

Kamila Wojas-Krawczyk, Paweł Krawczyk

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kojarzenie leków z grupy immunoterapii — skutki biologiczne i potencjalne korzyści

Combining different immunotherapy' drugs — biological effects and potential benefits

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Kamila Wojas-Krawczyk
 Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii
 i Alergologii
 Uniwersytet Medyczny w Lublinie
 ul. Jaczewskiego 8, 20-0954 Lublin
 e-mail: kamilawojas@wp.pl

STRESZCZENIE

Ze względu na ograniczoną skuteczność immunoterapii stosowanej w leczeniu I linii u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca powstały koncepcje łączenia klasycznej immunoterapii przeciwciałami przeciwko immunologicznym punktom kontroli (ICIs) z innymi metodami leczenia (chemioterapia, chemioradioterapia, immunoterapia). Z uwagi na stosunkowo niską toksyczność i wysoką efektywność wyjątkowo obiecujące są metody leczenia, w których stosuje się skojarzenie dwóch różnych metod immunoterapii. Takie postępowanie opiera się m.in. na obserwacjach z badań klinicznych, w których stosowano łącznie nivolumab i ipilimumab w terapii zaawansowanego czerniaka i niedrobnokomórkowego raka płuca. Okazało się, że podwójna blokada immunologicznych punktów kontrolnych aktywuje limfocyty T na różnych etapach formowania się swoistej odpowiedzi immunologicznej, jednocześnie wpływając na obniżenie aktywności immunologicznych komórek supresyjnych (limfocyty T regulatorowe). Eksperymenty te nie tylko zaowocowały rejestracją terapii skojarzonej z użyciem nivolumabu i ipilimumabu, ale także zainicjowały badania kliniczne, w których stosuje się przeciwciała przeciwko innym immunologicznym punktom kontrolnym w skojarzeniu ze znanymi ICIs. Prowadzone są też badania, w których kojarzy się ICIs z cząsteczkami modyfikującymi mikrośrodowisko nowotworowe oraz stymulującymi nieswoiście układ immunologiczny. W artykule opisano mechanizm synergistycznego działania skojarzenia różnych metod immunoterapii u chorych na nowotwory oraz potencjalne korzyści wynikające ze stosowania terapii skojarzonej.

Słowa kluczowe: immunoterapia, immunologiczne punkty kontroli, mikrośrodowisko nowotworowe

ABSTRACT

Frequently, immunotherapy with antibodies against immune checkpoints (ICIs) used in the first-line in patients with non-small cell lung cancer has limited effectiveness. Therefore the concepts of combining ICIs with other treatment methods (chemotherapy, chemoradiotherapy, immunotherapy) have become very interesting. Due to the relatively low toxicity and high efficiency, treatment methods that use combination of two different immunotherapy are extremely attractive. Early clinical trials in which nivolumab and ipilimumab were used together in the treatment of advanced melanoma patients or non-small cell lung cancer patients had shown very promising results. The double blockade of immune checkpoints activates T lymphocytes at different stages of the specific immune response formation, while reducing the activity of immune suppressive cells (regulatory T lymphocytes). These trials not only resulted in the registration of combination therapy with nivolumab and ipilimumab, but also initiated clinical trials in which antibodies against other immune checkpoints are used in combination with known ICIs. There are also studies in which ICIs are combined with molecules modifying the tumor microenvironment and stimulating non-specific immune response. The article concerns the synergistic action' mechanism of different immunotherapy combinations in cancer patients and the potential benefits of these methods.

Key words: immunotherapy, immune checkpoints, tumor microenvironment

Wprowadzenie

Istnieje wiele metod immunoterapii chorób nowotworowych. Historycznie pierwszymi próbami immunoterapii były eksperymenty z czynnikami nieswoicie aktywującymi układ immunologiczny, takimi jak toksyny bakteryjne lub cytokiny. Następnie pojawiły się metody swoistej immunoterapii czynnej i adoptywnej, prowadzonej za pomocą stymulacji układu immunologicznego antygenami nowotworowymi lub komórkami prezentującymi antygen (APCs, *antigen presenting cells*) uczulonymi antygenami nowotworowymi [1]. Metody te stosowane w monoterapii charakteryzowały się zazwyczaj niską skutecznością. Immunoterapia przeżyła swój renesans w leczeniu chorób nowotworowych dzięki wprowadzeniu do terapii inhibitorów punktów kontroli (ICIs, *immune checkpoint inhibitors*) odpowiedzi immunologicznej. Immunologiczne punkty kontrolne występują na powierzchni limfocytów, APCs, komórek nowotworowych oraz na powierzchni prawie wszystkich prawidłowych komórek organizmu [1, 2]. W immunoterapii zastosowano przeciwciała monoklonalne anty-PD-1 (receptor programowanej śmierci komórki 1; *programmed death 1*), anty-PD-L1 (ligand receptora programowanej śmierci komórki 1; *programmed death ligand 1*) i anty-CTLA-4 (antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T, *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*). W leczeniu wielu chorób nowotworowych [czerniak, niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP), rak nerki, raki regionu głowy i szyi, raki urotelialne] przeciwciała te okazały się skuteczne w monoterapii lub w skojarzeniu z chemioterapią albo chemioradioterapią [2–4]. Do przeciwciał anty-PD-1, które uzyskały rejestrację do leczenia różnych chorób nowotworowych, należą niwolumab, pembrolizumab i cemiplimab. W praktyce klinicznej zostały wykorzystane także przeciwciała anty-PD-L1: atezolizumab, durwalumab i awelumab oraz przeciwciało anty-CTLA-4 — ipilimumab [2–4].

Nie wszyscy chorzy odnoszą jednak korzyść z takiego leczenia, co wynika z braku wiarygodnych czynników predykcyjnych, które pozwoliłyby precyzyjnie zakwalifikować chorych do immunoterapii [5, 6]. W tym celu powszechnie stosuje się badanie ekspresji PD-L1, lecz brakuje jednolitej procedury badania tego markera, a jego obecność nie zawsze jest związana z odpowiedzią na leczenie. Ekspresję PD-L1 bada się za pomocą różnych testów immunohistochemicznych (IHC, *immunohistochemistry*) z różnymi klonami przeciwciał. Wykorzystuje się również różne sposoby oceny ekspresji PD-L1: odsetek komórek nowotworowych z ekspresją PD-L1, pole powierzchni guza nacieczonego przez komórki immunologiczne z ekspresją PD-L1 lub połączenie tych dwóch metod oceny (CPS, *Combined Positive Score*) [5–7]. Poziom ekspresji PD-L1 kwalifikujący do leczenia także jest zróżnicowany: w niektórych nowotworach niezbędne jest stwierdzenie ponad 50% komórek nowotworowych z ekspresją tej molekuly, w innych wystarczy stwierdzić jakąkolwiek ekspresję

PD-L1 na różnych komórkach występujących w guzie. Badanie obciążenia guza mutacjami somatycznymi (TMB, *tumor mutation burden*) też okazało się niewystarczające dla prawidłowej kwalifikacji chorych do immunoterapii. Wprawdzie wysokie TMB wiąże się z powstaniem dużej liczby antygenów swoistych dla nowotworu, ale nie zawsze to zjawisko przekłada się na powstanie w guzie nacieków z limfocytów T cytotoksycznych CD8+ (CTLs, *cytotoxic T cells*). Wystąpienie niestabilności mikrosatelitarnej (MSI, *microsatellite instability*), mimo zwiększania liczby antygenów nowotworowych, także nie zawsze wiąże się ze zwiększoną immunogennością guza [5–7].

