



Mecanismos de Resistência aos Inibidores de PD-1/PD-L1

Pedro Filipe Garrido Silveiras

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina submetida ao Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador: Prof. Dr. António M. F. Araújo, Professor Auxiliar Convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Diretor do Serviço de Oncologia Médica do Centro Hospitalar do Porto

Agradecimentos:

Ao Prof. Doutor António Araújo pela orientação desta tese, de uma forma clara e assertiva ajudando a focar o essencial e pelas respostas céleres a todas as minhas dúvidas.

Aos meus pais pelo apoio incondicional durante todos estes anos.

À Ana Catarina Oliveira Sá pelo apoio e paciência.

A todos os colegas e amigos que me acompanharam neste percurso.

Resumo

A terapêutica com inibidores de PD-1/PD-L1 afigura-se como promissora no combate a um crescente número de tumores, tendo demonstrado benefícios clínicos e respostas objetivas em vários estudos. Ainda assim, apesar de os resultados clínicos serem aparentemente positivos, a taxa de resistência primária ronda os 70%. Isto significa que uma proporção significativa dos doentes não é sensível à terapêutica. Para além disso, acrescentando a esse facto, a maioria dos doentes que responde inicialmente acaba por desenvolver resistências, conduzindo inevitavelmente à progressão da doença. A presente dissertação pretende dar a conhecer aqueles que são os mecanismos atualmente propostos para a resistência à terapêutica anti-PD-1/PD-L1, tanto primária como adquirida. Os mecanismos dependem sobretudo de fatores intrínsecos ao tumor como a carga antigénica, mas também de outros aspetos da sua imunogenicidade. A expressão de PD-L1 e o défice de linfócitos infiltrantes de tumor no microambiente tumoral, a apresentação antigénica e a ativação de linfócitos T efetores, interações PD-1/PD-L1, a exaustão severa de linfócitos T, a co-expressão de recetores inibitórios e algumas vias independentes da PD-1 são os fatores que serão explorados como responsáveis pela falta de sensibilidade à terapêutica. Por último, serão abordadas também algumas estratégias terapêuticas que poderão, no futuro, complementar a anti-PD-1/PD-L1 e diminuir as resistências que lhe estão associadas.

Palavras chave: imunoterapia, PD-1, PD-L1, resistência primária, resistência adquirida

Abstract

Anti-PD-1/PD-L1 blockade appears as a very promising immunotherapy in various types of tumours, having shown clinical benefits and objective responses. However, albeit positive clinical results have been shown, the primary resistance rate is still very high, around 70%. Moreover, most patients that show an early response end up developing acquired resistance leading to disease progression. This review shows the current understanding of the proposed mechanisms of resistance associated to anti-PD-1/PD-L1 blockade, both primary and acquired. This will be done by discussing the particular phenotypes and pathways that have been identified to contribute to resistance such as tumour immunogenicity, antigen presentation and effector T-cell activation, T-cell severe exhaustion, PD-1/PD-L1 interactions, inhibitory receptors co-expression and PD-1 independent pathways. At last, the potential efficacy of some therapeutics approaches for improving sensitivity to anti-PD-1/PD-L1 therapies will be discussed.

Keywords: immunotherapy, PD-1, PD-L1, primary resistance, acquired resistance

Conteúdo

Agradecimentos:.....	1
Resumo.....	2
Abstract	3
Lista de Abreviaturas.....	5
Objetivo.....	6
Material e Métodos	6
Introdução.....	6
Mecanismo de ação dos inibidores PD-1/PD-L1.....	7
Aplicação Clínica	9
Mecanismos de resistência	10
Imunogenicidade tumoral	10
Apresentação antigênica e ativação de linfócitos T efetores.....	12
Interações PD-1/PD-L1	12
Exaustão severa	13
Co-expressão de recetores inibitórios	14
Vias independentes da PD-1.....	15
Linfócitos T de memória.....	17
Perspetivas futuras: esquemas de combinação	17
Depleção de linfócitos T reguladores.....	17
Aumento da imunogenicidade	18
Aumento de linfócitos no microambiente tumoral	18
Libertação de células apresentadoras de antígenos.....	19
Inibição de vias que promovem exaustão de linfócitos T	19
Conclusão	20
Referências Bibliográficas	21

Lista de Abreviaturas

ALK – Anaplastic lymphoma kinase, cinase do linfoma anaplásico

APC – Antigen Presenting Cells; células apresentadoras de antígenos

CCL4 – Chemokine (C-C motif) ligand 4; Quimiocina C-C ligando 4

CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; proteína citotóxica 4 associada a linfócitos T

EGFR – Epidermal growth factor receptor; recetor do fator de crescimento epidérmico

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; fator estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos

IFN γ – Interferão gama

LCMV - Lymphocytic choriomeningitis; vírus da coriomeningite linfocítica

LAG-3 - Lymphocyte-activation gene 3; gene 3 da ativação linfocitária

MDSCs – Myeloid-derived supressor cells; Células supressoras derivadas da linhagem mieloide

MHC - major histocompatibility complex; complexo principal de histocompatibilidade

PD-1 – Programmed death 1; proteína da morte celular programada 1

PD-L1 – Programmed death ligand 1; ligando da proteína da morte celular programada 1

NSCLC – Non-small cell lung cancer; cancro do pulmão de não-pequenas células

PTEN - Phosphatase and tensin homolog; homólogo da tensina e fosfatase

TIL – Tumor infiltrate lymphocytes; linfócitos infiltrantes de tumor

TIM-3 – T-cell molecule with immunoglobulin and mucin domain 3; molécula de linfócito T com imunoglobulina e domínio 3 da mucina

TNF α – Tumor necrosis factor alfa; fator de necrose tumoral alfa

Objetivo

A imunoterapia afigura-se cada vez mais como uma alternativa no combate terapêutica a um número crescente de neoplasias. O aparecimento de terapêuticas anti-PD-1/PD-L1 é visto como um avanço no combate à doença oncológica, no entanto há desafios que têm de ser ultrapassados, nomeadamente as resistências que lhe estão inerentes, tanto primárias como adquiridas. Desta forma, esta dissertação visa abordar e discutir o panorama atual das vias celulares e moleculares que contribuem para o desenvolvimento de resistências aos inibidores da PD-1/PD-L1 bem como explorar eventuais terapêuticas de combinação que visem diminuir o efeito das mesmas.

Material e Métodos

Para a realização deste artigo de revisão bibliográfica foi efetuada uma pesquisa de artigos na base de dados bibliográfica MEDLINE – PubMed. A pesquisa bibliográfica dos artigos científicos foi realizada entre os meses de Agosto de 2016 e Abril de 2017. As palavras-chave usadas foram: imunoterapia, anti PD-1, anti PD-L1 resistência, checkpoint.

Os artigos foram selecionados ou excluídos conforme o conteúdo do título e/ou resumo. Apenas foram selecionados artigos publicados em inglês ou português e que foram publicados durante o período de 2012-2017. A pesquisa inclui também a procura de artigos nas referências bibliográficas de estudos analisados e selecionados, os quais se incluem no período de 1998-2017.

