

# Uloga PD-1 i PD-L1 signalnog puta u supresiji T-staničnog imunosnog odgovora u progresiji solidnih tumora

---

**Bandić, Ivan**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:497337>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Bandić**

**Uloga PD-1 i PD-L1 signalnog puta  
u supresiji T-staničnog imunosnog  
odgovora u progresiji solidnih tumora**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2020.**



Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Klinike za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod mentorstvom doc. dr. sc. Natalije Dedić Plavetić, dr. med. te je predan na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020..



# Popis oznaka i kratica

<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ aktin glatkog mišića	<b>NOS</b>	sintaza dušikova oksida
<b>ACSS2</b>	acetil-CoA sintetaza 2	<b>NSCLC</b>	nesitnostanični karcinom pluća
<b>ADCC</b>	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>	<b>OS</b>	ukupno preživljenje
<b>AP-1</b>	aktivatorski protein 1	<b>ORR</b>	objektivna stopa odgovora
<b>APC</b>	antigen prezentirajuća stanica	<b>p-MHC</b>	kompleks peptida vezanog na MHC molekulu
<b>Blimp-1</b>	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>	<b>PD-1</b>	<i>programmed cell death protein 1</i>
<b>CAF</b>	s tumorom povezan fibroblast	<b>PD-L1</b>	<i>programmed death-ligand 1</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	<b>PDRGR</b>	receptor na trombocitima nastalog čimbenika rasta
<b>CPT1A</b>	karnitin palmitoil transferaza 1A	<b>PEP</b>	fosfoenolpiruvat
<b>CR</b>	<i>complete response</i>	<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	PPAR- $\gamma$ koaktivator 1 $\alpha$
<b>CTL</b>	citotoksični T limfocit	<b>PGE2</b>	prostaglandin E2
<b>CTLA-4</b>	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	<b>PR</b>	djelomični odgovor
<b>DC</b>	dendritička stanica	<b>PSGL-1</b>	P-selektinski glikoproteinski ligan 1
<b>ECM</b>	ekstracelularni matriks	<b>RCC</b>	karcinom bubrežnih stanica
<b>EMT</b>	epitelno-mezenhimalna tranzicija	<b>SERCA</b>	sarko/ER Ca <sup>2+</sup> -ATPaza
<b>FAP</b>	protein aktivator fibroblasta	<b>SHP</b>	Src homologna regija 2 domena koja sadržava fosfatazu
<b>FASN</b>	sintaza masnih kiselina	<b>SMAC</b>	<i>central supramolecular activation cluster</i>
<b>FDA</b>	Agencija za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država	<b>T-bet</b>	<i>T-box expressed in T cells</i>
<b>FGF</b>	čimbenik rasta fibroblasta	<b>TAM</b>	s tumorom povezan makrofag
<b>FGL-1</b>	fibrinogenu sličan protein 1	<b>TAN</b>	s tumorom povezan neutrofil
<b>FSP1</b>	fibroblast specifičan protein 1	<b>TCR</b>	T stanični receptor
<b>GM-CSF</b>	čimbenik stimulacije kolonija granulocita i makrofaga	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transformirajući čimbenik rasta $\beta$
<b>HER2</b>	receptor za epidermalni čimbenik rasta 2	<b>TIGIT</b>	T stanični imunoglobulin i ITIM domena
<b>HIF</b>	čimbenik induciran hipoksijom	<b>TIL</b>	tumor infiltrirajući limfocit
<b>HLA</b>	ljudski leukocitni antigen	<b>Tim-3</b>	T stanični imunoglobulin - 3
<b>HMGB1</b>	visokomobilni protein grupe B1	<b>TIME</b>	tumorski imuno-mikrookoliš
<b>ICAM</b>	unutarstanična adehezijaska molekula	<b>TMB</b>	tumorsko mutacijsko opterećenje
<b>IDO</b>	indolamin 2,3 - dioksigenaza	<b>TNBC</b>	trostruko negativan karcinom dojke
<b>IFN</b>	interferon	<b>TME</b>	tumorski mikrookoliš
<b>IGF-1</b>	inzulinu sličan čimbenik rasta 1	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	čimbenik nekroze tumora $\alpha$
<b>IL</b>	interleukin	<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i>
<b>irAE</b>	nuspojave povezan s imunološkim sustavom	<b>VEGF</b>	vaskularni endotelijalni čimbenik rasta
<b>ITIM</b>	na tirozinu baziran imunoreceptorski inhibitoryni motiv	<b>VISTA</b>	Ig supresor T stanične aktivacije V-domene
<b>Lag-3</b>	limfocitni aktivacijski gen 3	<b>VSIG-3</b>	<i>V - set and immunoglobulin domain containing 3</i>
<b>LOX</b>	lizil hidroksilaza		
<b>M-CSF</b>	čimbenik stimulacije kolonija makrofaga		
<b>MDSC</b>	od mijeloida nastale supresorske stanice		
<b>MHC</b>	glavni sustav tkivne snošljivosti		
<b>miRNA</b>	mikro RNA		
<b>MMP</b>	matriks metaloproteinaza		
<b>NFATc1</b>	jezgreni čimbenik aktiviranog T limfocita, citoplazmatski 1		



