



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA
COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO
COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE
GONZÁLEZ**

**“INTRODUCCIÓN A LA FISIOLOGÍA DE LA
RESPUESTA INMUNE: RELEVANCIA DEL BLOQUEO
EN PUNTOS DE CONTROL INMUNOLÓGICOS EN
PATOLOGÍA TUMORAL”**

PROFESORAS INVITADAS:

DRA VANINA ANDREA FONTANA: Licenciada en Ciencias Biológicas con Orientación a la Biología Molecular. Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

DRA GABRIELA VERÓNICA SALAMONE: Licenciada en Biología de la Universidad CAECE. Doctora en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires.

salamone.gabriela@gmail.com

*Introducción a la fisiología de la respuesta inmune, relevancia del bloqueo en puntos de control inmunológicos en
patología tumoral*

Nuestro sistema inmunológico es altamente eficaz no sólo para defendernos frente a la colonización de diferentes microorganismos patogénicos, sino que, además, tiene la capacidad de patrullar y monitorear nuestro organismo para contrarrestar el desarrollo de tumores en un proceso conocido como inmunovigilancia del cáncer (1). El entorno que rodea a las células tumorales o mejor conocido como microambiente tumoral, consiste en células estromales, vasculares y **un importante número de células inmunes**, que, junto a la matriz extracelular, y gracias a la presencia de mediadores solubles, mantienen un diálogo estrecho con las células tumorales (2).

Las células tumorales desarrollan mecanismos que le permiten evadir al sistema inmunológico, desactivando las células inmunitarias o modificando su entorno para inhibir la respuesta inmune. La inmunoterapia es una estrategia terapéutica que tiene como objetivo potenciar o restaurar la capacidad del sistema inmunológico para reconocer y destruir las células cancerosas. Al intervenir en los mecanismos que permiten al cáncer evadir la inmunidad, la inmunoterapia puede mejorar la eficacia de la respuesta inmune ofreciendo nuevos tratamientos para diferentes tipos de tumores (3).

Un tipo de inmunoterapia aborda el bloqueo de los puntos de control inmunológico, o también conocidos como “inmune checkpoint” por su traducción al inglés. Los mismos son elementos clave del sistema inmunológico que regulan la actividad de las células inmunes, en particular de los linfocitos T, para mantener un equilibrio entre la activación y la inhibición de la respuesta inmunológica (4). Estos mecanismos reguladores normalmente mantienen las respuestas inmunes dentro de un nivel fisiológico deseado, impidiendo que se desarrollen procesos autoinmunes en el huésped (5, 6). Las células tumorales utilizan este control fisiológico a su favor para evadir la activación de la respuesta inmune. La posibilidad de bloquear los puntos de control inmunológico implica poder eliminar las señales inhibitorias de activación de linfocitos T; que permiten que los clones T reactivos contra el tumor superen los mecanismos reguladores y generen una eficaz respuesta antitumoral. En los últimos años, el bloqueo de los puntos de control permitió el desarrollo de nuevos tratamientos contra múltiples tipos de cáncer, anunciando una nueva era de tratamientos oncológicos. Sin embargo, las notables

respuestas a las inmunoterapias se limitan a una minoría de pacientes con características muy particulares. Actualmente, se está realizando un importante número de investigaciones preclínicas y clínicas explorando el potencial terapéutico de moléculas coestimuladoras o inhibitorias (7).

El siguiente artículo pretende describir los mecanismos de activación e inhibición más relevantes de los linfocitos T, cómo actúa el bloqueo de puntos de control, principalmente de las moléculas **CTLA-4** (del inglés, *cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4*) y **PD-1** (del inglés, *programmed death-1*), y la importancia en los tratamientos oncológicos que el bloqueo de las mismas ha generado (8).

Para comprender la relevancia de los puntos de control inmunológicos, primero debemos analizar cómo son los mecanismos de activación periféricos de los linfocitos T y cuáles son sus principales puntos de control.

Mecanismos de activación de los linfocitos T:

Para que los linfocitos T se activen requieren de la participación de dos señales diferentes y consecutivas (Figura 1):

- Señal 1: reconocimiento del péptido antigénico presentado por la célula dendrítica, sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (**CMH**), al receptor antigénico de las células T; **TCR** (*del inglés T cell receptor*).
- y la Señal 2: reconocimiento de las moléculas coestimuladoras expresadas, por la célula dendrítica: CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2); y por la molécula CD28 expresada por el linfocito T (9).

Los linfocitos T vírgenes que reconozcan el péptido antigénico, pero no perciban la señal 2, sufrirán un proceso denominado anergia clonal que es irreversible y que conduce a la no respuesta del linfocito T. La necesidad de que haya dos señales implica un control estricto para evitar la activación “no deseada” de los linfocitos T, silenciando a los posibles clones auto-reactivos (9).

Los linfocitos T activados pueden producir, en el término de 5 a 8 días, una progenie aproximada de 10.000 células hijas, como resultado de 14 a 20 divisiones celulares; un solo epítipo puede activar entre 50 y 500 linfocitos T vírgenes, es decir luego de la

expansión clonal podrían coexistir de 500.000 a 5.000.000 de linfocitos T. Claramente este mecanismo necesita de controles sumamente exhaustivos para regular el número de clones que se encuentran proliferando (9).