W związku z brakiem wiarygodnych czynników predykcyjnych i zawodnością immunoterapii stosowanej jako pojedyncza metoda leczenia lub w skojarzeniu z klasycznymi metodami terapii pojawiły się próby łączenia dwóch różnych metod immunoterapii [8–10]. Pomysł ten opiera się na idei pobudzania lub hamowania różnych komórek immunologicznych na różnych poziomach ich działalności (np. w węzle chłonnym i w guzie nowotworowym). Do badań klinicznych wróciły stare metody immunoterapii, takie jak stosowanie leków modyfikujących mikrośrodowisko guza nowotworowego (np. inhibitory dioksygenazy indoloaminy, adenozyiny lub deacetylazy histonów), cytokin nieswoicie stymulujących układ immunologiczny oraz antygenów nowotworowych i wirusów onkolitycznych. Rozpoczęto także próby kliniczne, w których łączono różne przeciwciała oddziałujące na immunologiczne punkty kontrolne. W tym celu najczęściej wykorzystuje się leczenie skojarzone z użyciem dwóch aktywatorów lub inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych, co skutkuje aktywacją CTLs i limfocytów T pomocniczych (Th, *T helper cells*) oraz supresją limfocytów T regulatorowych (Treg, *regulatory T cells*) bądź innych komórek immunosupresyjnych [1, 8–10].

Możliwości skojarzenia immunoterapii za pomocą różnych przeciwciał skierowanych przeciwko immunologicznym punktom kontrolnym

Najszerze zastosowanie w praktyce klinicznej znalazła terapia skojarzona z różnymi ICIs. Podwójną blokadę cząsteczek PD-1 i CTLA-4 za pomocą niwolumabu i ipilimumabu zastosowano w terapii czerniaka, raka nerki oraz NDRP [8, 11, 12].

U chorych na zaawansowanego NDRP z ekspresją PD-L1 na $\geq 1\%$ komórek nowotworowych zastosowanie znalazła terapia skojarzona I linii z użyciem niwolumabu i ipilimumabu. Ta terapia nie ma rejestracji Europejskiej Agencji Leków (EMA, *European Medicines Agency*) i jest wykorzystywana w Stanach Zjednoczonych, chociaż rekomenduje ją także Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej (ESMO, *European Society on Medical Oncology*). Amerykańska Agencja Żywności i Leków

(FDA, *Food and Drug Administration*) zarejestrowała też skojarzenie niwolumabu i ipilimumabu do leczenia chorych na NDRP bez ekspresji PD-L1, choć wyniki badania klinicznego w tej grupie chorych były kontrowersyjne [12–14]. W związku z nimi wycofano rejestrację niwolumabu i ipilimumabu do leczenia I linii u chorych na NDRP z wysokim TMB (> 10 mutacji na milion par zasad). Zarówno FDA, jak i EMA dopuściły do stosowania u chorych na zaawansowanego NDRP niezależnie od statusu PD-L1 terapię skojarzoną z użyciem niwolumabu, ipilimumabu i ograniczonej chemioterapii (2 cykle). Zastosowanie chemioterapii w tym wskazaniu miało doprowadzić do szybkiego opanowania choroby nowotworowej. Z kolei ograniczenie jej do 2 cykli spowodowało zmniejszenie toksyczności takiego leczenia [12–14]. Wymieniona terapia nie jest na razie (maj 2021) refundowana w Polsce.

Niwolumab w skojarzeniu z ipilimumabem znalazł zastosowanie w leczeniu nieresekcyjnego lub przerzutowego czerniaka, niezależnie od statusu genu *BRAF* i ekspresji PD-L1. W Polsce tego rodzaju terapia jest refundowana u chorych na zaawansowanego czerniaka skóry lub błon śluzowych w przypadku wystąpienia ekspresji PD-L1 na < 5% komórek nowotworowych. U chorych z ekspresją PD-L1 na ≥ 5% komórek nowotworowych stosuje się niwolumab lub pembrolizumab w monoterapii [15, 16].

Niwolumab w skojarzeniu z ipilimumabem został zarejestrowany przez EMA i FDA (brak polskiej refundacji) do stosowania u wcześniej nieleczonych chorych na zaawansowanego raka nerkowokomórkowego o pośrednim lub złym rokowaniu, niezależnie od ekspresji PD-L1. Ponadto FDA umożliwiła stosowanie tego skojarzenia także u chorych na nawrotowego lub przerzutowego raka nerki, którzy wcześniej otrzymali leczenie za pomocą inhibitorów wielokinazowych, leków antyangiogennych lub inhibitorów kinazy mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [15, 16].

W Stanach Zjednoczonych chorzy na przerzutowego raka jelita grubego z wysokim wskaźnikiem MSI lub z niezgodnością deficytu naprawczego (dMMR, *mismatch repair deficient*) mogą skorzystać z immunoterapii skojarzonej z użyciem niwolumabu i ipilimumabu w przypadku progresji po chemioterapii zawierającej fluoropirydynę, oksaliplatynę i irynotekan [15, 16].

Trwają badania kliniczne nad możliwością zastosowania u chorych na różne typy nowotworów skojarzenia durwalumabu i tremelimumabu (przeciwciała anty-CTLA-4) [17]. Ponadto w badaniu fazy I/II ocenie pod względem bezpieczeństwa i skuteczności poddawane jest nowe, humanizowane i wysoce selektywne przeciwciało anty-CTLA-4 — ONC-392, stosowane w skojarzeniu z pembrolizumabem u chorych na guzy lite. Siła wiązania ONC-392 do CTLA-4 jest zależna od pH środowiska reakcji. ONC-392 silniej wygasza aktywność limfocytów

Treg (CTLA-4-pozytywnych) w mikrośrodkowisku nowotworowym (kwaśnym), pozostawiając niezmienną aktywność limfocytów Treg na obwodzie. Taki sposób działania ma zminimalizować działania niepożądane terapii [18].

