5. Elemente privind modalitățile și rezultatele tratamentului*..... 9

*1.6. Impactul pandemiei COVID-19 asupra managementului cancerului pulmonar. Date de epidemiologie a infecției iCOVID-19*..... 10

*1.7. Grupele de risc pentru o evoluție nefavorabilă a infecției COVID-19*..... 11

*1.8. Factori protectori față de infecția COVID-19*..... 11

*1.9. Infecția COVID-19 la pacienții oncologici*..... 12

*1.9.1. Factori de prognostic pentru evoluția COVID-19 la pacienții oncologici*..... 12

*1.9.2. Profilaxia și tratamentul COVID-19*..... 13

*2. Rolul imunoterapiei cu inhibitori ai punctelor de control imun în tratamentul sistemic al NSCLC avansate*..... 15

*2.1. Terapie de linia întâi la pacienții NSCLC fără mutații driver, cu expresie PD-L1 pozitivă*..... 15

*2.1.1. Monoimunoterapie*..... 15

*2.1.2. Imunoterapia duală*..... 16

2.2. Terapie de linia întâi la pacienții NSCLC fără mutații driver, indiferent de expresia PD-L1.....	17
2.2.1. NSCLC non-scuamos.....	17
2.2.2. NSCLC scuamos.....	17
2.2.3. Toate subtipurile histologice de NSCLC, indiferent de expresia PD-L1.....	17
2.3. Terapie de linia întâi la pacienții NSCLC fără mutații driver, indiferent de expresia PD-L1, având contraindicații pentru imunoterapie.....	18
2.3.1. Carcinoame non-scuamoase.....	18
2.3.2. Carcinoame scuamoase.....	19
2.3.3. Status de performanță $\geq 2$ la pacienți fără mutații driver.....	19
2.3.4. Pacienți în vârstă, fără mutații driver.....	19
2.4. Terapie de întreținere.....	20
2.4.1. Întreținerea de continuare (“continuation maintenance”).....	20
2.4.2. Întreținerea secvențială (“switch maintenance”).....	20
2.4.3. Terapie de întreținere dublă.....	20
2.5. Terapie de salvare la pacienți fără mutații driver.....	20
3. Medicina personalizată, diagnosticul molecular și modalități de terapie moleculară țintită.....	23
3.1. Metode de detecție a biomarkerilor moleculari.....	23
3.2. Terapie cazurilor cu mutații conducătoare.....	24
3.2.1. Mutații EGFR.....	26
3.2.2. Rearanjările genei ALK.....	28
3.2.3. Rearanjările ROS1.....	29
3.2.4. Mutații ale BRAF.....	30

3.2.5. Fuziuni NTRK.....	30
3.2.6. Modificările MET.....	30
3.2.7. Modificările RET.....	31
3.2.8. Mutațiile KRAS.....	31
3.2.9. Mutațiile HER2.....	31
3.2.10. Alte ținte acționabile.....	31

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....**

4. Scop și obiective.....	35
5. Studiul 1. Impactul infecției COVID-19 asupra pacienților oncologici.....	39
5.1. Introducere.....	39
5.2. Obiective.....	39
5.3. Pacienți și metodă.....	40
5.4. Rezultate.....	42
5.5. Discuții.....	55
5.6. Concluzii.....	59
6. Studiul 2. Utilizarea unor strategii diferite de combinare a inhibitorilor PD-1 pentru imunoterapia de linia întâi a carcinoamelor non-microcelulare avansate.....	61
6.1. Introducere.....	61
6.2. Scop și Obiective.....	62
6.3 Pacienți și Metode.....	63
6.3.1 Citerii de includere și excludere, cadrul de desfășurare.....	63
6.3.2. Proceduri.....	63
6.3.3. Analiza statistică.....	65
6.4. Rezultate.....	66

6.4.1. Caracteristicile pacienților și tratamentul efectuat.....	66
6.4.2. Supraviețuirea globală.....	69
6.4.3. Supraviețuirea fără progresia bolii.....	73
6.4.4. Răspunsul tumoral.....	78
6.4.5. Tratament dincolo de progresie.....	82
6.4.6. Tratamente ulterioare.....	82
6.4.7. Supraviețuitori de lungă durată.....	83
6.4.8. Toxicitatea.....	83
6.5. Discuții.....	84
6.5.1. Peisajul combinațiilor de imunoterapie.....	84
6.5.2. Motivația combinațiilor de imunoterapie - mecanismele complementare de acțiune.....	84
6.5.3. Scopul și limitele studiului.....	85
6.5.4. Supraviețuirea globală, supraviețuirea fără progresie și supraviețuitorii pe termen lung.....	85
6.5.5. Analiza univariată și multivariată a factorilor de prognostic.....	87
6.5.6. Statusul de performanță.....	87
6.5.7. Vârsta.....	88
6.5.8. Corticosteroizi.....	89
6.5.9. Raportul neutrofile-limfocite.....	91
6.6. Concluzii.....	91
7. Studiul 3. Aportul testării genomice comprehensive (NGS) pentru terapia personalizată a pacienților având carcinoame bronhopulmonare non-microcelulare avansate.....	93
7.1. Introducere.....	93

7.2. Obiective.....	93
7.3. Pacienți și metode.....	94
7.3.1 Design.....	94
7.3.2 Criteriile de includere.....	95
7.3.3 Criteriile de excludere.....	95
7.3.4. Descrierea testului NGS.....	95
7.3.5 Testarea PD-L1.....	97
7.3.6. Metode statistice.....	97
7.4 Rezultate.....	97
7.4.1 Pacienți și testarea NGS.....	97
7.4.2 Anomaliile genetice găsite per total (F1CDx din țesut la diagnostic + F1LCDx din sânge la diagnostic + F1LCDx din sânge la progresie).....	98
7.4.3 Anomaliile genetice găsite la diagnostic în testarea F1CDx din țesutul tumoral + F1LCDx din sânge.....	104
7.4.4. Anomalii genetice găsite la diagnostic (baseline) cu testarea F1CDx din țesutul tumoral.....	104
7.4.5. Anomaliile genetice găsite la baseline (diagnostic) în biopsia lichidă (F1LCDx din sânge).....	105
7.4.6. Anomaliile genetice găsite la progresie în biopsia lichidă (F1LCDx din sânge).....	105
7.4.7. Frecvența mutațiilor la diagnostic versus progresie.....	105
7.4.8. Anomalii genetice găsite la baseline în biopsia de țesut și/ sau lichidă în funcție de histologie.....	106
7.4.9 Anomalii genetice găsite la baseline (țesut și/sau sânge) în funcție de fumat.....	108
7.4.10. Mutații acționabile găsite și aplicații clinice.....	110

7.4.11. Expresia PD-L1 în țesutul tumoral la baseline.....	112
7.4.12. Situații particulare	113
7.5. Discuții.....	114
7.6. Concluzii.....	123
8. Concluzii generale.....	125
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....	127

## REFERINȚE.....

### Cuvinte cheie:

carcinom bronhopulmonar non-microcelular (NSCLC) avansat, COVID-19, imunoterapie, terapie personalizată, next generation sequencing (NGS).

