

Sónia Raquel Mota Silva

## ANTI-PD1: UMA NOVA ESTRATÉGIA DE IMUNOTERAPIA

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sónia Raquel Mota Silva

# ANTI-PDI: UMA NOVA ESTRATÉGIA DE IMUNOTERAPIA

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Sereno Almeida Moreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## *Declaração de Honra*

Eu, Sónia Raquel Mota Silva, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011161734, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

---

(Sónia Raquel Mota Silva)

**O Tutor**

---

**(Professor Doutor João Nuno Moreira)**

**A Aluna**

---

**(Sónia Raquel Mota Silva)**

## ***Agradecimentos***

Gostaria de dedicar esta monografia à minha família e amigos,  
por terem estado sempre lá e por terem acreditado em mim,  
não me tendo permitido desistir, em momento algum.

## ***Lista de Abreviaturas***

**APC** – *Antigen-Presenting Cells*

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**IPI** – *Ipilimumab*

**IRAE** – *Immune-Related Adverse Events*

**NSCLC** – *Non Small Cell Lung Cancer*

**OMS** – *Organização Mundial de Saúde*

**PD-I** – *Programmed Death -I*

**PD-LI** – *Programmed Death Ligand -I*

**PFS** – *Progression-Free Survival*

**OS** – *Overall Survival*

**OR** – *Objective Response*

**ORR** – *Objective Response Rate*

**TCR** – *T Cells Receptor*

**RECIST** – *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*

**Q2W** – *Every 2 Weeks*

**Q3W** – *Every 3 Weeks*

**SI** – *Sistema Imune*

**Th2** – *Tcell helper 2*

**TIL** – *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*

## Índice

Resumo .....	8
Abstract .....	9
1. Introdução .....	10
2. Microambiente envolvente do Tumor .....	11
2.1. Interação do tumor com o Sistema Imune .....	11
2.2. Vigilância imunológica pelo SI .....	11
3. Características Biológicas da PD-1 .....	13
3.1. Estrutura e função da PD-1 .....	13
3.2 Mecanismo da PD-1 e Supressão do SI .....	15
4. Significado clínico da PD-1 para Melanoma .....	17
4.1. Melanoma .....	17
4.2. Terapêuticas anti-PD-1 e anti-PD-L1 .....	18
Anticorpos Monoclonais Anti-PD-1 .....	19
1- Nivolumab .....	19
2- Pembrolizumab .....	21
Anticorpos Monoclonais Anti-PD-L1 .....	24
1- BMS-936559/MDX-1105 .....	24
2- MPDL3280A .....	24
3- MEDI4736 e MSB0010718C .....	25
Anticorpos Monoclonais Anti-PD-L2 .....	25
5. Biomarcadores .....	25
6. Perspetivas Futuras .....	27
7. Conclusão .....	28
8. Bibliografia .....	29

## RESUMO

“O melanoma apresenta-se atualmente como a forma de carcinoma da pele mais preocupante, representando 80% deste tipo de cânceros. O investimento em terapêuticas e detecção precoce tem-se feito notar, mas ainda há muito caminho a percorrer no sentido de travar esta malignidade que tão fatalmente tem afetado os seus doentes, sobretudo aqueles em estadios avançados.

A PD-1 (*programmed death-1*), também denominada de *immune checkpoint molecule* é um receptor expresso à superfície das células T, B e NK ativadas que atua atenuando a resposta imune antitumoral. Esta molécula apresenta dois ligandos com os quais interage, o ligando PD-L1 e o PD-L2, onde vai desencadear a sinalização inibitória da resposta imune.

Os anticorpos monoclonais anti-PD-1 e anti-PD-L1 têm-se revelado terapêuticas bastante promissoras no tratamento de melanoma, tendo demonstrado resultados eficazes e perfis de segurança bem tolerados no organismo quando comparados com tratamentos antitumorais convencionais. Estes tratamentos estão a adquirir cada vez mais atenção, oferecendo a promessa de estender os seus benefícios clínicos a um maior número de doentes.

Apesar da sua eficácia promissora, certos determinantes genéticos podem influenciar a resposta interindividual à anti-PD-1. Deste modo, torna-se fulcral determinar quais os biomarcadores que se correlacionam com esta terapêutica, por forma a prever se o doente vai ou não ser bom respondedor.”

## **ABSTRACT**

“Melanoma currently presents itself as the most concerning form of skin cancer, accounting for 80% of such cancer. A considerable amount of investment has been done in therapeutics and early detection of melanoma, but a lot of work is yet to be done in order to stop this malignancy that affects many patients worldwide.

PD-1 (programmed cell death protein 1), also denominated immune checkpoint molecule, is a receptor expressed on the surface of activated T cells, B cells and NK cells which attenuates antitumor immune response. This molecule interacts with 2 ligands on T cells receptor (TRC) where it will trigger the immune response inhibitory signaling: PD-L1 and PD-L2.

Monoclonal anti-PD-1 and anti-PD-L1 have shown promising results in the treatment of melanoma. These antibodies have demonstrated effective results and a well-tolerated safety profile when compared to conventional antitumor therapies. These treatments are gaining more and more attention over time, and promise to bring clinical benefits to a larger number of patients.

Nevertheless, some genetic factors can influence the inter-individual response; having this in mind, it is essential to assess which biomarkers can be correlated with this therapy in order to be able to predict how well the patient will respond to the treatment.”

## I. INTRODUÇÃO

O Sistema Imune (SI) é um conjunto complexo e dinâmico que reconhece os antígenos estranhos, continuando no entanto a manter um inventário de antígenos próprios do organismo, que editam a resposta das células T e preservam a homeostase do organismo (Tsai & Daud, 2014). O SI possui a função de proteger o organismo contra patógenos invasores estranhos enquanto limita, simultaneamente, a autoimunidade e a destruição dos próprios tecidos. Este processo altamente seletivo é regulado por mecanismos de tolerância imunológica central e periférica. Pelo facto do papel da tolerância central ser por vezes incompleto, a deleção dos antígenos auto-reativos é também incompleta, desencadeando-se autoimunidade por via da interação com os TCRs (*T Cells Receptors*). Vários mecanismos estão envolvidos no controlo deste processo, nomeadamente a interação com o TCR regulada por moléculas inibidoras, como a PD-I. Esta molécula apresenta um papel preponderante no balanço entre a imunidade efetiva e a tolerância imunológica (Fife & Pauken, 2011).

Os recetores celulares desempenham um papel chave na regulação do cancro feita pelo SI, já que asseguram a ativação ou inibição das células envolvidas no controlo dos tumores e no desenvolvimento da autoimunidade. Alguns destes mecanismos são ativados e ditam a ocorrência da resposta imune, enquanto outros são inibidos, desencadeando uma forte repressão da mesma. Os anticorpos antagonistas atuam sobre esses repressores, permitindo que se desencadeie uma resposta imune melhorada pelo organismo (Mamalis, 2015).

Vou, assim sendo, focar nesta monografia, a importância das novas terapêuticas antitumorais antagonistas destes repressores da resposta imune, como é o caso da anti-PD-I, enquanto tratamento para doentes com melanoma. A PD-I é um recetor inibidor da resposta imune que foi descrito, pela 1ª vez, por investigadores japoneses em 1992. O seu nome, *programmed death 1*, deriva do seu isolamento a partir de uma hibridização subtrativa de um hibridoma de células T submetido a morte celular programada. A PD-I pertence à subfamília CD28 e é expressa em células T, B e NK ativadas (Tsai & Daud, 2014), (Pardoll, 2012). O mecanismo de interação da PD-I com o seu ligando ocorre em tecidos periféricos e serve como um regulador negativo das células T no controlo das respostas inflamatórias locais e na auto-tolerância (Sunshine, 2016).

A inibição do eixo PD-I/PD-L1 (seu ligando) com o uso de anticorpos monoclonais demonstrou uma surpreendente atividade antitumoral em vários estudos (Ott, Hodi, &

Robert, 2013). O bloqueio deste mecanismo inibidor está de facto a surgir como uma estratégia bastante promissora para a terapêutica antitumoral (Lipson, 2013).

Um objetivo fundamental destes anticorpos imunoestimuladores é portanto a modulação da atividade das células T e da eficácia da resposta imune antitumoral. Por conseguinte, o desenvolvimento e a implementação de ensaios para avaliar quais os biomarcadores apropriados para este propósito, é um objetivo preponderante nos mais variados estudos clínicos efetuados (Ascierto, Kalos, Schaer, Callahan, & Wolchok, 2013).