Skuteczność leczenia skojarzonego niwolumabem i ipilimumabem tłumaczy się faktem oddziaływania tych przeciwciał na różne immunologiczne punkty kontrolne [19–21]. Niwolumab, hamując receptor PD-1, powoduje aktywację limfocytów T w guzie nowotworowym, węzłach chłonnych oraz w tkankach obwodowych. Wynika to z faktu, że cząsteczka PD-L1, będąca naturalnym ligandem dla PD-1, występuje na komórkach nowotworowych (w guzie pierwotnym i przerzutach), na APCs naciekających guz i występujących w węzłach chłonnych (również prawidłowych, co ogranicza rozwój niekontrolowanej reakcji zapalnej) oraz na większości prawidłowych komórek zaangażowanych w rozwój odpowiedzi nieswoistej (ograniczenie reakcji autoagresji). W każdym z tych miejsc, w wyniku interakcji PD-L1 z PD-1, może dochodzić do wygaszenia aktywności limfocytów PD-1-pozytywnych. Funkcja cząsteczki CTLA-4, występującej na powierzchni limfocytów T, jest zupełnie inna. Jej stymulacja odgrywa istotną rolę podczas wzbudzenia reakcji immunologicznej na etapie prezentacji antygeny. CTLA-4 zamiast cząsteczki CD28 (główna cząsteczka kostymulująca) łączy się z cząsteczkami CD80 i CD86 na APCs, co powoduje zahamowanie proliferacji i aktywacji limfocytów Th i CTLs. Ponadto taka interakcja doprowadza do złuszczenia cząsteczek CD80 i CD86 z powierzchni APCs, powodując ich niefunkcjonalność. Wysoka ekspresja CTLA-4 na limfocytach T indukuje również wewnątrzkomórkowe białko FoxP3 (*forkhead box P3*), co prowadzi do przekształcania się tych komórek w limfocyty Treg. Do takich reakcji dochodzi w największym stopniu w węzłach chłonnych. Jak wynika z tych rozważań, synergistyczne działanie niwolumabu i ipilimumabu polega na wzmocnieniu aktywacji limfocytów Th i CTLs dzięki zablokowaniu jednego z najsilniejszych sygnałów hamujących te komórki (interakcja PD-1 i PD-L1) oraz przywróceniu najważniejszego, obok prezentacji antygeny, sygnału kostymulującego (połączenia CD28 z CD80 i CD86). Dodatkowo zastosowanie ipilimumabu zmniejsza immunosupresyjny wpływ innych komórek układu immunologicznego [19–21].

W badaniach laboratoryjnych stwierdza się silnie wyrażoną interakcję w działaniu dwóch opisanych powyżej przeciwciał. We krwi obwodowej chorych leczonych w sposób skojarzony, w porównaniu z monoterapią niwolumabem lub ipilimumabem, znacząco zwiększa się odsetek CTLs. W osoczu chorych otrzymujących immunoterapię skojarzoną obserwuje się wysokie stężenie cytokin prozapalnych — interleukin sIL-2R, IL-1 i chemokin (np. CXCL10), którego nie odnotowuje się w wyniku stosowania samego niwolumabu lub ipilimu-

mabu. U chorych wykazujących odpowiedź na terapię skojarzoną występuje zwiększenie, w stosunku do czasu sprzed terapii, odsetka limfocytów T pamięci o fenotypie Eomes+ (*eomesodermina*), CD69+, CD45RO+. Ponadto w grupie chorych odpowiadających na takie leczenie na powierzchni limfocytów obserwuje się niską ekspresję innych ujemnych punktów kontroli układu immunologicznego, w tym przede wszystkim TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) i LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*). Tego zjawiska nie odnotowuje się u chorych leczonych samym niwolumabem. Przeprowadzono także analizę ekspresji genów odpowiedzialnych za profil odpowiedzi immunologicznej w leukocytach krwi obwodowej. U chorych poddanych terapii skojarzonej dochodzi do ekspresji szerokiego panelu genów, w tym dla granzymów A/B, KLRF1 (*killer cell lectin like receptor F1*), FCRL3 (*Fc receptor like 3*), Ki-67, IL-8 i HLA-DR (*human leukocyte antigen — DR isotype*), co świadczy o aktywności cytotoxicznej i proliferacyjnej CTLs, a także o ich zdolności do infiltracji tkanki nowotworowej. Natomiast u chorych otrzymujących ipilimumab dochodzi do ekspresji genów związanych ze zdolnością limfocytów T do proliferacji i wytwarzania swoistych cytokin [m.in. geny dla Ki-67 i ICOS (*inducible T cell co-stimulator*)] [8, 20, 21]. Podsumowując, można sądzić, że zastosowaniu po terapii skojarzonej w porównaniu z monoterapią profil genów aktywowanych jest bardziej kompleksowy [19–21].

Oczywiście immunoterapia skojarzona z użyciem dwóch ICIs wiąże się z częstszymi i bardziej poważnymi działaniami niepożądanymi niż monoterapia ICIs. Wynika to z silniejszego oddziaływania na układ immunologiczny, większej jego aktywacji i wystąpienia różnych zjawisk autoimmunologicznych. Park i wsp. wykazali w swojej metaanalizie, że ryzyko wystąpienia działań niepożądanych wszystkich stopni było tylko nieco wyższe u chorych otrzymujących immunoterapię skojarzoną w porównaniu z monoterapią [ryzyko względne (RR, *relative risk*) = 1,07] [22]. Jednak ryzyko wystąpienia działań niepożądanych w stopniu 3. lub wyższym było już znacznie wyższe (RR = 2,21) u osób leczonych w sposób skojarzony. Do najczęstszych poważnych działań niepożądanych należą: zapalenie jelit i żołądka, śródmiaższowe zapalenie płuc, immunologiczne uszkodzenie wątroby, zmiany skórne pod postacią wysypki i świądu, endokrynopatie (np. zapalenie przysadki mózgowej lub zapalenie tarczycy) oraz neuropatie ruchowe lub czuciowe. Te działania niepożądane muszą być odpowiednio kontrolowane za pomocą hormonalnego leczenia zastępczego oraz leczenia immunosupresyjnego, często w wysokich dawkach, ale niestety mogą doprowadzić do konieczności przerwania terapii, a nawet do zgonu chorych [22].