## LISTA DE PUBLICAȚII

### Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Preda A, Ciuleanu T, Kubelac P, Todor N, Bălăcescu O, Achimaș-Cadariu P, Iancu D, Mocan C, Bandi-Vasilica M, Lușe M, Briciu VT, Man MA, Vlad C. Outcomes of patients with cancer infected with SARS-CoV-2: results from the Ion Chiricuță Oncology Institute series. *ESMO Open* 2022;7(2):100423. ISI, Factor de impact 7.1 (cuprins în studiul 1, partea de contribuții personale).
2. Preda AC, Ciuleanu TE, Todor N, Vlad C, Iancu DI, Mocan C, Mariana-Bandi V, Albu F, Todor-Bondei IM, Hapca M, Kubelac MP, Kubelac-Varro AD. Use of Different Anti-PD-1 Checkpoint Combination Strategies for First-Line Advanced NSCLC Treatment - the Experience of Ion Chiricuta Oncology Institute. *Cancers* 2024;16:2022 <https://doi.org/10.3390/cancers16112022>. ISI, Factor de impact 4.5, (cuprins în studiul 2, partea de contributii personale).
3. Preda AC, Todor N, Cârlan B, Kubelac-Varro AD, Iancu DI, Mocan C, Mariana Bandi Vasilica M, Kubelac MP, Vlad C, Ciuleanu TE. Prospective Upfront Next-Generation Sequencing for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Outcomes from the Ion Chiricuta Oncology Institute. *Int J Mol Sci* 2025;26:3403 <https://doi.org/10.3390/ijms26073403>. ISI, Factor de impact 4.9 (cuprins în studiul 3, partea de contributii personale).

## INTRODUCERE

Deși continuă să rămână o provocare adresată lumii medicale, progresele făcute în managementul cancerului pulmonar în ultimele două decenii sunt evidente.

Supraviețuirea mediană este de 3-6 ori mai lungă în cazurile NSCLC metastatice, dacă se face apel la cele mai noi metode de testare moleculară pentru identificarea cazurilor „oncogene driven” care beneficiază de terapii moleculare țintite, și a celor „non-oncogene driven”, care beneficiază de aportul imunoterapiei cu inhibitori ai punctelor de control imun. Managementul pacienților oncologici a fost îngreunat de pandemia COVID-19. Toate cele trei studii propuse pentru a fi realizate în cadrul lucrării doctorale au urmărit definirea unor strategii de ameliorare a managementului NSCLC avansate, rezultatele lor fiind publicate în reviste cu impact pentru practica oncologică (ESMO Open, Cancers, International Journal of Molecular Sciences).

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Cancerul pulmonar a fost responsabil, conform GLOBOCAN 2022 pentru 10.530 de decese în România, reprezentând 18,7% din totalul deceselor cauzate de cancer, menținându-și astfel poziția de cea mai letală formă de cancer. După o dezvoltare inițială, în primul deceniu al secolului XXI rezultatele chimioterapiei au început să plafoneze. Apariția terapiei moleculare țintite în primul deceniu și a imunoterapiei în al doilea deceniu au adus o dezvoltare terapeutică fără precedent. Supraviețuirea mediană este astăzi de 3-6 ori mai lungă în NSCLC metastatice, dacă se face apel la testarea NGS pentru identificarea cazurilor „oncogene driven” care beneficiază de terapii moleculare țintite, și a celor „non-oncogene driven”, care beneficiază de aportul imunoterapiei.

Pe durata pandemiei COVID-19, o parte a progreselor au fost umbrite de lock-down, care a redus capacitatea diagnostică a cancerelor pulmonare în stadii incipiente, cât și de gravitatea virozei în sine, care a complicat evoluția și tratamentele cancerelor pulmonare. Pacienții oncologici au fost desemnați de organizațiile internaționale ca reprezentând o populație vulnerabilă cu risc mai mare de a contracta SARS-CoV-2 și de a avea un deznodământ clinic sever. Asupra factorilor de prognostic în cazul pacienților oncologici care contractează COVID-19, datele diferitelor serii din literatură contemporană pandemiei au fost uneori discordante.

Imunoterapia cu inhibitori ai punctelor de control imun a surclasat chimioterapia, fără să existe însă comparații randomizate între diferiții inhibitori ai punctelor de control imun. Imunoterapia inițială se poate administra ca monoterapie (pembolizumab, atezolizumab sau cemiplimab) la cazurile cu expresie înaltă a PD-L1. Imunoterapia poate fi administrată în combinație cu chimioterapia (conform studiilor KeyNote-189, 407, IMpower-130, 150, EMPOWER-Lung-3 și POSEIDON) sau cu o altă imunoterapie (conform studiilor CheckMate-227, 9LA și POSEIDON). Pentru cazurile „non-oncogene-driven”, imunoterapia a devenit o componentă obligatorie în absența unor contraindicații. Studiile de înregistrare au raportat 20% supraviețuitori la 5 ani.

ASCO, NCCN sau ESMO recomandă o analiză genomică comprehensivă atât la momentul diagnosticului inițial cât și la progresie. Markerii acționabili în cazul carcinoamelor non-microcelulare (cu predilecție non-scuamoase), sunt EGFR, ALK, ROS1, BRAF, NTRK, MET, RET, KRAS G12C, HER2. Pentru alte ținte moleculare identificabile în carcinoamele pulmonare (ex. BRCA, PIK3CA, AKT, NF1, FGFR2B, etc.) există terapii autorizate în cazul altor tumori. Testarea comprehensivă NGS a devenit disponibilă (cu rezultate pentru EGFR, ALK, ROS1, RET, NTRK) prin Programul Național de Oncologie începând cu 2024.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### Studiul 1: Impactul infecției COVID-19 asupra pacienților oncologici

**Scop / Obiective:** Obiectivul general al cercetării a fost studiul relației reciproce între patologia oncologică și gravitatea infecției COVID-19 grefată la pacientul oncologic.

Obiectivele specifice au fost identificarea și ierarhizarea, prin metodele analizei univariate și multivariate, a factorilor de prognostic corelați cu (i) evoluția la formele moderate și severe/critice ale infecției, (ii) agravarea clinică (definită ca forme severe/critice sau deces) și (iii) supraviețuirea generală.

Obiectivul principal al acestei analize a fost acela de a caracteriza gravitatea bolii (procentul de pacienți care au dezvoltat forma moderată și severă/critică, respectiv agravarea bolii spre o formă severă/critică sau deces și factorii de prognostic pentru o astfel de progresie). Obiectivele secundare au fost supraviețuirea după infecție și elemente descriptive, cum ar fi simptomele bolii și tratamentele primite.

**Material și metode:** Am examinat datele clinice a 341 de pacienți cu cancer, cu un test RT-PCR SARS-CoV-2 pozitiv între aprilie 2020 și februarie 2021, în epoca prevaccinării.