## **2. MICROAMBIENTE ENVOLVENTE DO TUMOR**

### **2.1. Interação do tumor com o Sistema Imune**

Virtualmente todos os tumores são iniciados ou exacerbados por mediadores inflamatórios. As interações estabelecidas entre as células tumorais e as células inflamatórias do organismo resultam num ambiente complexo em que as células do SI podem promover a sobrevivência das células tumorais, ao invés da sua eliminação, como defesa do hospedeiro (Byrne, 2015).

A resposta do SI ao cancro, mediada pelas células T, é iniciada através do reconhecimento do antigénio (neste caso, o tumor) pelo TCR (Pardoll, 2016). Para que esta resposta imune ocorra, as células T devem ser específicas das células cancerígenas e ser ativadas num estadio tardio (células T efectoras). Além desta interação específica com o TCR, é ainda requerido um segundo sinal co-estimulador que origina a ativação completa das células T. A co-estimulação é regulada pelo equilíbrio entre sinais inibitórios e estimulatórios ao nível do recetor (Ott, 2013). Na falta do co-estimulador (CD28) a célula T entra num estado de anergia, perdendo a sua capacidade para desencadear a resposta imune (Mamalis, 2015).

### **2.2 Vigilância Imunológica pelo SI**

O conceito de vigilância imunológica é baseado na hipótese de que o sistema imune pode suprimir o desenvolvimento ou a progressão de tumores espontâneos (Merelli, Massi, Cattaneo, & Mandalà, 2014). A vigilância imunológica é um processo essencial no que toca ao controlo do desenvolvimento gradual do tumor. Todavia, pelo facto dos tumores malignos também se desenvolverem em indivíduos com o SI totalmente funcional, adotou-se o conceito de *'immunoediting'*. *'Immunoediting'* inclui, não só o processo de prevenção tumoral pelo SI, mas

também a moldagem da imunogenicidade dos tumores em desenvolvimento (Soysal, Zippelius, Tzankov, & Hoeller, 2016).

Foram propostas 3 etapas para o processo de *immunoediting*, as quais descrevem a contínua interação que se verifica entre o tumor e o SI:

1. Eliminação, que representa basicamente a vigilância imunológica; ou seja, o sistema imune inato e adaptativo reconhece e elimina as células tumorais nascentes. Se a eliminação for completa, este representa o ponto final do *immunoediting*.
2. Equilíbrio, que representa um estado em que o SI controla o tumor; as células cancerígenas podem permanecer assim durante anos.
3. Escape, em que as células tumorais escapam do controlo imunológico, proliferando de forma aleatória e originando um cancro clinicamente detetável (Soysal, 2016).

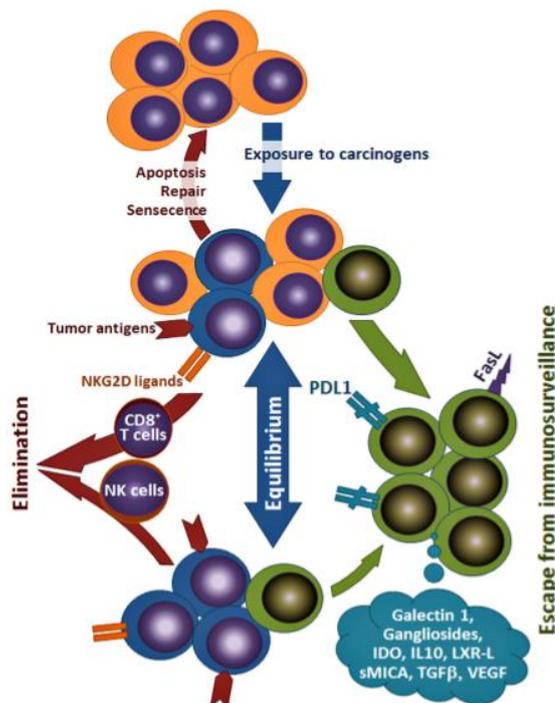


Figura 1: Etapas do processo de *immunoediting* em cancro. Após exposição a um carcinoma, o SI pode reagir de 3 formas diferentes: Eliminação do tumor (representada pelas células a vermelho); Equilíbrio do SI com o tumor (representado pelas células a azul) ou Escape do SI (representado pelas células a verde). Adaptado da ref.36.

O modelo de '*immunoediting*' prevê que as maiores alterações tumorais tenham lugar quando ocorre a progressão tumoral da fase de equilíbrio para a fase de escape. (Hakansson, 2016). Este processo de '*immunoediting*' ocasiona eventualmente o escape tumoral e a progressão para uma doença clinicamente evidente. Desse modo, o SI que suprime o tumor por um lado, também desencadeia a sua promoção por outro (Sapoznik, 2012).

Quando o doente já apresenta um tumor clinicamente detetável significa que o cancro já foi capaz de ultrapassar com sucesso os mecanismo de vigilância imunológica, e como tal, já está fora do alcance do SI (Teng, 2008).

### 3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DA PD-1

#### 3.1. Estrutura e função da PD-1

A PD-1 é uma proteína transmembranar do tipo I pertencente à superfamília das Imunoglobulinas (CD28) (Tsai & Daud, 2014). Existe sob a forma de um monômero à superfície das células, sendo composta por um domínio extracelular (que se assemelha à região variável de uma Imunoglobulina), uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática. A região citoplasmática contém um *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)* e um *immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM)* que são essenciais para a transmissão dos sinais inibitórios (Soysal, 2016).

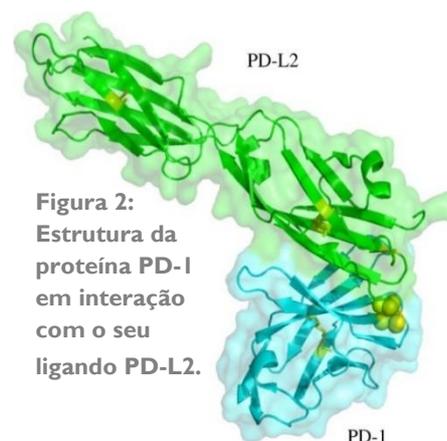


Figura 2: Estrutura da proteína PD-1 em interação com o seu ligando PD-L2.

A PD-1 (*programmed death-1*), também denominada de *immune checkpoint molecule* (devido ao seu papel na regulação da ativação da célula T), é um recetor inibitório expresso à superfície das células T ativadas onde atua atenuando a sua atividade, após exposição a níveis normais de antígenios (em resposta a uma infecção ou a um tumor). A PD-1 atenua a atividade das células T num estadio tardio, atenuando as respostas imunes inapropriadas e limitando a extensão e duração destas (Sui, Ma, Han, Wang, & Fang, 2015), (Luke & Ott, 2015), (Ott, 2013). A PD-1 interage ainda com outras células não-T ativadas, como é o caso das células B e das células NK, limitando a sua atividade lítica (Pardoll, 2012).

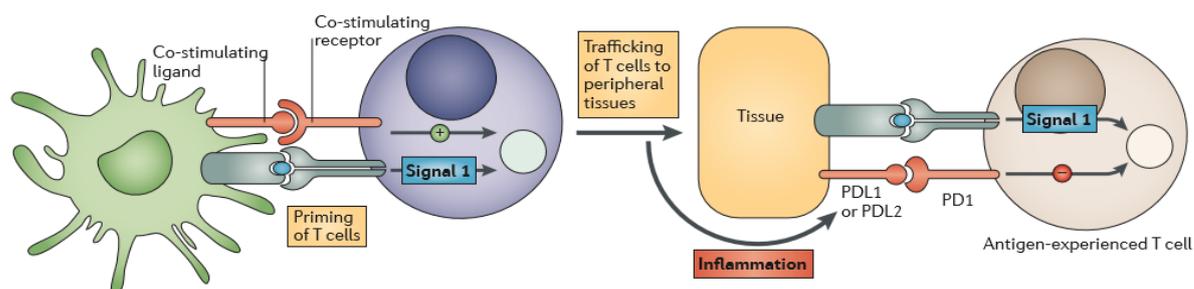


Figura 3: Regulação da resposta imune pela *immune checkpoint molecule*, PD-1. A PD-1 regula as respostas inflamatórias desenvolvidas em resposta ao tumor por células T efetoras. Estas reconhecem o antígeno nos tecidos periféricos. Adaptado da ref.33.