Na podstawie tych rozważań i wyników badań klinicznych pojawiły się inne koncepcje łączenia przeciwciał oddziałujących na różne immunologiczne

punkty kontroli. Trwają badania kliniczne u chorych na zaawansowane nowotwory, w których klasyczne przeciwciała anty-PD-1 lub anty-PD-L1 próbuje się łączyć z przeciwciałami przeciwko cząsteczkom ICOS, LAG-3, TIM-3 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3*) lub TIGIT [23–25]. Szczególnego znaczenia nabierają badania nad nowymi przeciwciałami anty-LAG-3 i anty-TIGIT. Jak powiedziano wcześniej, u chorych niewykazujących odpowiedzi na terapię skojarzoną z użyciem niwolumabu i ipilimumabu występował istotnie wyższy odsetek limfocytów T z ekspresją cząsteczek TIGIT czy LAG-3. Wskazuje to na fakt, że ich obecność może odgrywać wiodącą rolę w hamowaniu aktywacji limfocytów T oraz w indukowaniu oporności na istniejące metody immunoterapii [23–25]. Wynikają stąd przesłanki do zastępowania terapii anty-CTLA-4 w terapii skojarzonej z użyciem przeciwciał anty-PD-1 lub anty-PD-L1 przeciwciałami anty-LAG-3 lub anty-TIGIT. Szczególnie interesujących wyników dostarczyło badanie I fazy, w którym tiragolumab (przeciwciało anty-TIGIT) stosowano łącznie z atezolizumabem u chorych na zaawansowanego NDRP. Odpowiedź na tego typu terapię uzyskano u 46% chorych, a stabilizacja choroby wystąpiła u 85% pacjentów. Te zachęcające wyniki przyczyniły się do rozpoczęcia badań II fazy (CITYSCAPE) i III fazy (SKYSCRAPER-01), w których stosuje się terapię skojarzoną z atezolizumabem i tiragolumabem. Jej skuteczność i bezpieczeństwo są porównywane do działania samego atezolizumabu u chorych na zaawansowanego NDRP z ekspresją PD-L1 na komórkach nowotworowych. W badaniu CITYSCAPE wykazano odpowiedź na leczenie u 31,3% chorych leczonych w sposób skojarzony i u 16,2% chorych otrzymujących sam atezolizumab. Mediana czasu wolnego od progresji wynosiła w tych dwóch grupach chorych — odpowiednio — 5,4 miesiąca oraz 3,6 miesiąca [26, 27]. Cząsteczka LAG-3 to kolejny punkt uchwytu dla immunoterapii skojarzonej. Nadekspresję LAG-3 obserwowano na powierzchni „wyczerpanych” limfocytów T naciekających guz w wielu typach nowotworów i jest to uznawane za zły czynnik prognostyczny. Stymulacja cząsteczki LAG-3 wyhamowuje aktywność limfocytów T w guzie, dlatego podwójna blokada przeciwciałami anty-LAG-3 i anty-PD-1 przywraca funkcje cytotoxiczne limfocytów T CD-8-pozytywnych. Obecnie trwają badania I i II fazy nad skojarzeniem przeciwciał anty-LAG-3 i anty-PD-1. Pierwsze wyniki oceniające skuteczność i bezpieczeństwo takiego połączenia raportowano u chorych na zaawansowanego czerniaka, u których wystąpiła progresja choroby po wcześniejszym leczeniu anty-PD-1 lub anty-PD-L1. Odsetek obiektywnych odpowiedzi wyniósł 11,5% (61 chorych) i był co najmniej 3,5-krotnie wyższy u chorych z ekspresją LAG-3 na $\geq 1\%$ komórek immunologicznych naciekających zmianę nowotworową. Skuteczność takiego skojarzonego leczenia jest badana

m.in. u chorych na międzybłoniaka opłucnej czy potrójnie ujemnego raka piersi [28, 29].

Z drugiej strony trwają wczesne badania kliniczne, w których kojarzy się przeciwciała agonistyczne łączące się z cząsteczkami kostymulującymi (np. CD28, CD27) na limfocytach z przeciwciałami antagonistycznymi skierowanymi przeciwko ujemnym punktom kontroli (najczęściej anty-PD-1, anty-PD-L1 lub anty-CTLA-4). Aktywacja cząsteczek CD28, CD27, OX40, CD137 (4-1BB) lub GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related*) zwiększa proliferację limfocytów oraz pozytywnie stymuluje rozwój odpowiedzi immunologicznej. Jednak zastosowanie przeciwciał agonistycznych łączących się z tymi cząsteczkami często wywołuje poważne działania niepożądane. Mimo to obiecujące wyniki badań uzyskano u chorych na nowotwory leczonych za pomocą skojarzenia klasycznych ICIs z przeciwciałami stymulującymi aktywność CD27 i CD137 [30–33].

Aktywacja CD27 jest silnym czynnikiem kostymulującym w pierwszych etapach odpowiedzi immunologicznej, kiedy to promuje przeżycie limfocytów T i powstawanie limfocytów T pamięci. Jedynym ligandem dla CD27 jest cząsteczka CD70 występująca na APCs oraz na aktywowanych limfocytach T. Jednak interakcja pomiędzy CD27 i CD70 zmienia się w czasie trwania odpowiedzi immunologicznej. Przewlekła stymulacja CD27 przez CD70 (m.in. w przewlekłych stanach zapalnych) wygasza odpowiedź immunologiczną, a w przypadku komórek nowotworowych wykazujących ekspresję CD70 doprowadza do różnicowania limfocytów T w limfocyty Treg [34, 35]. W badaniu klinicznym fazy I/II u chorych na guzy łite stosowano warlilumab — agonistyczne przeciwciała łączące się z cząsteczką CD27 — w połączeniu z niwolumabem. Odpowiedź na leczenie uzyskano u 49% chorych, mimo że u większości z nich nie występowała ekspresja PD-L1 na komórkach nowotworowych. Okazało się, że po 4–6 tygodniach terapii 76% chorych nabyło ekspresję PD-L1 na APCs. Z jednej strony doszło do pobudzenia limfocytów T poprzez aktywację cząsteczki CD27, z drugiej zaś stworzył się cel dla terapii niwolumabem (poprzez nabytą ekspresję PD-L1 dochodziło do wyhamowywania limfocytów PD-1-pozytywnych) [34–36].

Wykorzystanie nieswoistej stymulacji układu immunologicznego i modyfikacji mikrośrodowiska guza w immunologicznych terapiach skojarzonych

Immunoterapia z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko immunologicznym punktom kontroli może być również kojarzona z immunoterapią nieswoistą. Nieswoiste pobudzenie odpowiedzi cytotoksycznej przeciwko komórkom nowotworowym można uzyskać poprzez

podanie cytokin prozapalnych lub poprzez zahamowanie funkcji cytokin o działaniu immunosupresyjnym. W pierwszym przypadku podjęto próby kliniczne leczenia skojarzonego chorych na nowotwory za pomocą przeciwciał anty-PD-1 lub anty-PD-L1 w połączeniu ze zmodyfikowanymi cytokinami IL-2 i IL-15 [37]. Pegylowana IL-2 z przyłączonymi łańcuchami glikolu polietylenowego (bempegaldesleukina) charakteryzuje się dłuższym okresem półtrwania w organizmie niż rekombinowana IL-2 (aldesleukina). Bempegaldesleukina przyłącza się do heterodimerskiego receptora IL-2R $\beta\gamma$ (CD122), co preferencyjnie aktywuje efektorowe CTLs i komórki NK (*natural killers*) we krwi obwodowej i w mikrośrodowisku guza. Pegylowana IL-2 wykazuje natomiast niskie powinowactwo do receptora dla IL-2 zbudowanego z podjednostek alfa, beta i gamma (IL-2R $\alpha\beta\gamma$, CD25), który występuje głównie na limfocytach Treg. Dzięki tym właściwościom bempegaldesleukina nie aktywuje tych komórek, co przekłada się na wyższy profil bezpieczeństwa w porównaniu z aldesleukiną. Zastosowanie bempegaldesleukiny w połączeniu z niwolumabem u chorych na zaawansowanego czerniaka wywołało odpowiedź na leczenie u 53% chorych, przy czym u 35% była to całkowita remisja. Odpowiedź na leczenie wystąpiła zarówno u chorych z jakąkolwiek ekspresją PD-L1, jak i u chorych bez tej ekspresji. Dwuletnie przeżycie odnotowano u 77% chorych [38, 39].