Introdução

O panorama da imunoterapia no contexto oncológico tem sofrido alterações nos últimos tempos, em virtude do aparecimento de terapêuticas imunológicas que têm como alvo os recetores do checkpoint imunossupressor da proteína citotóxica associada a linfócitos T (CTLA-4) ou da proteína da morte programada celular programada (PD-1) e do seu ligando (PD-L1).⁽¹⁾ Os inibidores de PD-1 e PD-L1 têm demonstrado serem clinicamente eficazes em mais de 15 tipos de neoplasias, nomeadamente melanoma, cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC), carcinoma das células renais, carcinoma da bexiga e linfoma de Hodgkin's.⁽²⁾

Neste sentido, recentemente foram aprovados pela FDA dois anticorpos monoclonais anti PD-1, nivolumab (Opdivo ®) e pembrolizumab (Keytruda ®) para o

tratamento de NSCLC, melanoma metastático e carcinoma de células renais ou NSLC e melanoma avançado, respetivamente. Em maio de 2016 foi aprovado pela FDA um anticorpo monoclonal anti PD-L1, atezolizumab (Tecentriq ®) para o carcinoma da bexiga. Em outubro de 2016 foi também aprovado o seu uso para o NSCLC. No entanto, a resistência primária às terapêuticas anti-PD-1 é ainda frequente, afetando até 70% dos doentes em alguns tipos de neoplasias. ⁽³⁾ A isso acresce o facto de que alguns doentes que manifestaram respostas iniciais positivas desenvolveram resistências às terapêuticas anti-PD-1, originando recidiva da doença. ⁽⁴⁾

Assim, é importante identificar os mecanismos por trás da resistência a esta terapêutica de forma a que seja possível no futuro delinear terapêuticas de combinação tendo por base os alvos identificados.

Mecanismo de ação dos inibidores PD-1/PD-L1

Ao longo do último século, a pesquisa ao nível da oncologia tentou utilizar o sistema imunitário como meio para combater o cancro. Várias terapêuticas, como transplantes alogénicos de células estaminais, injeção local de agentes inflamatórios como o Bacilo Calmette-Guerin (BCG), entre outras, têm vindo a ser utilizadas com diferentes graus de sucesso. Quando bem-sucedidas, estas terapêuticas são capazes de gerar remissão a longo prazo, no entanto, até recentemente, a imunoterapia estava limitada pela baixa eficácia e toxicidade severa. Daí que tenha sido com entusiasmo que a comunidade oncológica recebeu a descoberta da possibilidade de interferir com o microambiente tumoral ao nível da PD-1 e PD-L1. ⁽⁵⁾

As células tumorais escapam ao reconhecimento por parte do sistema imunitário a partir de vários mecanismos, entre os quais a *downregulation* de antigénios tumorais, o que permite gerar um microambiente imunossupressor através da secreção de citocinas anti-inflamatórias e expressão de reguladores do sistema imunitário que efetivamente desligam o combate às células tumorais. Uma das interações chave neste processo de combate às células tumorais reside precisamente na sinalização da ligação entre PD-L1 e PD-1. ⁽⁶⁾

O PD-L1 está presente na superfície das células tumorais e a PD-1 na superfície dos linfócitos T e B ativados. ⁽⁶⁾ Consequentemente, a ligação do PD-L1 à PD-1 resulta num efeito imunossupressor que permite ao tumor escapar à destruição por parte do sistema

imune. ⁽⁷⁾ Para além de limitar a resposta dos linfócitos T, também pode levar ao desenvolvimento de um fenótipo de linfócitos-T exaustos, caracterizado pela perda de proliferação e atividade citolítica, seguido de défices na produção de citocinas e, eventualmente, deleção. ⁽⁸⁾

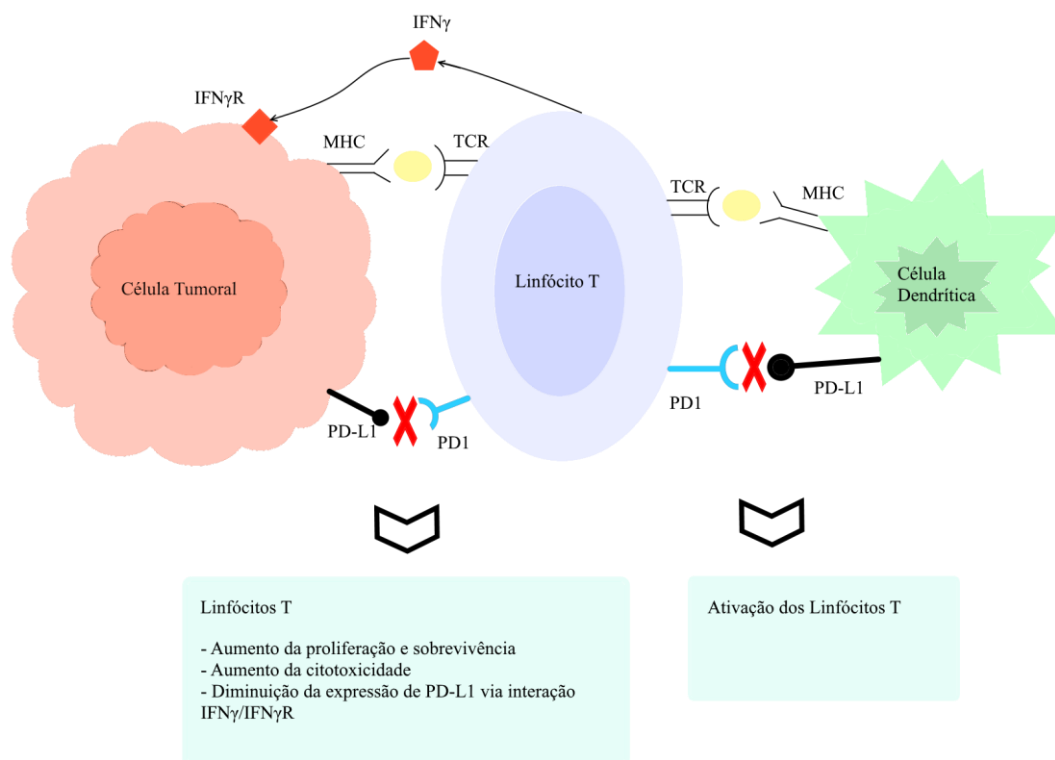


Figura I – Representação da inibição da interação PD-1/PD-L1 entre a célula tumoral e o linfócito T.