A PD-1 limita a função das células T (nomeadamente proliferação, secreção de citocinas e citólise das células-alvo) devido à transmissão de sinais negativos que se geram após ligação

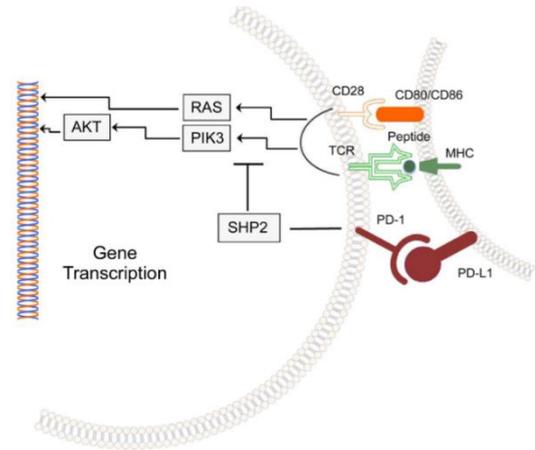
desta molécula aos seus ligandos: PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-H2) (Fife & Pauken, 2011), (Pardoll, 2012).

- A PD-L1 é o maior ligando da PD-I e encontra-se largamente distribuído por leucócitos, células não-hematopoiéticas e tecidos não-linfóides, incluindo ilhéus pancreáticos (Pardoll, 2016), (Fife, 2009). A PD-L1 medeia a tolerância imunológica periférica aos próprios antígenos do organismo, prevenindo a auto-imunidade (Sapoznik, 2012). A PD-L1 serve como regulador negativo, inibindo as respostas antitumorais mediadas pelas células T efectoras essencialmente em órgãos não-linfóides; e apresenta um papel protetor das respostas imunes das células T nos locais imuno-privilegiados como a placenta, os testículos ou o olho (Soysal, 2016).
- A PD-L2, o segundo ligando da PD-I, é expresso somente em Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) e está envolvida, tal como a PD-L1, na tolerância das células T ao ambiente dos antígenos (Sapoznik, 2012). Evidências oriundas de vários estudos demonstraram que a ligação da PD-L2 à PD-I inibe preferencialmente as respostas Th2 (Soysal, 2016). A PD-I apresenta uma maior afinidade para a PD-L2 comparativamente à PD-L1, embora as diferenças que isso origina ao nível da sinalização da célula T não sejam ainda conhecidas (Luke & Ott, 2015).

Recentemente, uma interação molecular inesperada entre PD-L1 e CD80 foi descoberta, pelo que a CD80 expressa pelas células T (e possivelmente em APCs também) pode comportar-se como um recetor em vez de um ligando, desencadeando sinais inibitórios quando ligado à PD-L1. A relevância desta interação na resistência ao tumor não é ainda conhecida (Pardoll, 2016). As diferenças da atividade clínica observadas entre anti-PD-I e anti-PD-L1 podem ser atribuídas à existência desta interação entre PD-L1 e CD80, assim como à suspeita de este ligando ser um segundo recetor para PD-L2 (Ishiwata, 2016).

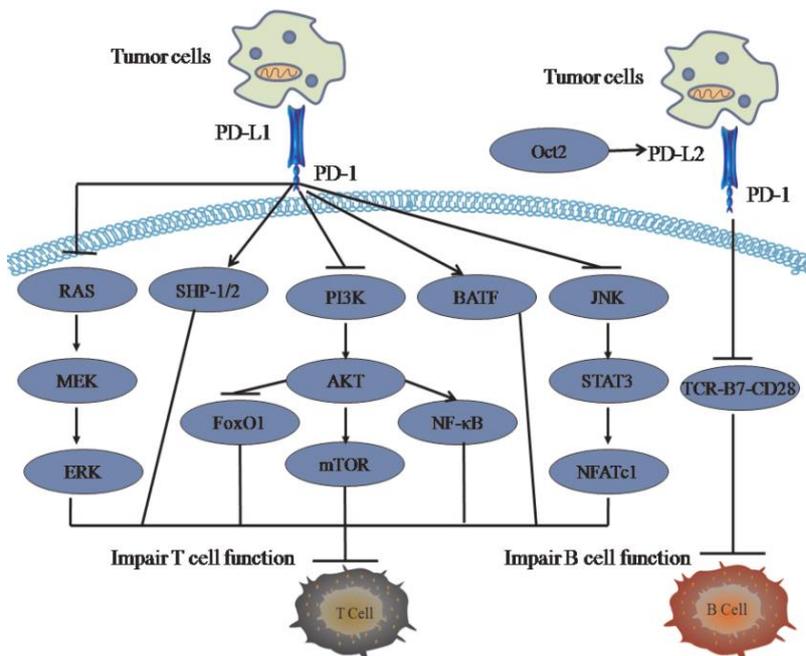
### 3.2. Mecanismo da PD-1 e supressão do SI

O maior papel envolvendo a PD-1 é a atenuação da atividade das células T nos tecidos periféricos, no momento da ocorrência da resposta inflamatória, e a limitação da autoimunidade (Pardoll, 2016). A PD-1 liga ao seu ligando, PD-L1 e vai interferir com o sinal TCR/CD28 de modo a suprimir a resposta imune da célula T no microambiente tumoral, por via do mecanismo PD-1/SHP-2/p-STAT1/Tbet (Li, 2015). A expressão da PD-1 em células T apresenta normalmente um efeito protetor, permitindo reduzir os danos tecidulares ocorridos em tecido normal não envolvido nas respostas imunes agudas (Ferris, 2013).



**Figura 4: Interação da PD-1 com o seu ligando PD-L1, à superfície das células T.** Esta interação vai interferir com o sinal TCR/CD28, levando ao recrutamento de fosfatases que vão fosforilar moléculas a jusante do sinal TCR. Adaptado da ref.28

A PD-1 limita a função das células T não só pelo facto de desencadear um mecanismo de atenuação da sinalização após ligar ao TCR, mas também por aumentar a expressão dos genes que prejudicam a função destas células (Sui, 2015).



**Figura 5: Importância do mecanismo PD-1/PD-L1 para a resposta imune.** Este mecanismo desencadeia a ativação de moléculas que vão prejudicar e suprimir a função da célula T, nomeadamente, o RAS, as fosfatases SHP 1 e 2, o PI3K, o BATF e o JNK. O ligando PD-L2 regula sobretudo as células B, onde atenua a sua atividade por meio da inibição do sinal TCR-B7-CD28. Adaptado da ref.37

Assim sendo, a PD-1, após estimular o TCR e interagir com o seu ligando, origina a fosforilação do ITSM e ITIM, levando ao recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2 que, por sua vez, fosforilam moléculas de sinalização a jusante, resultando na inibição da fosfatidilinositol

3-cinase. Este passo é seguido por um bloqueio da molécula sinalizadora AKT, o que desencadeia a diminuição da produção de citocinas, proliferação das células T e sobrevivência. Simultaneamente, a apoptose da célula T é promovida devido à inibição do fator de sobrevivência no grande linfoma das células B (Soysal, 2016).

Um circuito de retroalimentação negativa é criado após a produção de citocinas decorrentes da ativação das células T, que leva a uma sobre-regulação da PDL-I e da PD-L2 (com uma menor extensão), reforçando a atenuação da resposta imune (Soysal, 2016), (Pardoll, 2016). A PD-I regula negativamente a imunidade inata, cuja falha pode desencadear a ativação da autoimunidade (Sui, 2015).

A baixas concentrações de antígeno, as interações PD-L2/PD-I suprimem o sinal TCR-B7-CD28. Por sua vez, contrastando com isto, a elevadas concentrações de antígeno, as interações PD-L2/PD-I atenuam a produção de citocinas mas não inibem a proliferação das células T (Sui, 2015).

Esta molécula encontra-se relacionada com a tolerância imunológica, sendo que nas células tumorais em que o seu ligando é expresso, possibilita-se o desenvolvimento de um mecanismo de escape da vigilância do SI (Sui, 2015). O mecanismo de sinalização da PD-I origina nas células T específicas um estado denominado de “exaustão”, sendo esta molécula essencial para manter a célula T anérgica e, deste modo, prevenir que se estabeleça a autoimunidade. Assim sendo, a deleção genética da PD-I resulta numa complexa destruição auto-imune de vários órgãos. Do mesmo modo que o bloqueio da ligação PD-I/PD-L1 acelera a diabetes autoimune espontânea e reverte a tolerância imunológica. Estes dados sugerem então que o papel central da PD-I se apresenta como o maior mecanismo inibidor da autoimunidade e que a exaustão das células T e a tolerância imunológica periférica estão mecanisticamente relacionadas (Fife, 2009).

O mecanismo PD-I/PD-L1 parece, de facto, representar um mecanismo crítico de resistência das células T em malignidades humanas. A PD-I é regulada positivamente em cancros específicos das células T, onde ocasiona exaustão funcional destas células. Como a PD-L1 é expressa por uma variedade de cancros, sugere-se que estas malignidades usem o mecanismo de sinalização PD-I/PD-L1 para atenuar ou escapar da imunidade antitumoral da célula T e assim, facilitar a progressão tumoral (Soysal, 2016).