Podjęto także badania kliniczne nad stosowaniem rekombinowanej IL-15. Szybko jednak zastąpiono tę cząsteczkę superagonistą IL-15 (ALT-803), który składa się ze zmodyfikowanej cząsteczki IL-15 z wprowadzoną mutacją N72D, zmodyfikowanym receptorem dla IL-15 (IL-15R) oraz łączącym wszystko fragmentem Fc przeciwciała klasy IgG1 [40, 41]. Cząsteczka IL-15 ma za zadanie przyłączyć się do IL-2R $\beta\gamma$ w celu stymulacji CTLs i komórek NK, zmodyfikowany IL-15R zapewnia swoiste łączenie się ALT-803 z IL-2R $\beta\gamma$, a nie z IL-2R $\alpha\beta\gamma$, który znajduje się na limfocytach Treg, natomiast fragment Fc przeciwciała przedłuża okres półtrwania kompleksu i przyciąga komórki NK. W badaniu klinicznym fazy Ib przeprowadzonym u chorych na NDRP zastosowano ALT-803 w skojarzeniu z niwolumabem, uzyskując odpowiedź na leczenie u 29% chorych. Odpowiedź wystąpiła także u 27% chorych z pierwotną lub wtórną opornością na leczenie anty-PD-1. Odpowiedź obserwowano częściej u chorych z ekspresją PD-L1 na $\geq 50\%$ komórek nowotworowych (75% chorych z odpowiedzią na terapię) [42].

Bempegaldesleukinę i ALT-803 zastosowano w połączeniu z niwolumabem i atezolizumabem u chorych na różne typy nowotworów (w tym hematologiczne) w badaniach klinicznych I fazy, uzyskując obiecujące efekty i zadowalający poziom bezpieczeństwa [43]. Mniej skuteczne wydają się natomiast terapie, w których połączono przeciwciała anty-PD-1, anty-PD-L1 lub anty-CTLA-4 z leczeniem mającym na celu obniżenie

aktywności cytokin immunosupresyjnych, takich jak transformujący czynnik wzrostu nowotworów β (TGF- β , *transforming growth factor beta*), czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów (M-CSF, *macrophage-colony stimulating factor*) i IL-10. Dodanie leków blokujących funkcję IL-10 lub TGF- β do klasycznej immunoterapii zwiększało ryzyko wystąpienia działań niepożądanych pod postacią silnych reakcji autoagresji. Mimo to trwają badania kliniczne nad skutecznością M7824 — białka fuzyjnego składającego się z ludzkiego przeciwciała monoklonalnego IgG1 przeciwko PD-L1 połączonego z zewnątrzkomórkową domeną receptora dla TGF- β , który wychwytuje TGF- β w środowisku guza. Lek ten może mieć duży potencjał w leczeniu chorych na nowotwory zarówno w skojarzeniu z innymi metodami immunoterapii (np. anty-CTLA-4), jak i w monoterapii I linii oraz w połączeniu z chemioterapią. Działa wybiórczo w obrębie guzów PD-L1-pozytywnych i wywołuje mniej działań niepożądanych w porównaniu z innymi preparatami anty-TGF- β [43–45].

Mikrośrodowisko guza wywiera bardzo niekorzystny wpływ na funkcjonowanie w nim układu immunologicznego. Silne immunosupresyjne właściwości mikrośrodowiska nowotworowego powodują wykluczenie reakcji immunologicznej poza jego obszar. Szczególną rolę odgrywają w tym wypadku dwie substancje. Jedną z nich jest adenozyzna [46, 47]. Adenozyzna i adenozyntrifosforan (ATP) są obecne w bardzo niskich stężeniach w płynach zewnątrzkomórkowych. Stan zapalny, niedokrwienie lub proces nowotworowy mogą prowadzić do uwolnienia ATP z komórek poprzez kanały transportowe w błonach komórkowych, aktywną egzocytozę lub bezpośrednio w wyniku zniszczenia komórek. Zewnątrzkomórkowy ATP działa jako wzorzec molekularny związany z patogenami (DAMP, *danger-associated molecular pattern*), promując odpowiedź immunologiczną. Jednak podczas stanu zapalnego zewnątrzkomórkowy ATP jest stopniowo defosforylowany przez ektonukleotydyazy (głównie CD39 i CD73), czego konsekwencją jest tworzenie adenozyzny. Adenozyzna łączy się z swoimi receptorami A1, A2a, A2b i A3. Pobudzenie receptora A2a hamuje aktywność CTLs i promuje aktywność limfocytów Treg poprzez zwiększenie ekspresji białka FoxP3. Pod wpływem tej stymulacji na limfocytach efektorowych wzrasta ekspresja immunologicznych punktów kontrolnych, w tym PD-1, CTLA-4 i LAG-3. W badaniach klinicznych wczesnych faz pozostają cząsteczki blokujące łączenie adenozyzny z receptorem A2a oraz cząsteczki hamujące aktywność enzymów CD39 i CD73. Te nowe leki są stosowane w połączeniu z przeciwciałami anty-PD-1 lub anty-CTLA-4 u chorych na różne nowotwory [46–49].

Inną substancją powodującą eliminację komórek nowotworowych z obszaru guza jest 2,3-dioxygenaza indoloaminy (IDO, *indoleamine-2,3-dioxygenase*) [50]. IDO jest enzymem metabolizującym tryptofan do kinureniny.

Wytwarzanie IDO przez komórki nowotworowe obniża stężenie tryptofanu w guzie nowotworowym. Tryptofan to egzogeny aminokwas niezbędny do prawidłowego funkcjonowania limfocytów T. Brak tego aminokwasu w środowisku nowotworowym uniemożliwia limfocytom T wnikanie do wnętrza guza. Powoduje to powstanie guzów „zimnych”, nieimmunogennych. Badania nad możliwością połączenia inhibitorów IDO (np. epakadostatu) z klasycznymi ICIs u chorych na NDRP i czerniaka trwają od kilku lat. W badaniach klinicznych wczesnych faz obserwowano skuteczność takiego leczenia u chorych na czerniaka (40% chorych z całkowitą remisją), NDRP, raka nerkowokomórkowego, urogenitalnego oraz raka regionu głowy i szyi. Jednak w badaniach III fazy nie wykazano skuteczności takiej terapii, czego konsekwencją stanowi brak rejestracji epakadostatu w połączeniu z pembrolizumabem do leczenia chorych na czerniaka i NDRP [50, 51].