Scopul principal a fost de a caracteriza la diagnostic factorii de prognostic pentru (i) evoluția la formele moderate și severe/critice ale infecției, (ii) agravarea clinică (definită ca forme severe/critice sau deces) și (iii) supraviețuirea generală. Inițial, a fost efectuată o analiză univariată pentru a fi identificați factorii de prognostic folosind testele chi-pătrat și logrank. În analiza multivariată, s-au folosit modelul logistic și modelul Cox.

**Rezultate:** În timpul infecției, 40,5% dintre pacienți au rămas asimptomatici, 27,6% au dezvoltat o formă ușoară, 20,5% au avut o formă moderată și 11,4% o formă severă/critică de COVID-19 care a dus la deces în 7,6% din cazuri. Tratamentul a fost adaptat la severitatea bolii conform ghidurilor naționale. În seria noastră, incidența infecției cu COVID-19 a fost mai mică la pacienții cu cancer comparativ cu populația generală ( $p < 0,001$ ), cu toate acestea, rata mortalității a fost mai mare la pacienții cu cancer în comparație cu populația generală (7,6% față de 2,9%,  $p < 0,001$ ). În analiza multivariată, factorii de prognostic asociați cu evoluția către o manifestare clinică moderată sau severă/critică au fost: starea de performanță (PS) ( $p < 0,0001$ ) și niciun tratament activ în ultimele 3 luni ( $p = 0,031$ ). Factorii asociați cu agravarea clinică au fost: PS ( $p < 0,0001$ ), boala arterială periferică ( $p = 0,03$ ) și boala hepatică cronică ( $p = 0,04$ ). Factorii asociați cu supraviețuirea globală afectată au fost PS ( $p < 0,0001$ ), cardiopatia ischemică ( $p = 0,0126$ ), hepatopatia cronică ( $p = 0,001$ ) și radioterapia ( $p = 0,0027$ ).

**Concluzii:** Seria noastră confirmă o evoluție mai severă a infecției COVID-19 la pacienții cu cancer, având statusul de performanță ca cel mai proeminent factor de prognostic în toate cele trei analize multivariate. Prin screening activ, s-au făcut eforturi pentru a menține unitățile de cancer, cel puțin parțial, ca sanctuare lipsite de coronavirus.

### Studiul 2. Utilizarea unor strategii diferite de combinare a inhibitorilor PD-1 pentru imunoterapia de linia întâi a carcinoamelor non-microcelulare avansate

**Purpose/Objectives:** Various combinations of an anti-PD-1/PD-L1 agent and platinum-based chemotherapy or another checkpoint inhibitor (with or without a short course or full course of platinum doublet) have been shown to be superior to chemotherapy alone in several clinical trials, but these strategies have not been directly compared. The aim of

this study is to report real-world data results with different immunotherapy combinations that included a PD-1 inhibitor in a series of patients treated in consecutive cohorts at the Ion Chiricuță Institute of Oncology.

**Material și metode:** Un total de 122 de pacienți au fost înrolați succesiv în trei cohorte: (1A) nivolumab + ipilimumab (18 pacienți), (1B) nivolumab + ipilimumab + chimioterapie de scurtă durată (33 de pacienți) și (2) pembrolizumab plus chimioterapie completă (71 de pacienți). Au fost analizați parametrii de eficacitate (OS, PFS, ORR) și factorii de prognostic (legați de pacient, de caracteristicile bolii, de markerii biologici și de tipul de tratament), prin metode statistice consacrate.

**Rezultate:** Urmărirea mediană în cohortele consecutive 1A, 1B și 2 a fost de 83 față de 59 față de 14,2 luni. Mediana OS și PFS pentru toți pacienții au fost de 22,2 și, respectiv, 11,5 luni, iar OS și PFS actuariale la 2 ani au fost de 49% și, respectiv, 35%. Pentru combinațiile nivolumab + ipilimumab (cohortele 1A și 1B luate împreună) versus pembrolizumab (cohorta 2), OS mediană a fost de 14 vs. 24,8 luni ( $p=0,18$ ) și supraviețuirea actuarială la 2 ani 42% vs. 53%. PFS mediană a fost de 8,6 vs. 12,7 luni ( $p=0,41$ ) și PFS actuarială la 2 ani 34% vs. 35%. Ratele de răspuns au fost de 33,3% față de 47,9% ( $p=0,22$ ). Vârsta înaintată, PS afectată (2 versus 0-1), corticoterapia în prima lună de imunoterapie și raportul neutrofile/limfocite  $>3,81$  au fost factori independenți de prognostic nefavorabil în analiza multivariată a supraviețuirii (limitată la 2 ani de urmărire). Supraviețuirea pe termen lung pe 5 ani a fost de 30,5% și 18,8% pentru cohortele 1A și, respectiv, 1B (pentru cohorta 2 acest parametru nu a putut fi calculat din cauza urmăririi mai scurte a acestei cohorte la momentul prelucrării datelor).

**Concluzii:** Rezultatele de eficacitate folosind diferite strategii combinate de imunoterapie au fost promițătoare și nu au existat diferențe semnificative la 2 ani între protocoalele utilizate. Eficacitatea reală și rezultatele pe termen lung din seria noastră au fost în conformitate cu cele raportate în studiile de înregistrare corespunzătoare.

### **Studiul 3. Aportul testării genomice comprehensive (NGS) pentru terapia personalizată a pacienților având carcinoame bronhopulmonare non-microcelulare avansate**

**Scop / Obiective:** Analiza comprehensivă genomică inițială (NGS) este din ce în ce mai recomandată în NSCLC avansat pentru a ghida terapia țintită. Acest studiu prospectiv uni-instituțional din România a evaluat efectuarea NGS în NSCLC avansat la momentul inițial (țesut și/sau lichid) și la progresie (lichid).

**Material și metode:** FoundationOne NGS (țesut/lichid) a fost efectuat la 119 pacienți consecutivi cu NSCLC în stadiul IV, împreună cu imunohistochimie PD-L1 (IHC, SP263). Biopsia lichidă a fost repetată la progresie. Au fost evaluate timpul de răspuns pentru rezultatele NGS, prevalența țintelor acționabile și utilitatea clinică.

**Rezultate:** Pacienții au fost predominant bărbați (68,1%), cu o vârstă medie de 62 de ani (interval 30-86). Majoritatea au avut ECOG PS 0-1 (79%) și histologie non-scuamoasă (67,2%). Nefumătorii au reprezentat 25,2%. TAT median pentru rezultatele NGS a fost de 9 zile (interval 5-21). În total, 671 de modificări genetice au fost detectate în 149 de gene. Numărul mediu de mutații distincte per pacient a scăzut de la 5,6 la momentul inițial la 4,3 la progresie. Probele de țesut au evidențiat mai multe alterații genetice (6/pacient) decât biopsiile lichide inițiale (4,6/pacient). Tumorile scuamoase au avut mai multe modificări față de cele non-scuamoase (7,1/pacient vs. 4,8/pacient), iar numărul mutațiilor la fumători l-a depășit pe cel al nefumătorilor (6/pacient vs. 4,5/pacient).