## 4. SIGNIFICADO CLÍNICO DA PD-1 PARA MELANOMA

### 4.1. Melanoma

O melanoma é a forma mais preocupante de cancro da pele (Tsai & Daud, 2014). Durante os últimos 30 anos, a incidência de melanoma tem aumentado em todo o mundo e apesar da deteção precoce (que é curável), ressecção cirúrgica apropriada e terapia adjuvante, o número de doentes a morrer devido a esta patologia continua a subir. Segundo a OMS, cerca de 80% de todas as mortes relacionadas com o cancro de pele são atribuídas a melanoma, embora este diga respeito a somente 5% de todos os cancros da pele. É estimado que a taxa de sobrevida para melanoma avançado seja inferior a 16% (Siegel, 2015), (Gogas, Polyzos, & Kirkwood, 2013).

Apesar de todo o investimento em investigação clínica, as opções de tratamento antitumoral convencionais para as metástases de melanoma demonstram-se limitadas, pelo facto desta patologia se apresentar como uma das malignidades mais resistentes à Quimioterapia (Gogas, 2013). Várias terapias convencionais foram aprovadas pela FDA para uso em melanoma, nomeadamente, o Interferão Recombinante  $\alpha$ -2b, aprovado em 1995, e a InterLeucina-2 de Dose Elevada, aprovada em 1998. A terapia mais comumente usada em melanoma é a Dacarbazina, aprovado pela FDA em 1975 como fármaco de 1ª linha para doentes com melanomas metastáticos avançados. O problema relacionado com estes fármacos é a sua limitada taxa de resposta de aproximadamente 15% (Atkins, 1999), (Eigentler, Caroli, Radny, & Garbe, 2003).

O melanoma é um carcinoma associado com a inflamação (Napoli, 2015). Começando com os estadios mais precoces da melanogénese, a luz UV pode causar indução dos melanócitos e queratinócitos para produzir substâncias mediadoras da inflamação, as quais vão cooperar na proliferação do tumor e na criação de um microambiente tumoral. (Margolin, 2014) O melanoma é considerado então, um tumor “imunogénico”. Elevados níveis da PD-L1 encontram-se frequentemente expressos em melanomas, levando isso à ativação da ação da PD-1 e diminuição da imunidade antitumoral (Mamalis, 2015). Por este facto, as *immune checkpoint molecules*, caso da anti-PD-1, apresentam-se como uma terapêutica lógica para a imunoterapia em questão (Napoli, 2015).

#### 4.2. Terapêuticas anti-PD-I e anti-PD-L1

Durante as últimas décadas, um grande número de abordagens terapêuticas para o cancro tem sido estabelecidas, incluindo os inibidores *checkpoint*, como é o caso da anti-PD-I (Sui, 2015). A nova geração destes inibidores, usados quer em monoterapia ou em combinação, oferecem a promessa de estender os seus benefícios clínicos a um maior número de doentes (Luke & Ott, 2015).

O bloqueio dos inibidores *checkpoint*, em particular o mecanismo envolvido pela PD-I e pelos seus ligandos, está a emergir como uma estratégia promissora para a terapia antitumoral (Lipson, 2013). Os inibidores *checkpoint* anti-PD-I e anti-PD-L1 têm atraído uma enorme quantidade de interessados e encorajado no tratamento de doentes com tumores sólidos, especialmente em melanoma (Sui, 2015).

A família dos receptores inibidores da célula T limitam a função desta através da geração de sinais negativos nas células imunes. Um melhor entendimento dos mecanismos do tumor indicou que a atividade imune antitumoral efetiva pode ser conseguida com o uso de anticorpos monoclonais que bloqueiem esses receptores TCR; como é o caso do uso da anti-PD-I (Ferris, 2013).

Investigadores desenvolveram anticorpos anti-PD-I e anti-PD-L1 que interferem com os receptores e ligandos, permitindo que a célula tumoral possa ser reconhecida e atacada por citocinas provenientes da inflamação (Pardoll, 2012). Os anticorpos monoclonais direcionados para a PD-I foram então desenhados de modo a bloquear o estabelecimento desta ligação à PD-L1 ou à PD-L2 na célula tumoral (Luke & Ott, 2015).

Um anticorpo anti-PD-I bloqueia a interação com a PD-L1 e PD-L2, mas não é capaz de bloquear a interação entre PD-L1 e CD80. Pelo contrário, vários anticorpos anti-PD-L1 conseguem bloquear a interação entre PD-L1 e CD80 e entre PD-L1 e PD-I, mas já não conseguem bloquear a interação da PD-I com a PD-L2. Por este facto, dependendo do tipo de interações que predominam no cancro, os anticorpos anti-PD-I e anti-PD-L1 podem não apresentar uma atividade redundante (Pardoll, 2016).

Quando a PD-I liga à PD-L1, a célula T recebe um sinal inibitório que atenua a resposta imune. Deste modo, a inibição crónica desta ligação, ou seja, de uma PD-I à PD-L1 no tumor, conduz a anergia de células T e bloqueio de uma resposta imunitária antitumoral produtiva (Wherry, 2011). O papel crítico que envolve o mecanismo da PD-I na supressão da imunidade antitumoral, primeiramente revelado em modelos laboratoriais, foi agora validado com

estudos clínicos. A monoterapia recorrendo a fármacos bloqueadores da PD-1 ou do seu principal ligando, PD-L1, é capaz de mediar regressões rápidas e duradouras em doentes com tumores sólidos avançados que sejam refratários a anteriores tratamentos. Estes dados estabeleceram o mecanismo da PD-1 como um novo foco terapêutico para Oncologia (Topalian, 2014).

Em 2014, Pembrolizumab e Nivolumab foram aprovados, nos EUA, pela FDA como 2ª e 3ª linha de tratamento para doentes com melanoma avançado refratários ao Ipilimumab (em melanoma BRAF *wild-type*) ou ao Ipilimumab e Inibidores BRAF (em melanomas com a mutação BRAF V600) (Whitney Metcalfe, Jaime Anderson, VanAnh Trinh, 2015).

A terapêutica bloqueadora do mecanismo PD-1/PD-L1 é normalmente bem tolerada. Alguns eventos adversos que são comuns a ambos os agentes anti-PD-1 e anti-PD-L1 incluem prurido, fadiga e perda de apetite. Eventos adversos imunes relacionados (IRAE) com esta classe de agentes foram descritos, tais como dermatite, colite, e hepatite sendo em geral geridos com corticosteróides ou, quando for essencial, há interrupção da terapêutica (Vonderheide, 2014).

## **ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PD-1**

### **I- NIVOLUMAB**

O Nivolumab (também conhecido como ONO-4538, BMS936558 ou MDX-1106) é uma Imunoglobulina G4 (IgG4) totalmente humana, geneticamente desenhada, que atua inibindo a PD-1, para a qual é especificamente direcionada. Este anticorpo liga com elevada afinidade à PD-1, atenuando os sinais inibitórios e melhorando as respostas imunes antitumorais. Este anticorpo monoclonal foi aprovado, pela FDA, em Dezembro de 2014, para o tratamento de melanoma metastático (Sui, 2015) e no início de 2015, teve utilização aprovada, também pela FDA, para tratar doentes com NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*) que falharam com a Quimioterapia à base de Platina (Sunshine, 2016).

O primeiro relato de anti-PD-1 em tumores sólidos foi num ensaio aberto de Fase I que incluiu 39 doentes com melanoma avançado (entre outros tumores) que receberam terapêutica com Nivolumab (MDX-1106). Os objetivos primários deste estudo consistiram na caracterização da segurança e tolerabilidade de uma dose única desta terapêutica, enquanto os secundários incluíram a avaliação da sua atividade antitumoral, da sua farmacodinâmica e dos *endpoints* imunológicos. Avaliando os resultados, o Nivolumab demonstrou ser bem tolerado a uma dose máxima planeada de 10 mg/kg com registo de ocorrência de apenas um evento

adverso sério, colite inflamatória, nos 39 doentes envolvidos. Este perfil de segurança e evidência de atividade clínica duradora encorajou a realização de um ensaio de seguimento, um braço de maiores dimensões, intervencional e multicêntrico (Patrocinado pela *Bristol-Myers Squibb* e outros; ClinicalTrials.gov: NCT00730639), o qual aparentemente confirmou a tolerabilidade e a atividade antitumoral em doentes para os quais múltiplas terapias anteriores já haviam falhado. (Brahmer et al., 2010) Este braço incluiu 296 doentes, dos quais 104 com melanoma e a OR (*Objective Response*), tal como é definido por RECIST (*Response Evaluate Criteria in Solid Tumors*) modificado (Therasse, 2000) foi observada em 26 dos 94 (28%) doentes com melanoma, e previamente tratados (Topalian, 2012).