Istnieją również leki ukierunkowane molekularnie, które nie tylko powodują apoptozę komórek nowotworowych, ale także zmieniają aktywność układu immunologicznego i zwiększają zdolność limfocytów T do eliminacji komórek nowotworowych. Jednym z takich leków może się okazać entinostat — inhibitor deacetylazy histonów. Nadmierna deacetylacja histonów doprowadza do nieprawidłowego upakowania chromatyny w komórkach i zaburzenia ekspresji wielu genów, w tym kodujących czynniki immunostymulujące. W jednej z podgrup badania ENCORE-601 stosowano entinostat w połączeniu z pembrolizumabem u chorych na zaawansowanego NDRP po progresji po leczeniu przeciwciałami anty-PD-1. Odsetek odpowiedzi na tego rodzaju leczenie oraz mediana czasu wolnego od progresji choroby nie były imponujące i wynosiły — odpowiednio — 9,2% i 2,8 miesiąca. Jeśli jednak odpowiedź na leczenie wystąpiła, to trwała ona długo (mediana czasu trwania odpowiedzi — 10,1 miesiąca). Korzyść kliniczną z terapii skojarzonej obserwowano przede wszystkim u chorych z wysokim stężeniem krążących klasycznych monocytów we krwi obwodowej [52].

Sytuację sprzyjającą do stosowania immunoterapii stanowią obecność w komórkach nowotworowych wysokiego wskaźnika TMB oraz duża liczba antygenów nowotworowych. U chorych z tymi nieprawidłowościami, zwłaszcza u chorych na raka jelita grubego i odbyticy oraz u chorych na NDRP, często obserwuje się obecność mutacji w genie *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog*), która występuje u osób intensywnie palących papierosy. Immunoterapia wydaje się dobrą opcją terapeutyczną u tych chorych. Okazało się jednak, że u chorych ze współistnieniem mutacji w genie *KRAS* i mutacji w genie *STK11/LKB1* immunoterapia jest mniej skuteczna niż u chorych z samą mutacją w genie *KRAS*. Opracowano pierwsze inhibitory *KRAS* skuteczne u chorych z mutacją G12C tego genu — sotorasib i ada-

grasib, których efektywność była oceniana w badaniach klinicznych u chorych na NDRP po niepowodzeniu chemioterapii i immunoterapii (mutacja G12C występująca u 12% chorych na NDRP, głównie o typie gruczolowym). W badaniu KRYSTAL-1 udowodniono, że zastosowanie już 1 cyklu leczenia adagrasibem u chorych na NDRP z mutacją G12C w genie *KRAS* i mutacją w genie *STK11/LKB1* powoduje silny wzrost ekspresji genów kodujących czynniki immunostymulujące, w tym zwłaszcza genów zaangażowanych w produkcję białek ze szlaku interferonu, innych cytokin prozapalnych, czynników chemotaktycznych (CXCL12, CXCL14, CCL2, CXCL2) oraz cząsteczek kostymulujących (CD86, CD28, CD80), ale też ujemnych punktów kontrolnych (PD-L1, CD276). Obserwacje te dają przesłanki do rozpoczęcia badań klinicznych, w których nowe inhibitory *KRAS* zostaną skojarzone z immunoterapią za pomocą przeciwciał anty-PD-1 lub anty-PD-L1 u chorych na nowotwory z mutacjami w genach *KRAS* i *STK11/LKB1* [53].

Podsumowanie

Skojarzenie dwóch metod immunoterapii opiera się na idei pobudzania lub hamowania różnych komórek immunologicznych na różnych poziomach ich działalności za pomocą dwóch różnych aktywatorów bądź inhibitorów immunologicznych punktów kontroli lub zastosowaniu konwencjonalnych ICIs w połączeniu z czynnikami immunostymulującymi albo modyfikującymi mikrośrodowisko guza. Skuteczność skojarzonego leczenia przeciwciałami anty-PD-1 i anty-CTLA-4 tłumaczy się faktem oddziaływania tych przeciwciał na odmienne kluczowe punkty tworzenia się swoistej odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała anty-PD-1 powodują aktywację limfocytów T w guzie nowotworowym, węzłach chłonnych oraz w tkankach obwodowych w fazie wykonawczej odpowiedzi immunologicznej. Natomiast zablokowanie cząsteczki CTLA-4 pobudza reakcję immunologiczną na etapie prezentacji antygeny i hamuje funkcję komórek immunosupresyjnych, w tym przede wszystkim limfocytów Treg. Zastosowane cytokiny, chemokiny i innych substancji stymulujących aktywność komórek immunologicznych ma na celu przekształcenie guzów o niskiej immunogenności („zimnych”) w guzy o wysokiej immunogenności („gorących”, „zapalnych”), obfitujące w nacieki z aktywowanych i swoistych limfocytów T. Dzięki temu przełamany zostaje mechanizm ucieczki komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego.