Dos vários tumores capazes de expressar PD-L1 uma minoria tem vindo a ser apontada como expressando este ligando de forma constitutiva por fatores oncogénicos (EGFR e ALK no NSCLC) ou mutações no supressor tumoral (PTEN em alguns glioblastomas). ⁽⁹⁻¹¹⁾ No entanto, a maioria dos tumores expressam PD-L1 com um carácter reativo e adaptativo em resposta às citocinas inflamatórias, nomeadamente interferão tipo I e II (sobretudo interferão gama - IFN γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Este fenómeno, denominado por resistência imune adaptativa, permite ao tumor escapar à ação imunológica do organismo. ⁽¹²⁻¹³⁾

Desta forma, ao contrário de imunoterapias anteriores que atuavam principalmente exacerbando resposta imunes ou gerando imunidade de novo contra o cancro, a

terapêutica anti-PD-1/PD-L1 modula a resposta imune no local tumoral, tendo como alvo os defeitos imunes induzidos pelas células tumorais, reparando as respostas imunes correntes. ⁽¹⁴⁾

Aplicação Clínica

A introdução dos inibidores de PD-1/PD-L1 foi um marco importante no tratamento de vários tumores. O seu aparecimento foi particularmente relevante ao nível do tratamento do melanoma. A sobrevida a 1 ano para doentes em estadio avançado (estadio III não ressecável ou estadio IV) era de 25-30% em 2009 ⁽¹⁵⁾ e nos doentes tratados com terapêuticas envolvendo anti-PD-1 essa sobrevida excedeu os 70%. ⁽¹⁶⁻²⁰⁾

Apesar de apenas dois anticorpos monoclonais anti PD-1 estarem aprovados pela FDA, nivolumab (Opdivo®) e pembrolizumab (Keytruda®), várias alternativas estão em processo de desenvolvimento. ⁽¹⁴⁾ A vantagem da terapêutica anti-PD1 consiste sobretudo na duração dos seus efeitos, na toxicidade reduzida e tolerável e pelo facto de ser aplicável a um espectro alargado de neoplasias, nomeadamente no que aos tumores sólidos diz respeito. Este aspeto coloca-a numa categoria à parte, distinta das terapêuticas personalizadas ou tumor-específicas. ⁽¹⁴⁾

O nivolumab foi o primeiro anticorpo monoclonal tendo como alvo a PD-1 a apresentar atividade clínica relevante em melanomas não ressecáveis ou metastáticos, NSCLC e carcinomas de células renais metastáticos. ^(3,21) Relativamente ao NSCLC escamoso metastático, o nivolumab aumentou a sobrevida geral dos doentes, quando comparado à quimioterapia standard, para além de ter revelado uma taxa de resposta objetiva de 15% em doentes que tinham progredido após receberem pelo menos dois regimes sistémicos. ⁽²²⁾

O pembrolizumab demonstrou eficácia e segurança similares ao nivolumab no tratamento do melanoma avançado, sendo agora aprovado como tratamento de segunda linha pela FDA. ^(23,24) Para além disso, demonstrou ser eficaz em doentes com NSCLC avançado (com uma taxa de resposta objetiva de 19%) ⁽²⁵⁾ e tem mostrado efeitos promissores noutros tumores sólidos, nomeadamente cancro gástrico avançado ⁽²⁶⁾, cancro da bexiga avançado ⁽²⁷⁾, cancro da cabeça e pescoço ⁽²⁸⁾, linfoma de Hodgkin clássico ⁽²⁹⁾ e cancro da mama triplo negativo ⁽³⁰⁾.

Porém, a terapêutica anti PD-1/PD-L1, ainda que bastante eficaz, é de pouco benefício para muitos doentes. Assim sendo, podemos classificá-los de acordo com a resposta clínica à terapêutica como sendo sensíveis, resistentes primários ou resistentes adquiridos. Nos doentes com melanoma, a doença que mais tem beneficiado com a introdução desta terapêutica, cerca de 30% revelaram ser sensíveis (ou seja, com progressão de doença estável ou resposta completa) enquanto que 70% não revelaram qualquer benefício, apresentando progressão da doença, tendo sido por isso considerados resistentes primários. Entre aqueles que beneficiaram da terapêutica numa fase inicial, alguns acabaram por voltar a sofrer progressão da doença, fruto de resistências adquiridas. ^(3,31)

Mecanismos de resistência

Como já foi abordado, o mecanismo de ação da terapêutica anti-PD-1/PD-L1 depende da limitação da interação entre PD-1 e PD-L1 com consequente inativação da supressão de linfócitos T específicos para o antígeno tumoral. Logo, os mecanismos que levam ao desenvolvimento de resistências primárias e adquiridas deverão funcionar no sentido de contrariar a atividade tumor-específica das linfócitos T previamente ou em resposta ao tratamento, respetivamente. Assim, os mecanismos que irão ser abordados e que se pensam estar envolvidos na promoção de resistências recaem sobretudo naqueles que afetam a imunogenicidade tumoral, a apresentação de antígenos e desenvolvimento de linfócitos T efetores, o encontro de antígenos e PD-L1 por linfócitos T tumor-específicos, a atividade e eficácia de respostas imunes tumor-específicas e a indução de memória imunológica. ⁽⁴⁾

Imunogenicidade tumoral

A imunogenicidade tumoral é um fator essencial para a eficácia da terapêutica anti-PD-1 e constitui um dos grupos mais importantes envolvidos nas resistências primárias. Os tumores expressam antígenos que os diferenciam de células não transformadas. Estes antígenos devem, na teoria, ser derivados de proteínas não mutadas para as quais a tolerância dos linfócitos T é incompleta, antígenos virais em que a transformação maligna é promovida pela infecção viral ou mutações não-sinónimas que originam neoantígenos. ⁽³²⁻³⁴⁾

Tumores pouco imunogénicos são amplamente resistentes à terapêutica anti-PD-1, como se pode comprovar pela observação de que a carga tumoral de neoantígenos se

correlaciona com a imunogenicidade e sensibilidade à terapêutica anti-PD-1. ⁽³⁵⁾ O melanoma, carcinoma das células renais e NSCLC são altamente imunogénicos, com 5 a 10 mutações somáticas por mega-base de DNA. ^(3,33) No mesmo sentido, estes tumores estão entre os mais sensíveis à terapêutica anti-PD-1. Já os tumores pouco imunogénicos, como são exemplo o do pâncreas ou da próstata, tendem a ter entre 0,1 a 1 mutações somáticas por mega base de DNA e são amplamente correlacionados com uma maior resistência à terapêutica anti-PD-1. ^(33, 36) Os tumores com maior carga de neoantígenos também demonstraram níveis superiores de atividade citolítica mediada por linfócitos T. Este facto é suportado pela abundância de linfócitos T CD8+ e níveis elevados de granzima A e mRNA perforina que apresentam. ⁽³⁷⁾

Por outro lado, a imunogenicidade dos tumores pode também ser influenciada pelo timing no qual as vias imunossupressoras são adotadas aquando do seu desenvolvimento. Durante as fases iniciais do desenvolvimento tumoral uma proporção elevada de neoantígenos pode ser excluída pelo processo de imunoedição. ⁽³⁸⁾ A indução da PD-L1 numa fase mais precoce do desenvolvimento tumoral pode levar ao seu crescimento em tumores de maior imunogenicidade, sendo que o timing de indução em diferentes tipos de tumores pode ser influenciado pelo tipo de tecido a partir do qual o tumor se origina e a relevância do checkpoint PD-1/PD-L1.⁽⁴⁾ Nesse sentido a escassa expressão de PD-L1 na próstata, por exemplo, pode explicar porque é que tumores que se originam nessa zona expressam níveis baixos de PD-L1, apresentando por isso uma alta taxa de resistência primária à terapêutica anti-PD-1. ⁽³⁶⁾

Porém, a carga de mutações e imunogenicidade podem ser relevantes também na resistência adquirida. Em doentes que inicialmente respondem à terapêutica anti-PD-1 pode ocorrer uma seleção de clones tumorais com a capacidade de subverter a resposta dos linfócitos T. ⁽⁴⁾ Isto pode ocorrer por vários mecanismos como a perda de antígenos ^(39,40), *downregulation* da classe MHC I via mutação da β -2-microglobulina ^(41,42) (necessária para responsividade a interferões), mutações que afetam o desenvolvimento da via JAK-STAT (necessária para a responsividade aos IFNs) ou pelo desenvolvimento de células tumorais que induzem vias alternativas de imunossupressão.

