

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Miriam Majerová**

**Faktory ovlivňující účinnost protinádorové terapie blokuující  
signalizační dráhu PD-1/PD-L1 a prediktivní biomarkery této léčby**

**Factors affecting the efficacy of anti-tumor therapy by blocking the  
PD-1/PD-L1 signaling pathway and predictive biomarkers of this  
treatment**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Michal Šmahel, Ph.D.

Praha, 2019

## **Pod'akovanie**

Chcela by som pod'akovať vedúcemu mojej bakalárskej práce RNDr. Michalovi Šmahelovi, Ph.D. za cenné rady, trpezlivosť a odborné vedenie počas celej doby písania. Ďakujem aj svojej rodine, ktorá na mňa myslí, posilňuje a povzbudzuje ma. Vďaka nim viem, že som na správnej ceste.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 08. 05. 2019

Podpis: .....

Miriam Majerová

## Abstrakt

V posledných rokoch sa čoraz väčšia pozornosť venuje postupom protinádorovej liečby, ktoré využívajú samotný imunitný systém pacienta, namiesto tradičných postupov. Jedným druhom takejto liečby je použitie inhibítorov kontrolných bodov imunitných reakcií. Blokovanie signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1 predstavuje jednu z hlavných druhov imunoterapie využívajúcej imunitné bunky pacienta k zničeniu nádorov. Napriek pozitívam vyplývajúcim z tejto liečby veľká časť pacientov neodpovedá. Pozornosť sa preto upriamuje na lepšie pochopenie mechanizmov imunitného systému, ale aj faktorov, ktoré na účinnosť liečby vplývajú. Dôležité je hľadať a sumarizovať prediktívne biomarkery, na základe ktorých by bolo možné vybrať pacientov s najväčšou pravdepodobnosťou dosiahnutia pozitívneho výsledku liečby. Prinieslo by to väčšie percento pozitívne odpovedajúcich pacientov a predchádzalo by sa zbytočnej záťaži organizmu.

**Kľúčové slová:** kontrolné body imunitných reakcií, imunoterapia, inhibítory, PD-1, PD-L1, biomarkery

## **Abstract**

In recent years there has been a focus on cancer therapies that use patient's immune system instead of invasive traditional methods. One such method of immunotherapy is using checkpoint inhibitors. Blockade of PD-1/PD-L1 signaling pathway is one of main immunotherapy approaches utilizing patient's immune cells to combat cancer cells. Despite of positives that come along with this blockade, many patients do not respond to treatment. Therefore, better understanding of immune mechanisms and factors that affect the efficacy is needed. Finding and summarizing predictive biomarkers play an important role in selection of patients with highest chances of positive outcome and it could result in higher percentage of positively responding patients. It could also prevent patients from experiencing adverse events and unnecessary discomfort.

Key words: immune checkpoints, immunotherapy, inhibitors, PD-1, PD-L1, biomarkers

## Zoznam skratiek

APC	<i>Antigen presenting cell</i>	Bunka prezentujúca antigén
APLNR	<i>Apelin receptor</i>	
BCR	<i>B-cell receptor</i>	Receptor B lymfocytov
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i>	
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4</i>	
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Receptor epidermálneho rastového faktoru
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	
HPV	<i>Human papillomavirus</i>	Ľudský papilomavírus
IFN- $\gamma$	<i>Interferon- <math>\gamma</math></i>	Interferón $\gamma$
ICOS	<i>Inducible T-cell costimulator</i>	Inducibilný kostimulačný receptor T lymfocytov
IPRES	<i>Innate anti-PD-1 resistance</i>	
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>	
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>	
KBIR		Kontrolné body imunitných reakcií
LAMA3	<i>Laminin subunit alpha 3</i>	
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>	
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Hlavný histokompatibilný komplex
MMRd	<i>Mismatch repair-deficient</i>	Deficit opráv nesprávneho párovania báz
MMRp	<i>Mismatch repair-proficient</i>	Funkčný systém opráv nesprávneho párovania báz
NK	<i>Natural killer cell</i>	Prirodzená zabíjačská bunka
NKT	<i>Natural killer T cell</i>	
NSCLC	<i>Non-small-cell lung carcinoma</i>	Nemalobunkový karcinóm pľúc
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>	
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>	
PD-L2	<i>Programmed cell death 1 ligand 2</i>	
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	

SHP-1	<i>Src homology-2 containing protein tyrosine phosphatase 1</i>	
SHP-2	<i>Src homology-2 containing protein tyrosine phosphatase 2</i>	
TCR	<i>T-cell receptor</i>	Receptor T lymfocytov
TIL	<i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>	Lymfocyty infiltrujúce nádor
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin mucin-3</i>	

## Obsah

Úvod .....	1
Inhibítory KBIR .....	2
Štruktúra PD-1 a PD-L1 .....	4
Liečba nádorov pomocou protilátok blokujúcich signalizáciu PD-1/PD-L1 .....	8
Rezistencia voči liečbe .....	8
Primárna rezistencia.....	9
Sekundárna rezistencia .....	9
Biomarkery predikujúce odpoveď na liečbu .....	10
Expresia MHC proteínov .....	11
Expresia PD-L1 .....	12
Mutačná záťaž .....	12
Génové mutácie ovplyvňujúce funkciu proteínov.....	14
Nádorové mikroprostredie .....	15
Vírusové infekcie .....	16
Markery periférnej krvi.....	16
Črevná mikróflóra.....	17
Záver .....	18
Zoznam literatúry .....	19

# Úvod

Imunitný systém sa skladá z dvoch komponentov, ktoré pracujú v súčinnosti. Vrodená imunita k svojej aktivácii nepotrebuje stimuláciu antigénmi, získaná imunita sa aktivuje po prezentácii antigénov prostredníctvom buniek prezentujúcich antigény (*antigen presenting cells*, APC). Pozostáva z humorálnej zložky (B lymfocytov) a bunkovej zložky (T lymfocytov).

Je nežiadúce, aby sa získaná imunita prejavovala autoreaktívne, preto sú na aktiváciu lymfocytov potrebné dva signály. Prvý je antigénne špecifický, poskytujú ho molekuly hlavného histokompatibilného komplexu (*major histocompatibility complex*, MHC) s naviazaným antigénnym peptidom receptorom na T lymfocytoch (*T-cell receptor*, TCR). Pre CD8 T lymfocyty je to konkrétne molekula MHC I a pre CD4 T lymfocyty molekula MHC II. Druhý signál je kostimulačný, tvorený väzbou kostimulačných receptorov na T lymfocytoch a molekúl exprimovaných na APC (Chen et al., 1993). Autoreaktivite sa predchádza aj inhibičnými signálmi sprostredkovanými kontrolnými bodmi imunitných reakcií (KBIR) - inhibičnými receptormi a ich ligandmi.

Po aktivácii a prebehnutej imunitnej reakcii nasleduje jej terminácia. Zabezpečujú ju okrem iného aj koinhibičné receptory, ktoré sú indukované aktiváciou T lymfocytov, a po interakcii so svojimi ligandmi na povrchu APC zahajujú apoptózu T lymfocytov (Webb et al., 2018). Nádory môžu zneužiť tieto KBIR na to, aby sa aktívne vyhli imunitnému systému (Allison et al. 1995). Blokácia týchto inhibičných signalizácií inhibítormi KBIR pomáha zachovať aktivovaný stav cytotoxických T lymfocytov a tak eliminovať nádorové bunky.

Systém KBIR taktiež udržuje odpoveď organizmu v požadovaných fyziologických medziach. Zabezpečuje efektivitu reakcií a chráni pred autoimunitou navodením tolerancie. Hlavným predmetom skúmania KBIR sú v súčasnej dobe receptor *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) a *programmed cell death- 1* (PD-1), kvôli svojej schopnosti modulovať imunitné odpovede prostredníctvom negatívnej regulácie aktivácie T lymfocytov.

CTLA-4 je okrem iných buniek exprimovaný aj na CD8 T lymfocytoch a reguluje skoré štádium imunitnej odpovede. Spolu s kostimulačným receptorom CD28 na T lymfocytoch zdieľajú spoločné ligandy na APC – CD80 a CD86. CTLA-4 a CD28 si kompetujú, ale keďže CTLA-4 má k ligandom vyššiu afinitu, inhibičný signál je silnejší než kostimulačný a aktivácia CD8 T lymfocytov je v prípade expresie oboch receptorov tlmená. Blokačné protilátky proti CTLA-4 bránia interakcii medzi CTLA-4 a jeho ligandmi, a tak predchádzajú inhibícii CD8 T lymfocytov (Pardoll, 2012). Práve táto protilátka bola pod názvom ipilimumab schválená *Food and Drug Administration* (FDA) v roku 2011 ako prvý liek z kategórie inhibítorov KBIR na liečbu melanómu (Cameron et al., 2011).

Úspech terapie pomocou inhibítorov KBIR podporil štúdium ďalších inhibičných signalizačných dráh a vývoj ich protilátok. Významná je najmä dráha PD-1/PD-L1, v ktorej kontakt receptora PD-1 exprimovaného na T lymfocytoch a jeho ligandov *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) a PD-L2 spôsobuje inhibíciu funkcií T lymfocytov. Použitím blokačných protilátok proti receptoru PD-1 alebo proti ligandom PD-L1 a PD-L2 sa predíde ich vzájomnému kontaktu, preto funkcia cytotoxických T lymfocytov ostáva zachovaná (McDermott and Atkins, 2013).

Cieľom tejto práce je priblížiť fakty o regulácii imunitných reakcií signalizačnou dráhou PD-1/PD-L1, o možnostiach liečby nádorov inhibíciou tejto signalizačnej dráhy a hlavne o najnovších informáciách o prediktívnych biomarkeroch liečby nádorov blokáciou signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1. Taktiež predkladá výhody, ale aj nevýhody tohto typu terapie, a jeho možné budúce smerovanie.

## **Inhibítory KBIR**

V oblasti imunoterapie nádorov znamená vývoj inhibítorov KBIR dôležitý míľnik. Na rozdiel od obvyklých metód, ktoré sú zamerané na nádorové bunky (rádioterapia a chemoterapia), cieľom inhibítorov KBIR je narúšať koinhibičné signalizácie imunitných buniek. Okrem iných buniek pôsobia hlavne na cytotoxické CD8 T lymfocyty – hlavné protinádorové efektorové bunky – a dovoľujú im ostať v aktivovanom stave a útočiť na nádorové bunky. Okrem ipilimumabu – protilátky proti CTLA-4, ktorej účinnosť je 15-20% boli postupom času schválené na liečbu aj ďalšie inhibítory KBIR (Webb et al., 2018).

Protinádorová odpoveď bola pozorovaná aj pri blokácii dráhy PD-1/PD-L1, ktorej efektívnosť sa pohybuje v rozmedzí 20-50% (Webb et al., 2018). Pozitívne odpovedali pacienti s nemalobunkovým karcinómom pľúc (*non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC), melanómom a karcinómom obličiek (Topalian et al., 2012). Protilátky proti PD-1 pembrolizumab a nivolumab sa aplikovali na liečbu melanómu ako druhá, tretia, alebo štvrtá línia liečby. Neúspešné kroky liečby zahŕňali chemoterapiu, ipilimumab, inhibítory *B-Raf proto-oncogene* (BRAF) a *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK), a iné druhy imunoterapie okrem ipilimumabu (Robert et al., 2014; Weber et al., 2015). V roku 2014 preto FDA schválila protilátky proti PD-1 pembrolizumab a nivolumab ako druhú líniu liečby melanómu (Iwai et al., 2017). Vďaka pozitívnym výsledkom liečby melanómu schválila FDA protilátku proti CTLA-4 – ipilimumab – aj ako prvú líniu liečby. Výsledky ďalšej klinickej štúdie v tretej fáze na pacientoch trpiacich melanómom v III. a IV. štádiu ukázali, že nivolumab a ipilimumab sa vo svojich účinkoch navzájom dopĺňajú. Nivolumab sám alebo v kombinácii s ipilimumabom významne predĺžil dobu prežitia bez progresie, ktorá bola u pacientov

liečených oboma inhibítormi 11,5 mesiaca v porovnaní s 2,9 mesiacmi u pacientov liečených len ipilimumabom, a 6,9 mesiacmi u pacientov liečených len nivolumabom (Larkin et al., 2015). FDA schválila na liečbu aj protilátky proti PD-L1: atezolizumab, avelumab a durvalumab. V súčasnosti sa blokácia dráh CTLA-4 a PD-1/D-L1 využíva na liečbu rôznych karcinómov (Tabuľka 1).