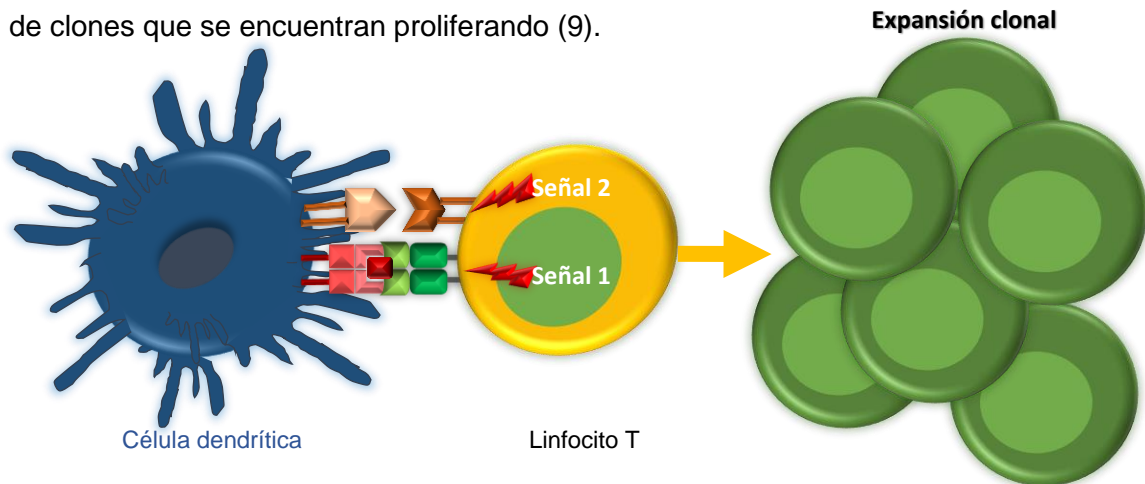
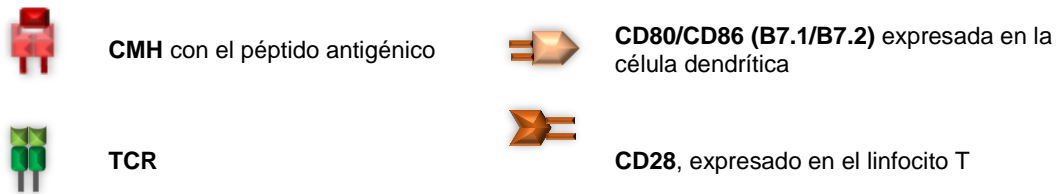


Figura 1: Activación del Linfocito T: interacción entre un linfocito T virgen y una célula dendrítica madura. El linfocito T recibe 2 señales.



Control homeostático de la expansión clonal T

La expansión clonal T es estrictamente regulada por diferentes moléculas, en especial por las moléculas de **CTLA-4** y **PD-1**.

Punto de control: molécula de CTLA-4

La expresión y función de CTLA-4 está intrínsecamente ligada con la activación de células T. Posterior a la inducción de la señal 1 mediada por el TCR la molécula de CTLA-4 alcanza su punto máximo de expresión después de 2 a 3 días de activación (36 a 72 hs post-activación) (10, 11). La molécula de CTLA-4, que se encuentra contenida en las vesículas intracelulares, es transportada rápidamente a la membrana para unirse en la **sinapsis inmunológica** (los términos inmunológicos convencionales son explicados en el **BOX 1**). El grado de reclutamiento de CTLA-4 en dicha sinapsis se correlaciona directamente con la intensidad de la señal del TCR (12). CTLA-4 presenta una homología de secuencia aminoacídica del 30% con CD28; e interactúa con las

Introducción a la fisiología de la respuesta inmune, relevancia del bloqueo en puntos de control inmunológicos en patología tumoral

moléculas coestimuladoras CD80 (B7.1) y CD86 (B7.1), expresada en la superficie de la célula dendrítica. Es decir, compete por sus ligandos con la molécula de CD28, desplazándola de la unión de CD80 y CD86 debido a que tiene mayor afinidad y avidéz. Pero, a diferencia de CD28, su interacción con CD80 y CD86 no conduce a la activación T, sino a **la inducción de una poderosa señal inhibitoria**. La inhibición competitiva de ambas moléculas es necesaria para atenuar adecuadamente la activación de las células T.

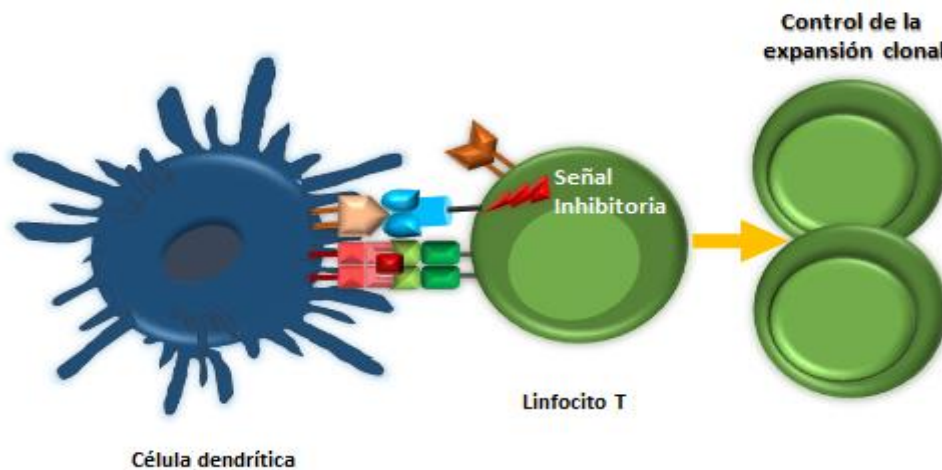







Figura 2: Control homeostático de la proliferación de linfocitos T: CTLA-4, expresada por el linfocito T activado, interacciona con las moléculas CD80 y CD86, expresadas en la célula dendrítica, inhibe la expansión clonal T.

-  **CMH con el péptido antigénico**
-  **TCR**
-  **CD80/CD86 (B7.1/B7.2) expresada en la célula dendrítica**
-  **CD28, expresado en el linfocito T**
-  **CTLA-4, expresada en el linfocito T**

Las descripciones previas respecto a la coestimulación negativa de CTLA-4 asociado al desplazamiento de CD28 son funciones **intrínsecas** de esta molécula. Por otra parte, CTLA-4 funciona principalmente para regular la actividad de las células T en los sitios donde se inicia la respuesta inmune (por ej., órganos linfáticos secundarios). Además, de esta función central, la molécula también atenúa la activación de las células T en

tejidos periféricos dado que los ligandos B7 (B7.1 y B7.2) son constitutivamente expresados en diverso grado, por células presentadoras de antígenos (CPA).

El papel crítico de la molécula CTLA-4 como regulador negativo de la activación T es revelado en ratones deficientes del gen *CTLA-4*. Estos ratones conducen a una linfoproliferación masiva, sucumbiendo entre las 3 y 4 semanas de edad (13, 14).

No hay dudas que CTLA-4 juega un papel fundamental en el control de la activación y la tolerancia de las células T; inhibiendo la proliferación clonal, la progresión del ciclo celular y la producción de interleuquina (IL)-2 (10, 15). Además, de su papel durante la activación, CTLA-4 puede controlar las funciones efectoras de las células T (16, 17).