Konflikt interesów

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, et al. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*. 2020; 27(Suppl 2): S87–S97, doi: [10.3747/co.27.5223](https://doi.org/10.3747/co.27.5223), indexed in Pubmed: [32368178](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32368178/).
2. Korman AJ, Peggs KS, Allison JP. Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Adv Immunol*. 2006; 90: 297–339, doi: [10.1016/S0065-2776\(06\)90008-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90008-X), indexed in Pubmed: [16730267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16730267/).
3. Valecha GK, Vennepureddy A, Ibrahim U, et al. Anti-PD-1/PD-L1 antibodies in non-small cell lung cancer: the era of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017; 17(1): 47–59, doi: [10.1080/14737140.2017.1259574](https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1259574), indexed in Pubmed: [27841044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27841044/).
4. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*. 2018; 62: 29–39, doi: [10.1016/j.intimp.2018.06.001](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.001), indexed in Pubmed: [29990692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29990692/).
5. Spencer KR, Wang J, Silk AW, et al. Biomarkers for Immunotherapy: Current Developments and Challenges. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2016; 35: e493–e503, doi: [10.1200/EDBK_160766](https://doi.org/10.1200/EDBK_160766), indexed in Pubmed: [27249758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27249758/).
6. Weber JS. Biomarkers for Checkpoint Inhibition. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2017; 37: 205–209, doi: [10.1200/EDBK_175463](https://doi.org/10.1200/EDBK_175463), indexed in Pubmed: [28561695](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28561695/).
7. Zappasodi R, Merghoub T, Wolchok JD, et al. Emerging Concepts for Immune Checkpoint Blockade-Based Combination Therapies. *Cancer Cell*. 2018; 33(4): 581–598, doi: [10.1016/j.ccell.2018.03.005](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.005), indexed in Pubmed: [29634946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29634946/).
8. Das R, Verma R, Sznoł M, et al. Combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 leads to distinct immunologic changes in vivo. *J Immunol*. 2015; 194(3): 950–959, doi: [10.4049/jimmunol.1401686](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401686), indexed in Pubmed: [25539810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25539810/).
9. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018; 8(9): 1069–1086, doi: [10.1158/2159-8290.CD-18-0367](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367), indexed in Pubmed: [30115704](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30115704/).
10. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell*. 2017; 170(6): 1120–1133.e17, doi: [10.1016/j.cell.2017.07.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.024), indexed in Pubmed: [28803728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28803728/).
11. Hellmann M, Paz-Ares L, Caro RB, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2019; 381(21): 2020–2031, doi: [10.1056/nejmoa1910231](https://doi.org/10.1056/nejmoa1910231).
12. Reck M, Ciuleanu TE, Dols M, et al. Nivolumab (NIVO) + ipilimumab (IPI) + 2 cycles of platinum-doublet chemotherapy (chemo) vs 4 cycles chemo as first-line (1L) treatment (tx) for stage IV/recurrent non-small cell lung cancer (NSCLC): CheckMate 9LA. *J Clin Oncol*. 2020; 38(15_suppl): 9501–9501, doi: [10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9501](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9501).
13. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22(2): 198–211, doi: [10.1016/S1470-2045\(20\)30641-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30641-0), indexed in Pubmed: [33476593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33476593/).
14. Ramalingam S, Ciuleanu T, Pluzanski A, et al. Nivolumab + ipilimumab versus platinum-doublet chemotherapy as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer: Three-year update from CheckMate 227 Part 1. *J Clin Oncol*. 2020; 38(15_suppl): 9500–9500, doi: [10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9500](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9500).
15. Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS J*. 2021; 23(2): 39, doi: [10.1208/s12248-021-00574-0](https://doi.org/10.1208/s12248-021-00574-0), indexed in Pubmed: [33677681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33677681/).
16. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, et al. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(3), doi: [10.3390/cancers12030738](https://doi.org/10.3390/cancers12030738), indexed in Pubmed: [32245016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32245016/).
17. Rizvi NA, Cho BC, Reinmuth N, et al. MYSTIC Investigators. Durvalumab With or Without Tremelimumab vs Standard Chemotherapy in First-line Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: The MYSTIC Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020; 6(5): 661–674, doi: [10.1001/jamaoncol.2020.0237](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.0237), indexed in Pubmed: [32271377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32271377/).
18. Rolfo C, Bentzen S, Devenport M, et al. First-in-human phase I/II clinical trial of ONC-392: Preserving CTLA-4 immune tolerance checkpoint for safer and more effective cancer immunotherapy. *J Clin Oncol*. 2020; 38(15_suppl): TPS3159–TPS3159, doi: [10.1200/jco.2020.38.15_suppl.tps3159](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.tps3159).
19. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations.