**Tabuľka 1: Typy karcinómov, pre ktoré FDA schválila liečbu inhibítormi KBIR**

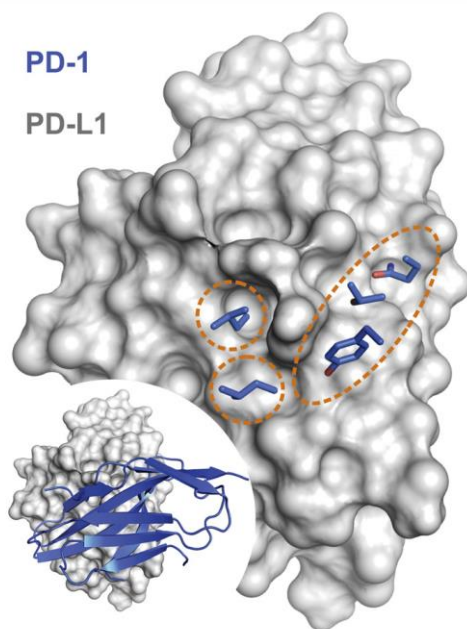
Typ karcinómu	Liek	Rok schválenia FDA
Melanóm	Ipilimumab	2011
Melanóm	Nivolumab	2014
Melanóm	Pembrolizumab	2014
NSCLC	Nivolumab	2015
NSCLC	Pembrolizumab	2015
Karcinóm obličiek	Nivolumab	2015
Hodgkinov lymfóm	Nivolumab	2016
Uroteliálny karcinóm	Atezolizumab	2016
Karcinóm hlavy a krku	Nivolumab	2016
Karcinóm hlavy a krku	Pembrolizumab	2016
NSCLC	Atezolizumab	2016
Hodgkinov lymfóm	Pembrolizumab	2017
Karcinóm Merkelových buniek	Avelumab	2017
Uroteliálny karcinóm	Avelumab	2017
Uroteliálny karcinóm	Durvalumab	2017
Uroteliálny karcinóm	Nivolumab	2017
Uroteliálny karcinóm	Pembrolizumab	2017
Hepatocelulárny karcinóm	Nivolumab	2017
Karcinóm žalúdka	Pembrolizumab	2017
NSCLC	Durvalumab	2018
Karcinóm obličiek	Ipilimumab + Nivolumab	2018

Prevzaté z Wei et al., 2018.

## Štruktúra PD-1/PD-L1, mechanizmus pôsobenia

Povrchový receptor PD-1 má svojou inhibičnou funkciou nezastupiteľnú úlohu v regulovaní imunitných reakcií a navodení periférnej tolerancie. Štúdie na myších modeloch ukázali, že chýbajúci PD-1 spôsobený defektom v jeho géne vedie k rozvoju chronicky postupujúcej glomerulonefritídy a artritídy, dvom hlavným zmenám na tkanivách v organizme postihnutom systémovým lupusom, čo je znak zrútenia systému autotolerancie (Nishimura et al., 1999)

Ľudský PD-1 je transmembránový receptor zložený z 288 aminokyselinových zbytkov. Na extracelulárnej strane má topológiu  $\beta$ -sendviču. Vyskytuje sa v monomérskej forme. Medzi cysteínmi sa tvorí disulfidový mostík, ktorý je len jeden, na rozdiel od receptorov CD28, CTLA-4 a inducibilného kostimulačného receptoru T lymfocytov (*inducible T-cell costimulator*, ICOS), patriacich do rovnakej rodiny, ktoré ich majú dva. Na každú molekulu PD-1 sa viaže práve jedna molekula PD-L1. Formovanie komplexu PD-1/PD-L1 sprevádzajú zmeny v orientácii aminokyselinových reťazcov a polohe atómov. Vytvárajú sa 4 vodíkové mostíky, ktoré komplex stabilizujú. V tomto proteín-proteínovom kontakte hrajú úlohu polárne aj hydrofóbne väzby,  $\pi$ - $\pi$  interakcie a soľné mostíky (Zak et al., 2015) Interakciu PD-1 a PD-L1 znázorňuje obrázok 1.



**Obrázok 1: Model interakcie molekúl PD-1 a PD-L1**

PD-1 je zobrazený modrou farbou, PD-L1 sivým povrchom. Kľúčové miesta pre väzbu sú v oranžových krúžkoch. Naľavo dole je zobrazená orientácia komplexu PD-1/PD-L1. Prevzaté zo Zak et al., 2015.

PD-1 je exprimovaný hlavne na aktivovaných CD4 a CD8 T lymfocytoch a B lymfocytoch, ale aj na aktivovaných dendritických bunkách, prirodzených zabíjačských bunkách (*natural killer cell*, NK), prirodzených zabíjačských T lymfocytoch (*natural killer T cell*, NKT) a monocytoch (Grywalska et al., 2018). Indukcia expresie PD-1 je podmienená aktivačnými signálnymi dráhami receptorov T a B lymfocytov (Agata et al., 1996), ale aj vystavením cytokínom IL-2, IL-7, IL-15 alebo IL-21 (Kinter et al., 2008).

Expresia mRNA kódujúca PD-1 je vyššia u vyčerpaných CD8 T lymfocytov než u funkčných CD8 T lymfocytov, čo bolo potvrdené aj na proteínovej úrovni použitím protilátok proti PD-1 (Barber et al., 2006). Vyčerpané T lymfocyty vo všeobecnosti vznikajú počas chronických ochorení. Podľa porovnania výsledkov génovej expresie efektorových, pamäťových a vyčerpaných CD8 T lymfocytov s naivnými bunkami sa zistilo, že z celkového počtu 490 génov so zvýšenou alebo zníženou expresiou sa až 338 génov vo vyčerpaných bunkách exprimuje odlišne. Najprekvapujúcejším výsledkom bola zvýšená miera expresie mRNA pre molekuly bunkového povrchu s inhibičnou aktivitou. Okrem PD-1 to bolo 13 ďalších receptorov potenciálne inhibičných signalizácií (Wherry et al., 2007).

Nádorové mikroprostredie podnecuje indukciu expresie PD-1 a jeho zachovanie na lymfocytoch infiltrujúcich nádory (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL). Expresia PD-1 bola detegovaná aj na CD4 a CD8 T lymfocytoch infiltrujúcich metastázy melanómu. Podľa tejto štúdie sa tiež ukázalo, že T lymfocyty v nádoroch majú najviac PD-1, v normálnom tkanive a periférnej krvi je jeho množstvo na bunkách nižšie než v nádoroch. Vyššie množstvo PD-1 na bunkách spôsobuje vyčerpanie a stratu schopnosti efektívnej imunitnej odpovede (Ahmadzadeh et al., 2009).

Množstvo PD-1 je spojené aj so stupňom rakoviny. U pacientov s karcinómom žalúdka bola na CD4 a CD8 T lymfocytoch z nádorového tkaniva zistená väčšia expresia PD-1 než na T lymfocytoch z normálneho žalúdočného tkaniva, pričom tá sa zvyšovala so zhoršujúcim sa stupňom rakoviny (Saito et al., 2013).

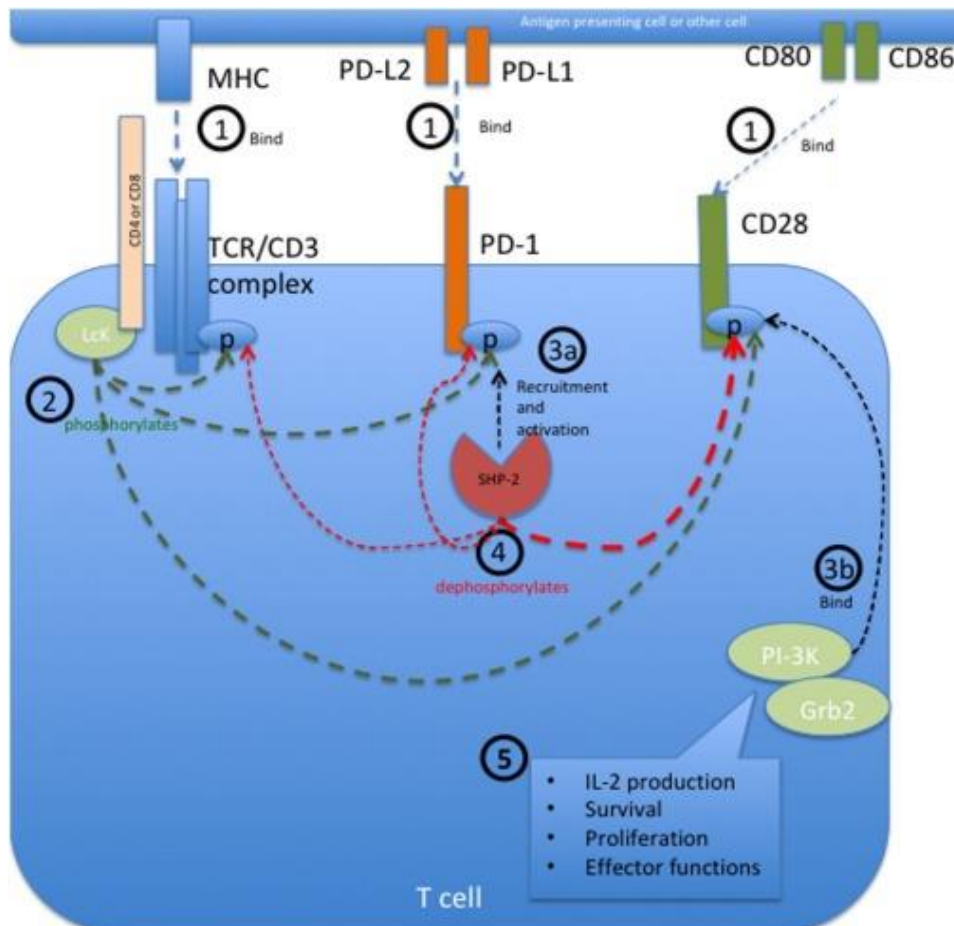
PD-1 sa okrem spomenutých buniek vyskytuje aj na nezrelých Langerhansových bunkách (Peña-Cruz et al., 2010). Na neaktivovaných periférnych B lymfocytoch je PD-1 exprimovaný konštitutívne, zatiaľ čo v germinálnych centrách expresia drasticky poklesne, aby mohla prebehnúť proliferácia B lymfocytov a ďalšie procesy selekcie pamäťových buniek. PD-1 tak hrá významnú úlohu v kontrole aktivácie B lymfocytov. Pri štúdiu distribúcie PD-1 ako koreceptoru pri aktivácii B lymfocytov sa zistilo, že sa zoskupuje na receptore B lymfocytov (*B-cell receptor*, BCR) už 15 minút po stimulácii, a ostáva tak najmenej po dobu 30 minút interferovať s transdukčnou dráhou BCR. PD-1 tak inhibuje aktivitu B lymfocytov (Thibult et al., 2013).