Finalmente, además de las funciones intrínsecas; CTLA-4 puede modular la activación de las células T a través de varios mecanismos celulares **extrínsecos**. La mayor parte de la función supresora extrínseca de CTLA-4 está mediado a través de linfocitos T regulatorios (Treg) (18, 19). La pérdida específica de CTLA-4 en Treg es suficiente para inducir una activación aberrante de las células T y dar lugar a procesos de autoinmunidad (20, 21). CTLA-4 expresado por células Treg puede limitar la disponibilidad de los ligandos B7 (B7-1 y B7-2) para la coestimulación positiva mediada por CD28 a células T efectoras.

Las células Treg FOXP3+ (del inglés *Forkhead Box Protein P3*) expresan constitutivamente CTLA-4 (22-24). Los ratones carentes de CTLA-4, sólo en células Treg, desarrollan constitutivamente una enfermedad linfoproliferativa y de autoinmunidad multiorgánica, similar a los ratones *Ctla4*^{-/-}, pero con cinética mucho más lenta (20). Las células Treg se pueden expandir en estos ratones, pero no suprimen, los mecanismos con tanta eficacia, como en los ratones controles.

Los mecanismos celulares intrínsecos y extrínsecos de CTLA-4 se describen en el **BOX 2** (15, 25, 26).

BOX 1

Sinapsis inmunológica: área de mayor interacción entre las moléculas de las células dendríticas y el linfocito T.

T efectoras: Células T que pasan de un estado inactivo a un estado activado, una conversión que es acompañada de proliferación y adquisición de funciones efectoras específicas (en el caso de los linfocitos T CD4+ pueden adquirir perfiles como T helper (Th) 1, Th 2, Th 17, T reg, y para los linfocitos T CD8+, su mecanismo efector citotóxicos).

Treg: son un subconjunto de células T que suprimen la actividad inmune, también se encuentran dentro del microambiente tumoral. Algunas de las Treg expresan el factor de transcripción FOXP3.

IDO: ejerce un efecto inmunosupresor sobre la respuesta T a través de la depleción del aminoácido triptófano.

mAC humanizados: es en su mayoría una secuencia proteica humana excepto en la porción variable en las regiones determinantes de complementariedad donde tienen secuencias murinas.

mAC humanos: Son producidos en ratones transgénicos que expresan inmunoglobulina humana. Toda la secuencia proteica es humana.

Clon autorreactivo: Clon T que reconoce antígenos propios.

BOX 2

CTLA-4 puede ejercer funciones intrínsecas y extrínsecas de las células T

Vía intrínseca

Señalización inhibitoria: señales a través de CTLA-4 puede interferir con la señalización del TCR y CD28. **Competencia por ligandos:** CTLA-4 tiene mayor afinidad que CD28 por CD80/CD86 y puede superar a CD28 en la unión de CD80/CD86. **Inhibición independiente del ligando:** una variante de empalme de CTLA-4 que no puede unirse a ligandos puede inhibir la activación de las células T a través de un mecanismo similar.

Vía extrínseca:

Revertir señalización a través de ligandos en CPA: CTLA-4 induce una señal inversa a través de CD80 y CD86 en CPA, lo que lleva a la producción de la enzima indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y la supresión de las respuestas efectoras de células T. **Reducir expresión/disponibilidad del ligando:** factores secretados como IL-10, TGF- β o variantes de empalme solubles de CTLA-4 reducen la expresión o disponibilidad del ligando. **CTLA-4 elimina ligandos de las CPA:** unión de CTLA-4 a CD80 o CD86 puede provocar transendocitosis de los ligandos de las CPA, lo que da como resultado niveles más bajos de ligandos en la superficie de las CPA.

En conjunto, estos estudios indican que CTLA-4 utiliza múltiples mecanismos para ejercer sus funciones inhibitoras críticas en las células T efectoras y T reg.

Punto de control: molécula de PD-1

PD-1 es una proteína transmembrana cuyo dominio citosólico posee el motivo inhibitor ITIM (del inglés *Inmunoreceptor de Tirosina basados en motivos de activación*). Esta molécula, no se expresa en linfocitos T en reposo, pero sí en linfocitos T activados. Además, puede expresarse post-activación en linfocitos B (27). La interacción PD-1 con su ligando conduce a una señal inhibitoria en el linfocito T. Consistente con esta función inhibitoria se demostró que la deficiencia en PD-1 en ratones genera fenómenos de autoinmunidad. PD-1 regula la activación de las células T mediante la interacción con dos ligandos PD-L1 y PD-L2 (28-30).

Los ligandos se expresan ampliamente en los tejidos no linfoides, es por ello que PD-1 actúa principalmente para amortiguar la activación de las células T en la periferia (31). El ligando con mayor distribución tisular es PD-L1, el cual se expresa ampliamente tanto en células hematopoyéticas (incluidas las células T, las células B, las células dendríticas y macrófagos) como en células no hematopoyéticas (incluidas las células endoteliales

Introducción a la fisiología de la respuesta inmune, relevancia del bloqueo en puntos de control inmunológicos en patología tumoral

vasculares y estromales, células de los islotes pancreáticos, sincitiotrofoblastos placentarios y queratinocitos). Las señales proinflamatorias pueden incrementar los niveles de expresión de PD-L1. Por el contrario, la expresión de PD-L2 es mucho más restringida, se encuentra predominantemente en células dendríticas, macrófagos y poblaciones de células B. La expresión de PD-L2 es generalmente baja en estado basal, pero de igual manera que PD-L1, se puede incrementar por estímulos inflamatorios. La principal función biológica de PD-1 es mantener la tolerancia periférica regulando los mecanismos efectores de los linfocitos T dentro de un rango fisiológico deseado (**Figura 3**). Debido a que el sistema regulador PD-1/PD-L1 es inducido por respuestas inmune, esto forma un circuito de retroalimentación negativa para atenuar las respuestas locales de los linfocitos T y minimizar el daño tisular (**Figura 3 A**).

Otra de las funciones principales de PD-1 es la inducción de agotamiento clonal en linfocitos T. Este mecanismo limita la activación de los clones T en presencia de estimulación crónica del antígeno; permitiendo la preservación de estos clones, que, de otro modo, moriría en tales condiciones. Diferentes estudios demuestran que la estimulación antigénica constante favorece cambios transcripcionales, epigenéticos y metabólicos (32) que definen este estado de agotamiento clonal T (33, 34) (**Figura 4**).