Um Ensaio de Fase I (ClinicalTrials.gov número NCT01358721) que avalia os biomarcadores imunológicos e moleculares que se correlacionam com o Nivolumab está de momento a decorrer, ainda que até à data, não apresente resultados publicados (Topalian, 2012).

Um Ensaio de Fase II (ClinicalTrials.gov número NCT01354431) está também a decorrer, já apresentando resultados publicados. Este faz o estudo do Nivolumab como terapia para cancro avançado em células renais. O Nivolumab demonstrou comprovada atividade antitumoral com um perfil de segurança aceitável nas três doses estudadas, ainda que sem relação dose-resposta registada, conforme medido pela PFS (*Progression-Free Survival*). (Motzer, Rini, Mcdermott, Redman, & Kuzel, 2015). Este ensaio de Fase II vai de encontro aos resultados até ao momento obtidos, encorajando a configuração de Ensaios de Fase III (os quais já estão inclusive a ser planeados) (Topalian, 2012).

Num ensaio multicêntrico de Fase I (patrocinado pela *Bristol-Myers Squibb* e outros; ClinicalTrials.gov número NCT00729664), procedeu-se à administração intravenosa do anticorpo anti-PD-I num total de 207 doentes selecionados com múltiplos tumores avançados, dos quais 55 tinham melanoma. Como resultados do estudo, o bloqueio da ligação à PD-L1 produziu uma regressão do tumor durável, com uma OR de 6 a 17%, tendo sido 17% no caso de melanoma (OR observável em 9 dos 52 casos de melanoma) e uma estabilização prolongada da patologia nestes doentes, por um período superior a 24 semanas (Hwu, 2012).

Num ensaio clínico de Fase I randomizado, que incluía 107 doentes com melanoma avançado, em que 62% destes já haviam experimentado entre 1 a 5 terapias sistémicas anteriores, a terapêutica com Nivolumab demonstrou melhorar significativamente a PSF média para 3.7 meses, a OS (*Overall Survival*) média para 16.8 meses e a ORR (*Objective Response Rate*) para 31% apenas de regressão tumoral objetiva (Topalian, 2014).

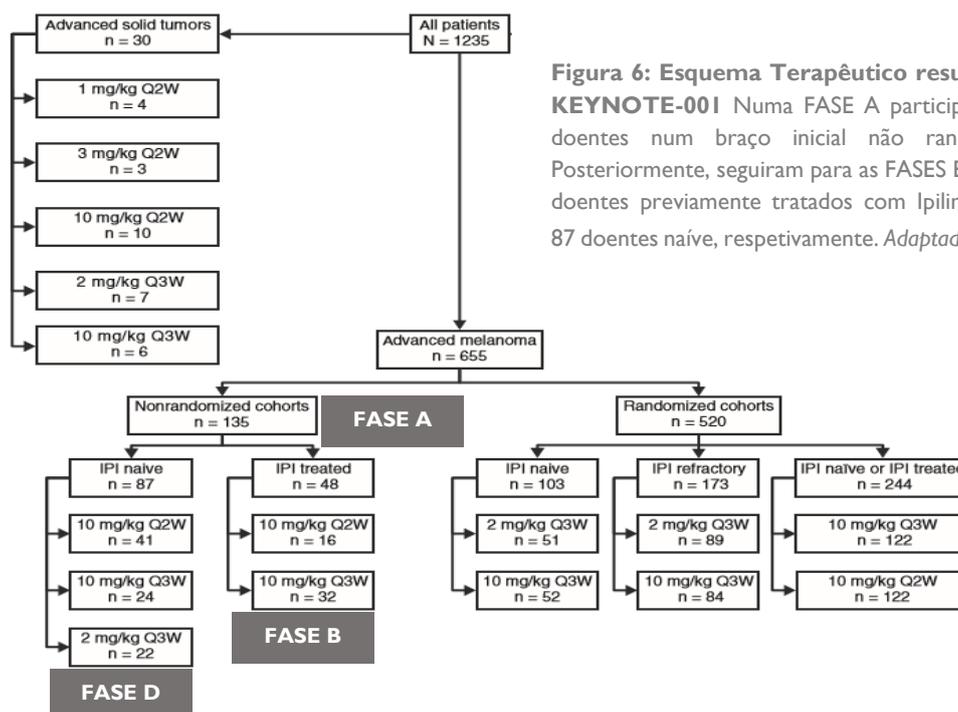
Os resultados de 2 ensaios clínicos de Fase III para a monoterapia com a anti-PD-I em doentes com melanoma foram reportados. O primeiro estudo é um ensaio multicêntrico, duplamente cego, que reporta o uso do Nivolumab como 1ª linha de tratamento em 418 doentes naíves a qualquer terapêutica prévia com melanoma metastático com mutação BRAF *wild-type*. Os doentes foram randomizados em dois grupos, tendo recebido um dos grupos (210 doentes) Nivolumab e o outro (208 doentes) Dacarbazina. O *endpoint* primário avaliado foi a taxa de OS, a qual demonstrou ser de 73% para os doentes tratados com Nivolumab, comparativamente a 42% para os doentes com Dacarbazina, após 1 ano de tratamento. Os outros *endpoints* avaliados, nomeadamente PFS e ORR também demonstraram ser notoriamente superiores no caso do anticorpo anti-PD-I. (Dutriaux, 2015) O segundo estudo (ClinicalTrials.gov número NCT01721746, financiado pela Bristol-Myers Squibb) diz respeito ao primeiro ensaio clínico de Fase III com um agente anti-PD-I (denominado de CA209-037), o qual foi apresentado no congresso de *European Society of Medical Oncology (ESMO)* de 2014. Refere-se a um estudo randomizado, controlado, aberto que comparou o Nivolumab com a Quimioterapia convencional escolhida pelo investigador (Dacarbazina ou Carboplatina + Paclitaxel) em 405 doentes com melanoma metastático avançado, até à progressão ou toxicidade inaceitável. Os doentes foram estratificados de acordo com a expressão da PD-L1, mutação BRAF *wild-type* e a melhor resposta antitumoral prévia ao Ipilimumab, sendo que tal como no primeiro estudo reportado, foram posteriormente randomizados em 2 grupos (272 doentes com Nivolumab vs. 133 doentes com Quimioterapia). Em doentes com a mutação BRAF *wild-type* e naíves ao Nivolumab foram reportadas OR significativamente superiores no caso do anticorpo anti-PD-I, com um registo de 31.7% para o *endpoint* avaliado, comparativamente a apenas 10.6% no caso da Quimioterapia. O Nivolumab registou menos efeitos tóxicos do que as alternativas de regimes de Quimioterapia disponíveis para melanoma avançado (Weber, 2015), (Ascierto, 2015).

Estes resultados, no seu conjunto, suportam a ideia de continuar a investir no desenvolvimento clínico da anti-PD-I para o tratamento de cancros em estado avançado, incluindo melanomas (Sunshine, 2016).

## 2- PEMBROLIZUMAB

O Pembrolizumab (MK-3475), é um anticorpo monoclonais IgG4 anti-PD-I que se considera que reative a atividade imune antitumoral. Foi o primeiro agente anti-PD-I a ser aprovado pela FDA (em Setembro de 2014), para uso em doentes com melanoma metastático com doença progressiva (Khoja, Butler, Kang, Ebbinghaus, & Joshua, 2015), (Roy, 2013).

Num ensaio clínico inicial de Fase I, multicêntrico (Patrocinado pela *Merck Sharp and Dohme*; ClinicalTrials.gov número NCT01295827), denominado de KEYNOTE-001, avaliou-se o Pembrolizumab em 135 doentes com melanoma metastático. Inicialmente os doentes foram envolvidos todos num braço em que o Pembrolizumab foi estudado via intravenosa segundo o esquema terapêutico apresentado na Figura 6 - FASE A, tendo seguido posteriormente para outros braços de expansão não randomizados onde foram separados segundo toma prévia de Ipilimumab (48 doentes) ou não (87 doentes) – FASE B e D, respetivamente.