Dva ligandy receptora PD-1, PD-L1 a PD-L2, boli identifikované na základe prehľadávania databázy EST (*expressed sequence tag*) a hľadania homológie s rodinou génov B7. Hlavným induktorom expresie ligandov PD-L1 a PD-L2 je interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Brown et al., 2003). PD-L1 sa konštitutívne exprimuje na T a B lymfocytoch, a na APC. Po aktivácii týchto buniek sa expresia PD-L1 zvyšuje. (Freeman et al., 2000). Okrem spomenutých buniek sa PD-L1 vyskytuje aj na bunkách pľúc, pečene, pankreasu, obličiek a sleziny, ďalej na epitelových, endotelových a svalových bunkách, a na astrocytoch (Grywalska et al., 2018). PD-L2 sa vyskytuje na APC, ale aj na bunkách placenty, srdca, pankreasu, pľúc a pečene (Latchman et al., 2001; Rozali et al., 2012).

Interakcia PD-1 a PD-L1/PD-L2 inhibuje proliferáciu T lymfocytov a znižuje produkciu cytokínov IFN- $\gamma$ , IL-10 a IL-2. Inhibícia proliferácie je spôsobená zastavením bunkového cyklu, pričom PD-L2 je o niečo menej účinný než PD-L1 (Latchman et al., 2001). Zmena T lymfocytu z kľudového do aktivovaného stavu vyžaduje náhlu zmenu hospodárenia s energiou. Aktivované T lymfocyty potrebujú pre svoju proliferáciu vyšší príjem glukózy a metabolický obrat. Kostimulácia T lymfocytov prostredníctvom CD28 vedie k fosforylácii proteín kinázy B (PKB) fosfatidylinozitol-3-kinázou (PI3K). PKB je zodpovedná za zvýšený príjem glukózy a priebeh glykolýzy u aktivovaných T lymfocytov (Frauwirth et al., 2002). PD-1 má na kostimuláciu receptorom CD28 protichodný efekt, blokuje indukciu PI3K aktivity, čím inhibuje fosforyláciu PKB a zabraňuje vyššiemu príjmu glukózy bunkou a priebehu glykolýzy (Parry et al., 2005). Funkčné dôsledky interakcie PD-1 s PD-L1 závisia aj na sile signálov TCR a CD28. Ak sú tieto aktivačné a kostimulačné signály dostatočne silné, dokážu prekonať inhibičný efekt PD-1 (Freeman et al., 2000).

PD-1 má na intracelulárnom konci dva tyrozínové motívy - *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) a *immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM). Fosfatázy *Src homology-2 containing protein tyrosine phosphatase 1* (SHP-1) a SHP-2 sa viažu na cytoplazmatický koniec PD-1 v T lymfocytoch. Pri aktivácii T lymfocytu sa povrchové receptory TCR (s naviazaným CD4 alebo CD8), PD-1 a CD28 viažu na svoje ligandy MHCI I/MHC II, PD-L1/PD-L2 a CD80/CD86, a dostanú sa do blízkeho kontaktu. Vytvára sa tak imunologická synapsia. To dovoľuje receptorom navzájom interagovať. Kináza Lck, naviazaná na intracelulárny koniec molekúl CD4 alebo CD8, fosforyluje tyrozínové zbytky na intracelulárnom konci PD-1 a CD28. Fosforylácia ITSM na intracelulárnom konci PD-1 spôsobí, že sa okolo neho začnú zhromažďovať fosfatázy SHP-1 a SHP-2, ktoré sa aktivujú. Okolo fosforylovaného konca CD28 sa zhromažďujú iné signalizačné molekuly, napr. PI3K. Vďaka blízkosti intracelulárnych koncov receptorov v rámci imunologickej synapsie fosfatáza SHP-2 defosforyluje intracelulárny koniec CD28 a zabraňuje tak naviazaniu molekúl potrebných na kostimuláciu T lymfocytov. Znemožnenie naviazania PI3K a iných molekúl

na receptor CD28 spôsobuje zníženie signalizácie v dráhach pre proliferáciu, prežitie a efektorové funkcie T lymfocytov, a produkciu IL-2 (Chemnitz et al. 2004; Seidel, Otsuka, Kabashima 2018; Obrázok 2).



**Obrázok 2: Mechanizmus pôsobenia signalizácie PD-1/PD-L1**

- 1) naviazanie receptorov TCR na svoje ligandy na APC
- 2) fosforylácia tyrozínových zbytkov PD-1 a CD28 kinázou Lck
- 3) a) zhromažďovanie a aktivácia fosfatáz SHP  
b) zhromažďovanie signalizačných molekúl okolo fosforylovaného konca CD28
- 4) fosfatáza SHP-2 svojou aktivitou znemožňuje naviazanie kostimulačných molekúl
- 5) výsledkom pôsobenia signalizácie PD-1/PD-L1 je znížené prežívanie, proliferácia a efektorové funkcie T lymfocytov

Prevzaté zo Seidel et al., 2018.

# Liečba nádorov pomocou protilátok blokujúcich signalizáciu PD-1/PD-L1

Blokáda signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1 sa potýka s výzvou zvýšiť podiel pacientov pozitívne reagujúcich na liečbu. V tejto súvislosti je dôležité definovať prediktívne biomarkery, na základe ktorých by sa rozlíšili potenciálni pozitívne odpovedajúci pacienti. K maximalizovaniu úspešnej aplikácie liečby na čo najširšiu skupinu pacientov prispievajú aj informácie o mechanizmoch primárnej a získanej rezistencie, a možnostiach kombinácie terapií.

Výhodou liečby blokáciou signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1 je nižší výskyt vedľajších účinkov, pretože T lymfocyty preferenčne vyhľadávajú antigény pôvodom z nádoru, nie telu vlastné, zatiaľ čo liečba chemoterapiou poškodzuje okrem nádorových buniek aj zdravé tkanivá. Dôkazom je napr. štúdia na 272 pacientoch, ktorá ukázala vyššiu mieru odpovede na liečbu nivolumabom (20%) v porovnaní s tradičnou chemoterapiou (9%, liek docetaxel), a nižší výskyt vedľajších účinkov 3. a 4. stupňa (7% výskyt pri nivolumabe, 55% výskyt pri docetaxele) (Borghaei et al., 2015). Kvôli pozitívam sa terapia blokáciou dráhy PD-1/PD-L1 používa stále častejšie, čo však znamená aj viac pacientov trpiacich na vedľajšie účinky liečby. Najčastejšie sa vyskytujúce vedľajšie účinky sú únava, nevoľnosť, svrbenie a vyrážka, ktoré sa vyskytujú u 16-20% pacientov; vedľajšie účinky 3. a 4. stupňa (napr. hnačka, kolitída, zúženie priedušiek, hypotenzia, anafylaktický šok, poškodenie pečene a pankreasu, epidermálna nekróza) sa vyskytujú u 10-14% pacientov (Garon et al., 2015; Lakomý and Poprach, 2015; Robert et al., 2015; Ribas et al., 2016) Výskyt závažných, až život ohrozujúcich komplikácií si vyžaduje zastavenie imunoterapie a nasadenie kortikosteroidov na potlačenie autoimunitných reakcií. Určenie rizikových faktorov zodpovedných za navodenie vedľajších účinkov by pomohlo predpovedať, ktorí pacienti sú náchylní na ich prejavenie (Kartolo et al., 2018).

Napriek celkovo lepším výsledkom terapie nádorových chorôb blokáciou KBIR sú problémom pacienti, ktorí na liečbu len jedným liekom neodpovedajú, alebo sa po prvotnej odpovedi choroba vráti kvôli vzniku rezistencie na liečbu. Pochopenie mechanizmov odpovede a rezistencie pomáha odhaliť biomarkery nielen pozitívnej, ale aj negatívnej prognózy, a tiež kombinácie liekov vedúcich k efektívnej liečbe.

## Rezistencia voči liečbe

Účinná odpoveď na liečbu zahŕňa celú kaskádu procesov, od úspešnej prezentácie antigénov T lymfocytom, cez ich aktiváciu až po zničenie nádorových buniek. Ak sa v ktoromkoľvek kroku

objaví chyba, liečba je neúčinná. Hlavný problém z hľadiska vzniku rezistencie predstavuje nedostatočná tvorba a funkcia T lymfocytov a znížená tvorba pamäťových buniek. Rezistencia na liečbu môže byť primárna a sekundárna (Obrázok 3).

## **Primárna rezistencia**

Primárna rezistencia môže vzniknúť, ak CD8 T lymfocyty nedokážu rozpoznať nádor, alebo sú neaktívne. Dôvodom môže byť neprítomnosť dostatočne imunogénnych antigénov na nádore (Gubin et al., 2014).

Ďalším mechanizmom, ktorým sa nádor vyhýba zničeniu, je vylúčenie T lymfocytov. Je to zabránenie ich prenikaniu do nádorového mikroprostredia bez toho, aby boli postihnuté dráhy prezentácie antigénu. Vylúčenie spôsobujú mutačné procesy v nádore, napr. aktivácia WNT/ $\beta$ -katenínovej signalizačnej dráhy (Spranger et al., 2015), alebo nefunkčný tumor supresorový proteín *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) (Peng et al., 2016).

U primárnej aj sekundárnej rezistencii sa objavuje nedostatočná odpoveď nádoru na IFN  $-\gamma$ . Ten produkujú okrem iných buniek aj aktivované CD8 T lymfocyty. IFN  $-\gamma$  sa viaže na svoj receptor, čo aktivuje kinázy JAK1 a JAK2. Tie fosforylujú proteíny STAT1 a STAT3, ktoré po translokácii do jadra majú funkciu transkripčných faktorov, ktoré pôsobia na gény zodpovedné za proliferáciu nádorových buniek a ich apoptózu, a zvýšenie expresie PD-L1 (Nowicki et al., 2018).

## **Sekundárna rezistencia**

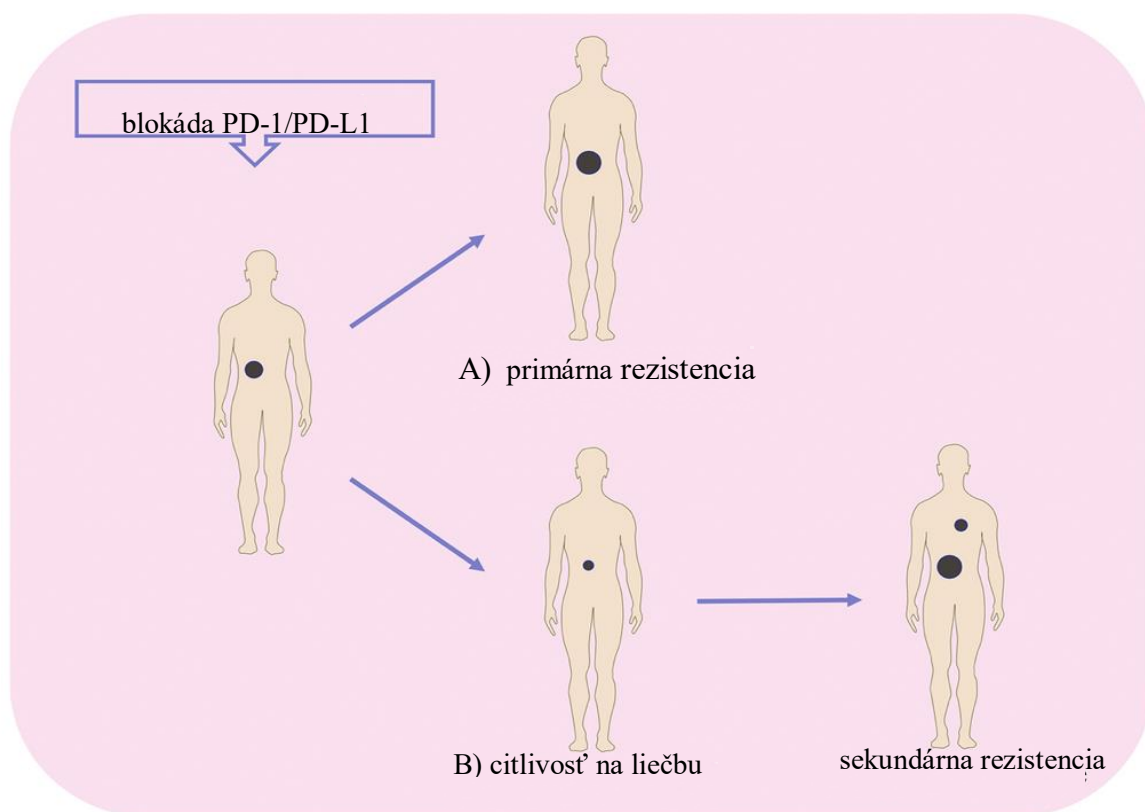
O získanej rezistencii voči terapii sa hovorí vtedy, ak sa u pacientov po prvotnej odpovedi na liečbu opäť objaví postup choroby. Môže sa prejavovať rovnakými mechanizmami ako primárna rezistencia (strata funkcie T lymfocytov, chybná signalizácia IFN  $-\gamma$ ).