Por otra parte, se han identificado nuevas funciones para el eje de señalización PD-1/PD-L1. Por ejemplo, la expresión de PD-L1 en macrófagos puede conducir a un desalojo activo de células T del microambiente tumoral (35). Esto sugiere que además de la regulación de la activación de las células T y los mecanismos efectores, la señalización de PD-1 también puede regular el tráfico y la migración de linfocitos T (36). Particularmente en cáncer, tanto PD-L1 como PD-L2, pueden ser expresados por células tumorales, siendo PD-L1 el encontrado con mayor frecuencia (**Figura 3B**). La expresión de PD-L1 a menudo se asocia con inflamación persistente, aunque también, algunas mutaciones en las células tumorales pueden incrementar los niveles de esta molécula en ausencia de inflamación. Las citoquinas son reguladores cruciales de la expresión de PD-L1 y PD-L2, siendo los interferones tipo I y II algunos de los estímulos más potentes (37, 38). La capacidad de los interferones para regular la expresión de PD-L1 contribuyó al concepto de “**resistencia adaptativa**” en tumores, que propone que un estado inflamatorio puede incrementar la expresión de PD-L1 y promover la inmunosupresión en el microambiente tumoral. Este proceso representa un ejemplo clave de cómo los puntos de control actúan como un mecanismo de retroalimentación negativa para amortiguar la respuesta inmune adaptativa (8, 39-41).

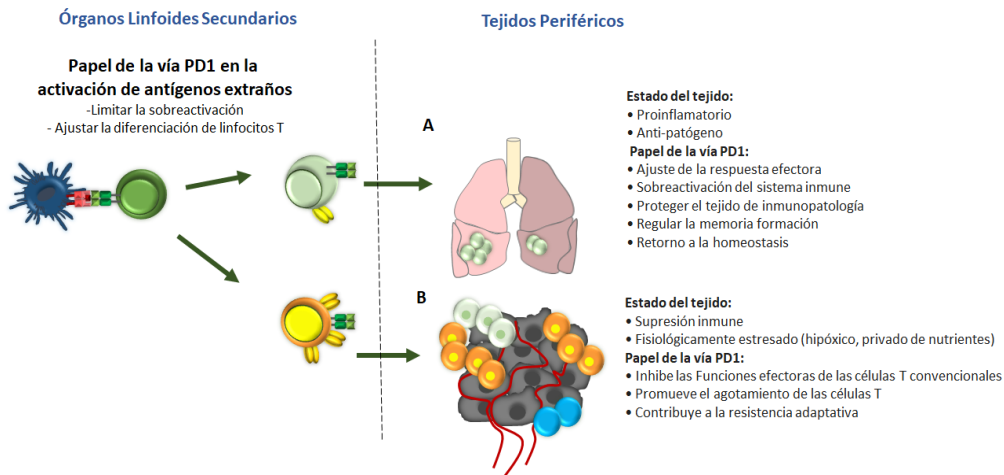


Figura 3: Rol del eje PD-1/PD-L1. A. En Infección aguda: regulación de la respuesta efectora en tejidos periféricos. **B. En cáncer:** expresión de la molécula PD-L1 en células tumorales. Figura adaptada de Nature Reviews (39).

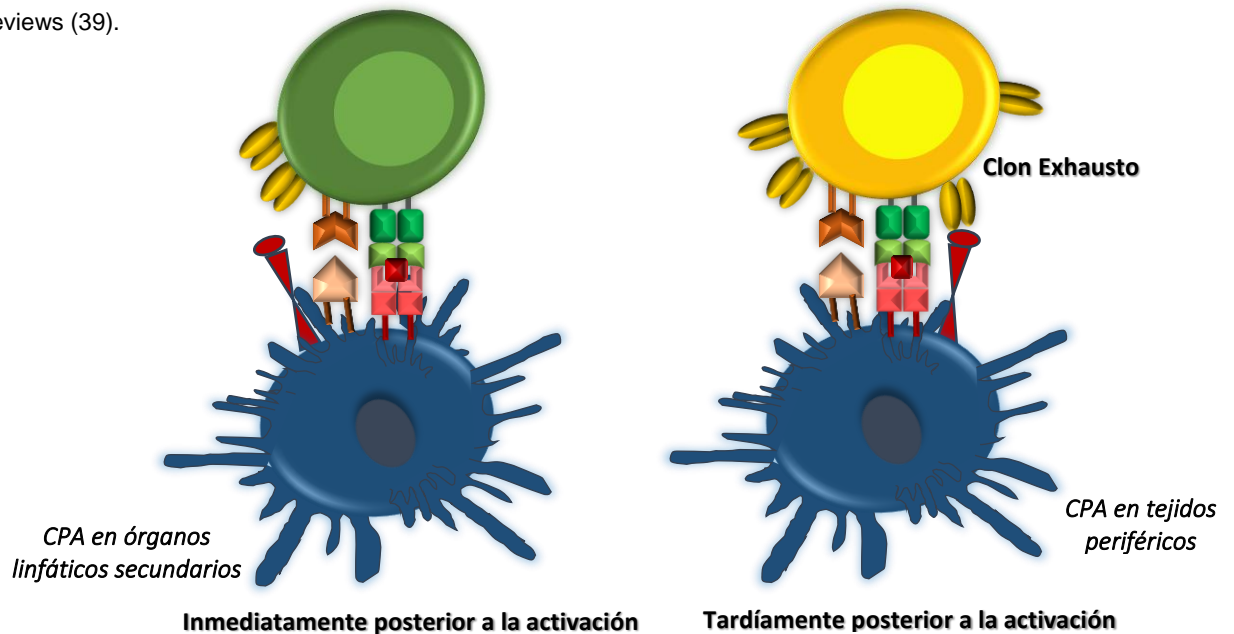
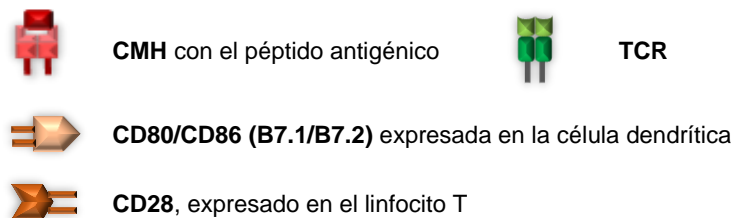


Figura 4: Inhibición de clones exhaustos en linfocitos T con estimulación antigénica constante: PD-1 expresada por el linfocito T activado, interacciona con las moléculas PD-L1, expresadas en la célula dendrítica, inhibe la expansión clonal T.