Apresentação antigénica e ativação de linfócitos T efetores

A preparação e ativação de linfócitos T efetores com especificidade para antígenos tumorais é levada a cabo por células apresentadoras de antígenos (APC) como as células dendríticas.⁽⁴³⁾ Na presença de sinais de ativação as células dendríticas maturam de forma a aumentar a eficiência do processamento antigénico, a sua motilidade e a expressão de maquinaria co-estimulatória necessária à ativação dos linfócitos T. No entanto a maturação não é suficiente para a ativação dos linfócitos T, é também necessário que as células dendríticas migrem para os órgãos linfoides secundários e apresentem o MHC aos linfócitos T *naïve*.⁽⁴³⁾

Recentemente foram identificados mecanismos que perturbam a apresentação antigénica e ativação dos linfócitos T resultando em resistência à terapêutica anti-PD-1. Entre eles estão mutações em melanomas que aumentam a estabilidade e sinalização da β -catenina, reduzindo a expressão de CCL4 (quimiocina C-C ligando 4 com especificidade para recetores CCR5) que é importante para a migração das células dendríticas.⁽⁴⁴⁾ Reduzidos níveis de CCL4 e ineficiente infiltração de células dendríticas no microambiente tumoral foram associados a resistência à terapêutica anti-PD-1.⁽⁴⁴⁾ Num estudo recente em modelos com ratos foi demonstrado que aqueles cuja flora intestinal não tinha *Bifidobacterium genus* apresentavam uma redução intratumoral de células dendríticas e respostas muito escassas à terapêutica anti-PD-1, embora os mecanismos pelos quais isto ocorre não sejam ainda bem compreendidos.⁽⁴⁵⁾

Para além de perturbarem a migração das células dendríticas, alguns tumores também demonstraram terem um efeito deletério na sua maturação. Implicados nesse efeito parecem estar a citocina *milieu*⁽⁴⁾, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)⁽⁴⁶⁾, o fator de crescimento transformador derivado de tumor Beta (TGF- β)⁽⁴⁷⁾ e a interleucina-10 (IL-10)⁽⁴⁸⁾.

Interações PD-1/PD-L1

A ativação de linfócitos T requer o agrupamento de linfócitos T antígeno específicos com células que apresentem antígenos correspondentes: tal como acontece com a ligação do PD-1 expressado pelos linfócitos T com o PD-L1 expressado no microambiente tumoral.⁽⁴⁹⁾ Desta forma, é expectável que fatores que impeçam a migração de linfócitos T tumor-específicos ou a atividade da PD-1 no tecido tumoral sejam importantes na limitação da eficácia da terapêutica anti-PD-1.

Em termos gerais, a presença de infiltrados inflamatórios ricos em linfócitos foi associada a melhores resultados nos tumores colorretal, ovárico, pancreático, esofágico e NSCLC. Foi também reportado, em alguns casos, uma associação com uma melhor resposta à terapêutica anti-PD-1. ⁽⁵⁰⁾ No melanoma, onde há mais resultados de investigações, a presença de linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) dentro da margem invasiva correlacionou-se com a sensibilidade à terapêutica anti-PD-1. ^(51,52) Por outro lado, a presença em abundância de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs) no tecido tumoral e razões mais elevadas de linfócitos T reguladores Foxp3+ /linfócitos T CD8+ foram associadas a resistências. ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾

Ainda assim, embora estas observações tenham significado prognóstico, os mecanismos que promovem estas diferenças relativamente à infiltração de células linfóides e mielóides entre tumores ainda são bastante sombrios. ⁽⁴⁾ Relativamente à pobre infiltração tumoral, sabe-se que a ausência de linfócitos T tumor-específicos poderá ser um fator predisponente. Assim, é expectável que o desenvolvimento tumoral ocorra a um maior ritmo quando a imunogenicidade é baixa ou quando a apresentação antigénica é suprimida. ⁽⁴⁴⁾

No entanto, há alguns tumores que apresentam resistência e que contêm TILs. É o caso de alguns melanomas nos quais foram encontradas expansões *in situ* de linfócitos T CD8+ exaustos associadas ao tumor. ⁽⁵¹⁾ Estes dados correlacionaram-se com um prognóstico negativo, mesmo em doentes com infiltrados tumorais linfocíticos extensos. ⁽⁵⁶⁾ Já a co-localização de TILs PD-1+ e células tumorais PD-L1+ correlacionou-se fortemente com resposta à terapêutica anti-PD-1, suportando aqueles que atualmente se acreditam ser os mecanismos de ação destes fármacos. ⁽⁵³⁾

Exaustão severa

A exposição crónica de antigénios correspondentes pode despoletar a *upregulation* da expressão de PD-1 e, ao interagir com o seu ligando, induzir a exaustão dos linfócitos T. ⁽⁸⁾ Para além disso, técnicas *in vitro* demonstraram que a força da sinalização de PD-1 é determinada pelo seu nível de expressão relativa e pode definir a severidade da exaustão da população de linfócitos T. ⁽⁵⁷⁾ A presença de níveis relativos elevados de PD-1 em populações severamente exaustas de linfócitos T em estudos pré-clínicos foi associada a resistência à terapêutica anti-PD-1. Já as populações de linfócitos T exaustos que exibiam

níveis relativos intermédios ou baixos de PD-1 mantiveram a capacidade de ser revigoradas pela terapêutica anti-PD-1. ⁽⁵⁸⁾

Co-expressão de recetores inibitórios

Associado ao fenótipo de exaustão severa manifestado por alguns linfócitos T está a sobre-expressão de múltiplos recetores inibitórios como a molécula de linfócito T com imunoglobulina e domínio 3 da mucina (TIM-3), CTLA-4, gene 3 da ativação linfocitária (LAG3) e atenuador dos linfócitos B e T (BTLA), para além do PD-1. ⁽⁴⁾ A capacidade imunossupressora destes recetores foi inicialmente definida em modelos de infeção crónica pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV). ⁽⁵⁹⁾ No entanto, embora haja alguns paralelismos no que concerne à persistência antigénica na infeção crónica e aquela que acontece em tumores, não é claro se os padrões de expressão e atividade se comportam de forma igual em ambas as condições. ⁽⁸⁾