Nefunkčné či vyčerpané T lymfocyty vznikajú pri ich dlhodobej stimulácii antigénmi, pretože začnú exprimovať molekuly PD-1. Ich výskyt spolu s nedostatkom pamäťových lymfocytov vedie k opätovnému rozvoju choroby. Okrem PD-1 spôsobujú problémy aj iné receptory potlačujúce imunitnú odpoveď, napr. CTLA-4, *T-cell immunoglobulin mucin-3* (TIM-3), *lymphocyte activation gene-3* (LAG-3) a *V-domain Ig suppressor of T cell activation* (VISTA) (Nowicki et al., 2018).

Pokles množstva antigénov exprimovaných nádorom je ďalšou príčinou vzniku rezistencie. Ten môže nastať práve v dôsledku terapie. Pri porovnaní exónových sekvencií nádorov NSCLC pred liečbou a po prejave rezistencie sa zistil pokles množstva neoantigénov. Ten bol spojený s mutáciami

postihujúcimi tie miesta peptidu, ktoré sú potrebné pre väzbu na MHC. Mutácie zahŕňali aj stratu heterozygoty a delécie (Anagnostou et al., 2017).

Prezentácii antigénov môžu zabrániť aj mutácie postihujúce  $\beta$ -2-mikroglobulín a kinázy JAK1 a JAK2. Ich mutácie boli u pacientov liečených na melanóm pozorované až v nádoroch vzniknutých po relapse choroby, čo dokazuje schopnosť imunoterapie blokáciou signálnej dráhy PD-1/PD-L1 vyvolať selekciu tých nádorových buniek, ktoré majú mutácie pomáhajúce nádorovým bunkám vyhnúť sa imunologickému dohľadu (Zaretsky et al., 2016).



**Obrázok 3: Primárna a sekundárna rezistencia**

- A) primárna rezistencia – pacient neodpovedá na liečbu už pri prvom podaní lieku
- B) sekundárna rezistencia – pacient najprv na liečbu reaguje, po čase sa však u neho vyvinie rezistencia voči lieku, čo vedie k relapsu

Prevzaté a upravené podľa Wang and Wu, 2017.

## **Biomarkery predikujúce odpoveď na liečbu**

Rozhodujúcim predpokladom na výber pacientov, ktorý by boli vhodní pre efektívnu terapiu protilátkami blokujúcimi KBIR, je identifikácia vhodných prediktívnych biomarkerov. Medzi

faktory, ktoré ovplyvňujú účinnosť liečby protilátkami proti PD-1/PD-L1, patrí hlavne expresia PD-L1, prítomnosť lymfocytov, ktoré infiltrujú nádor, genómové zmeny v nádorových bunkách, ale aj črevná mikróflóra a funkcie imunitného systému pacientov. Vypracovanie systému hodnotenia týchto faktorov pomocou predikujúcich biomarkerov by malo význam pri vyberaní pacientov vnímavých na liečbu. Prinieslo by to účinnejšie a dlhotrvajúce výsledky liečby s minimálnym zbytočným zaťažením pacientov vedľajšími účinkami, a v neposlednom rade aj finančné úspory.

## **Expresia MHC proteínov**

Úroveň expresie MHC proteínov má vplyv na mieru odpovede na liečbu blokáciou signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1. Na skupine 30 pacientoch s melanómom sa ukázalo, že expresia MHC II v bunkách melanómu pozitívne koreluje s odpoveďou na blokádu PD-1/PD-L1. Na liečbu odpovedalo 79 % MHC II<sup>+</sup> pacientov, v porovnaní s 38 % MHC II<sup>-</sup> pacientov. Podobný výsledok bol ukázaný aj na inej skupine 23 pacientov, v ktorej pozitívnu odpoveď na liečbu malo 75 % z MHC II<sup>+</sup> pacientov, ale len 27 % MHC II<sup>-</sup> pacientov (Johnson et al., 2016).

U pacientov s melanómom pred imunoterapiou sa bežne vyskytuje znížená expresia MHC I, alebo jeho úplná absencia, z dôvodu straty expresie  $\beta$ -2-mikroglobulínu. Tento stav je spojený s postupom choroby, chýbajúcou odpoveďou na liečbu a s nízkym prežívaním pacientov liečených protilátkami proti CTLA-4. Naproti tomu, nízke prežívanie a progresia choroby nesúvisela s expresiou MHC I u pacientov liečených protilátkami proti PD-L1 (Rodig et al., 2018).

Z týchto skutočností vyplýva, že pacienti môžu mať rôznu citlivosť na protilátky proti CTLA-4 a PD-1 v závislosti na expresii molekúl MHC I a MHC II. Zatiaľ čo odpoveď na liečbu protilátkami proti CTLA-4 závisí na expresii MHC I (protilátky proti CTLA-4 spôsobia obnovenie efektorových funkcií CD8 T lymfocytov, ktoré pre svoj protinádorový účinok vyžadujú prezentáciu antigénov prostredníctvom MHC I), odpoveď na liečbu protilátkami proti PD-1 môže byť u melanómu ovplyvnená expresiou MHC II (prezentácia antigénov prostredníctvom MHC II obnovuje efektorové funkcie CD4 T lymfocytov; tie môžu mať v prípade redukovanej expresie MHC I aj cytotoxickú aktivitu). V prípade absencie MHC I je preto na začiatku terapie dôležitá liečba protilátkami proti PD-1, a množstvo MHC I a MHC II na bunkách nádoru tak slúži ako biomarker predpovedajúci odpoveď na liečbu (Rodig et al., 2018).

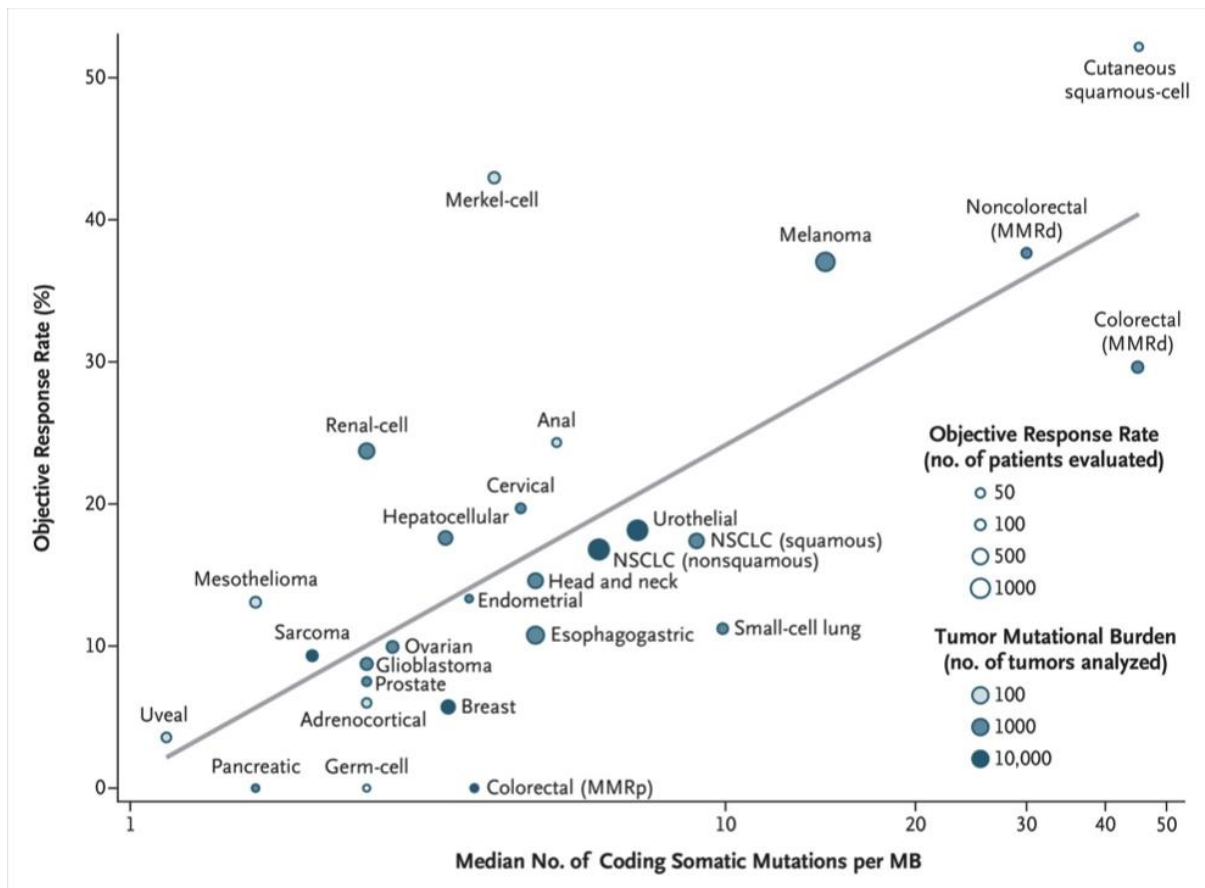
## **Expresia PD-L1**

PD-L1 je jeden z najpreštudovanejších a najčastejšie využívaných biomarkerov. Jeho vysoká expresia je spojená s tým, že v nádoroch prevažujú imunosupresívne mechanizmy a zabraňujú tak funkcii T lymfocytov (Spranger et al. 2013). Podľa štúdie na pacientoch s NSCLC, karcinómom hrubého čreva a konečníka, obličiek a prostaty je práve expresia PD-L1 na bunkách nádoru faktor, ktorý najviac odráža mieru odpovede na liečbu, v porovnaní s expresiou PD-1 a PD-L2 (Taube et al., 2014). Hodnotenie expresie PD-L1 imunohistochemickými metódami naznačilo koreláciu medzi množstvom PD-L1 na nádorových bunkách pred liečbou a odpoveďou na terapiu. Výskyt PD-L1 spôsobuje nie len samotnú existenciu odpovede, ale ovplyvňuje aj jej účinnosť (Muller et al., 2017; Passiglia et al., 2016; Topalian et al., 2012).