Mutațiile TP53 au fost cele mai frecvente (70,59%). Variante acționabile au fost găsite la 74,8% dintre pacienți, deși doar 35,3% au primit terapie personalizată, în mare parte din cauza deteriorării stării de performanță, lipsei rambursării sau a absenței unui studiu clinic adecvat. Țintele comune în tumorile non-scuamoase au inclus EGFR (21%), KRAS G12C (11%), NF1 (11%) și ERBB2 (6%); în tumorile scuamoase, ținte comune au inclus NF1 (24%), PIK3CA (18%) și ERBB2 (8%). Printre fumători, cele mai frecvente mutații driver au fost NF1 (15%), PIK3CA (11%), KRAS G12C (9%) și ERBB2 (8%); nefumătorii au fost dominați de mutații ale EGFR (45%), NF1 (15%) și KRAS G12C (8%). TMB $\geq$ 10 mut/Mb a fost observat la 26,9%. Niciun pacient nu a fost MSI-H. PD-L1 TPS a fost  $<1\%$  la 33% dintre pacienți, 1-49% la 20%,  $\geq 50\%$  la 18% și necunoscut la 29%.

**Concluzii:** Analiza NGS efectuată la baseline oferă date genomice cuprinzătoare, obținute rapid, ghidând atât terapiile standard cât și orientarea către trialuri clinice personalizate în NSCLC avansat. Rebiopsia lichidă la progresie rafinează și mai mult deciziile de tratament.

## CONCLUZII GENERALE

1.1. Primul studiu al tezei a căutat să transforme perioada pandemiei în oportunitatea de a studia interferențele biunivoce între cancer și infecția concomitentă cu virusul SARS-CoV-2. În seria Institutului Oncologic Cluj-Napoca, mortalitatea infecției cu COVID-19 a fost mai mare în rândul pacienților cu cancer în comparație cu populația generală.

1.2. Analiza multivariată a evidențiat următorii factori de prognostic independenți pentru evoluția infecției COVID-19 la pacienții neoplazici:

-absența tratamentului oncologic specific în ultimele 3 luni (prognostic pentru evoluția spre formă moderată sau severă/critică a COVID-19),

-comorbiditățile de tip arteriopatie cronică obstructivă a membrilor, hepatopatie cronică (prognostice pentru agravarea clinică, definită ca evoluție spre forme severe/critice și/sau deces),

-comorbiditățile de tip cardiopatie ischemică, hepatopatie cronică, cât și radioterapia efectuată în cele 3 luni anterioare infecției (prognostice pentru supraviețuirea generală la infecția COVID-19).

1.3. Statusul de performanță deteriorat (PS ECOG 2-4) a fost singurul factor predictiv independent în toate analizele multivariate efectuate, legat atât de o evoluție către o formă moderată sau severă/critică, o agravare spre formă severă/critică și/sau deces, cât și de o supraviețuire afectată de infecția COVID-19.

2.1. Al doilea studiu doctoral a analizat rezultatele obținute prin combinarea unui inhibitor al punctului de control PD-1 în tratamentul sistemic de primă linie al NSCLC avansat cu a). o altă imunoterapie (anti-CTLA4), cu sau fără chimioterapie de scurtă durată (2 cicluri), sau b). un regim complet de chimioterapie (4 cicluri).

2.2. Aceste combinații au demonstrat o supraviețuire globală și supraviețuire fără progresie comparabilă cu cele observate în studiile de referință, marcând un avans semnificativ în comparație cu chimioterapia exclusivă. Medianele OS și PFS pentru toți pacienții au fost de 22,2 și 11,5 luni, iar OS și PFS actuariale la 2 ani au fost de 49% și 35% în populația intention-to-treat.

2.3. Cele două modalități de a combina imunoterapia anti-PD-1 au arătat rezultate similare în OS și PFS la doi ani, într-o comparație nerandomizată. Combinațiile între pembrolizumab și chimioterapia standard au avut un avantaj numeric față de imunoterapia duală cu nivolumab și ipilimumab (+/- chimioterapie scurtă), dar nesemnificativ statistic.

2.4. Datele referitoare la imunoterapia duală indică prezența supraviețuitorilor pe termen lung, cu procente de 30,5% și 18,8% la 5 ani, în cele două cohorte monitorizate.

2.5. Analiza multivariată a identificat ca factori de prognostic nefavorabili pentru supraviețuirea globală: statusul de performanță ECOG 2 (față de 0-1), vârsta înaintată, utilizarea precoce a corticoidelor și un raport crescut între neutrofile și limfocite (>3,81).

3.1. Al treilea studiu susține utilizarea testării genetice NGS la diagnostic (biopsie de țesut sau/și lichidă) și la progresie (biopsie lichidă). Beneficiile includ:

- a) rezultate rapide (mediana 9 zile),
- b) detectarea mai multor mutații acționabile pentru terapia moleculară țintită,
- c) orientarea pacienților către studiile clinice disponibile și viitoare.

3.2. În lipsa unei cantități suficiente de țesut inițial, biopsia lichidă a furnizat informații fiabile despre modificările genetice. Repetarea biopsiei lichide la progresie a oferit o imagine dinamică asupra acționabilității modificărilor genetice.

3.3. S-au găsit 671 de modificări genetice în 149 de gene la cei 119 pacienți testați cu FoundationOne la diagnostic și progresie.

3.4. Numărul mediu de modificări genetice a scăzut de la diagnostic la progresie.

3.5. Mai multe mutații au fost identificate în biopsia tisulară inițială comparativ cu biopsia lichidă, în NSCLC scuamos versus non-scuamos și la fumători versus nefumători.

3.6. Cele mai frecvente modificări au fost la gena TP53 (70,59% din pacienți), considerată un factor de prognostic negativ.

3.7. FoundationOne a identificat modificări acționabile la 74,8% dintre pacienți, dar doar 35,3% au primit tratamentul personalizat corespunzător, din cauza deteriorării stării de sănătate, lipsei rambursării și absenței unui studiu clinic adecvat.

3.8. S-au observat diferențe între categoriile histologice și statusul de fumător/nefumător în ceea ce privește mutațiile tratabile medicamentos. S-au descris căi distincte de oncogeneză, implicând gene conducătoare diferite în carcinoamele non-scuamoase față de cele scuamoase, precum și la nefumători comparativ cu fumătorii.

3.9. Expresia PD-L1 TPS a fost negativă la 33% din pacienți, moderată la 20%, înaltă la 18% și necunoscută la 29%. Toți pacienții au prezentat stabilitate

microsatelitară (MSS), iar 26,9% au avut o încărcătură mutațională înaltă (TMB high). Informațiile despre TMB și PD-L1 sunt completare pentru indicația imunoterapiei.