Recentemente, foi identificado que a co-expressão de PD-1, TIM-3, LAG3, CTLA-4 e BTLA está associado à resistência à terapêutica anti-PD-1 no NSCLC. ⁽⁶⁰⁾ Linfócitos T CD8+ que expressavam os cinco recetores demonstraram defeitos severos na produção de citocinas, proliferação e migração. Foi proposto ainda que a expressão de PD-1, TIM-3, LAG3 e CTLA-3 estivessem associados a um fenótipo de exaustão mais ligeiro que seria agravado pela expressão de BTLA. ⁽⁶⁰⁾

É ainda desconhecido se a resistência primária demonstrada por linfócitos T CD8+ severamente exaustos com nível relativo de PD-1 elevado é resultado de uma sinalização compensatória mediada por recetores inibitórios co-expressados ou se os níveis elevados de PD-1 conseguem, por si só, dotar os linfócitos T de um defeito intrínseco na sensibilidade à terapêutica anti-PD-1. ⁽⁴⁾

Num estudo recente usando modelos de adenocarcinoma do pulmão de ratos foi demonstrado que a *upregulation* de TIM-3 nos linfócitos PD-1+ se correlacionou com a indução de resistência adquirida à terapêutica anti-PD-1. ⁽⁶¹⁾ A expressão de TIM-3 neste modelo foi superior nos linfócitos T com maior expressão de PD-1. A implicação é então que, dado a ligação de anti-PD-1 ser limitada pela expressão de PD-1, a TIM-3 foi expressa por linfócitos T CD8+ severamente exaustos com níveis de PD-1 elevados. ⁽⁶¹⁾ Para além disso, linfócitos T de tumores resistentes também sobre-expressaram LAG3 e CTLA-4, no entanto a expressão de BTLA foi variável. ⁽⁶²⁾

Em suma, os mecanismos que promovem a indução de exaustão severa de células T no microambiente tumoral ainda não estão muito bem definidos e ainda é desconhecido se a redução da expressão de PD-1 entre os linfócitos T CD8+ severamente exaustos com altos níveis de PD-1 poderá aumentar a sensibilidade à terapêutica. Adicionalmente também se desconhece ao certo se expressão dos outros recetores pode ser independente do PD-1.

Vias independentes da PD-1

Para além das vias dependentes da PD-1 existem outras que limitam a resposta de alguns tumores à terapêutica anti-PD-1. Por exemplo, os linfócitos T estão limitados metabolicamente pela biodisponibilidade de triptofano e deixam de proliferar na sua ausência. ⁽⁴⁾ Muitos tumores expressam a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelo mesmo mecanismo induzido pelo IFN da PD-L1. ⁽⁶²⁾ A expressão de IDO pelas células tumorais ocorreu em modelos experimentais de ratos que revelaram resistência à terapêutica anti-PD-1. ^(63, 64)

Alguns estímulos pro-inflamatórios como o stress celular iniciado por hipoxia ou isquemia pode promover a produção de adenosina imunossupressora. O ATP (adenosina trifosfato) libertada no meio extracelular interage com o CD39 para produzir AMP (adenosina monofosfato) que é desfosforilada pelo CD73 em adenosina. A ligação da adenosina a recetores A2A expressados pelos linfócitos, como os linfócitos T CD8+, inibe as suas funções efetoras. ⁽⁶⁵⁾ Em modelos experimentais de tumores do cólon, próstata e mama em ratos foi demonstrado que a ativação da sinalização da adenosina exacerbava a expressão de PD-1 em linfócitos T CD8+ associadas ao tumor, promovendo um fenótipo de exaustão severa e resistência à terapêutica anti-PD-1. ⁽⁶⁶⁾

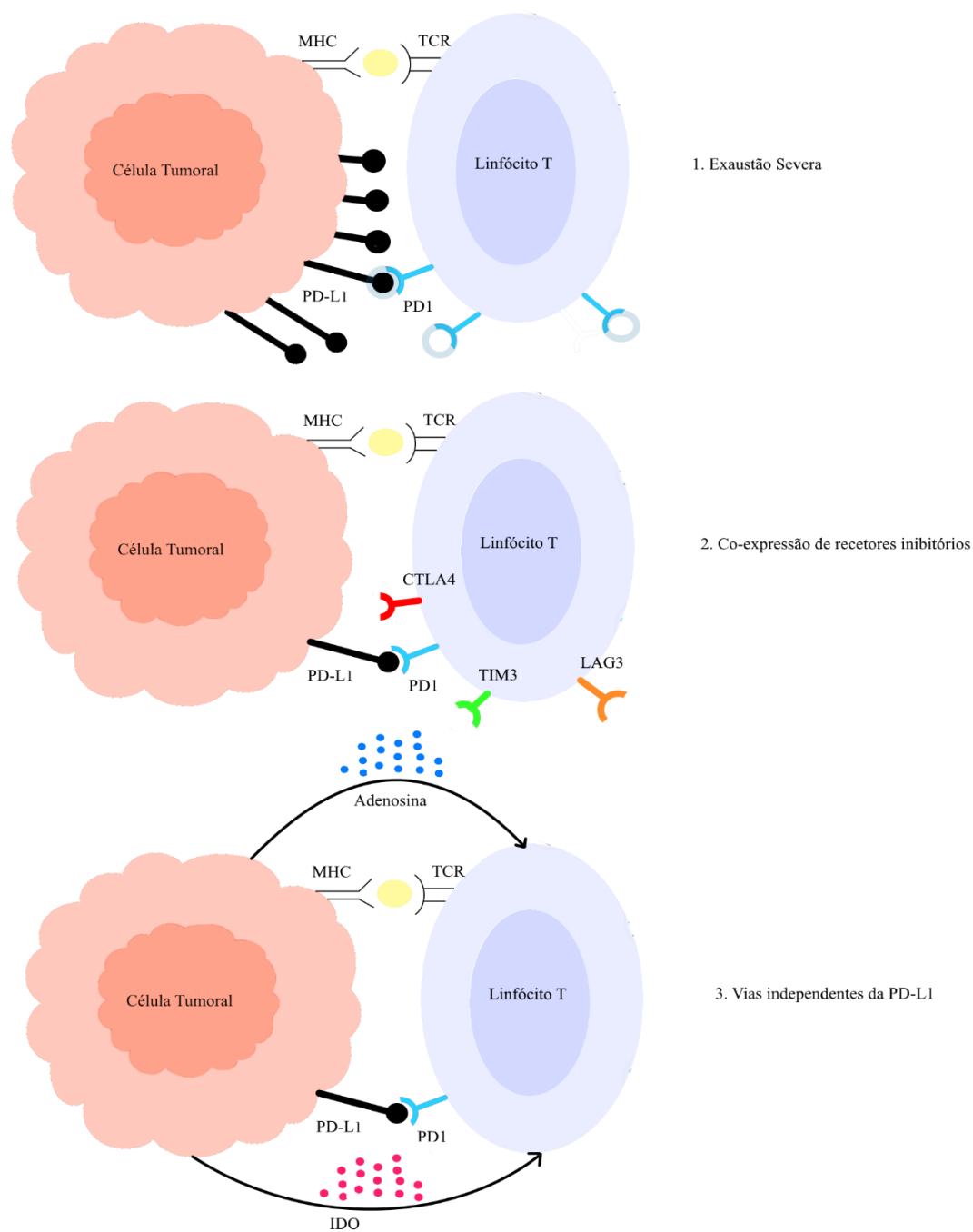


Figura II – Mecanismos de resistência à terapêutica anti-PD-1/PD-L1 – exaustão severa. **1** – Linfócitos T específicos de tumor que demonstram um fenótipo de exaustão severa, caracterizado por elevada expressão de PD-1. **2** – A expressão de marcadores de exaustão como TIM3, LAG3 e CTLA-4 podem facilitar a exaustão. **3** – A expressão de metabolitos imunossupressores como a IDO ou adenosina demonstraram suprimir a função dos linfócitos T mesmo na presença de inibidores anti-PD-1. Adaptado de O’Donnell, J.S., Long, G.V., Scolyer, R.A., W. L. Teng, M., Smyth, M.J., *Resistance to PD-1/PD-L1 checkpoint inhibition*, Cancer Treatment Reviews, 2016