PD-1, expresada en el linfocito T



PDL-1, expresado en la célula dendrítica

Bloqueo de los puntos de control en cáncer

Inhibidores de puntos de control inmunológico

En la última década, un grupo de anticuerpos específicos dirigidos a los puntos de control de las células inmunitarias han demostrado una notable eficacia clínica en pacientes con cáncer (42). La inhibición de dichos puntos de control, se está utilizando para el tratamiento de cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de células renales, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de células escamosas, entre otros (**Tabla 1**) (42).

Los inhibidores de puntos de control inmunológico demuestran tasas de respuesta entre 20-30% en la mayoría de los tipos de tumores (43). Sin embargo, ciertas enfermedades malignas como Linfoma de Hodgkin y cáncer de piel (43), tumores con alta inestabilidad de microsatélites (44, 45) y los que poseen expresión elevada de PD-L1 (46) o alta carga mutacional (47), y algunos cánceres asociados con virus (48) tienen tasas de respuesta sustancialmente más elevadas. Actualmente se están investigando más de 20 puntos de control inmunológico en ensayos clínicos, en este artículo nos focalizaremos únicamente en los anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 y del eje PD-1/PD-L1.

Mecanismos de reactivación de la respuesta Inmune.

Los anticuerpos que bloquean los puntos de control inmunológico inhiben las vías que regulan negativamente las células T, reactivando así a los linfocitos T citotóxicos para eliminar las células tumorales.

PD-1 interactúa con PD-L1 y PD-L2, que a menudo se encuentra expresado en la superficie de las células cancerosas, bloqueando la proliferación de los linfocitos T inducida por la interacción entre el TCR-CMH (señal 1); y limita la respuestas de las células T contra las células cancerosas, evadiendo así el tumor a la respuesta inmune (49). CTLA-4 por su parte, compite con CD28 para unirse a CD80 y CD86 en la CPA. La unión de CTLA-4 con estos ligandos bloquea la señalización de CD28 (señal 2), suprimiendo también la activación de células T (50). Anticuerpos que bloqueen estas interacciones permiten una reactivación de los linfocitos T (49), reestableciendo la "**revigorización**" de estas células inclusive aquellas que han permanecido en estado de

agotamiento clonal (51, 52). Además, favorece el infiltrado de nuevos clones T con mecanismos efectores activos contra el tumor (53). Los inhibidores de puntos de control también podrían tener efectos directos sobre la Treg. Algunos estudios, realizados en

Blanco	Anticuerpo	Isotipo	Formato	Tipo de tumor
CTLA-4	IPILIMUMAB	IgG1	Humano	Melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer de colon con inestabilidad de microsatélite.
	TREMELIMUMAB	IgG2	Humano	carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón
PD-1	NIVOLUMAB	IgG4	Humano	Melanoma, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de células renales, linfoma de Hodgkin, cáncer urotelial, cáncer de células escamosas, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico y esofágico, cáncer de colon con inestabilidad de microsatélite.
	PEMBROLIZUMAB	IgG4	Humanizado	Melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de células renales, linfoma de Hodgkin, cáncer endometrial, cáncer de células escamosas, cáncer de cabeza y cuello; cáncer endometrial, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico y esofágico, cáncer de colon con inestabilidad de microsatélite, linfoma primario de células B de mediastino.
PDL-1	ATEZOLIZUMAB	IgG1	Humanizado	Melanoma, cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, sarcoma alveolar de partes blandas.
	AVELUMAB	IgG1	Humano	Cáncer de células renales, urotelial cáncer.
	DURVALUMAB	IgG1	Humano	carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de vías biliares.

Tabla 1: Anticuerpos bloqueantes de puntos de control inmunológicos. Adaptado de Nature Reviews (42).

Introducción a la fisiología de la respuesta inmune, relevancia del bloqueo en puntos de control inmunológicos en patología tumoral

modelos murinos, sugieren que el bloqueo de PD-1 y CTLA-4 puede desactivar o eliminar, preferentemente las células Treg y mejorar de esta manera la inmunidad antitumoral (54, 55). Sin embargo, la eliminación de las Treg no ha sido aún, demostrado en pacientes (56).

Bloqueo de CTLA-4 en cáncer: El reconocimiento de CTLA-4 como regulador negativo de la activación de las células T dio lugar a la idea de que bloquear sus acciones podría desencadenar un efecto terapéutico, al restablecer la activación de las linfocitos T contra el tumor (57). James Allison y col. demostraron que los anticuerpos neutralizantes anti-CTLA-4 inducían inmunidad antitumoral en modelos murinos (58). Además, al desafiar a los animales tratados con los anticuerpos anti-CTLA-4 con las mismas células tumorales lograban, a través de mecanismos inmunológicos, eliminar el tumor, confirmando de esta forma, la presencia de clones T de memoria (58, 59).

Los estudios preclínicos mostraron un éxito desigual, sin embargo, los anticuerpos monoclonales (mAc) dirigidos contra CTLA-4 demostraron ser eficaces en la práctica clínica particularmente en ensayos de melanoma. Ipilimumab, un anti-CTLA-4, obtuvo la aprobación de la **administración de medicamentos y alimentos** (FDA, del inglés, *Food and Drug Administration*) en 2011 para melanoma no resecable en estadio III/IV (60), con el que se observó un claro beneficio de supervivencia a corto plazo (61). Los datos de supervivencia a largo plazo demostraron que el 22% de los pacientes con melanoma avanzado tratados con ipilimumab tuvieron una supervivencia de 3 años o más (62, 63). Desafortunadamente, los resultados en carcinoma de células renales (64), cáncer tanto de células pequeñas (65), como células no pequeñas de pulmón (66) y cáncer de próstata (67) han producido menores efectos que los observados en pacientes con melanoma.

Las mutaciones somáticas son uno de los sellos distintivos de diferentes tumores y probablemente sean la fuente principal de neoantígenos, los cuales pueden ser blancos claves de la respuesta inmune. La frecuencia de mutación somática o carga mutacional es un biomarcador característico para la determinación de la utilización de inhibidores de punto de control. Los tumores con gran expresión de neoantígenos, presentan una respuesta favorable a la terapia anti-CTLA-4 (68, 69). Uno de los puntos críticos del éxito de la terapia anti-CTLA-4 dependerá, en última instancia, de la proporción de células T efectoras y células Treg infiltrantes en el tumor (57, 70), y de aquí se desprende que la eficacia de los mAc anti-CTLA-4 dependa principalmente de la eliminación de Treg

intratumorales (71). Los mecanismos de acción del bloqueo de CTLA-4 se ilustran en la **Figura 5**.