**Figura 6: Esquema Terapêutico resumindo o KEYNOTE-001** Numa FASE A participaram 135 doentes num braço inicial não randomizado. Posteriormente, seguiram para as FASES B vs. D, 48 doentes previamente tratados com Ipilimumab vs. 87 doentes naïve, respetivamente. *Adaptado da ref.23*

O *endpoint* primário avaliado foi o perfil de segurança desta terapêutica e o *endpoint* secundário foi a atividade antitumoral do Pembrolizumab em doentes que tenham recebido ou não tratamento prévio com Ipilimumab. Foi reportada uma atividade antitumoral promissora, que aumentou de 25%, no primeiro braço, para 52% no segundo (em que a exposição prévia ao Ipilimumab não fez variar este valor); além de uma segurança aceitável, já que as reações adversas reportadas foram de baixo grau e controladas com a gestão da sintomatologia ou interrupção da terapêutica (Hamid, 2013), (Khoja, 2015), (Patnaik, 2015).

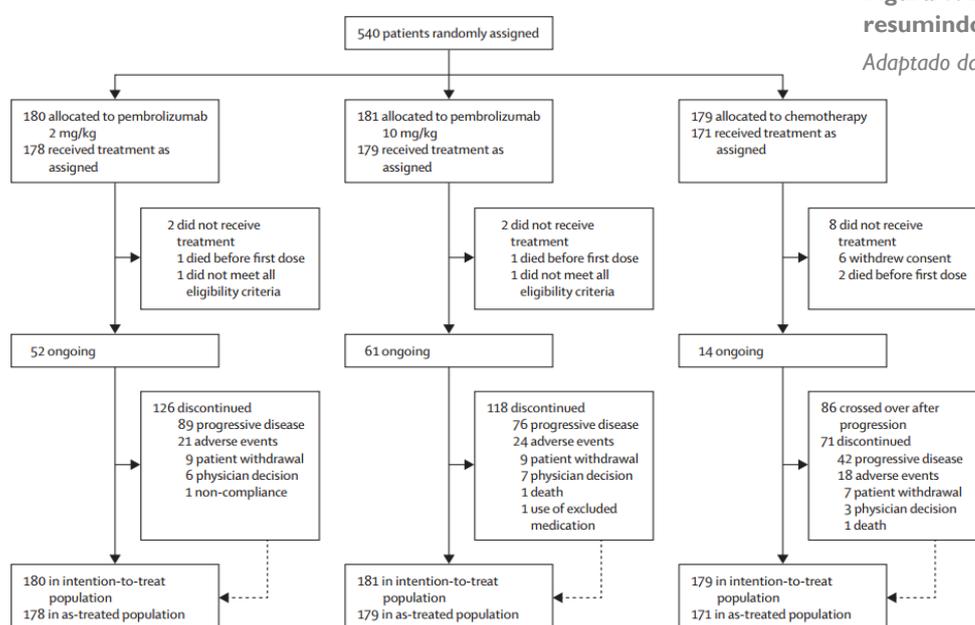
O benefício clínico deste anticorpo monoclonal foi, em seguida, avaliado num braço expansional subsequente (ClinicalTrials.gov número NCT01375842) que incluiu 171 doentes avaliados pela segurança e 122 pela eficácia. Este estudo foi o maior ensaio reportado de um tratamento com anti-PD-I em doentes com melanoma e a primeira comparação randomizada reportada de um agente anti-PD-I. Foi com base nos resultados deste estudo que o

Pembrolizumab obteve a aprovação pela FDA. A ORR, que foi avaliada pelo RECIST, foi de 21% e a PFS foi de 44%, confirmando então que esta terapêutica é bem tolerada e apresenta respostas clínicas duráveis (Roy, 2013).

O KEYNOTE-002 (ClinicalTrials.gov número NCT01704287) foi um ensaio clínico de Fase II de seguimento que permitiu confirmar a eficácia e segurança do uso de Pembrolizumab como terapêutica de 2ª linha vs. Quimioterapia escolhida pelo investigador (nomeadamente, Paclitaxel + Carboplatina, Paclitaxel, Dacarbazina, ou Temozolomida Oral), tendo envolvido 540 doentes que tinham confirmado progressão da doença com outras terapêuticas antitumorais prévias, os quais foram randomizados (em que 180 receberam Pembrolizumab 2 mg/kg, 181 receberam 10 mg/kg; e 179 receberam Quimioterapia).

Figura 7: Desenho esquemático resumindo o KEYNOTE-002

Adaptado da ref.3



A PFS registou melhorias nas duas doses de Pembrolizumab comparando com a Quimioterapia. Não se verificaram diferenças significativas na PFS a 6 meses, entre estas duas doses, tendo sido 34% e 38% para a dose de 2mg/kg e 10 mg/kg, respetivamente, comparando com apenas 16% no grupo da Quimioterapia.

O estudo concluiu e confirmou, portanto, que este anticorpo monoclonal permite uma redução do risco de progressão da doença ou morte, apresentando comprovados resultados clínicos quando comparado com a Quimioterapia (Khoja, 2015), (Ribas, 2015).

O KEYNOTE-006 (ClinicalTrials.gov número NCT01866319, patrocinado pela Merck Sharp & Dohme), por sua vez, é um ensaio clínico de Fase III randomizado e controlado que compara 3 tratamentos diferentes de Pembrolizumab (10 mg/kg Q2W ou Q3W) vs. Ipilimumab (3 mg/kg Q3W) em 834 doentes com melanoma avançado naíveis a tratamentos

antitumorais ou que só haviam recebido um tratamento prévio sistêmico. Com a realização deste ensaio, comprovou-se que o Pembrolizumab produz uma melhoria clinicamente significativa nos *endpoints* primários definidos, nomeadamente PFS (47.3% para o Pembrolizumab Q2W e 46.4% para Pembrolizumab Q3W, comparando com apenas 26.5% para o Ipilimumab) e OS (74.1% para o Pembrolizumab Q2W e 68.4% para o Pembrolizumab Q3W, comparando com 58.2% para o Ipilimumab). Aparentemente, não se verificaram diferenças significativas entre os dois regimes de tratamento definidos para o Pembrolizumab, não havendo portanto uma relação dose-resposta estabelecida, o que confirma mais uma vez, ser congruente com os resultados obtidos para os ensaios anteriores de Fase I e II, KEYNOTE-001 e KEYNOTE-002, respetivamente (Arance, 2015).

## **ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PD-L1**

Os inibidores da PD-L1 atuam por bloqueio da interação entre PD-1/PD-L1, mas não da PD-1/PD-L2. (Luke & Ott, 2015). Foi inclusive reportado que, o bloqueio seletivo da ligação PD-1/PD-L1, mantendo a ligação PD-1/PD-L2 intacta pode oferecer vantagens em termos de toxicidade reduzidas (Chen, Irving, & Hodi, 2012).

Dois ensaios de Fase I com anticorpos anti-PD-L1 tem demonstrado uma atividade promissora destas terapêuticas em melanoma avançado, ainda que com taxas de resposta inferiores quando comparados com os anticorpos anti-PD-1 (Tsai & Daud, 2014).

### **1- BMS-936559/MDX-1105**

O BMS-936559/MDX-1105 é um anticorpo monoclonal IgG4 específico da PD-L1 que atua bloqueando a interação da PD-L1 com a PD-1. Resultados iniciais de um estudo de Fase I envolvendo 207 doentes com tumores sólidos avançados (incluindo 55 com melanoma) demonstraram uma regressão do tumor durável (com uma taxa de OR de 6 a 17%) e uma prolongada estabilização da patologia (taxas de 12 a 41% em 24 semanas). Dos doentes com melanoma, 3 obtiveram uma resposta completa ao tratamento (Tsai & Daud, 2014).

### **2- MPDL3280A**

O MPDL3280A é um anticorpo monoclonal com um domínio Fc desenhado para se direcionar para a PD-L1. Resultados iniciais de um estudo de Fase I envolvendo 171 doentes com tumores sólidos avançados, registaram uma taxa de OR de 21% e uma PFS de 44%. Esta terapêutica demonstrou, portanto, ser bem tolerada e apresentar respostas antitumorais duráveis (Herbst, 2013).

### 3- MEDI4736 e MSB0010718C

Estes anticorpos anti-PD-L1 tem sido avaliados para melanomas avançados em alguns ensaios clínicos em fases iniciais (Tsai & Daud, 2014).

### ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PD-L2

Existe um anticorpo anti-PD-L2 atualmente em desenvolvimento: **AMP-224**. Este anticorpo é uma proteína recombinante de fusão do domínio extracelular da PD-L2, apresentando potencial para bloquear a interação PD-L2/PD-I.

Um estudo de expansão de Fase I (ClinicalTrials.gov: NCT01352884) que teve início em 2011 e investigou esta molécula como monoterapia em tumores avançados já está terminado embora ainda não apresente resultados publicados (Tsai & Daud, 2014), (Suzanne Topalian, Charles Drake, 2013).