Embora ainda esteja por definir o seu papel exato em humanos, é possível ficar com uma ideia de que vias independentes dentro do microambiente tumoral poderão promover por si só o desenvolvimento tumoral e resistências à terapêutica anti-PD-1, tanto primárias como adquiridas.

Linfócitos T de memória

Os linfócitos T CD8+ já demonstraram o seu papel na eficácia das terapêuticas anti-PD-1, no entanto, estudos recentes apontam que a indução de linfócitos T de memória também tem alguma relevância.

Estes linfócitos T são altamente diferenciados e após entrarem na fase de memória, que pode ser mantida durante toda a vida do hospedeiro, estão preparados para responder no caso de ressurgimento de um antígeno específico.

Recentemente, um estudo comparando infiltrados imunológicos em células tumorais pré e pós terapêutica anti-PD-1 demonstrou que os linfócitos T CD8+ efetores de memória eram o subtipo de linfócitos T mais expandido em doentes que demonstraram sensibilidade.⁽⁶⁷⁾ Ou seja, doentes categorizados como tendo respondido mal à terapêutica revelaram um número mais reduzido de linfócitos T efetores de memória que aqueles que foram considerados sensíveis.⁽⁶⁷⁾ É, então, legítimo pensar que a indução de linfócitos T efetores de memória é um mecanismo que contribui para a eficácia da terapêutica anti-PD-1 e que a resistência à terapêutica limita a indução deste fenótipo de linfócitos T.

Perspetivas futuras: esquemas de combinação

O conhecimento dos atuais mecanismos de resistência à terapêutica anti-PD-1 permite identificar vários alvos que poderão ter interesse no âmbito de eventuais estratégias terapêuticas de combinação para sensibilizar doentes resistentes.

Depleção de linfócitos T reguladores

Uma razão elevada de linfócitos T reguladores Foxp3+/ linfócitos T CD8+ está associada a resistência à terapêutica anti-PD-1.⁽⁵⁶⁾ Para reduzir esta razão no microambiente tumoral algumas estratégias terapêuticas demonstraram eficácia na depleção de linfócitos T reguladores.

A terapêutica anti-CTLA-4 permitiu a depleção de linfócitos T reguladores e o aumento da eficácia da imunidade anti-tumoral mediada por linfócitos T específicos de tumor ⁽⁶⁸⁾ e foi demonstrado que tem efeito sinérgico com a terapêutica anti-PD-1. (19,69)

O anticorpo monoclonal anti-OX40 demonstrou atuar seletivamente na depleção de linfócitos T reguladores tumorais e limitar o crescimento do tumor. ⁽⁷⁰⁾ Embora tenha sido demonstrado efeito sinérgico com a terapêutica anti-PD-1 em modelos pré-clínicos com cancro do ovário resistentes à monoterapia com anti-PD-1, estudos clínicos para verificarem a sua eficácia ainda estão a ser levados a cabo. ⁽⁷⁰⁾

Terapêuticas anti-TIM-3 e anti-TIGIT estão a ser testadas em modelos pré-clínicos de cancro colo-retal e melanoma, respetivamente. ^(71,72)

Aumento da imunogenicidade

Doentes com tumores pouco imunogénicos podem beneficiar de outras terapêuticas que disponibilizam mais antigénio tumoral para as APC o que se traduz num aumento da sensibilidade à terapêutica anti-PD-1. ⁽⁷³⁻⁷⁶⁾ A radioterapia e alguns agentes de quimioterapia, como a doxorubicina, podem ser usados em combinação com anticorpos monoclonais anti-PD-1 para promover uma imunidade anti-tumoral mais eficaz. ^(77,78)

No entanto, estas terapêuticas estão geralmente associadas a efeitos adversos severos, pelo que outras alternativas mais inócuas têm vindo a ser estudadas, como é o caso das vacinas celulares autólogas que demonstraram aumentarem a sensibilidade à terapêutica anti-PD-1 ⁽⁷⁹⁾ ou, alternativamente, vacinas neoantigénicas cujos resultados em modelos pré-clínicos se têm revelado promissores. ⁽³³⁾

Aumento de linfócitos no microambiente tumoral

A ausência de um microambiente rico em linfócitos está associado a uma resposta diminuída à terapêutica. Assim, dado que a terapêutica associada com BRAF/inibidores da MEK (cinase da cinase MAP) demonstrou aumentar a proporção de linfócitos T CD8+, CD4+ e PD-1+ no microambiente tumoral ⁽⁸⁰⁾, a sua associação com a terapêutica anti-PD-1 está ser alvo de investigação clínica. ⁽⁸¹⁾

Alternativamente, injeções peritumorais de RNA imunoestimulador que promove a infiltração de linfócitos e afeta o crescimento tumoral foram descritas como meio de promover respostas inflamatórias citotóxicas ⁽⁸²⁾. A secreção de IFN γ estimulada por

RNA promoveu a resistência imune adaptativa no microambiente tumoral por *upregulation* da expressão PD-L1 o que resultou num aumento da imunidade anti-tumoral. ⁽⁸²⁾

Libertação de células apresentadoras de antígenos

A supressão das APC no microambiente tumoral ocorre sobretudo devido à expressão de citocinas como a VEGF e TGF-beta. Assim, o bloqueio destas citocinas por anticorpos monoclonais demonstrou ser um método de libertar as funções efetoras das APC. ⁽⁸³⁾ Atualmente, terapêuticas anti-VEGF já são aplicadas na clínica em combinação com agentes de quimioterapia sendo que os seus efeitos em combinação com anti-PD-1 estão a ser testados clinicamente.