FDA schválil využitie imunohistochemických postupov ako sprievodnej diagnostiky na zistenie množstva PD-L1. Využitie týchto postupov však prináša veľa faktorov, ktoré môžu spôsobiť rozdielne výsledky v ohodnotení úrovne expresie PD-L1. Takáto analýza expresie PD-L1 nie je zatiaľ štandardizovaná. Používajú sa rôzne techniky farbenia a rôzne druhy protilátok, a nie sú jednotné ani úrovne, podľa ktorých sa určuje pozitivita testu. Rozdiel je aj v tom, či sa berie do úvahy expresia PD-L1 len bunkami nádoru, alebo aj bunkami nádorového mikroprostredia. Štyri štúdie na myších modeloch nezávisle na sebe dospeli k podobným záverom, keď skúmali úlohu expresie PD-L1 na rôznych druhoch buniek v nádorovom mikroprostredí. Efekt liečby blokáciou dráhy PD-1/PD-L1 bol pozorovaný aj v prípadoch, keď sa na bunkách nádoru nevyskytoval PD-L1, ale bol prítomný na bunkách nádorového mikroprostredia (Kleinovink et al., 2017).

## **Mutačná záťaž**

Účinnosť imunoterapie závisí na tom, ako veľmi je nádor imunogénny – schopný vyvolať imunitnú odpoveď. Imunogenicita je spojená s počtom somatických mutácií v nádorových bunkách (Alexandrov et al. 2013; Obrázok 4). V nádoroch sú často nefunkčné mechanizmy na opravu DNA, preto majú viac mutácií než normálne bunky. Tieto mutácie spôsobujú, že nádorové bunky tvoria nové, pre telo nevlastné antigény – neoantigény. Výskyt a rozpoznanie týchto neoantigénov je dôležitým predpokladom účinnosti imunoterapie.



#### Obrázok 4: Korelácia medzi mutačnou záťažou a odpoveďou na liečbu

Korelácia medzi mutačnou záťažou u 27 typoch nádorov a odpoveďou pacientov na liečbu. Percentuálny výnos odpovede na liečbu blokácie dráhy PD-1/PD-L1 v závislosti na logaritme strednej hodnoty somatických mutácií na  $10^6$  báz. Počet pacientov, u ktorých bola odpoveď hodnotená, je znázornená veľkosťou krúžkov, počet nádorov analyzovaných na zistenie mutačnej záťaže znázorňuje farba krúžku.

MMRd (*mismatch repair-deficient*)- deficit opráv nesprávneho párovania báz, MMRp (*mismatch repair-proficient*)- funkčný systém opráv nesprávneho párovania báz

Prevzaté z Yarchoan et al., 2017

Úlohu týchto mutácií v efektívite liečby nádorov podporujú viaceré štúdie. Väčšia mutačná záťaž sa prejavila napr. vyššou účinnosťou liečby pacientov s NSCLC liečených protilátkou proti PD-1 (pembrolizumab; Rizvi et al. 2015). Pri štúdiu účinnosti aktivity liečby karcinómu hrubého čreva a konečníka pembrolizumabom sa prejavil význam systému na opravu správneho párovania báz. Funkčný systém spôsobuje nižšiu mutačnú záťaž, čo sa prejavilo tým, že ani jeden z 18 pacientov na liečbu neodpovedal. V prípade, že tento systém nefunguje (*mismatch-repair deficiency*), sa najmä v mikrosatelitových regiónoch chromozómov (miesta s repetíciami DNA) objavuje veľké množstvo mutácií, pretože tieto miesta sú náchylné na kopírovanie vzniknutých chýb. Nahromadenie mutácií v týchto miestach sa označuje ako mikrosatelitová nestabilita. U pacientov s touto nestabilitou sa zvýšil podiel tých, ktorí odpovedali na liečbu (40 %; (Le et al., 2015).

Vyšší počet mutácií v nádore sa objaví napr. aj pri nefunkčnosti génu *BRCA2*. Ten hrá úlohu v oprave dvojlákových zlomov DNA a v homologickej rekombinácii. Pri vyššom počte mutácií spôsobujúcich stratu funkcie v géne *BRCA2* sa zvýšila aj celková mutačná záťaž, čo prinieslo efektívnejšiu odpoveď na terapiu protilátkou proti PD-1 (Hugo et al., 2016).

## **Génové mutácie ovplyvňujúce funkciu proteínov**

Zmeny v genóme nádorových buniek môžu narušiť rovnováhu v ústredných signalizačných dráhach. Aktivácia WNT/ $\beta$ -katenínovej signalizačnej dráhy v nádorových bunkách vedie k nedostatočnej aktivácii dendritických buniek potrebných na prezentáciu antigénov CD8 T lymfocytom. Lymfocyty preto neidentifikujú nádorové bunky alebo nie sú v nádore prítomné, čo vedie k neúčinnosti terapie protilátkami proti PD-L1 a CTLA-4 (Spranger et al., 2015).

Mutácia v géne pre PTEN spôsobuje aktiváciu PI3K. Tá je zodpovedná za proliferáciu buniek nádoru. Chýbajúci PTEN spôsobí produkciu imunosupresívnych cytokínov. Nasleduje znížená akumulácia a aktivita T lymfocytov v nádore, znížený počet lýzovaných buniek nádoru a vznik rezistencie voči liečbe (Peng et al., 2016; Sun et al., 1999).

Onkogénna signalizácia prostredníctvom mutovaného receptoru pre epidermálny rastový faktor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) dokáže vyvolať zmeny v nádorovom mikroprostredí vedúce k úniku imunitnému systému. Aktivovaná dráha EGFR v nádore vedie k zvýšenej expresii inhibičných cytokínov a k zvýšenej aktivite regulačných T lymfocytov. Spolu so znížením počtu cytotoxických T lymfocytov vytvára imunosupresívne mikroprostredie, ktoré znižuje odpoveď na liečbu (Akbay et al., 2013).

Biopsie nádorov pacientov, ktorým bol liečený melanóm pembrolizumabom, ukázali prítomnosť mutácií spôsobujúcich stratu funkcie génov kódujúcich kinázy JAK1 alebo JAK2, a ľahký reťazec MHC I -  $\beta$ -2-mikroglobulín. JAK1 a JAK2 hrajú úlohu v signalizačnej dráhe IFN  $\gamma$ , ktorá ovplyvňuje expresiu génov zodpovedných za bunkovú proliferáciu a apoptózu.  $\beta$ -2-mikroglobulín je nutný pre správne zloženie komplexu MHC I a jeho transport na povrch bunky. Pri jeho absencii chýba celý komplex MHC I na povrchu buniek. Nádor tak nemôže byť rozpoznaný T lymfocytmi, čo vedie k rezistencii na ďalšiu liečbu (Zaretsky et al., 2016).

Melanómy rezistentné voči liečbe vykazujú transkripčné profily označované ako *innate anti-PD-1 resistance* (IPRES). Tie zahŕňajú zvýšenú expresiu (môže byť také slovné spojenie?) génov zodpovedných za bunkovú adhéziu, angiogénu a hojenie rán (Hugo et al., 2016). Transkripčné profily spojené s rezistenciou k terapii blokádou PD-1/PD-L1 zahŕňali aj napr. zvýšenie expresie

génu *Laminin subunit alpha 3 (LAMA3)* v metastázach melanómu, ktorý je spojený s tranzíciou epiteliálnych buniek na mezenchymálne, a so zlou prognózou pri karcinóme pľúc (Ascierto et al., 2017), alebo gény, ktorých strata v bunkách nádoru znamená zhoršené efektorové funkcie CD8 T lymfocytov. Ide hlavne o gény potrebné pre prezentáciu antigénov a signalizačnú dráhu IFN- $\gamma$ , napr. gén pre apelinový receptor (*Apelin receptor, APLNR*; (Patel et al., 2017). Zmiernenie procesov, ktoré sú základom tejto rezistencie voči PD-1 terapii, môže zlepšiť odpoveď na terapiu u pacientov trpiacich melanómom a ďalšími druhmi rakovín

## **Nádorové mikroprostredie**

Skúmanie rôznorodosti mechanizmov a dynamiky interakcií v rámci nádorového mikroprostredia je dôležitým faktorom, ktorý zvyšuje efektivitu liečby a pre jednotlivých pacientov pomáha vybrať terapeutické postupy, ktoré predídu vzniku rezistencie (Koyama et al., 2016). Nádorové mikroprostredie obsahuje okrem nádorových buniek aj endotelové a imunitné bunky, fibroblasty a extracelulárnu matrix. Toto prostredie podporuje angiogézu, nekontrolovateľný rast a metastázovanie nádoru. Prítomnosť TIL sa považuje za znak pozitívnej prognózy. Výskyt TIL totiž pozitívne koreluje s dĺžkou doby prežitia. Tvrdenie sa opiera o pozorovania u pacientov s karcinómom hrubého čreva a konečníka (Reissfelder et al., 2015) a s NSCLC (Ruffini et al., 2009; Brambilla et al., 2016).

Prítomnosť TIL v nádore však môže znamenať aj negatívnu prognózu. Závisí to na type nádoru. Príkladom je adenokarcinóm žalúdka, v ktorom bol veľký počet CD8 T lymfocytov spojený s nízkou dobou prežitia a času bez progresie. CD8 T lymfocyty invadujúce nádor exprimovali veľa PD-L1, čo znamená, že v tomto type nádoru sa vyvinula rezistencia voči terapii (Thompson et al., 2017).

Ďalšie príklady biomarkerov, ktoré predpovedajú rezistenciu voči terapii, je prítomnosť regulačných T lymfocytov a myeloidných supresorových buniek. Ich účinok spolu s PD-1 môže viesť k zníženej funkcii CD8 T lymfocytov, tlmeniu protinádorovej imunitnej odpovede a ďalšiemu vývoju choroby (Kalathil et al., 2013). Aby bola liečba protilátkami proti PD-1 odpoveď účinná, je nevyhnutné znížiť počet regulačných T lymfocytov (Orillion et al., 2017; Taylor et al., 2017).

S negatívnou prognózou je spojená aj vysoká expresia indolamín 2,3-dioxigenázy 1 (IDO1). Tento enzým hrá úlohu v metabolizme tryptofánu, čím znižuje jeho množstvo. Nadprodukcia enzýmu v nádorových a myeloidných supresorových bunkách v nádorovom mikroprostredí sa odrazí na zníženej funkcii cytotoxických T lymfocytov. Vedľajším produktom metabolizmu tryptofánu je

kynurenín, látka, ktorá spôsobuje zmenu CD4 T lymfocytov na regulačné T lymfocyty. Dôsledkom ich zvýšeného počtu a nefunkčných CD4 T lymfocytov je rast nádorov (Schafer et al., 2016),.

Kostimulačná dráha CD28/B7 sa ukázala ako ďalší potenciálny biomarker efektívnej terapie. Štúdium na myších modeloch ukázalo, že signalizácia CD28 je potrebná na záchranu vyčerpaných a proliferáciu nových CD8 T lymfocytov, a efektívnu terapiu protilátkami proti PD-1 (Kamphorst et al., 2017).

Zatiaľ čo množstvo PD-L1 väčšinou pozitívne koreluje s efektivitou liečby, rozvoj signalizácií iných KBIR nepôsobí pozitívne. V nádoroch, ktoré po prvotnej odpovedi na liečbu začali opäť rásť, sa objavila vyššia expresia alternatívnych KBIR, najmä TIM-3. Ten spôsobuje napr. tlmenie T lymfocytov. Blokácia TIM-3 protilátkami obnovila ich funkciu a efektivitu liečby. Spustenie alternatívnych dráh je ďalším dôkazom, že nádory sa pod tlakom imunoterapie stávajú rezistentnými voči liečbe.