## 5. BIOMARCADORES

Ainda que variados estudos comprovem, de facto, a eficácia da terapêutica anti-PD-I, a variabilidade interindividual dos doentes com melanoma pode influenciar essa resposta ótima. (Sui, 2015) No sentido de adivinhar então, quais os potenciais doentes que irão responder bem ao tratamento, tem-se feito estudos de modo a determinar os biomarcadores que melhor se correlacionam com a resposta antitumoral destes anticorpos monoclonais.

A expressão da PD-I no microambiente tumoral pode ser um potencial candidato. Pelo facto de se considerar que os anticorpos anti-PD-I atuam localmente dentro do tumor, a expressão da PD-L1 no tumor prévio a tratamento tem sido explorada como um possível “biomarcador” de modo a tentar prever quais os doentes que vão responder melhor a estas terapias anti-PD-I/PD-L1 (Napoli, 2015).

A possibilidade da existência de uma associação entre a expressão tumoral da PD-L1 prévia à terapêutica com as respostas posteriores que se conseguem com o tratamento foi reportada, pela primeira vez, por *Topalian et al.* num ensaio de Fase I com Nivolumab. A expressão da PD-L1, a qual é detetada por imunohistoquímica, foi encontrada em biópsias de 25 de 42 doentes. Destes 25 doentes com expressão positiva à PD-L1, 9 demonstraram uma taxa de OR ao tratamento de 36%; enquanto dos 17 doentes com expressão negativa à PD-L1, nenhum demonstrou resposta ao tratamento. Estes dados fundamentaram a hipótese sugerida pelos investigadores (Topalian, 2012), (Ascierto, 2013).

Dados subsequentes sugeriram que doentes com melanoma metastático que demonstrem falta de expressão da PD-L1 conseguem responder ao tratamento com anti-PD-I, ainda que com uma taxa de resposta diminuída. Alguns ensaios clínicos tem recolhido biópsias de tumores prévias a tratamento, que serão úteis para avaliações futuras da expressão da PD-L1 e da sua correlação com a resposta antitumoral (Tsai & Daud, 2014).

Segundo um estudo de Akbay *et al.*, foi demonstrada relação entre a mutação EGFR (oncogene) e uma expressão de elevados níveis de PD-L1 em tumores, sendo que os ratos avaliados que apresentavam esta mutação demonstraram uma resposta significativa ao tratamento com anticorpos anti-PD-I, indicando deste modo, que a mutação EGFR pode ser um biomarcador promissor de avaliação da resposta antitumoral a esta terapêutica. (Akbay, 2014) Por sua vez, noutro estudo efetuado, foi reportado que a expressão da PD-L1 é sobre-regulada em células de melanoma que tenham desenvolvido resistência aos Inibidores BRAF (terapêutica antitumoral) (Hooijkaas, 2012).

Ainda que outros fatores do microambiente tumoral, nomeadamente, expressão da PD-I, expressão da PD-L1 por células imunes, razão CD4:CD8 e a presença de TIL (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*), tenham sido investigados como potenciais biomarcadores da resposta à terapêutica com anticorpos anti-PD-I, a expressão da PD-L1 por células tumorais manteve-se como o preditivo da resposta imune mais relevante.

O valor preditivo destes potenciais biomarcadores pode ser aumentado através do estudo da associação de mais que um biomarcador, em vez do recurso a um único (Napoli, 2015).

A expressão da PD-L1 na célula tumoral parece ser, portanto, o biomarcador mais correlacionado com a resposta antitumoral da anti-PD-I, sendo que esta conclusão se tem mantido constante nos sucessivos estudos que tem sido feitos (Sunshine, 2016).

## **6. PERSPETIVAS FUTURAS**

Perspetiva-se a aprovação das terapêuticas anti-PD-I e anti-PD-L1 para tumores adicionais, como sendo uma realidade num futuro próximo. (Sunshine, 2016) Como é o caso do carcinoma do pulmão, onde se considera que estas terapêuticas se possam apresentar como novos alvos da sua imunoterapia (Byrne, 2015).

Também é prospetivável que um ou mais dos ensaios de imunohistoquímica usados para deteção da PD-L1 se possa tornar aprovado pela FDA (Sunshine, 2016).

É previsível ainda que apareçam várias combinações terapêuticas de imunoterapias vão transformar a atual abordagem do tratamento em melanoma (Tsai & Daud, 2014).

## 7. CONCLUSÃO

Cada vez mais se verifica um investimento em investigação científica e no desenvolvimento de novas metodologias de tratamento antitumoral para melanoma, de forma a combater aquela patologia que tanta preocupação desperta e que tão gravemente afeta os doentes, sobretudo os que se encontram em estadios avançados.

Nesse sentido, a anti-PD-I é já uma realidade atual, e que apresenta resultados clínicos bastante promissores para imunoterapia antitumoral em melanoma.

A PD-I é uma molécula endógena do organismo, que foi descrita, pela 1ª vez, em 1992 e apresenta um papel relacionado com a inibição da resposta imune mediada pelas células T ativadas, essencialmente, mas também pelas células B e NK ativadas. Apresenta, de igual modo, um papel relacionado com a limitação da autoimunidade ou tolerância imunológica do organismo. Deste modo, torna-se importante controlar este mecanismo inibidor da resposta do SI, visto ser ela tão fundamental para o combate dos patógenos invasores estranhos ao organismo, como é o caso do tumor.

O antagonismo do mecanismo desencadeado pela PD-I apresenta-se, assim sendo, como uma lógica opção para a abordagem terapêutica antitumoral, pois contraria a resposta inibitória originada pela PD-I quando liga ao seu ligando PD-L1, registando-se uma resposta imune melhorada perante o tumor.

Neste sentido, vários estudos clínicos, em diferentes fases, tem sido elaborados, os quais tem mostrado coerência e comprovado, de facto, o papel preponderante e as melhorias clínicas significativas que os antagonistas da PD-I/PD-L1 registam, não só para melanoma, mas para variados outros carcinomas também.

Os inibidores de todas as moléculas que se correlacionam com este mecanismo, nomeadamente, os ligandos da PD-I, PD-L1 e PD-L2, tem sido de igual modo estudados para os mesmos fins terapêuticos, apresentando resultados bastante satisfatórios nos ensaios clínicos até ao momento elaborados.

Derivado de vários determinantes genéticos que influenciam a boa ou má resposta a esta terapêutica, torna-se absolutamente fundamental avaliar primeiramente, quais os biomarcadores que se correlacionam com esta imunoterapia, de modo a serem conseguidos os melhores resultados clínicos possíveis.