3.10. Studiul doctoral concluzionează că utilizarea tehnicilor genetice NGS contribuie semnificativ la managementul pacienților. Aceste tehnici, aplicate atât pe biopsii tisulare cât și lichide, pot permite selecția unor tratamente moleculare țintite eficiente și a modalităților optime de imunoterapie pentru carcinoamele care nu au oncogene conducătoare.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Studiile care au stat la baza acestei teze de doctorat au adus o contribuție inovatoare în cercetarea oncologică din România:

-Studiul 1: Constituie o primă serie românească de pacienți oncologici (n=341) cu infecție concomitentă COVID-19 în perioada prevaccinală, la care s-a realizat o analiză complexă (uni- și multivariată) a factorilor de prognostic pentru evoluția formelor infecției, agravarea acesteia și supraviețuirea la episodul infecțios. Date din acest capitol au constituit subiectul unor articole publicate în 2021 [210] și 2022 [142] în revista ESMO Open (ISI, IF=7,1).

-Studiul 2: Constituie prima analiză uni- și multivariată asupra rezultatelor unor combinații diferite de imunoterapie în linia întâi de tratament în NSCLC avansate, realizată într-o instituție românească de profil (n=122 pacienți). Studiul este original prin comparația academică realizată între cohorte de pacienți tratate cu combinații de imunoterapie diferite (cu molecule realizate de producători diferiți), care nu au șansa unei comparații directe în studii head-to-head sponsorizate de către firmele farmaceutice. Rezultatele pot servi clinicienilor în argumentarea selecției terapiei. Date din cel de-al doilea studiu al cercetării doctorale au constituit subiectul unui articol publicat în 2024 în revista Cancers (ISI, IF=4,5; 5-years IF=4,9) [211].

-Studiul 3: Reprezintă primul studiu românesc care a analizat prin NGS, la diagnostic și la progresie, o serie reprezentativă de pacienți (n=119) cu NSCLC avansat. Studiul aduce argumente pentru testarea NGS la toți pacienții cu NSCLC avansat, datorită rapidității și cantității de informații oferite, utile în selectarea tratamentului molecular țintit sau orientarea către chimioimunoterapie sau către trialuri clinice. Studiul este relevant prin analiza moleculară comprehensivă care a identificat genele conducătoare în carcinogeneza carcinoamelor pulmonare non-scuamoase versus scuamoase și la nefumători versus fumători. Datele au fost publicate în 2025 în International Journal of Molecular Sciences (ISI, IF=4,9; 5-years IF=5,6) [212].





*SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS*

# **Strategies for optimizing the use of biological therapy in clinical practice in bronchopulmonary carcinomas and the impact of the COVID-19 pandemic**

---

*PhD candidate: Alexandra-Cristina PREDA*

---

*Doctoral Supervisor: Prof. Dr. Tudor-Eliade CIULEANU*

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

## CONTENTS

### INTRODUCTION.....

### CURRENT STATE OF KNOWLEDGE.....

<i>1. Bronchopulmonary carcinomas: epidemiology, natural history, management “in a nutshell”. Impact of the COVID-19 pandemic on lung cancer management.....</i>	<i>7</i>
1.1. Epidemiological data.....	7
1.2. Histopathological classification.....	8
1.3. Natural history.....	9
1.4. Lung carcinoma screening.....	9
1.5. Elements regarding treatment modalities and outcomes.....	9
1.6. Impact of the COVID-19 pandemic on lung cancer management. Epidemiology data of COVID-19 infection.....	10
1.7. Risk groups for an unfavorable outcome of COVID-19 infection.....	11
1.8. Protective factors against COVID-19 infection.....	11
1.9. COVID-19 infection in oncology patients.....	12
1.9.1. Prognostic factors for the evolution of COVID-19 in oncology patients.....	12
1.9.2. Prophylaxis and treatment of COVID-19.....	13
<i>2. The role of immunotherapy with immune checkpoint inhibitors in the systemic treatment of advanced NSCLC.....</i>	<i>15</i>
2.1. First-line therapy in NSCLC patients without driver mutations, regardless of PD-L1 expression.....	15
2.1.1. Monoimmunotherapy.....	15
2.1.2. Dual immunotherapy.....	16

2.2. First-line therapy in NSCLC patients without driver mutations, regardless of PD-L1 expression.....	17
2.2.1. Non-squamous NSCLC.....	17
2.2.2. Squamous NSCLC.....	17
2.2.3. All histological subtypes of NSCLC, regardless of PD-L1 expression.....	17
2.3. First-line therapy in NSCLC patients without driver mutations, regardless of PD-L1 expression, with contraindications for immunotherapy.....	18
2.3.1. Non-squamous carcinomas.....	18
2.3.2. Squamous carcinomas.....	19
2.3.3. Performance status $\geq 2$ in patients without driver mutations.....	19
2.3.4. Elderly patients without driver mutations.....	19
2.4. Maintenance therapy.....	20
2.4.1. Continuation maintenance.....	20
2.4.2. Sequential maintenance (“switch maintenance”).....	20
2.4.3. Double maintenance.....	20
2.5. Salvage therapy in patients without driver mutations.....	20
3. Personalized medicine, molecular diagnostics and targeted molecular therapy modalities.....	23
3.1. Molecular biomarker detection methods.....	23
3.2. Therapy of cases with driver mutations.....	24
3.2.1. EGFR mutations.....	26
3.2.2. ALK gene rearrangements.....	28
3.2.3. ROS1 rearrangements.....	29
3.2.4. BRAF mutations.....	30
3.2.5. NTRK fusions.....	30

3.2.6. <i>MET</i> alterations.....	30
3.2.7. <i>RET</i> alterations.....	31
3.2.8. <i>KRAS</i> mutations.....	31
3.2.9. <i>HER2</i> mutations.....	31
3.2.10. Other actionable targets.....	31

**PERSONAL CONTRIBUTION.....**

4. Aim and objectives.....	35
5. Study 1. Impact of COVID-19 infection on oncology patients.....	39
5.1. Introduction.....	39
5.2. Objectives.....	39
5.3. Patients and method.....	40
5.4. Results.....	42
5.5 Discussion.....	55
5.6. Conclusions.....	59
6. Study 2. Use of different PD-1 inhibitor combination strategies for first-line immunotherapy of advanced non-small cell carcinomas.....	61
6.1. Introduction.....	61
6.2. Aim and Objectives.....	62
6.3 Patients and Methods.....	63
6.3.1 Inclusion and Exclusion Criteria, Study Design.....	63
6.3.2. Procedures.....	63
6.3.3. Statistical Analysis.....	65
6.4. Results.....	66

---

6.4.1. Patient Characteristics and Treatment.....	66
6.4.2. Overall Survival.....	69
6.4.3. Progression-Free Survival.....	73
6.4.4. Tumor Response.....	78
6.4.5. Treatment Beyond Progression.....	82
6.4.6. Subsequent treatments.....	82
6.4.7. Long-term survivors.....	83
6.4.8. Toxicity.....	83
6.5. Discussions.....	84
6.5.1. Landscape of immunotherapy combinations.....	84
6.5.2. Rationale for immunotherapy combinations - complementary mechanisms of action.....	84
6.5.3. Study aim and limitations.....	85
6.5.4. Overall survival, progression-free survival and long-term survivors.....	85
6.5.5. Univariate and multivariate analysis of prognostic factors.....	87
6.5.6. Performance status.....	87
6.5.7. Age.....	88
6.5.8. Corticosteroids.....	89
6.5.9. Neutrophil-to-lymphocyte ratio.....	91
6.6. Conclusions.....	91
7. Study 3. The contribution of comprehensive genomic testing (NGS) for personalized therapy of patients with advanced non-small cell lung carcinomas.....	93
7.1. Introduction.....	93
7.2. Objectives.....	93