Anticorpos monoclonais agonistas para moléculas imunoestimuladoras como CD40 ou CD137 também demonstraram aumentar a função efetora das APC. ^(84,85)

Vírus oncolíticos também poderão ser usados. Por exemplo o T-VEC (talimogene laherparepvec) é uma imunoterapia oncolítica derivada do vírus herpes simplex tipo 1 que se replica seletivamente em tumores para produzir GM-CSF e promover morte celular por lise. A lise das células tumorais combinada com as propriedades quimiotáticas da GM-CSF promove a migração, o processamento antigénico e a maturação de células dendríticas dentro do microambiente tumoral. ⁽⁸⁶⁾ Demonstraram *in vivo* prevenirem a resistência a terapêutica anti-PD-1 em doentes com melanoma avançado ⁽⁸⁷⁾ e está a ser estudada a sua combinação na terapêutica contra o melanoma não-ressecável. ⁽⁸⁸⁾

Inibição de vias que promovem exaustão de linfócitos T

A exaustão de linfócitos T é um dos fatores importantes no sucesso da terapêutica anti-PD-1 e para além das vias relacionadas com a PD-1, existem outras vias alternativas que a influenciam. Anticorpos monoclonais anti-TIM-3 e LAG3 demonstraram resultados sinérgicos com a terapêutica anti-PD-1 em modelos pré-clínicos. ⁽⁴⁾

Bloqueio de metabolitos como a adenosina pode aumentar a sensibilidade à terapêutica anti-PD-1, estando os anti-CD73 a ser estudado como anticorpos monoclonais a usar nesse sentido. ⁽⁶⁶⁾

A inibição de recetores A2A demonstrou também efeitos anti-metastáticos sinérgicos em modelos pré-clínicos. ⁽⁸⁹⁾

Conclusão

Até à data a imunoterapia que tem como alvo PD-1/PD-L1 representa o mais eficaz meio de tratamento para uma grande variedade de neoplasias, uma vez que são bem toleradas e podem ser usadas em monoterapia. No entanto, embora alguns doentes beneficiem desta terapêutica, a maioria acaba por não responder.

Entender os mecanismos de resistência à terapêutica anti-PD-1 permite delinear estratégias que no futuro possam contornar esses obstáculos e atingir esquemas terapêuticos mais eficazes e que prolonguem a sobrevivência e qualidade de vida dos doentes. Os mecanismos atualmente propostos foram feitos à luz do conhecimento atual da terapêutica anti-PD-1. Porém, é expectável que a sua adoção mais abrangente a nível clínico num futuro próximo permita um melhor entendimento de todos os fatores envolvidos na sua resistência.

Ainda assim, o desenvolvimento de terapêuticas que aumentem a sensibilidade dos doentes ainda necessita de vários estudos até que possam ser colocadas em prática como esquemas de combinação viáveis. Se se demonstrarem eficazes, no entanto, será possível no futuro termos esquemas terapêuticos muito mais dirigidos e personalizados, não só tendo em conta o estadio do tumor e seus biomarcadores, mas também pelo próprio imunofenótipo do tumor.

Referências Bibliográficas

1. Smyth, M.J., et al., *Combination cancer immunotherapies tailored to the tumor microenvironment*. Nat Rev Clin Oncol, 2015.
2. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. 348(6230): p. 56-61.
3. Topalian, S.L., et al., *Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer*. New England Journal of Medicine, 2012. 366(26): p. 2443-2454.
4. O'Donnell, J.S., Long, G.V., Scolyer, R.A., W. L. Teng, M., Smyth, M.J., *Resistance to PD-1/PD-L1 checkpoint inhibition*, Cancer Treatment Reviews, 2016
5. Swaika, A., et al., *Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy*. Mol. Immunol.(2015)
6. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., et al., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J. Exp. Med. 192, 1027–1034.
7. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., et al., 2000. *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. Adv. Immunol., 181–273.
8. Wherry, E.J., *T cell exhaustion*. Nat Immunol, 2011. 12(6): p. 492-499.
9. Marzec, M., et al., *Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(52): p. 20852-7.
10. Parsa, A.T., et al., *Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma*. Nat Med, 2007. 13(1): p. 84-8.
11. Mittendorf, E.A., et al., *PD-L1 expression in triple-negative breast cancer*. Cancer Immunol Res, 2014. 2(4): p. 361-70.
12. Ribas, A., *Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack*. Cancer Discov, 2015. 5(9): p. 915-9.
13. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Ver Cancer, 2012. 12(4): p. 252-64.

14. Chen, L. and X. Han, Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*, 2015. 125(9): p. 3384-91.
15. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. *J Clin Oncol*, 2009. 27(36): p. 6199-206.
16. Robert , C., et al., *Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation*. *New England Journal of Medicine*, 2015. 372(4): p. 320-330.
17. Robert, C., et al., *Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. *New England Journal of Medicine*, 2015. 372(26): p. 2521-2532.
18. Schachter, J., Ribas, A., Long , G. V., *Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: Final overall survival analysis of KEYNOTE-006*, in *ASCO Meeting Abstracts* 34:9504. 2016.
19. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *New England Journal of Medicine*, 2015. 373(1): p. 23-34.
20. Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., *Updated results from a phase III trial of nivolumab (NIVO) combined with ipilimumab (IPI) in treatment-naive patients (pts) with advanced melanoma (MEL) (CheckMate 067)*, in *ASCO Meeting Abstracts* 34:9505. 2016.
21. Brahmer JR, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3167–3175.
22. Rizvi NA, et al. *Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamousnon-small-cell lung cancer (CheckMate063): a phase 2, single-arm trial*. *Lancet Oncol*. 2015;16(3):257–265.
23. Hamid O, et al. *Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma*. *N Engl J Med*. 2013;369(2):134–144.
24. Robert C, et al. *Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial*. *Lancet*. 2014;384(9948):1109–1117.
25. Garon EB, et al. *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018–2028.

26. Bang Y-J, et al. *Relationship between PD-L1 expression and clinical outcomes in patients with advanced gastric cancer treated with the anti-PD-1 monoclonal antibody pembrolizumab (MK-3475) in KEYNOTE-012.* J Clin Oncol. 2015;33(suppl 3):abstr 3.
27. O'Donnell PH, et al. *Pembrolizumab (Pembro; MK-3475) for advanced urothelial cancer: Results of a phase IB study.* J Clin Oncol. 2015;33(suppl 7):abstr 296.
28. Seiwert TY, et al. *Inflamed-phenotype gene expression signatures to predict benefit from the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in PD-L1+ head and neck cancer patients.* J Clin Oncol. 2015;33(suppl):abstr 6017.
29. Moskowitz CH, et al. *PD-1 Blockade with the Monoclonal Antibody Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Classical Hodgkin Lymphoma after Brentuximab Vedotin Failure: Preliminary Results from a Phase 1b Study (KEYNOTE-013).* Presented at: 56th ASH Annual Meeting; December 8, 2014; San Francisco, California, USA. Abstract 290.
30. Nanda R, et al. *A phase Ib study of pembrolizumab (MK-3475) in patients with advanced triple-negative breast cancer.* Presented at: 2014 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 10, 2014; San Antonio, Texas, USA. Abstract S1-09.
31. Restifo, N.P., M.J. Smyth, and A. Snyder, *Acquired resistance to immunotherapy and future challenges.* Nat Rev Cancer, 2016. 16(2): p. 121-126.
32. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer.* Nature, 2013. 500(7463): p. 415-421.
33. Schumacher, T.N. and R.D. Schreiber, *Neoantigens in cancer immunotherapy.* Science, 2015. 348(6230): p. 69-74.
34. Kreiter, S., et al., *Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer.* Nature, 2015. 520(7549): p. 692-6.
35. Rizvi, N.A., et al., *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer.* Science, 2015. 348(6230): p. 124-8.