- Front Oncol. 2018; 8: 86, doi: [10.3389/fonc.2018.00086](https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086), indexed in Pubmed: [29644214](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29644214/).
20. Wei SC, Anang NAAS, Sharma R, et al. Combination anti-CTLA-4 plus anti-PD-1 checkpoint blockade utilizes cellular mechanisms partially distinct from monotherapies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116(45): 22699–22709, doi: [10.1073/pnas.1821218116](https://doi.org/10.1073/pnas.1821218116), indexed in Pubmed: [31636208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31636208/).
 21. Gide TN, Quek C, Menzies AM, et al. Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. *Cancer Cell*. 2019; 35(2): 238–255. e6, doi: [10.1016/j.ccell.2019.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.003), indexed in Pubmed: [30753825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30753825/).
 22. Park R, Lopes L, Cristancho CR, et al. Treatment-Related Adverse Events of Combination Immune Checkpoint Inhibitors: Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2020; 10: 258, doi: [10.3389/fonc.2020.00258](https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00258), indexed in Pubmed: [32257944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32257944/).
 23. Pesce S, Trabaneli S, Di Vito C, et al. Cancer Immunotherapy by Blocking Immune Checkpoints on Innate Lymphocytes. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(12), doi: [10.3390/cancers12123504](https://doi.org/10.3390/cancers12123504), indexed in Pubmed: [33255582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33255582/).
 24. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016; 44(5): 989–1004, doi: [10.1016/j.immuni.2016.05.001](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001), indexed in Pubmed: [27192565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27192565/).
 25. Solomon BL, Garrido-Laguna I. TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunol Immunother*. 2018; 67(11): 1659–1667, doi: [10.1007/s00262-018-2246-5](https://doi.org/10.1007/s00262-018-2246-5), indexed in Pubmed: [30232519](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30232519/).
 26. Bendell J, Bedard P, Bang YJ, et al. Abstract CT302: Phase Ia/Ib dose-escalation study of the anti-TIGIT antibody tiragolumab as a single agent and in combination with atezolizumab in patients with advanced solid tumors. *Bioinformatics, Convergence Science, and Systems Biology*. 2020, doi: [10.1158/1538-7445.am2020-ct302](https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2020-ct302).
 27. Rodriguez-Abreu D, Johnson M, Hussein M, et al. Primary analysis of a randomized, double-blind, phase II study of the anti-TIGIT antibody tiragolumab (tira) plus atezolizumab (atezo) versus placebo plus atezo as first-line (1L) treatment in patients with PD-L1-selected NSCLC (CITYSCAPE). *J Clin Oncol*. 2020; 38(15_suppl): 9503–9503, doi: [10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9503](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.9503).
 28. Shan C, Li X, Zhang J. Progress of immune checkpoint LAG-3 in immunotherapy. *Oncol Lett*. 2020; 20(5): 207, doi: [10.3892/ol.2020.12070](https://doi.org/10.3892/ol.2020.12070), indexed in Pubmed: [32963613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32963613/).
 29. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, et al. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer*. 2020; 8(2), doi: [10.1136/jitc-2020-001014](https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001014), indexed in Pubmed: [32929051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32929051/).
 30. Sanmamed MF, Pastor F, Rodriguez A, et al. Agonists of Co-stimulation in Cancer Immunotherapy Directed Against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin Oncol*. 2015; 42(4): 640–655, doi: [10.1053/j.seminoncol.2015.05.014](https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.014), indexed in Pubmed: [26320067](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320067/).
 31. Starzer AM, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open*. 2020; 4(Suppl 3): e000629, doi: [10.1136/esmoopen-2019-000629](https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000629), indexed in Pubmed: [32152062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32152062/).
 32. van de Ven K, Borst J. Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy*. 2015; 7(6): 655–667, doi: [10.2217/imt.15.32](https://doi.org/10.2217/imt.15.32), indexed in Pubmed: [26098609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26098609/).
 33. Wong HYi, Schwarz H. CD137 / CD137 ligand signalling regulates the immune balance: A potential target for novel immunotherapy of autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2020; 112: 102499, doi: [10.1016/j.jaut.2020.102499](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102499), indexed in Pubmed: [32505443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32505443/).
 34. Buchan S, Manzo T, Flutter B, et al. OX40- and CD27-mediated costimulation synergizes with anti-PD-L1 blockade by forcing exhausted CD8+ T cells to exit quiescence. *J Immunol*. 2015; 194(1): 125–133, doi: [10.4049/jimmunol.1401644](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401644), indexed in Pubmed: [25404365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25404365/).
 35. Buchan SL, Fallatah M, Thirdborough SM, et al. PD-1 Blockade and CD27 Stimulation Activate Distinct Transcriptional Programs That Synergize for CD8 T-Cell-Driven Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res*. 2018; 24(10): 2383–2394, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-17-3057](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3057), indexed in Pubmed: [29514845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29514845/).
 36. Sanborn R, Pishvaian M, Callahan M, et al. Anti-CD27 agonist antibody varilumab (vari) with nivolumab (nivo) for colorectal (CRC) and ovarian (OVA) cancer: Phase (Ph) 1/2 clinical trial results. *J Clin Oncol*. 2018; 36(15_suppl): 3001–3001, doi: [10.1200/jco.2018.36.15_suppl.3001](https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.15_suppl.3001).
 37. Barroso-Sousa R, Ott PA. Transformation of Old Concepts for a New Era of Cancer Immunotherapy: Cytokine Therapy and Cancer Vaccines as Combination Partners of PD1/PD-L1 Inhibitors. *Curr Oncol Rep*. 2018; 21(1): 1, doi: [10.1007/s11912-018-0738-2](https://doi.org/10.1007/s11912-018-0738-2), indexed in Pubmed: [30498900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30498900/).
 38. Doberstein SK. Bempregaldesleukin (NKTR-214): a CD-122-biased IL-2 receptor agonist for cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2019; 19(12): 1223–1228, doi: [10.1080/14712598.2019.1685489](https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1685489), indexed in Pubmed: [31652082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31652082/).
 39. Khushalani NI, Diab A, Ascierto PA, et al. Bempregaldesleukin plus nivolumab in untreated, unresectable or metastatic melanoma: Phase III PIVOT IO 001 study design. *Future Oncol*. 2020; 16(28): 2165–2175, doi: [10.2217/fo-2020-0351](https://doi.org/10.2217/fo-2020-0351), indexed in Pubmed: [32723187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32723187/).
 40. Knudson KM, Hodge JW, Schlom J, et al. Rationale for IL-15 superagonists in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2020; 20(7): 705–709, doi: [10.1080/14712598.2020.1738379](https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1738379), indexed in Pubmed: [32159390](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32159390/).
 41. Knudson KM, Hicks KC, Alter S, et al. Mechanisms involved in IL-15 superagonist enhancement of anti-PD-L1 therapy. *J Immunother Cancer*. 2019; 7(1): 82, doi: [10.1186/s40425-019-0551-y](https://doi.org/10.1186/s40425-019-0551-y), indexed in Pubmed: [30898149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30898149/).
 42. Wrangle JM, Velcheti V, Patel MR, et al. ALT-803, an IL-15 superagonist, in combination with nivolumab in patients with metastatic non-small cell lung cancer: a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol*. 2018; 19(5): 694–704, doi: [10.1016/S1470-2045\(18\)30148-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30148-7), indexed in Pubmed: [29628312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29628312/).
 43. Strauss J, Heery CR, Schlom J, et al. Phase I Trial of M7824 (MSB0011359C), a Bifunctional Fusion Protein Targeting PD-L1 and TGFβ, in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2018; 24(6): 1287–1295, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-17-2653](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2653), indexed in Pubmed: [29298798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29298798/).
 44. Lee HJ. Recent Advances in the Development of TGF-β Signaling Inhibitors for Anticancer Therapy. *J Cancer Prev*. 2020; 25(4): 213–222, doi: [10.15430/JCP.2020.25.4.213](https://doi.org/10.15430/JCP.2020.25.4.213), indexed in Pubmed: [33409254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33409254/).
 45. Ni G, Zhang Lu, Yang X, et al. Targeting interleukin-10 signaling for cancer immunotherapy, a promising and complicated task. *Hum Vaccin Immunother*. 2020; 16(10): 2328–2332, doi: [10.1080/21645515.2020.1717185](https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1717185), indexed in Pubmed: [32159421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32159421/).
 46. Leone RD, Emens LA. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2018; 6(1): 57, doi: [10.1186/s40425-018-0360-8](https://doi.org/10.1186/s40425-018-0360-8), indexed in Pubmed: [29914571](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29914571/).
 47. Helms RS, Powell JD. Rethinking the adenosine-AR checkpoint: implications for enhancing anti-tumor immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2020; 53: 77–83, doi: [10.1016/j.coph.2020.07.003](https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.07.003), indexed in Pubmed: [32781414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32781414/).
 48. Viganò S, Alatzoglou D, Irving M, et al. Targeting Adenosine in Cancer Immunotherapy to Enhance T-Cell Function. *Front Immunol*. 2019; 10: 925, doi: [10.3389/fimmu.2019.00925](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00925), indexed in Pubmed: [31244820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31244820/).
 49. Zhang J, Yan W, Duan W, et al. Tumor Immunotherapy Using A Adenosine Receptor Antagonists. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13(9), doi: [10.3390/ph13090237](https://doi.org/10.3390/ph13090237), indexed in Pubmed: [32911819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32911819/).
 50. Cheong JE, Sun L. Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2018; 39(3): 307–325, doi: [10.1016/j.tips.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.007), indexed in Pubmed: [29254698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29254698/).
 51. Labadie BW, Bao R, Luke JJ. Reimagining IDO Pathway Inhibition in Cancer Immunotherapy via Downstream Focus on the Tryptophan-Kynurenine-Aryl Hydrocarbon Axis. *Clin Cancer Res*. 2019; 25(5): 1462–1471, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-18-2882](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2882), indexed in Pubmed: [30377198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30377198/).
 52. Hellmann MD, Jänne PA, Opyrchal M, et al. Entinostat plus Pembrolizumab in Patients with Metastatic NSCLC Previously Treated with Anti-PD-(L)1 Therapy. *Clin Cancer Res*. 2021; 27(4): 1019–1028, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-20-3305](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3305), indexed in Pubmed: [33203644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33203644/).
 53. Riely GJ, Ou SHI, Rybkin II, et al. KRYSTAL-1: Activity and preliminary pharmacodynamic (PD) analysis of adagrasib (MRTX849) in patients (pts) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring KRAS G12C mutation. *J Thorac Oncol*. 2021; 16(4S): Abstr. 990_PR.