7.3. Patients and methods.....	94
7.3.1 Design.....	94
7.3.2 Inclusion criteria.....	95
7.3.3 Exclusion criteria.....	95
7.3.4. Description of the NGS test.....	95
7.3.5 PD-L1 testing.....	97
7.3.6. Statistical methods.....	97
7.4 Results.....	97
7.4.1 Patients and NGS testing.....	97
7.4.2 Genetic abnormalities found overall (F1CDx in tissue at diagnosis + F1LCDx in blood at diagnosis + F1LCDx in blood at progression).....	98
7.4.3 Genetic abnormalities found at baseline in F1CDx in tumor tissue + F1LCDx in blood.....	104
7.4.4. Genetic abnormalities found at baseline with F1CDx in tumor tissue.....	104
7.4.5. Genetic abnormalities found at baseline in liquid biopsy (F1LCDx in blood). .....	105
7.4.6. Genetic abnormalities found at progression in liquid biopsy (F1LCDx in blood).....	105
7.4.7. Mutation frequency at diagnosis versus progression.....	105
7.4.8. Genetic abnormalities found at baseline in tissue and/or liquid biopsy according to histology.....	106
7.4.9 Genetic abnormalities found at baseline (tissue and/or blood) according to smoking.....	108
7.4.10. Actionable mutations found and clinical applications.....	110
7.4.11. PD-L1 expression in tumor tissue at baseline.....	112
7.4.12 Particular situations.....	113

7.5. Discussions.....	114
7.6. Conclusions.....	123
8. General conclusions.....	125
9. Originality and innovative contributions of the thesis.....	127

## REFERENCES.....

**Keywords:** *advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), COVID-19, immunotherapy, personalized therapy, next generation sequencing (NGS).*

## LIST OF PUBLICATIONS

### Articles published *in extenso* as a result of doctoral research

1. Preda A, Ciuleanu T, Kubelac P, Todor N, Bălăcescu O, Achimaș-Cadariu P, Iancu D, Mocan C, Bandi-Vasilica M, Lupșe M, Briciu VT, Man MA, Vlad C. Outcomes of patients with cancer infected with SARS-CoV-2: results from the Ion Chiricuță Oncology Institute series. *ESMO Open* 2022;7(2):100423. ISI, Impact Factor 7.1 (included in study 1, personal contributions section).
2. Preda AC, Ciuleanu TE, Todor N, Vlad C, Iancu DI, Mocan C, Mariana-Bandi V, Albu F, Todor-Bondei IM, Hapca M, Kubelac MP, Kubelac-Varro AD. Use of Different Anti-PD-1 Checkpoint Combination Strategies for First-Line Advanced NSCLC Treatment - the Experience of Ion Chiricuta Oncology Institute. *Cancers* 2024;16:2022 <https://doi.org/10.3390/cancers16112022>. ISI, Impact Factor 4.5 (included in study 2, personal contributions section).
3. Preda AC, Todor N, Cârlan B, Kubelac-Varro AD, Iancu DI, Mocan C, Mariana Bandi Vasilica M, Kubelac MP, Vlad C, Ciuleanu TE. Prospective Upfront Next-Generation Sequencing for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Outcomes from the Ion Chiricută Oncology Institute. *Int J Mol Sci* 2025;26:3403 <https://doi.org/10.3390/ijms26073403>. ISI, Impact Factor 4.9 (included in study 3, personal contributions section).

## INTRODUCTION

*Although it continues to be a challenge for the medical world, the progress made in the management of lung cancer in the last two decades is evident. Median survival is 3-6 times longer in metastatic NSCLC cases, if the latest molecular testing methods are used to identify “oncogene driven” cases that benefit from targeted molecular therapies, and “non-oncogene driven” cases that benefit from immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. The management of oncological patients has been made more difficult by the COVID-19 pandemic. All three studies proposed to be carried out within the doctoral thesis aimed at defining strategies to improve the management of advanced NSCLC, their results being published in journals with impact for oncological practice (ESMO Open, Cancers, International Journal of Molecular Sciences).*

## CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

*Lung cancer was responsible, according to GLOBOCAN 2022, for 10,530 deaths in Romania, representing 18.7% of all deaths caused by cancer, thus maintaining its position as the most lethal form of cancer. After an initial development, in the first decade of the 21st century the results of chemotherapy began to plateau. The emergence of targeted molecular therapy in the first decade and immunotherapy in the second decade brought unprecedented therapeutic development. Median survival is today 3 to 6 times longer in metastatic NSCLC, if NGS testing is used to identify “oncogene driven” cases that benefit from targeted molecular therapies, and “non-oncogene driven” ones, that benefit from immunotherapy.*

*During the COVID-19 pandemic, some of the progress was overshadowed by the lockdown, which reduced the diagnostic capacity of lung cancers in their early stages, as well as by the severity of the virus itself, which complicated the evolution and treatments of lung cancers. Oncology patients have been designated by international organizations as representing a vulnerable population with a higher risk of contracting SARS-CoV-2 and of having a severe clinical outcome. Regarding the prognostic factors in oncology patients contracting COVID-19, the data from different series in the literature contemporary to the pandemic were sometimes discordant.*

*Immunotherapy with immune checkpoint inhibitors has outperformed chemotherapy, but there have been no randomized comparisons between different immune checkpoint inhibitors. Initial immunotherapy can be administered as monotherapy (pembrolizumab, atezolizumab or cemiplimab) in cases with high PD-L1 expression. Immunotherapy can be administered in combination with chemotherapy (according to the KeyNote-189, 407, IMpower-130, 150, EMPOWER-Lung-3 and POSEIDON studies) or with another immunotherapy (according to the CheckMate-227, 9LA and POSEIDON studies). For “non-oncogene-driven” cases, immunotherapy has become a mandatory component in the absence of contraindications. Registration studies have reported 20% survival at 5 years.*

ASCO, NCCN and ESMO recommend comprehensive genomic analysis both at the time of initial diagnosis and at progression. Actionable markers in NSCLC are EGFR, ALK, ROS1, BRAF, NTRK, MET, RET, KRAS G12C, HER2. For other molecular targets also identifiable in lung carcinomas (e.g. BRCA, PIK3CA, AKT, NF1, FGFR2B, etc.) there are authorized therapies for other tumors. Comprehensive NGS testing has become available (with results limited to EGFR, ALK, ROS1, RET and NTRK) through the National Oncology Program starting with 2024.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

### Study 1: Impact of COVID-19 infection on oncology patients

#### **Purpose / Objectives:**

The general objective of the research was to study the reciprocal relationship between cancer and the severity of the COVID-19 infection grafted to the oncological patient.