36. Martin, A.M., et al., *Paucity of PD-L1 expression in prostate cancer: innate and adaptive immune resistance*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2015. 18(4): p. 325-32.
37. Van Allen, E.M., et al., *Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma*. Science, 2015. 350(6257): p. 207-11.
38. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 329-60.
39. Korkolopoulou, P., et al., *Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer*. Br J Cancer, 1996. 73(2): p. 148-53.
40. Zhao, F., et al., *Melanoma lesions independently acquire T-cell resistance during metastatic latency*. Cancer Res, 2016.
41. Shin, D., et al., *Innate resistance of PD-1 blockade through loss of function mutations in JAK resulting in inability to express PD-L1 upon interferon exposure*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2015. 3(2): p. 1-2.
42. Zaretsky, J.M., et al., *Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma*. New England Journal of Medicine. 0(0): p. null.
43. Merad, M., et al., *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and 643 their subsets in the steady state and the inflamed setting*. Annu Rev Immunol, 2013. 31: p. 644 563-604.
44. Spranger, S., R. Bao, and T.F. Gajewski, *Melanoma-intrinsic [bcr]-catenin signalling prevents anti-tumor immunity*. Nature, 2015. 523(7559): p. 231-235.
45. Sivan, A., et al., *Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy*. Science, 2015. 350(6264): p. 1084-9.
46. Ellis, L.M. and D.J. Hicklin, *VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-653 tumor activity*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(8): p. 579-591.
47. Young, M.R., et al., *Tumor-derived cytokines induce bone marrow suppressor cells that mediate immunosuppression through transforming growth factor beta*. Cancer Immunol Immunother, 1992. 35(1): p. 14-8.
48. Commeren, D.L., et al., *Paradoxical effects of interleukin-10 on the maturation of murine myeloid dendritic cells*. Immunology, 2003. 110(2): p. 188-96.
49. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 275-308.

50. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. 12(4): p. 298-306.
51. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. 313(5795): p. 1960-4.
52. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. Nature, 2014. 515(7528): p. 568-71
53. Curran, M.A., et al., *PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. 107(9): p. 4275-4280.
54. Duraiswamy, J., et al., *Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors*. Cancer Res, 2013. 73(12): p. 3591-603
55. Highfill, S.L., et al., *Disruption of CXCR2-mediated MDSC tumor trafficking enhances anti-PD-1 efficacy*. Sci Transl Med, 2014. 6(237): p. 237ra67.
56. Ngiew, S.F., et al., *A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD-1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD-1*. Cancer Res, 2015. 75(18): p. 3800-11
57. Wei, F., et al., *Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(27): p. E2480-9.
58. Sznol, M. and L. Chen, *Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer*. Clin Cancer Res, 2013. 19(5): p. 1021-34.
59. Zajac, A.J., et al., *Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function*. J Exp Med, 1998. 188(12): p. 2205-13.
60. Thommen, D.S., et al., *Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors*. Cancer Immunol Res, 2015. 3(12): p. 1344-55
61. Koyama, S., et al., *Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints*. Nat Commun, 2016. 7
62. Spranger, S., et al., *Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells*. Sci Transl Med, 2013. 5(200): p. 200ra116

63. Holmgaard, R.B., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4*. J Exp Med, 2013. 210(7): p. 1389-402
64. Spranger, S., et al., *Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment*. J Immunother Cancer, 2014. 2: p. 3
65. Young, A., et al., *Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches*. Cancer Discov, 2014. 4(8): p. 879-88.
66. Allard, B., et al., *Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs*. Clin Cancer Res, 2013. 19(20): p. 5626-35.
67. Ribas, A., et al., *PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells*. Cancer Immunol Res, 2016. 4(3): p. 194-203.
68. Wolchok, J.D. and Y. Saenger, *The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation*. Oncologist, 2008. 13 Suppl 4: p. 2-9.
69. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma*. New England Journal of Medicine, 2013. 369(2): p. 122-133.
70. Guo, Z., et al., *PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e89350.
71. Sakuishi, K., et al., *Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity*. J Exp Med, 2010. 207(10): p. 2187-94.
72. Chauvin, J.M., et al., *TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients*. J Clin Invest, 2015. 125(5): p. 2046-58.
73. Sharabi, A.B., et al., *Stereotactic Radiation Therapy Augments Antigen-Specific PD-1-Mediated Antitumor Immune Responses via Cross-Presentation of Tumor Antigen*. Cancer Immunol Res, 2015. 3(4): p. 345-55
74. Zeng, J., et al., *Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013. 86(2): p. 343-9.

75. Loi, S., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98*. J Clin Oncol, 2013. **31**(7): p. 860-7.
76. Rios-Doria, J., et al., *Doxil synergizes with cancer immunotherapies to enhance antitumor responses in syngeneic mouse models*. Neoplasia, 2015. **17**(8): p. 661-70.
77. Pauken, K.E. and E.J. Wherry, *Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer*. Trends in Immunology. **36**(4): p. 265-276.
78. Twyman-Saint Victor, C., et al., *Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer*. Nature, 2015. **520**(7547): p. 373-7.
79. Emens, L.A., *Cancer vaccines: on the threshold of success*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(2): p. 295-308.
80. Kakavand, H., et al., *PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes Define Different Subsets of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients*. American Association for Cancer Research, 2015. **21**(14): p. 3140-3148.
81. Ribas, A., Hodi, F.S., Lawrence, D.P., *Pembrolizumab (pembro) in combination with dabrafenib (D) and trametinib (T) for BRAF-mutant advanced melanoma: Phase I KEYNOTE-022 study.*, in *ASCO Meeting Abstracts 34:3014*. 2016.
82. Bald, T., et al., *Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation*. Cancer Discov, 2014. **4**(6): p. 674-87.
83. Gabrilovich, D.I., et al., *Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2963-70.
84. Zippelius, A., et al., *Induced PD-L1 expression mediates acquired resistance to agonistic anti-CD40 treatment*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(3): p. 236-44.
85. Sanchez-Paulete, A.R., et al., *Cancer Immunotherapy with Immunomodulatory Anti-CD137 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Requires BATF3-Dependent Dendritic Cells*. Cancer Discov, 2016. **6**(1): p. 71-9

86. Kohlhapp, F.J. and H.L. Kaufman, *Molecular Pathways: Mechanism of Action for Talimogene Laherparepvec, a New Oncolytic Virus Immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2015
87. Andtbacka, R.H., et al., *Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma*. J Clin Oncol, 2015. **33**(25): p. 2780-8
88. Long, G.V., Dummer, R., Ribas, A. et al, *Efficacy analysis of MASTERKEY-265 phase 1b study of talimogene laherparepvec (T-VEC) and pembrolizumab (pembro) for unresectable stage IIIB-IV melanoma*. , in *ASCO Meeting Abstracts* 34:9568. 2016
89. Hickey, P. and M. Stacy, *Adenosine A2A antagonists in Parkinson's disease: what's next?* Curr Neurol Neurosci Rep, 2012. **12**(4): p. 376-85