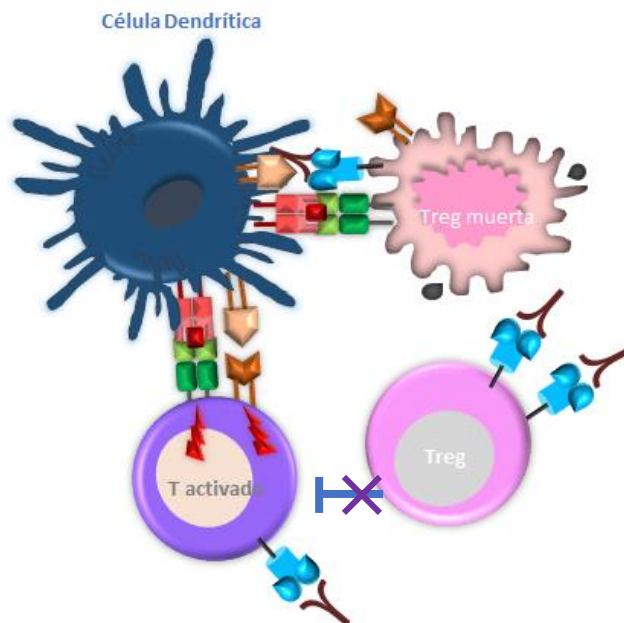








Figura 5: Mecanismos de acción de bloqueo con los mAc anti-CTLA-4: Activación del linfocito T efector y la eliminación de los linfocitos Treg.

-  **CMH** con el péptido antigénico
-  **TCR**
-  **CD80/CD86 (B7.1/B7.2)** expresada en la célula dendrítica
-  **CD28**, expresado en el linfocito T
-  **CTLA-4**, expresada en el linfocito T
-  **Anticuerpo anti-PD-1**

Bloqueo del eje PD1/PDL1 en cáncer. En primer lugar, se demostró que el incremento de expresión de PD-L1 o PD-L2 en líneas celulares tumorales restringen la capacidad de los linfocitos T CD8+ citotóxicos, inhibiendo así la respuesta antitumoral. Sin embargo, los ratones carentes de PD-1 podían rechazar el tumor eficientemente (72, 73). Por otra parte, el bloqueo de PD-1 suprimió el crecimiento de células de mieloma trasplantadas en animales singénicos (73), además la neutralización del eje PD-1/PD-L1 usando mAc o dominios secretados extracelulares de PD-1 (74) restableció la

capacidad citotóxica de linfocitos T CD8+ contra el tumor (73), **Figura 6**. La inhibición de PD-1 no sólo aumentó la inmunidad antitumoral sino también limitó el desarrollo de focos metastásicos, en modelos murinos de melanoma y de carcinoma de colon (75).

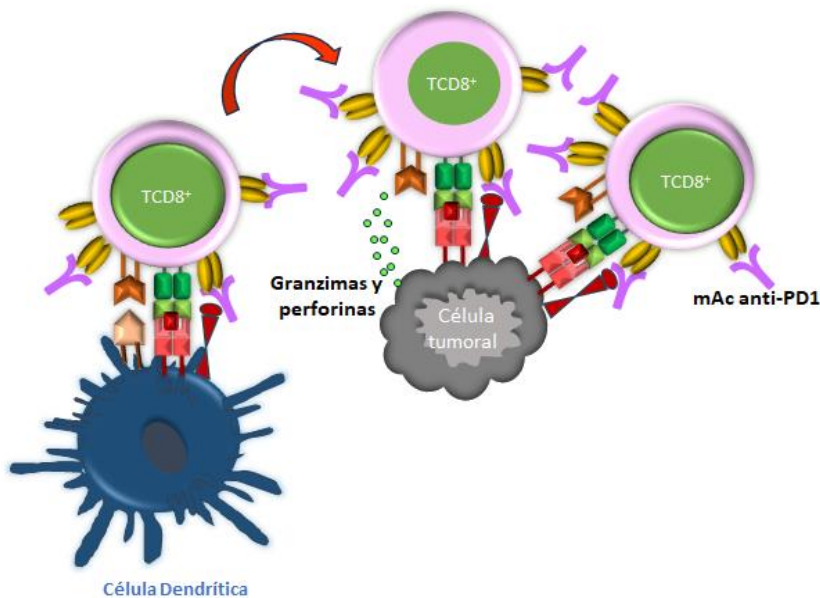









Figura 6: Mecanismos de acción de bloqueo con los mAc anti-PD-1: Activación del linfocito T efector y la eliminación de células tumorales.

-  **CMH** con el péptido antigénico
-  **TCR**
-  **CD80/CD86 (B7.1/B7.2)** expresada en la célula dendrítica
-  **CD28**, expresado en el linfocito T
-  **PD-1**, expresada en el linfocito T
-  **PDL-1**, expresado en la célula dendrítica
-  **Anticuerpo anti-PD-1**

Aparte del papel de PD-1 y sus ligandos en el tratamiento del cáncer, múltiples estudios también han demostrado una correlación negativa en la expresión tumoral de PD-L1 y el pronóstico de los pacientes, indicando la utilidad de esta proteína como un potencial

biomarcador (76-78). Tras el éxito preclínico de los mAc diseñados para contrarrestar la inmunorregulación negativa por el eje PD-1/PDL-1 comenzaron los ensayos clínicos (79) y los primeros anticuerpos anti-PD1; pembrolizumab y nivolumab fueron aprobados por la FDA; mostrando una clara respuesta terapéutica para el melanoma refractario e irresecable (80, 81). En una comparación directa, pembrolizumab mostró una mejor supervivencia de pacientes que ipilimumab (82). Los ensayos clínicos de nivolumab demostraron una supervivencia global del 72,9%, luego de un año, en comparación con el 42,1% de supervivencia en el grupo de pacientes tratados con la quimioterapia convencional (83). En 2015 (79), pembrolizumab fue aprobado para el tratamiento de carcinoma de pulmón de células no pequeñas porque también proporcionó una mayor supervivencia que los protocolos convencionales (84, 85). Por otra parte, el aumento de la expresión de PD-L1 en el tumor se asoció con mejor respuesta al bloqueo del eje PD-1/PD-L1 (86). Otros ensayos clínicos exitosos ampliaron la utilización de pembrolizumab a tumores como: carcinoma de células escamosas cabeza y cuello (87), linfoma de Hodgkin (88), carcinoma urotelial (89), cáncer de unión gastroesofágica (90) y carcinoma agnóstico de tejido con un alto grado de inestabilidad de los microsátélites (91), (79) **Tabla 1.**

Finalmente, pembrolizumab se convirtió en el primer fármaco aprobado para ser utilizado como un biomarcador molecular expresado en el tumor. Sin embargo, el microambiente inmunosupresor de diferentes tejidos hace difícil predecir cuáles de los pacientes se beneficiarán realmente con el tratamiento (92).