The specific objectives were to identify and rank, through univariate and multivariate analysis methods, the prognostic factors correlated with (i) the evolution to moderate and severe/critical forms of the infection, (ii) clinical worsening (defined as severe/critical forms or death) and (iii) overall survival.

The primary objective of this analysis was to characterize the severity of the disease (the percentage of patients who developed the moderate and severe/critical form, respectively the worsening of the disease to a severe/critical form or death and the prognostic factors for such progression).

The secondary objectives were survival after infection and descriptive elements, such as symptoms of the disease and treatments received.

**Material and methods:** We examined the clinical data of 341 cancer patients with a positive SARS-CoV-2 RT-PCR test between April 2020 and February 2021, in the prevaccination era. The main aim was to characterize prognostic factors for diagnosis (i) progression to moderate and severe/critical forms of infection, (ii) clinical deterioration (defined as severe/critical forms or death), and (iii) overall survival. Initially, a univariate analysis was performed to identify prognostic factors using the chi-square and logrank tests. In the multivariate analysis, the logistic model and the Cox model were used.

**Results:** During the infection, 40.5% of patients remained asymptomatic, 27.6% developed a mild form, 20.5% had a moderate form and 11.4% a severe/critical form of COVID-19 which led to death in 7.6% of cases. Treatment was adapted to the severity of the disease according to national guidelines. In our series, the incidence of COVID-19 infection was lower in cancer patients compared to the general population ( $p < 0.001$ ), however, the mortality rate was higher in cancer patients compared to the general population (7.6% vs. 2.9%,  $p < 0.001$ ). In multivariate analysis, the prognostic factors associated with the evolution to a moderate or severe/critical clinical manifestation were performance status (PS) ( $p < 0.0001$ ) and no active treatment in the last 3 months ( $p = 0.031$ ). Factors associated with clinical worsening were PS ( $p < 0.0001$ ), peripheral arterial disease ( $p = 0.03$ ) and chronic liver disease ( $p = 0.04$ ). Factors associated with impaired overall survival were PS ( $p < 0.0001$ ), ischemic heart disease ( $p = 0.0126$ ), chronic liver disease ( $p = 0.001$ ) and radiotherapy ( $p = 0.0027$ ).

**Conclusions:** Our series confirms a more severe course of COVID-19 infection in cancer patients, with performance status as the most prominent prognostic factor in all three multivariate analyses. Through active screening, efforts were made to maintain cancer units, at least in part, as coronavirus-free sanctuaries.

### **Study 2. Use of different PD-1 inhibitor combination strategies for first-line immunotherapy of advanced NSCLC.**

**Purpose/Objectives:** Various combinations of an anti-PD-1/PD-L1 agent and platinum-based chemotherapy or another checkpoint inhibitor (with or without a short course or a full course of a platinum doublet) have been shown to be superior to chemotherapy alone in several clinical trials, but these strategies have not been directly compared. The aim of this study is to report real-world data results with different immunotherapy combinations that included a PD-1 inhibitor in a series of patients treated in consecutive cohorts at the Ion Chiricuță Institute of Oncology.

The endpoints included overall survival (OS), progression-free survival (PFS), objective response rate (ORR), and exploratory univariate and multivariate analysis of prognostic factors.

**Material and methods:** A total of 122 patients were successively enrolled in three cohorts: (1A) nivolumab + ipilimumab (18 patients), (1B) nivolumab + ipilimumab + short-course chemotherapy (33 patients), and (2) pembrolizumab plus full-course chemotherapy (71 patients). Efficacy parameters (OS, PFS, ORR) and prognostic factors (patient-related, disease-related, biomarkers, and treatment type) were analyzed using established statistical methods.

**Results:** Median follow-up in the consecutive cohorts 1A, 1B, and 2 was 83 vs. 59 vs. 14.2 months. Median OS and PFS for all patients were 22.2 and 11.5 months, respectively, and actuarial OS and PFS at 2 years were 49% and 35%, respectively. For nivolumab + ipilimumab combinations (cohorts 1A and 1B taken together) versus pembrolizumab (cohort 2), median OS was 14 vs. 24.8 months ( $p=0.18$ ) and actuarial survival at 2 years 42% vs. 53%. Median PFS was 8.6 vs. 12.7 months ( $p=0.41$ ) and actuarial PFS at 2 years 34% vs. 35%. Response rates were 33.3% vs. 47.9% ( $p=0.22$ ). Older age, impaired PS (2 vs. 0-1), corticosteroid therapy in the first month of immunotherapy, and neutrophil/lymphocyte ratio  $>3.81$  were independent prognostic factors in multivariate survival analysis (limited to 2 years of follow-up). Long-term 5-year survival was 30.5% and 18.8% for cohorts 1A and 1B, respectively (for cohort 2 this parameter could not be calculated due to the shorter follow-up of this cohort at the time of data lock).

**Conclusions:** The efficacy results using different combination immunotherapy strategies were promising and there were no significant differences at 2 years between the protocols used. The actual efficacy and long-term outcomes in our series were in line with those reported in the corresponding registration studies.

### **Study 3. The contribution of comprehensive genomic testing (NGS) for personalized therapy of patients with advanced non-small cell lung carcinomas**

**Purpose / Objectives:** Initial comprehensive genomic analysis (NGS) is increasingly recommended in advanced NSCLC to guide targeted therapy. This prospective single-

Romanina institutional study evaluated the performance of NGS in advanced NSCLC at baseline (tissue and/or liquid) and at progression (liquid).

**Material and methods:** FoundationOne NGS (tissue/liquid) was performed in 119 consecutive patients with stage IV NSCLC, together with PD-L1 immunohistochemistry (IHC, SP263). Liquid biopsy was repeated at progression. Turnaround time for NGS results (TAT), prevalence of actionable targets and clinical utility were evaluated.

**Results:** Patients were predominantly male (68.1%), with a median age of 62 years (range 30-86). The majority had ECOG PS 0-1 (79%) and non-squamous histology (67.2%). Non-smokers accounted for 25.2%. Median TAT for NGS results was 9 days (range 5-21). In total, 671 genetic alterations were detected in 149 genes. The median number of distinct mutations per patient decreased from 5.6 at baseline to 4.3 at progression. Tissue samples revealed more genetic alterations (6/patient) than initial liquid biopsies (4.6/patient). Squamous tumors had more mutations than non-squamous tumors (7.1/patient vs. 4.8/patient), and the number of mutations in smokers exceeded that in non-smokers (6/patient vs. 4.5/patient). TP53 mutations were the most common (70.59%). Actionable variants were found in 74.8% of patients, although only 35.3% received personalized therapy, largely due to deteriorating performance status, lack of reimbursement, or the absence of an appropriate clinical trial. Common targets in non-squamous tumors included EGFR (21%), KRAS G12C (11%), NF1 (11%), and ERBB2 (6%); in squamous tumors, common targets included NF1 (24%), PIK3CA (18%), and ERBB2 (8%). Among smokers, the most common driver mutations were NF1 (15%), PIK3CA (11%), KRAS G12C (9%), and ERBB2 (8%); nonsmokers were dominated by mutations in EGFR (45%), NF1 (15%), and KRAS G12C (8%). TMB $\geq$ 10 mut/Mb was observed in 26.9%. No patients were MSI-H. PD-L1 TPS was <1% in 33% of patients, 1-49% in 20%,  $\geq$ 50% in 18%, and unknown in 29%.