## **Vírusové infekcie**

Prítomnosť vírusových infekcií sa v nedávnej dobe ukázala ako potenciálny biomarker pozitívnej odpovede na imunoterapiu. Proteíny produkované onkogénnymi vírusmi pôsobia ako nádorovo špecifické antigény. Pre nádorové bunky to prináša nebezpečenstvo odhalenia imunitným systémom, ktorému sa snažia vyhnúť jeho inhibíciou, napr. nadprodukciou PD-L1. Tento trend je pozorovaný pri karcinóme Merkelových buniek spôsobenom polyomavírom Merkelových buniek (Wong et al., 2015). Vyššia expresia PD-1, PD-L1 a PD-L2 bola zistená aj pri karcinóme žalúdka v prítomnosti víru Epstein a Barrovej; odpoveď na liečbu bola za týchto podmienok u 56% pacientov (Panda et al., 2018; Ribas and Wolchok, 2018). Ďalším príkladom pozitívnej korelácie medzi vyššou expresiou PD-1 a prítomnosťou vírusu sú pacienti s karcinómom hlavy a krku, ktorí sú pozitívni na ľudský papilomavírus (*human papillomavirus*, HPV) (Badoual et al., 2013). Prítomnosť HPV neznamenala len vyššiu expresiu PD-1, ale aj vyššie percento pacientov odpovedajúcich na liečbu pembrolizumabom; pozitívna odpoveď bola u 25% HPV<sup>+</sup> pacientov v porovnaní so 14% HPV<sup>-</sup> pacientov (Seiwert et al., 2016).

## **Markery periférnej krvi**

Periférna krv je ďalším zdrojom informácií o potenciálnej pozitívnej odpovedi pacientov. Keďže sa získava jednoducho, vzrástol záujem o determináciu biomarkerov aj v periférnej krvi.

Štúdiá na 616 pacientoch trpiacich melanómom liečených pembrolizumabom ukázala, že dôležitú úlohu pri predikcii liečby má množstvo laktát dehydrogenázy a relatívne alebo absolútne počty eozinofilov, bazofilov a neutrofilov, a absolútny počet lymfocytov. Hladina laktát dehydrogenázy korelovala s prežívaním pacientov. Pri zvýšení tejto hladiny 1,7-krát, respektíve 2,5-krát nad hornú hranicu normálu, sa stredná hodnota prežitia sa znížila z 16,1 mesiaca pri normálnej hladine na 8,7 a 2,3 mesiaca. S odpoveďou na liečbu boli spojené aj vysoké počty eozinofilov a bazofilov. Naopak, vysoké počty neutrofilov a leukocytov naznačovali negatívnu koreláciu s dobou prežitia (Weide et al., 2016). Pozitívna korelácia s prežívaním pacientov bola popísaná aj pre pomer neutrofilov a lymfocytov pred liečbou menší ako 5 (Bagley et al., 2017).

## Črevná mikroflóra

Štúdiá na pacientoch trpiacich melanómom a liečených blokáciou PD-1/PD-L1 dráhy ukázala rozdiely v zložení črevnej mikroflóry. Pacienti odpovedajúci na liečbu mali vyššie množstvo baktérií čeľade *Ruminococcaceae* a radu *Clostridiales*. Tiež sa u nich vyskytovalo viac anabolických dráh než u neodpovedajúcich pacientov. Vďaka tomuto priaznivému mikrobiálnemu prostrediu mali zvýšenú protinádorovú odpoveď a vyšší počet efektorových CD4 a CD8 T lymfocytov so zlepšenou funkciou na periférii aj v nádorovom mikroprostredí. Naopak, neodpovedajúci pacienti mali menšiu diverzitu baktérií, zvýšené množstvo baktérií radu *Bacteroidales* a zvýšený počet regulačných T lymfocytov. Kvôli obmedzenej infiltrácii nádorov T lymfocytmi vykazovali slabšiu protinádorovú imunitnú odpoveď (Gopalakrishnan et al., 2018).

Ďalšia štúdiá na pacientoch s melanómom ukázala koreláciu medzi odpoveďou na terapiu protilátkami proti PD-1 a diverzitou baktérií. Prítomné boli napr. rody *Bifidobacterium* a *Enterococcus*. Dokonca sú rozdiely aj medzi biodiverzitou u pacientov odpovedajúcimi na liečbu rôznymi blokujúcimi protilátkami. Pacienti odpovedajúci na ipilimumab a ivolumab majú viac baktérií druhu *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides thetaiotaomicron* a *Holdemania filiformis*, a pacienti odpovedajúci na pembrolizumab majú viac baktérií *Dorea formicogenerans* (Frankel et al., 2017).

Tieto výsledky ukazujú, že na modulácii odpovedi na imunoterapiu sa podieľa aj črevná mikroflóra pacientov. Napriek týmto zisteniam sú potrebné ďalšie analýzy samotných bakteriálnych druhov a ich produktov. Črevná mikroflóra je značne variabilná. Pretože na jej zloženie vplyva veľa faktorov (zloženie stravy, životné prostredie, užívanie antibiotík, príslušnosť do etnickej skupiny a iné), je jej hodnotenie ako prediktívneho biomarkeru obtiažne (Frankel et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2018; Matson et al., 2018).

## Záver

Použitie inhibítorov KBIR predstavuje významný spôsob liečby nádorov. Dôležitou súčasťou takýchto terapií je okrem iných aj inhibícia signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1. Táto dráha oslabuje efektorové funkcie imunitných buniek, hlavne CD8 T lymfocytov, hlavných buniek zodpovedných za cytotoxický efekt na nádorové bunky. Napriek pozitívam, ktoré liečba inhibíciou signalizačnej dráhy PD-1/PD-L1 prináša oproti tradičným postupom, a širokému spektru nádorov, ktoré je táto terapia schopná liečiť, ostáva veľkým problémom malé percento odpovedajúcich pacientov, a veľa faktorov, ktoré účinnosť nepriaznivo ovplyvňujú.

Lepšie chápanie vzťahov medzi imunitným systémom, správaním nádoru a mechanizmom pôsobenia signalizácie PD-1/PD-L1 by umožnilo efektívnejšie využitie tejto terapie, jej nasadenie už v skorších štádiách choroby, a tiež jej kombináciu s inými druhmi terapie. Používajú sa napr. inhibítory iných KBIR (TIGIT, TIM-3), peptidové vakcíny u nádorov s nízkou mutačnou záťažou, lokálna aplikácia onkolytických vírusov, a použitie rádioterapie (Sakuishi et al., 2010; Karyampudi et al., 2014; Chauvin et al., 2015; Sharabi et al., 2015; Shaverdian et al., 2017; Bourgeois-Daigneault et al., 2018; Samson et al., 2018). Pri rozhodovaní, ktorý typ kombinácie by bol vhodný pre konkrétneho pacienta, ale aj pri hľadaní nových kombinácií, by mali pomáhať prediktívne biomarkery. Aby bol výsledok kombinácie blokácie signalizácie PD-1/PD-L s inými možnosťami terapie optimálny, sú potrebné ďalšie klinické testy.

Využívanie imunoterapie v liečbe onkologických pacientov je dôležitým krokom, vďaka ktorému pribúdajú pacienti žijúci bez príznakov, poprípade tí, ktorí sa vyliečia. Nevýhodou však je, že nie všetky druhy nádorov na ňu odpovedajú svojou regresiou. Je preto dôležité pokračovať v snahách o čo najlepšie pochopenie mechanizmov pôsobenia inhibítorov KBIR a vyvíjať úsilie na to, aby z tejto liečby malo prospech čo najviac pacientov.

## Zoznam literatúry

Prehľadné články sú označené \*

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubat, T., Yagita, H., Honjo, T., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology* 8, 765–772.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., Rosenberg, S.A., 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544.
- Akbay, E.A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J.H., Christensen, C.L., Mikse, O.R., Cherniack, A.D., Beauchamp, E.M., Pugh, T.J., Wilkerson, M.D., Fecci, P.E., Butaney, M., Reibel, J.B., Soucheray, M., Cohoon, T.J., Janne, P.A., Meyerson, M., Hayes, D.N., Shapiro, G.I., Shimamura, T., Sholl, L.M., Rodig, S.J., Freeman, G.J., Hammerman, P.S., Dranoff, G., Wong, K.-K., 2013. Activation of the PD-1 Pathway Contributes to Immune Escape in EGFR-Driven Lung Tumors. *Cancer Discovery* 3, 1355–1363.
- Alexandrov et al., ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MMML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A.P., Caldas, C., Davies, H.R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjörd, J.E., Foekens, J.A., Greaves, M., Hosoda, F., Hutter, B., Illicic, T., Imbeaud, S., Imielinski, M., Jäger, N., Jones, D.T.W., Jones, D., Knappskog, S., Kool, M., Lakhani, S.R., López-Otín, C., Martin, S., Munshi, N.C., Nakamura, H., Northcott, P.A., Pajic, M., Papaemmanuil, E., Paradiso, A., Pearson, J.V., Puente, X.S., Raine, K., Ramakrishna, M., Richardson, A.L., Richter, J., Rosenstiel, P., Schlesner, M., Schumacher, T.N., Span, P.N., Teague, J.W., Totoki, Y., Tutt, A.N.J., Valdés-Mas, R., van Buuren, M.M., van 't Veer, L., Vincent-Salomon, A., Waddell, N., Yates, L.R., Zucman-Rossi, J., Andrew Futreal, P., McDermott, U., Lichter, P., Meyerson, M., Grimmond, S.M., Siebert, R., Campo, E., Shibata, T., Pfister, S.M., Campbell, P.J., Stratton, M.R., 2013. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.
- Allison, J.P., Hurwitz, A.A., Leach, D.R., 1995. Manipulation of Costimulatory Signals to enhance Antitumor T-cell Responses. *Current Opinion in Immunology* 7:682-686
- Anagnostou, V., Smith, K.N., Forde, P.M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., White, J., Zhang, T., Adleff, V., Phallen, J., Wali, N., Hruban, C., Guthrie, V.B., Rodgers, K., Naidoo, J., Kang, H., Sharfman, W., Georgiades, C., Verde, F., Illei, P., Li, Q.K., Gabrielson, E., Brock, M.V., Zahnow, C.A., Baylin, S.B., Scharpf, R.B., Brahmer, J.R., Karchin, R., Pardoll, D.M., Velculescu, V.E., 2017. Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discovery* 7, 264–276.
- Ascierto, M.L., Makohon-Moore, A., Lipson, E.J., Taube, J.M., McMiller, T.L., Berger, A.E., Fan, J., Kaunitz, G.J., Cottrell, T.R., Kohutek, Z.A., Favorov, A., Makarov, V., Riaz, N., Chan, T.A., Cope, L., Hruban, R.H., Pardoll, D.M., Taylor, B.S., Solit, D.B., Iacobuzio-Donahue, C.A., Topalian, S.L., 2017. Transcriptional Mechanisms of Resistance to Anti-PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research* 23, 3168–3180.

- Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Van Ryswick, C., Ravel, P., Benhamouda, N., Levionnois, E., Nizard, M., Si-Mohamed, A., Besnier, N., Gey, A., Rotem-Yehudar, R., Pere, H., Tran, T., Guerin, C.L., Chauvat, A., Dransart, E., Alanio, C., Albert, S., Barry, B., Sandoval, F., Quintin-Colonna, F., Bruneval, P., Fridman, W.H., Lemoine, F.M., Oudard, S., Johannes, L., Olive, D., Brasnu, D., Tartour, E., 2013. PD-1-Expressing Tumor-Infiltrating T Cells Are a Favorable Prognostic Biomarker in HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Cancer Research* 73, 128–138.
- Bagley, S.J., Kothari, S., Aggarwal, C., Bauml, J.M., Alley, E.W., Evans, T.L., Kosteva, J.A., Ciunci, C.A., Gabriel, P.E., Thompson, J.C., Stonehouse-Lee, S., Sherry, V.E., Gilbert, E., Eaby-Sandy, B., Mutale, F., DiLullo, G., Cohen, R.B., Vachani, A., Langer, C.J., 2017. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 106, 1–7.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufel, M., Arrieta, O., Burgio, M.A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D.E., Gettinger, S.N., Rudin, C.M., Rizvi, N., Crinò, L., Blumenschein, G.R., Antonia, S.J., Dorange, C., Harbison, C.T., Graf Finckenstein, F., Brahmer, J.R., 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 373, 1627–1639.
- Bourgeois-Daigneault, M.-C., Roy, D.G., Aitken, A.S., El Sayes, N., Martin, N.T., Varette, O., Falls, T., St-Germain, L.E., Pelin, A., Lichty, B.D., Stojdl, D.F., Ungerechts, G., Diallo, J.-S., Bell, J.C., 2018. Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy. *Science Translational Medicine* 10, eaao1641.
- Brambilla, E., Le Teuff, G., Marguet, S., Lantuejoul, S., Dunant, A., Graziano, S., Pirker, R., Douillard, J.-Y., Le Chevalier, T., Filipits, M., Rosell, R., Kratzke, R., Popper, H., Soria, J.-C., Shepherd, F.A., Seymour, L., Tsao, M.S., 2016. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 34, 1223–1230.
- Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.-R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., Freeman, G.J., 2003. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *The Journal of Immunology* 170, 1257–1266.
- Cameron, F., Whiteside, G., Perry, C., 2011. Ipilimumab: First Global Approval. *Drugs* 71, 1093–1104.
- Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J.M., Chen, T.T., Maurer, M., Korman, A.J., Zarour, H.M., 2015. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *Journal of Clinical Investigation* 125, 2046–2058.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., Riley, J.L., 2004. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology* 173, 945–954.

- \* Chen, L., Linsley, P.S., Hellström, K.E., 1993. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunology Today* 14, 483-485.
- Frankel, A.E., Coughlin, L.A., Kim, J., Froehlich, T.W., Xie, Y., Frenkel, E.P., Koh, A.Y., 2017. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia* 19, 848–855.
- Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R.V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., Thompson, C.B., 2002. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity* 16, 769–777.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., 2000. 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* 192, 1027–1034.
- Garon, E.B., Rizvi, N.A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A.S., Eder, J.P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M.D., Hamid, O., Goldman, J.W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R.Z., Zhang, J., Luceford, J.K., Rangwala, R., Lubiniecki, G.M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L., 2015. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* 372, 2018–2028.
- Gopalakrishnan, V., Spencer, C.N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M.C., Karpinets, T.V., Prieto, P.A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S.C., Cogdill, A.P., Zhao, L., Hudgens, C.W., Hutchinson, D.S., Manzo, T., Petaccia de Macedo, M., Cotechini, T., Kumar, T., Chen, W.S., Reddy, S.M., Szczepaniak Sloane, R., Galloway-Pena, J., Jiang, H., Chen, P.L., Shpall, E.J., Rezvani, K., Alousi, A.M., Chemaly, R.F., Shelburne, S., Vence, L.M., Okhuysen, P.C., Jensen, V.B., Swennes, A.G., McAllister, F., Marcelo Riquelme Sanchez, E., Zhang, Y., Le Chatelier, E., Zitvogel, L., Pons, N., Austin-Breneman, J.L., Haydu, L.E., Burton, E.M., Gardner, J.M., Sirmans, E., Hu, J., Lazar, A.J., Tsujikawa, T., Diab, A., Tawbi, H., Glitza, I.C., Hwu, W.J., Patel, S.P., Woodman, S.E., Amaria, R.N., Davies, M.A., Gershenwald, J.E., Hwu, P., Lee, J.E., Zhang, J., Coussens, L.M., Cooper, Z.A., Futreal, P.A., Daniel, C.R., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., Tetzlaff, M.T., Sharma, P., Allison, J.P., Jenq, R.R., Wargo, J.A., 2018. Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 359, 97–103.
- \* Grywalska, E., Pasiarski, M., Gózdź, S., Roliński, J., 2018. Immune-checkpoint inhibitors for combating T-cell dysfunction in cancer. *Onco Targets Ther* 11, 6505–6524.
- Gubin, M.M., Zhang, X., Schuster, H., Caron, E., Ward, J.P., Noguchi, T., Ivanova, Y., Hundal, J., Arthur, C.D., Krebber, W.-J., Mulder, G.E., Toebes, M., Vesely, M.D., Lam, S.S.K., Korman, A.J., Allison, J.P., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., Pearce, E.L., Schumacher, T.N., Abersold, R., Rammensee, H.-G., Melief, C.J.M., Mardis, E.R., Gillanders, W.E., Artyomov, M.N., Schreiber, R.D., 2014a. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515, 577–581.
- Hugo, W., Zaretsky, J.M., Sun, L., Song, C., Moreno, B.H., Hu-Lieskovan, S., Berent-Maoz, B., Pang, J., Chmielowski, B., Cherry, G., Seja, E., Lomeli, S., Kong, X., Kelley, M.C., Sosman, J.A.,

- Johnson, D.B., Ribas, A., Lo, R.S., 2016. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell* 165, 35–44.
- Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., Honjo, T., 2017. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of Biomedical Science* 24.
- Johnson, D.B., Estrada, M.V., Salgado, R., Sanchez, V., Doxie, D.B., Opalenik, S.R., Vilgelm, A.E., Feld, E., Johnson, A.S., Greenplate, A.R., Sanders, M.E., Lovly, C.M., Frederick, D.T., Kelley, M.C., Richmond, A., Irish, J.M., Shyr, Y., Sullivan, R.J., Puzanov, I., Sosman, J.A., Balko, J.M., 2016. Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nature Communications* 7.
- Kalathil, S., Lugade, A.A., Miller, A., Iyer, R., Thanavala, Y., 2013. Higher Frequencies of GARP+CTLA-4+Foxp3+ T Regulatory Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients Are Associated with Impaired T-Cell Functionality. *Cancer Research* 73, 2435–2444.
- Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., Sica, G.L., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Blazar, B.R., Turka, L.A., Owonikoko, T.K., Pillai, R.N., Ramalingam, S.S., Araki, K., Ahmed, R., 2017. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1–targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423–1427.
- Kartolo, A., Sattar, J., Sahai, V., Baetz, T., Lakoff, J.M., 2018. Predictors of immunotherapy-induced immune-related adverse events. *Current Oncology* 25.
- Karyampudi, L., Lamichhane, P., Scheid, A.D., Kalli, K.R., Shreeder, B., Krempski, J.W., Behrens, M.D., Knutson, K.L., 2014. Accumulation of Memory Precursor CD8 T Cells in Regressing Tumors following Combination Therapy with Vaccine and Anti-PD-1 Antibody. *Cancer Research* 74, 2974–2985.
- Kinter, A.L., Godbout, E.J., McNally, J.P., Sereti, I., Roby, G.A., O’Shea, M.A., Fauci, A.S., 2008. The Common  $\gamma$ -Chain Cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 Induce the Expression of Programmed Death-1 and Its Ligands. *The Journal of Immunology* 181, 6738–6746.
- \* Kleinovink, J.W., van Hall, T., Ossendorp, F., Fransen, M.F., 2017. PD-L1 immune suppression in cancer: Tumor cells or host cells? *OncoImmunology* e1325982.
- Koyama, S., Akbay, E.A., Li, Y.Y., Herter-Sprue, G.S., Buczkowski, K.A., Richards, W.G., Gandhi, L., Redig, A.J., Rodig, S.J., Asahina, H., Jones, R.E., Kulkarni, M.M., Kuraguchi, M., Palakurthi, S., Fecci, P.E., Johnson, B.E., Janne, P.A., Engelman, J.A., Gangadharan, S.P., Costa, D.B., Freeman, G.J., Bueno, R., Hodi, F.S., Dranoff, G., Wong, K.-K., Hammerman, P.S., 2016. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nature Communications* 7.
- \* Lakomý, R., Poprach, A., 2015. Side-effects of Modern Immunotherapy and How to Solve Them in the Clinics. *Klinicka onkologie* 28, 4S103-4S114.
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P.F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M.S., Haanen, J.B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G.A., Ascierto, P.A., Long, G.V., Callahan,

- M.K., Postow, M.A., Grossmann, K., Sznol, M., Dreno, B., Bastholt, L., Yang, A., Rollin, L.M., Horak, C., Hodi, F.S., Wolchok, J.D., 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *New England Journal of Medicine* 373, 23–34.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2, 261–268.
- Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R.C., Zaheer, A., Fisher, G.A., Crocenzi, T.S., Lee, J.J., Duffy, S.M., Goldberg, R.M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhajee, F., Huebner, T., Hruban, R.H., Wood, L.D., Cuka, N., Pardoll, D.M., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Zhou, S., Cornish, T.C., Taube, J.M., Anders, R.A., Eshleman, J.R., Vogelstein, B., Diaz, L.A., 2015. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine* 372, 2509–2520.
- Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M.-L., Luke, J.J., Gajewski, T.F., 2018. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 359, 104–108.
- \* McDermott, D.F., Atkins, M.B., 2013. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Medicine* 2(5), 662-673
- Muller, M., Schouten, R.D., De Gooijer, C.J., Baas, P., 2017. Pembrolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* 17, 399–409.
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T., 1999. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity* 11, 141–151.
- \* Nowicki, T.S., Hu-Lieskovan, S., Ribas, A., 2018. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade: The Cancer Journal 24, 47–53.
- Orillion, A., Hashimoto, A., Damayanti, N., Shen, L., Adelaiye-Ogala, R., Arisa, S., Chintala, S., Ordentlich, P., Kao, C., Elzey, B., Gabrilovich, D., Pili, R., 2017. Entinostat Neutralizes Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Antitumor Effect of PD-1 Inhibition in Murine Models of Lung and Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 23, 5187–5201.
- Panda, A., Mehnert, J.M., Hirshfield, K.M., Riedlinger, G., Damare, S., Saunders, T., Kane, M., Sokol, L., Stein, M.N., Poplin, E., Rodriguez-Rodriguez, L., Silk, A.W., Aisner, J., Chan, N., Malhotra, J., Frankel, M., Kaufman, H.L., Ali, S., Ross, J.S., White, E.P., Bhanot, G., Ganesan, S., 2018. Immune Activation and Benefit From Avelumab in EBV-Positive Gastric Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 110, 316–320.
- \* Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 252–264.

- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., Riley, J.L., 2005. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology* 25, 9543–9553.
- Passiglia, F., Bronte, G., Bazan, V., Natoli, C., Rizzo, S., Galvano, A., Listì, A., Cicero, G., Rolfo, C., Santini, D., Russo, A., 2016. PD-L1 expression as predictive biomarker in patients with NSCLC: a pooled analysis. *Oncotarget* 7.
- Patel, S.J., Sanjana, N.E., Kishton, R.J., Eidizadeh, A., Vodnala, S.K., Cam, M., Gartner, J.J., Jia, L., Steinberg, S.M., Yamamoto, T.N., Merchant, A.S., Mehta, G.U., Chichura, A., Shalem, O., Tran, E., Eil, R., Sukumar, M., Guijarro, E.P., Day, C.-P., Robbins, P., Feldman, S., Merlino, G., Zhang, F., Restifo, N.P., 2017. Identification of essential genes for cancer immunotherapy. *Nature* 548, 537–542.
- Peña-Cruz, V., McDonough, S.M., Diaz-Griffero, F., Crum, C.P., Carrasco, R.D., Freeman, G.J., 2010. PD-1 on Immature and PD-1 Ligands on Migratory Human Langerhans Cells Regulate Antigen-Presenting Cell Activity. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 2222–2230.
- Peng, W., Chen, J.Q., Liu, C., Malu, S., Creasy, C., Tetzlaff, M.T., Xu, C., McKenzie, J.A., Zhang, C., Liang, X., Williams, L.J., Deng, W., Chen, G., Mbofung, R., Lazar, A.J., Torres-Cabala, C.A., Cooper, Z.A., Chen, P.-L., Tieu, T.N., Spranger, S., Yu, X., Bernatchez, C., Forget, M.-A., Haymaker, C., Amaria, R., McQuade, J.L., Glitza, I.C., Cascone, T., Li, H.S., Kwong, L.N., Heffernan, T.P., Hu, J., Bassett, R.L., Bosenberg, M.W., Woodman, S.E., Overwijk, W.W., Lizee, G., Roszik, J., Gajewski, T.F., Wargo, J.A., Gershenwald, J.E., Radvanyi, L., Davies, M.A., Hwu, P., 2016. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discovery* 6, 202–216.
- Reissfelder, C., Stamova, S., Gossmann, C., Braun, M., Bonertz, A., Walliczek, U., Grimm, M., Rahbari, N.N., Koch, M., Saadati, M., Benner, A., Büchler, M.W., Jäger, D., Halama, N., Khazaie, K., Weitz, J., Beckhove, P., 2015. Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte activity determines colorectal cancer patient prognosis. *Journal of Clinical Investigation* 125, 739–751.
- Ribas, A., Hamid, O., Daud, A., Hodi, F.S., Wolchok, J.D., Kefford, R., Joshua, A.M., Patnaik, A., Hwu, W.-J., Weber, J.S., Gangadhar, T.C., Hersey, P., Dronca, R., Joseph, R.W., Zarour, H., Chmielowski, B., Lawrence, D.P., Algazi, A., Rizvi, N.A., Hoffner, B., Mateus, C., Gergich, K., Lindia, J.A., Giannotti, M., Li, X.N., Ebbinghaus, S., Kang, S.P., Robert, C., 2016. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* 315, 1600.
- \* Ribas, A., Wolchok, J.D., 2018. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350–1355.
- Rizvi, Naiyer A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., Miller, M.L., Rekhtman, N., Moreira, A.L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmı, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E.B., Merghoub, T., Wolchok, J.D., Schumacher, T.N., Chan, T.A., 2015. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348, 124–128.
- Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocho, E., Savage, K.J., Hernberg, M.M., Lebbé, C., Charles, J.,

- Mihalcioiu, C., Chiarion-Sileni, V., Mauch, C., Cognetti, F., Arance, A., Schmidt, H., Schadendorf, D., Gogas, H., Lundgren-Eriksson, L., Horak, C., Sharkey, B., Waxman, I.M., Atkinson, V., Ascierto, P.A., 2015. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *New England Journal of Medicine* 372, 320–330.
- Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J.S., Joshua, A.M., Hwu, W.-J., Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Dronca, R., Zarour, H., Joseph, R.W., Boasberg, P., Chmielowski, B., Mateus, C., Postow, M.A., Gergich, K., Elassaiss-Schaap, J., Li, X.N., Iannone, R., Ebbinghaus, S.W., Kang, S.P., Daud, A., 2014. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet* 384, 1109–1117.
- Rodig, S.J., Gusenleitner, D., Jackson, D.G., Gjini, E., Giobbie-Hurder, A., Jin, C., Chang, H., Lovitch, S.B., Horak, C., Weber, J.S., Weirather, J.L., Wolchok, J.D., Postow, M.A., Pavlick, A.C., Chesney, J., Hodi, F.S., 2018. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. *Science Translational Medicine* 10, eaar3342.
- \* Rozali, E.N., Hato, S.V., Robinson, B.W., Lake, R.A., Lesterhuis, W.J., 2012. Programmed Death Ligand 2 in Cancer-Induced Immune Suppression. *Clinical and Developmental Immunology* 2012, 1–8.
- Ruffini, E., Asioli, S., Filosso, P.L., Lyberis, P., Bruna, M.C., Macrì, L., Daniele, L., Oliaro, A., 2009. Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Neoplasms. *The Annals of Thoracic Surgery* 87, 365–372.
- Saito, H., Kuroda, H., Matsunaga, T., Osaki, T., Ikeguchi, M., 2013. Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer: PD-1 Expression in Gastric Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 107, 517–522.
- Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J.M., Blazar, B.R., Kuchroo, V.K., Anderson, A.C., 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 207, 2187–2194.
- Samson, A., Scott, K.J., Taggart, D., West, E.J., Wilson, E., Nuovo, G.J., Thomson, S., Corns, R., Mathew, R.K., Fuller, M.J., Kottke, T.J., Thompson, J.M., Ilett, E.J., Cockle, J.V., van Hille, P., Sivakumar, G., Polson, E.S., Turnbull, S.J., Appleton, E.S., Migneco, G., Rose, A.S., Coffey, M.C., Beirne, D.A., Collinson, F.J., Ralph, C., Alan Anthony, D., Twelves, C.J., Furness, A.J., Quezada, S.A., Wurdak, H., Errington-Mais, F., Pandha, H., Harrington, K.J., Selby, P.J., Vile, R.G., Griffin, S.D., Stead, L.F., Short, S.C., Melcher, A.A., 2018. Intravenous delivery of oncolytic reovirus to brain tumor patients immunologically primes for subsequent checkpoint blockade. *Science Translational Medicine* 10, eaam7577.
- \* Schafer, C.C., Wang, Y., Hough, K.P., Sawant, A., Grant, S.C., Thannickal, V.J., Zmijewski, J., Ponnazhagan, S., Deshane, J.S., 2016. Indoleamine 2,3-dioxygenase regulates anti-tumor immunity in lung cancer by metabolic reprogramming of immune cells in the tumor microenvironment. *Oncotarget* 7.
- \* Seidel, J.A., Otsuka, A., Kabashima, K., 2018. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Frontiers in Oncology* 8.

- Seiwert, T.Y., Burtness, B., Mehra, R., Weiss, J., Berger, R., Eder, J.P., Heath, K., McClanahan, T., Lunceford, J., Gause, C., Cheng, J.D., Chow, L.Q., 2016. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology* 17, 956–965.
- Sharabi, A.B., Nirschl, C.J., Kochel, C.M., Nirschl, T.R., Francica, B.J., Velarde, E., Dewese, T.L., Drake, C.G., 2015. Stereotactic Radiation Therapy Augments Antigen-Specific PD-1-Mediated Antitumor Immune Responses via Cross-Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Immunology Research* 3, 345–355.
- Shaverdian, N., Lisberg, A.E., Bornazyan, K., Veruttipong, D., Goldman, J.W., Formenti, S.C., Garon, E.B., Lee, P., 2017. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *The Lancet Oncology* 18, 895–903.
- Spranger, S., Bao, R., Gajewski, T.F., 2015. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 523, 231–235.
- Spranger, S., Spaapen, R.M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T.T., Gajewski, T.F., 2013. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science Translational Medicine* 5, 200ra116-200ra116.
- Sun, H., Lesche, R., Li, D.-M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilo, N., Mueller, B., Liu, X., Wu, H., 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6199–6204.
- Taube, J.M., Klein, A., Brahmer, J.R., Xu, H., Pan, X., Kim, J.H., Chen, L., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., Anders, R.A., 2014. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research* 20, 5064–5074.
- Taylor, N.A., Vick, S.C., Iglesia, M.D., Brickey, W.J., Midkiff, B.R., McKinnon, K.P., Reisdorf, S., Anders, C.K., Carey, L.A., Parker, J.S., Perou, C.M., Vincent, B.G., Serody, J.S., 2017. Treg depletion potentiates checkpoint inhibition in claudin-low breast cancer. *Journal of Clinical Investigation* 127, 3472–3483.
- Thibult, M.-L., Mamessier, E., Gertner-Dardenne, J., Pastor, S., Just-Landi, S., Xerri, L., Chetaille, B., Olive, D., 2013. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *International Immunology* 25, 129–137.
- Thompson, E.D., Zahurak, M., Murphy, A., Cornish, T., Cuka, N., Abdelfatah, E., Yang, S., Duncan, M., Ahuja, N., Taube, J.M., Anders, R.A., Kelly, R.J., 2017. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut* 66, 794–801.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., Leming, P.D., Spigel, D.R., Antonia, S.J., Horn, L., Drake, C.G., Pardoll, D.M., Chen, L., Sharfman, W.H., Anders, R.A., Taube, J.M., McMiller, T.L., Xu, H., Korman, A.J., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, G.D., Gupta, A.,

- Wigginton, J.M., Sznol, M., 2012. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine* 366, 2443–2454.
- Wang, Q., Wu, X., 2017. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *International Immunopharmacology* 46, 210–219.
- \* Webb, E.S., Liu, P., Baleeiro, R., Lemoine, N.R., Yuan, M., Wang, Y., 2018. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy 10.
- Weber, J.S., D'Angelo, S.P., Minor, D., Hodi, F.S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N.I., Miller, W.H., Lao, C.D., Linette, G.P., Thomas, L., Lorigan, P., Grossmann, K.F., Hassel, J.C., Maio, M., Sznol, M., Ascierto, P.A., Mohr, P., Chmielowski, B., Bryce, A., Svane, I.M., Grob, J.-J., Krackhardt, A.M., Horak, C., Lambert, A., Yang, A.S., Larkin, J., 2015. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 16, 375–384.
- Wei, S.C., Duffy, C.R., Allison, J.P., 2018. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discovery* 8, 1069–1086.
- Weide, B., Martens, A., Hassel, J.C., Berking, C., Postow, M.A., Bisschop, K., Simeone, E., Mangana, J., Schilling, B., Di Giacomo, A.M., Brenner, N., Kähler, K., Heinzerling, L., Gutzmer, R., Bender, A., Gebhardt, C., Romano, E., Meier, F., Martus, P., Maio, M., Blank, C., Schadendorf, D., Dummer, R., Ascierto, P.A., Hossers, G., Garbe, C., Wolchok, J.D., 2016. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clinical Cancer Research* 22, 5487–5496.
- Wherry, E.J., Ha, S.-J., Kaech, S.M., Haining, W.N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J.N., Barber, D.L., Ahmed, R., 2007. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity* 27, 670–684.
- Wong, S.Q., Waldeck, K., Vergara, I.A., Schroder, J., Madore, J., Wilmott, J.S., Colebatch, A.J., De Paoli-Iseppi, R., Li, J., Lupat, R., Semple, T., Arnau, G.M., Fellowes, A., Leonard, J.H., Hraby, G., Mann, G.J., Thompson, J.F., Cullinane, C., Johnston, M., Shackleton, M., Sandhu, S., Bowtell, D.D.L., Johnstone, R.W., Fox, S.B., McArthur, G.A., Papenfuss, A.T., Scolyer, R.A., Gill, A.J., Hicks, R.J., Tothill, R.W., 2015. UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas. *Cancer Research* 75, 5228–5234.
- Yarchoan, M., Hopkins, A., Jaffee, E.M., 2017. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *New England Journal of Medicine* 377, 2500–2501.
- Zak, K.M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., Holak, T.A., 2015. Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure* 23, 2341–2348.
- Zaretsky, J.M., Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D.Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., Saco, J., Homet Moreno, B., Mezzadra, R., Chmielowski, B., Ruchalski, K., Shintaku, I.P., Sanchez, P.J., Puig-Saus, C., Cherry, G., Seja, E., Kong, X., Pang, J., Berent-Maoz, B., Comin-Anduix, B., Graeber, T.G., Tume, P.C., Schumacher, B.N., 2016. Molecular Correlates of Response to Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. *Cell* 164, 91–102.

T.N.M., Lo, R.S., Ribas, A., 2016. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 375, 819–829.