Por su parte, el nivolumab se está utilizando también para el tratamiento un gran número de tumores (93-98) **Tabla 1.**

El bloqueo de PD-1 ha demostrado una eficacia clínica más amplia que el tratamiento anti-CTLA-4 probablemente porque la molécula de PD-L1 es expresada directamente sobre el tumor.

Posteriormente, se aprobó el mAc humanizado, atezolizumab, y el avelumab contra PD-L1 para el tratamiento del carcinoma urotelial (99), este anticuerpo, no ha demostrado que tenga una clara eficacia clínica (100, 101).

No existen comparaciones directas entre los anticuerpos bloqueantes de PD-1 y PD-L1 en ensayos clínicos para ver cuál es más eficiente, sólo un metaanálisis de ensayos clínicos ha concluido que los anticuerpos anti-PD-1 son algo más eficaces que los anticuerpos anti-PD-L1 (102), posiblemente porque los anticuerpos anti-PD-1 bloqueen tanto las interacciones de PD-1 con PD-L1 y como con PD-L2.

Toxicidad de los inhibidores de puntos de control inmunológico. Los nuevos anticuerpos producidos, median la destrucción de las células tumorales activando el sistema inmune, que a veces puede dirigirse erróneamente contra tejidos sanos. Los anticuerpos inhibidores de puntos de control inmunológico tienen un espectro particular de efectos adversos conocidos como “eventos adversos relacionados con el sistema inmunológico”. Estas reacciones adversas abarcan diversas manifestaciones autoinmunes, incluyendo dermatológicas, gastrointestinales, hepáticas, endocrinas, pulmonares, eventos neurológicos, cardíacos entre otros (98). Aunque poco frecuente, son graves y ocasionalmente pueden provocar efectos tóxicos potencialmente fatales como resultado de la respuesta inmune. En estas circunstancias se recomienda la inmunosupresión temporal con glucocorticoides, antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros para inhibir la respuesta inmune (42, 103, 104) **Figura 7.**

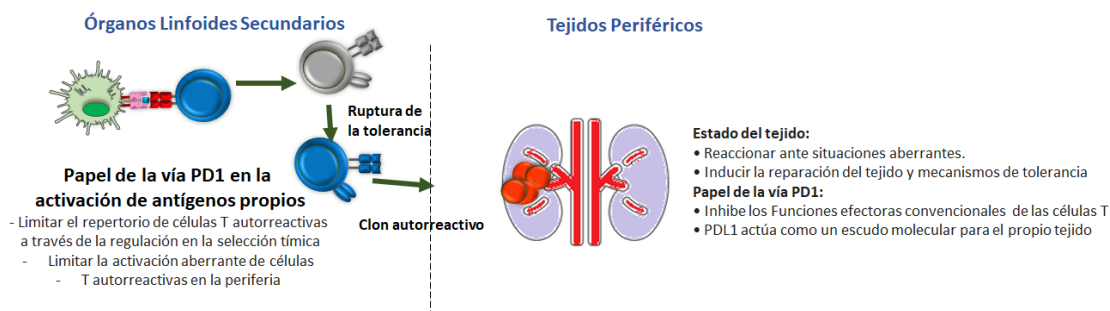


Figura 7: Rol del eje PD-1/PD-L1. En la tolerancia periférica: regulación de la respuesta efectora frente antígenos propios y ruptura de la tolerancia. Figura adaptada de Nature Reviews (39)

Existen claras evidencias clínicas con los tratamientos de inhibición en los puntos de control inmunológico, sin embargo, se manifiestan recaídas y el porcentaje de respuesta es exclusivo de un grupo de pacientes, se necesitan más investigaciones y la posibilidad de combinación de varios tratamientos para una mejor eficacia en la utilización de inhibidores de puntos de control.

Referencias

1. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*. 2015;348(6230):74-80.
2. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine*. 2018;24(5):541-50.
3. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature reviews Immunology*. 2020;20(11):651-68.

Introducción a la fisiología de la respuesta inmune, relevancia del bloqueo en puntos de control inmunológicos en patología tumoral

4. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015;348(6230):56-61.
5. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*. 2015;27(4):450-61.
6. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
7. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer discovery*. 2018;8(9):1069-86.
8. Johnson DB, Nebhan CA, Moselehi JJ, Balko JM. Immune-checkpoint inhibitors: long-term implications of toxicity. *Nature reviews Clinical oncology*. 2022;19(4):254-67.
9. Fainboim y Geffner. *Introducción a la Inmunología Humana*. 6ta Edición, Buenos Aires, Argentina. Editorial Medica Panamericana; 2011.
www.medicapanamericana.com/inmunología/fainboim.
10. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994;1(5):405-13.
11. Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *Journal of immunology*. 1999;162(10):5813-20.
12. Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. 2002;16(1):23-35.
13. Chambers CA, Cado D, Truong T, Allison JP. Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(17):9296-301.
14. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995;270(5238):985-8.
15. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(6):2541-50.
16. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity*. 2014;41(6):1026-39.
17. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity*. 2014;41(6):1013-25.
18. Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, et al. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(2):421-34.
19. Read S, Greenwald R, Izcue A, Robinson N, Mandelbrot D, Francisco L, et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *Journal of immunology*. 2006;177(7):4376-83.
20. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322(5899):271-5.
21. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(4):1524-8.
22. Gibson HM, Hedgcock CJ, Aufiero BM, Wilson AJ, Hafner MS, Tsokos GC, et al. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *Journal of immunology*. 2007;179(6):3831-40.
23. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*. 2006;126(2):375-87.
24. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007;445(7130):936-40.
25. Corse E, Allison JP. Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *Journal of immunology*. 2012;189(3):1123-7.