## 8. BIBLIOGRAFIA:

1. Akbay, E. A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Jeremy, H., Christensen, C. L., ... Lynette, M. (2014). Activation of the PD-I pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumor. *Cancer Discovey*, 3(12), 1–17. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0310.Activation>
2. Andrew Mamalis et al. (2015). Targeting the PD-I Pathway: A Promising Future for the Treatment of Melanoma. *Arch Dermatol Res*, 306(6), 511–519. <http://doi.org/10.1007/s00403-014-1457-7.Targeting>
3. Anthony Ribas et al. (2015). Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy KEYNOTE 002. *Lancet Oncol*, 16, 908–18.
4. Arance, A., Ph, D., Grob, J. J., Ph, D., Mortier, L., Ph, D., ... Ebbinghaus, S. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 372(26), 2521–2532. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>
5. Ascierto, P. A. (2015). Immunotherapies and novel combinations : the focus of advances in the treatment of melanoma American Society of Clinical Oncology European Society of Medical Oncology. *Cancer Immunol Immunother*, 64, 271–274. <http://doi.org/10.1007/s00262-014-1647-3>
6. Ascierto, P. A., Kalos, M., Schaer, D. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2013). Biomarkers for Immunostimulatory Monoclonal Antibodies in Combination Strategies for Melanoma and Other Tumor Types. *Clin Cancer Res*, 19(9), 1009–1020. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2982>
7. Brahmer, J. R., Drake, C. G., Wollner, I., Powderly, J. D., Picus, J., Sharfman, W. H., ... Topalian, S. L. (2010). Phase I Study of Single-Agent Anti – Programmed Death-I ( MDX-1106 ) in Refractory Solid Tumors : Safety , Clinical Activity , Pharmacodynamics , and Immunologic Correlates. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY ORIGINAL*, 28(19), 3167–3175. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.7609>
8. Byrne, K. O. (2015). Stimulating immune responses to fight cancer : Basic biology and mechanisms. *Clinical Oncology*, 11(July), 9–15. <http://doi.org/10.1111/ajco.12410>
9. Chen, D. S., Irving, B. A., & Hodi, F. S. (2012). Molecular Pathways : Next-Generation Immunotherapy — Inhibiting Programmed Death-Ligand I and Programmed. *Clinical Cancer Research*, 18(24), 6580–6587. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1362>
10. Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J. C., Rutkowski, P., Ph, D., ... Ascierto, P. A. (2015). Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without. *New England Journal of Medicine Original*, 372, 320–330. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082>
11. Eigentler, T. K., Caroli, U. M., Radny, P., & Garbe, C. (2003). Palliative therapy of disseminated malignant melanoma : a systematic review of 41 randomised clinical trials, 4(December), 748–759.
12. Ferris, R. (2013). PD-I Targeting in Cancer Immunotherapy. *Cancer*, 119(23), 1–5. <http://doi.org/10.1002/cncr.27832.PD-I>
13. Fife, B. T., & Pauken, K. E. (2011). The role of the PD-I pathway in autoimmunity and peripheral tolerance, 4, 45–59. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x>
14. Fife, B. T., Pauken, K. E., Eagar, T. N., Obu, T., Wu, J., Azuma, M., ... Bluestone, J. A. (2009). Interactions between programmed death-I and programmed death ligand-I promote tolerance by blocking the T cell receptor - induced stop signal. *Nature Immunol*, 10(11), 1185–1192. <http://doi.org/10.1038/ni.1790.Interactions>
15. Gogas, H., Polyzos, A., & Kirkwood, J. (2013). Immunotherapy for advanced melanoma : Fulfilling the promise. *Cancer Treatment Reviews*, 39(8), 879–885. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.04.006>
16. Hamid, O., Robert, C., Ph, D., Daud, A., Wolchok, J. D., Ph, D., ... Tume, P. C. (2013). Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti – PD-I) in Melanoma. *New England Journal O F Medicine Original*, 369, 134–144. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1305133>
17. Herbst Roy, et al. (2013). A study of MPDL3280A, an engineered PD-LI antibody in patients with locally advanced or metastatic tumors. *J Clin Oncol*, 31. Retrieved from <http://meetinglibrary.asco.org/content/115865-132>

18. Herbst, R. S., Gordon, M. S., Fine, G. D., Sosman, J. A., Soria, C., Hamid, O., ... Hodi, F. S. (2013). A study of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic tumors. *ASCO Annual Meeting*, 1, 35–36.
19. Hooijkaas, A. I., Gadiot, J., Morrow, M., Stewart, R., Schumacher, T. N., & Blank, C. U. (2012). Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. *Oncolmmunology*, (August), 609–617.
20. Hwu, W., Ph, D., Topalian, S. L., Hwu, P., Chen, S., Ph, D., ... Ph, D. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine Original*, 366, 2455–2465.
21. Joel Sunshine et al. (2016). PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 23, 32–38. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011> PD-1/PD-L1
22. Kenji Ishiwata et al. (2016). Costimulator B7-DC Attenuates Strong Th2 Responses Induced by *Nippostrongylus brasiliensis*. *The Journal of Immunology*, 184, 2086–2094. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0804051>
23. Khoja, L., Butler, M. O., Kang, S. P., Ebbinghaus, S., & Joshua, A. M. (2015). Pembrolizumab. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 1–13. <http://doi.org/10.1186/s40425-015-0078-9>
24. Leif Hakansson. (2016). The capacity of the immune system to control cancer. *European Journal of Cancer*, 5, 8–10. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.06.002>
25. Li, J., Jie, H., Lei, Y., Gildener-leapman, N., Trivedi, S., Green, T., ... Ferris, R. L. (2015). PD-1 / SHP-2 Inhibits Tc1 / Th1 Phenotypic Responses and the Activation of T Cells in the Tumor Microenvironment, 75(3), 508–518. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1215>
26. Lipson, E. J. (2013). Durable tumor regression and successful re-induction therapy using anti-PD1 antibodies Re-orienting the immune system. *Oncolmmunology*, (April), 1–3.
27. Luke, J. J., & Ott, P. A. (2015). PD-1 pathway inhibitors : The next generation of immunotherapy for advanced melanoma. *Oncotarget*, 6(6), 16–25.
28. Margolin, K. (2014). Introduction to the Role of the Immune System in Melanoma. *Hematol Oncol Clin N Am*, 28, 537–558. <http://doi.org/10.1016/j.hoc.2014.02.005>
29. Merelli, B., Massi, D., Cattaneo, L., & Mandalà, M. (2014). Targeting the PD1 / PD-L1 axis in melanoma : Biological rationale, clinical challenges and opportunities. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 89(1), 140–165. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.08.002>
30. Michael Atkins et al. (1999). high-dose recombinant interleucin 2 therapy for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*.
31. Motzer, R. J., Rini, B. I., Mcdermott, D. F., Redman, B. G., & Kuzel, T. M. (2015). Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma : Results of a Randomized Phase II Trial. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 33(13). <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.0703>
32. Napoli, B., Ascierto, P. A., Atkins, M., Bifulco, C., Botti, G., Cochran, A., ... Gajewski, T. F. (2015). Future perspectives in melanoma research : meeting report from the “ Melanoma Bridge.” *Journal of Translational Medicine*, 1–20. <http://doi.org/10.1186/s12967-015-0736-1>
33. Ott, P. A., Hodi, F. S., & Robert, C. (2013). CTLA-4 and PD-1 / PD-L1 Blockade: New Immunotherapeutic Patients. *Clin Cancer Res*, 19(19), 5300–5310. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0143>
34. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature*, 12(April). <http://doi.org/10.1038/nrc3239>
35. Pardoll, D. M. (2016). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Rev Cancer*, 12(4), 252–264. <http://doi.org/10.1038/nrc3239>.The
36. Patnaik, A., Kang, S. P., Rasco, D., Papadopoulos, K. P., Elassaiss-schaap, J., Beeram, M., ... Tolcher, A. W. (2015). Phase I Study of Pembrolizumab ( MK-3475 ; Anti – PD-1 Monoclonal Antibody ) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4286–4293. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2607>

37. Sapochnik, S., Hammer, O., Ortenberg, R., Besser, M. J., Ben-moshe, T., Schachter, J., & Markel, G. (2012). Novel Anti-Melanoma Immunotherapies : Dismantling Tumor Escape Mechanisms. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 9. <http://doi.org/10.1155/2012/818214>
38. Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies : therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*, 279, 541–562. <http://doi.org/10.1111/joim.12470>
39. Sui, X., Ma, J., Han, W., Wang, X., & Fang, Y. (2015). The anticancer immune response of anti-PD-I / PD-LI and the genetic determinants of response to anti-PD-I / PD-LI antibodies in cancer patients. *Oncotarget*, 6(23).
40. Suzanne Topalian, Charles Drake, D. P. (2013). Targeting the PD-I/B7-HI (PD-LI) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 24(2), 207–212. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2011.12.009>. Targeting
41. Therasse, P., Arbutk, S. G., Eisenhauer, E. A., Wanders, J., Kaplan, R. S., Rubinstein, L., ... Gwyther, S. G. (2000). New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(3).
42. Topalian SL et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-I antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012, 366(26), 2443–2454. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1200690>. Safety
43. Topalian, S. L., Sznol, M., Mcdermott, D. F., Kluger, H. M., Carvajal, R. D., Sharfman, W. H., ... Hodi, F. S. (2014). Survival , Durable Tumor Remission , and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 32(10). <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.0105>
44. Tsai, K. K., & Daud, A. I. (2014). PD-I and PD-LI antibodies for melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 1(November), 3111–3116.
45. Vonderheide, T. C. G. & R. H. (2014). Mitigating the toxic effects of anticancer immunotherapy. *Nature*, 11, 91–99.
46. Weber, J. S., Angelo, S. P. D., Minor, D., Hodi, F. S., Gutzmer, R., Neyns, B., ... Thomas, L. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment ( CheckMate 037 ): a randomised , controlled , open-label , phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 16, 375–384. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70076-8](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70076-8)
47. Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nature Publishing Group*, 131(6), 492–499. <http://doi.org/10.1038/ni.2035>
48. Whitney Metcalfe, Jaime Anderson, VanAnh Trinh, W.-J. H. (2015). Anti-Programmed Cell Death-I (PD-I) Monoclonal Antibodies in Treating Advanced Melanoma. *Discovery Medicine*, 19(106), 393–401. Retrieved from <http://www.discoverymedicine.com/Whitney-Metcalfe/2015/05/anti-programmed-cell-death-i-pd-i-monoclonal-antibodies-in-treating-advanced-melanoma/>