**Conclusions:** Baseline NGS analysis provides comprehensive, rapidly acquired genomic data, guiding both standard therapies and orientation towards personalized clinical trials in advanced NSCLC. Liquid rebiopsy at progression further refines treatment decisions.

## GENERAL CONCLUSIONS

The **first study** of the thesis sought to transform the pandemic period into an opportunity to study the biunivocal interferences between cancer and concurrent infection with the SARS-CoV-2 virus.

1.1. In our series, the mortality of COVID-19 infection was higher among cancer patients compared to the general population.

1.2. Multivariate analysis revealed the following independent prognostic factors for the evolution of COVID-19 infection in neoplastic patients:

-absence of specific oncological treatment in the last 3 months (prognostic for the evolution towards moderate or severe/critical form of COVID-19),

-comorbidities such as chronic obstructive arteriopathy of the limbs, chronic hepatopathy (prognostic for clinical worsening, defined as evolution towards severe/critical forms and/or death),

-comorbidities such as ischemic cardiopathy, chronic hepatopathy, as well as radiotherapy performed in the 3 months prior to infection (prognostic for overall survival from COVID-19 infection).

1.3. Deteriorated performance status (ECOG PS 2-4) was the only independent predictive factor in all multivariate analyses performed, linked to both a progression to moderate or severe/critical form, a worsening to severe/critical form and/or death, and to a survival affected by COVID-19 infection.

**The second study** analyzed the results obtained by combining a PD-1 checkpoint inhibitor in the first-line systemic treatment of advanced NSCLC with a) another immunotherapy (anti-CTLA4), with or without short-term chemotherapy (2 cycles), or b) a full chemotherapy regimen (4 cycles).

2.1. These combinations demonstrated overall survival and progression-free survival comparable to those observed in the reference studies, marking a significant advance compared to chemotherapy alone. The median OS and PFS for all patients were 22.2 and 11.5 months, and the actuarial OS and PFS at 2 years were 49% and 35% in the intention-to-treat population.

2.2. The two immunotherapy combination strategies showed similar results in OS and PFS at two years, in a non-randomized comparison. Pembrolizumab combinations had a numerical advantage over nivolumab and ipilimumab, but not statistically significant.

2.3. Data on dual immunotherapy indicates the presence of long-term survivors, with percentages of 30.5% and 18.8% at 5 years, in the two monitored cohorts.

2.4. Multivariate analysis identified as unfavorable prognostic factors for overall survival: ECOG performance status 2, older age, early use of corticosteroids and an increased neutrophil to lymphocyte ratio (>3.81).

**The third study** supports the use of NGS genetic testing at diagnosis (tissue or liquid biopsy) and at progression (liquid biopsy).

3.1 Benefits of upfront NGS include:

- a) rapid results (median 9 days),
- b) detection of many actionable mutations for targeted molecular therapy,
- c) referral of patients to available and upcoming clinical trials.

3.2. In situations where tissue was not available in sufficient quantity initially, liquid biopsy provided reliable information about genetic alterations. Repeating liquid biopsy at progression provided a dynamic picture of the actionability of genetic alterations at different time points.

3.3. A total of 671 genetic alterations were found in 149 distinct genes in the 119 patients who successfully tested FoundationOne at baseline and at progression.

3.4. The average number of distinct genetic alterations decreased from baseline (tissue and/or liquid biopsy) to progression (liquid biopsy).

3.5. More mutations were identified in the initial tissue biopsy compared to the liquid biopsy, in squamous versus non-squamous NSCLC, and in smokers compared to non-smokers.

3.6. The most common changes were found in the TP53 suppressor gene (70.59% of all patients), which is currently not actionable and is considered a negative prognostic factor.

3.7. FoundationOne identified actionable changes in 74.8% of patients (including elevated TMB). However, only 35.3% received the appropriate personalized treatment.

*The main reasons were deteriorating health, lack of reimbursement for therapy, and the absence of an adequate clinical trial.*

*3.8. Regarding drug-treatable mutations, differences were observed between non-squamous and squamous histological categories, as well as between non-smoker and smoker status (active or former). Distinct pathways of oncogenesis have been described, involving different driver genes in non-squamous versus squamous carcinomas, as well as in non-smokers versus smokers.*

*3.9. PD-L1 TPS expression (by IHC) was negative in 33% of patients, moderate in 20%, high in 18% and unknown in 29%. All patients had microsatellite stability (MSS) and 26.9% had a high mutational burden (TMB high). Information regarding TMB and PD-L1 levels is complementary and is useful for an appropriate indication of immunotherapy.*

*3.10. The doctoral study concludes that the use of NGS genetic techniques (used in the initial diagnosis and at progression of advanced NSCLC) significantly contributes to patient management. These techniques, applied to both tissue and liquid biopsies, may allow the selection of effective targeted molecular treatments and optimal immunotherapy modalities for carcinomas that do not have driver oncogenes.*

## ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF DOCTORAL RESEARCH

*The studies that formed the basis of this doctoral thesis made an innovative contribution to oncology research in Romania.*

**Study 1:** *It constitutes the first series in Romania of oncological patients (n=341), with concurrent COVID-19 infection, from the pre-vaccination period, in which a complex analysis (uni- and multivariate) of prognostic factors for the evolution of infection forms, aggravation and survival after SARS-CoV2 infection was performed. The unfavorable prognostic factor detected in all three multivariate analyses was the deteriorated performance status of the oncological patient, preceding the onset of COVID-19 infection.*

**Study 2:** *Study 2: This is the first univariate and multivariate analysis of the results of different immunotherapy combinations in the first-line treatment of advanced NSCLC, conducted in a Romanian institution (n=122 patients). The study is original in that it compares cohorts of patients treated with different immunotherapy combinations (with molecules made by different manufacturers), which do not have the opportunity for direct comparison in head-to-head studies sponsored by pharmaceutical companies. The results can help clinicians to make the selection of therapy. Data from the second study of the doctoral research was the subject of an article published in 2024 in the journal Cancers (ISI, IF=4.5; 5-years IF=4.9) [211].*

**Study 3:** *It represents the first Romanian study that analyzed by NGS, at diagnosis and progression, a representative series of patients (n=119) with advanced NSCLC. The study brings arguments for NGS testing in all patients with advanced NSCLC, due to the speed and amount of information provided, useful in selecting targeted molecular treatment or orientation towards chemoimmunotherapy or clinical trials. The study is relevant through the comprehensive molecular analysis that identified the driving genes in the carcinogenesis of non-squamous versus squamous carcinomas and in non-smokers*

*versus smokers. The data were published in 2025 in the International Journal of Molecular Sciences (ISI, IF=4.9; 5-years IF=5.6) [212].*