26. Wang CJ, Kenefeck R, Wardzinski L, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Cutting edge: cell-extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *Journal of immunology*. 2012;189(3):1118-22.
27. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology*. 1996;8(5):765-72.
28. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*. 2001;2(3):261-8.
29. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(7):1027-34.
30. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*. 1999;5(12):1365-9.
31. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(4):883-95.
32. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity*. 2016;45(2):358-73.
33. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science*. 2016;354(6316):1160-5.
34. Philip M, Fairchild L, Sun L, Horste EL, Camara S, Shakiba M, et al. Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature*. 2017;545(7655):452-6.
35. Kortlever RM, Sodir NM, Wilson CH, Burkhart DL, Pellegrinet L, Brown Swigart L, et al. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell*. 2017;171(6):1301-15 e14.
36. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell*. 2015;162(6):1242-56.
37. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology*. 2008;26:677-704.
38. Eppihimer MJ, Gunn J, Freeman GJ, Greenfield EA, Chernova T, Erickson J, et al. Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells. *Microcirculation*. 2002;9(2):133-45.
39. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature reviews Immunology*. 2018;18(3):153-67.
40. Johnson DB, Nixon MJ, Wang Y, Wang DY, Castellanos E, Estrada MV, et al. Tumor-specific MHC-II expression drives a unique pattern of resistance to immunotherapy via LAG-3/FCRL6 engagement. *JCI insight*. 2018;3(24).
41. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2016;375(9):819-29.
42. Paul S, Konig MF, Pardoll DM, Bettgowda C, Papadopoulos N, Wright KM, et al. Cancer therapy with antibodies. *Nature reviews Cancer*. 2024;24(6):399-426.
43. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018;359(6382):1350-5.
44. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine*. 2015;372(26):2509-20.
45. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409-13.
46. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2018;378(22):2078-92.

47. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K, et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *The Lancet Oncology*. 2020;21(10):1353-65.
48. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L, et al. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2016;374(26):2542-52.
49. Chamoto K, Yaguchi T, Tajima M, Honjo T. Insights from a 30-year journey: function, regulation and therapeutic modulation of PD1. *Nature reviews Immunology*. 2023;23(10):682-95.
50. Sharma P, Siddiqui BA, Anandhan S, Yadav SS, Subudhi SK, Gao J, et al. The Next Decade of Immune Checkpoint Therapy. *Cancer discovery*. 2021;11(4):838-57.
51. Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by alphaPD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(39):15016-21.
52. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature*. 2016;537(7620):417-21.
53. Yost KE, Satpathy AT, Wells DK, Qi Y, Wang C, Kageyama R, et al. Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nature medicine*. 2019;25(8):1251-9.
54. Romano E, Kusio-Kobialka M, Foukas PG, Baumgaertner P, Meyer C, Ballabeni P, et al. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(19):6140-5.
55. Kim MJ, Kim K, Park HJ, Kim GR, Hong KH, Oh JH, et al. Deletion of PD-1 destabilizes the lineage identity and metabolic fitness of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Nature immunology*. 2023;24(1):148-61.
56. Sharma A, Subudhi SK, Blando J, Scutti J, Vence L, Wargo J, et al. Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3(+) Regulatory T Cells (Tregs) in Human Cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(4):1233-8.
57. Grosso JF, Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer immunity*. 2013;13:5.
58. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-6.
59. Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, Madias C, Feldhaus AL, Greenberg NM, et al. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(15):8099-103.
60. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4712-7.
61. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*. 2010;363(8):711-23.
62. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(17):1889-94.
63. Maio M, Grob JJ, Aamdal S, Bondarenko I, Robert C, Thomas L, et al. Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(10):1191-6.
64. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *Journal of immunotherapy*. 2007;30(8):825-30.

65. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(17):2046-54.
66. Reck M, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013;24(1):75-83.
67. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJ, et al. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(7):700-12.
68. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(23):2189-99.
69. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, Velds A, Toebes M, Heemskerk B, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(32):e439-42.
70. Yang YF, Zou JP, Mu J, Wijesuriya R, Ono S, Walunas T, et al. Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer research*. 1997;57(18):4036-41.
71. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer immunology research*. 2013;1(1):32-42.
72. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer research*. 2005;65(3):1089-96.
73. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(19):12293-7.
74. He YF, Zhang GM, Wang XH, Zhang H, Yuan Y, Li D, et al. Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. *Journal of immunology*. 2004;173(8):4919-28.
75. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International immunology*. 2005;17(2):133-44.
76. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(9):3360-5.
77. Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC. Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer research*. 2007;67(4):1545-54.
78. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(6):1757-61.
79. Alan J. Korman, Sarah C. Garrett-Thomson and Nils Lonberg. The foundations of immune checkpoint blockade and the ipilimumab approval decennial. *NATURE REVIEW-DRUG DISCOVERY*, 2022; 21: 509-228.

80. Gong J, Chehrazi-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):8.
81. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. 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. *The Lancet Oncology*. 2015;16(4):375-84.
82. Schachter J, Ribas A, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet*. 2017;390(10105):1853-62.
83. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine*. 2015;372(4):320-30.
84. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-50.
85. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;375(19):1823-33.
86. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;372(21):2018-28.
87. Cohen EEW, Soulieres D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;393(10167):156-67.
88. Armand P, Shipp MA, Ribrag V, Michot JM, Zinzani PL, Kuruvilla J, et al. Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(31):3733-9.
89. Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, Fradet Y, Lee JL, Fong L, et al. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2017;376(11):1015-26.
90. Fuchs CS, Doi T, Jang RW, Muro K, Satoh T, Machado M, et al. Safety and Efficacy of Pembrolizumab Monotherapy in Patients With Previously Treated Advanced Gastric and Gastroesophageal Junction Cancer: Phase 2 Clinical KEYNOTE-059 Trial. *JAMA oncology*. 2018;4(5):e180013.
91. Boyiadzis MM, Kirkwood JM, Marshall JL, Pritchard CC, Azad NS, Gulley JL. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):35.
92. Ding L, Chen F. Predicting Tumor Response to PD-1 Blockade. *The New England journal of medicine*. 2019;381(5):477-9.
93. Tawbi, H. A. et al. Relatlimab and nivolumab versus nivolumab in untreated advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 386, 24–34 (2022).
94. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2015;373(19):1803-13.
95. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(3):312-22.
96. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017;389(10088):2492-502.

97. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*. 2015;372(4):311-9.
98. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2017;18(9):1182-91.
99. Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387(10031):1909-20.
100. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2019;380(12):1103-15.
101. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*. 2017;377(20):1919-29.
102. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer research*. 2004;64(3):1140-5.
103. Brahmer JR, Lacchetti C, Thompson JA. Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Summary. *Journal of oncology practice*. 2018;14(4):247-9.
104. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA oncology*. 2018;4(12):1721-8.