# Sadržaj

## Sažetak

## Summary

<b>1</b>	<b>Uvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Međuodnos tumora i imunološkog sustava</b>	<b>2</b>
2.1	Tumorski mikrookoliš . . . . .	2
2.1.1	Građevne stanice i uvjeti u tumorskom mikrookolišu . . . . .	2
2.1.2	Imunološke stanice u tumorskom mikrookolišu . . . . .	4
2.1.3	T limfociti u tumorskom mikrookolišu . . . . .	5
2.2	Imunološko uređivanje tumora . . . . .	6
2.3	Tumorski bijeg od imunološkog odgovora . . . . .	7
2.3.1	Poremećaji u predstavljanju antigena . . . . .	7
2.3.2	Imunosupresivno okruženje unutar tumorskog mikrookoliša . . . . .	8
2.3.3	Inhibitorne kontrolne točke . . . . .	8
<b>3</b>	<b>PD-1/PD-L1 signalni put</b>	<b>10</b>
3.1	Izražavanje PD-1 na T limfocitima . . . . .	10
3.2	Regulacija izražavanja PD-L1 i PD-L2 u tumorskom mikrookolišu . . . . .	10
3.3	Djelovanje PD-L1 na T limfocite u tumorskom mikrookolišu . . . . .	12
3.4	Iscrpljeni T limfociti . . . . .	12
3.5	Mehanizmi djelovanja inhibitora PD-1 i PD-L1 . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Imunoterapija PD-1 i PD-L1 inhibitorima</b>	<b>15</b>
4.1	Inhibitori PD-1 i PD-L1 u kliničkoj praksi . . . . .	15
4.1.1	Melanom . . . . .	15
4.1.2	Karcinom pluća nemalih stanica . . . . .	16
4.1.3	Karcinomi urološkog sustava . . . . .	17
4.1.4	Karcinom dojke . . . . .	17
4.2	Prediktivni čimbenici i biomarkeri . . . . .	18
4.3	Rezistencija na djelovanje inhibitora PD-1 i PD-L1 . . . . .	19
4.4	Nuspojave PD-1 i PD-L1 inhibicije . . . . .	20
4.4.1	Gastrointestinalni sustav i jetra . . . . .	20
4.4.2	Endokrinološki sustav . . . . .	21
4.4.3	Koža . . . . .	21
4.4.4	Mišićno-zglobni sustav . . . . .	21
4.4.5	Središnji i periferni neurološki sustav . . . . .	21
4.4.6	Krvotvorni sustav . . . . .	22
4.4.7	Srce, pluća i bubreg . . . . .	22
<b>5</b>	<b>Zaključak</b>	<b>22</b>
	<b>Životopis</b>	<b>24</b>
	<b>Popis literature</b>	<b>25</b>





# Sažetak

**Naslov:** Uloga PD-1 i PD-L1 signalnog puta u supresiji T-staničnog imunološkog odgovora u progresiji solidnih tumora

**Autor:** Ivan Bandić

Rak je izrazit javnozdravstveni problem u Republici Hrvatskoj i drugi je uzrok smrti, nakon bolesti srca i krvnih žila. Solidni tumori čine velik postotak mortaliteta i morbiditeta raka te je starenjem stanovništva primjećeno povećanje incidencije. Terapija solidnih tumora je izrazito kompleksan predmet istraživanja, a novije spoznaje nam omogućuju pronalaženje novih meta i postupaka terapije. Nedavna su istraživanja pokazala kako solidni tumori uređuju imunološki odgovor te onemogućuju imunološki napad u tumorskom mikrookolišu, u procesu koji se opisuje kao tumorski bijeg. Jedna od ključnih komponenti u tumorskom bijegu o imunološkog sustava je PD-1 molekula koju nalazimo na površini aktiviranih T limfocita i koja dolazi u interakciju s PD-L1 i PD-L2. Tumorske stanice, ali i nekolicina drugih staničnih tipova, izražavaju PD-L1 na svojoj površini i tako dokidaju napad citotoksičnih T limfocita. Blokadom te inhibicije iscrpljeni T limfociti koji nastanjuju tumorski mikrookoliš ponovno poprimaju efektorski fenotip i pokreću obnovljeni napad na neoplastične stanice. Imunoterapija koja se bazira na blokadi PD-1/PD-L1 signalne osi pokazala je znatan potencijal u kliničkim istraživanjima. U Republici Hrvatskoj upravo je taj vid imunoterapije ušao u kliničku praksu u slučaju nekolicine solidnih tumora, primarno melanoma, trostruko negativnog karcinoma dojke, ne-sitnostaničnog karcinoma pluća, karcinoma mokraćnog mjehura te karcinoma bubrežnih stanica. U ovom diplomskom radu obrađeni su detalji vezani uz djelovanje osi PD-1/PD-L1 na imunološko uređivanje tumora i kliničke implikacije njene blokade.

**Ključne riječi:** tumorski mikrookoliš; imunološko uređivanje; imunoterapija; PD-1; PD-L1

# Summary

**Title:** Role of the PD-1 and PD-L1 Signal Pathway in the Suppression of the T cell Immune Response in Solid Tumor Progression

**Author:** Ivan Bandić

Cancer poses a major public health problem in the Republic of Croatia and it is the second leading cause of death, after cardiovascular disease. Solid tumours account for a large percentage of cancer mortality and morbidity, and an increased incidence has been observed as the population ages. Therapy of solid tumours is an extremely complex subject of research, and recent findings allow us to find new targets and procedures for therapy. Recent research has shown that solid tumours regulate the immune response and prevent an immune attack in the tumour microenvironment, in a process described as cancer immune escape. One of the key components in the tumour escape of the immune system is the PD-1 molecule found on the surface of activated T lymphocytes, which interacts with PD-L1 and PD-L2. Tumour cells, but also several other cell types, express PD-L1 on their surface and thus eliminate the attack of cytotoxic T lymphocytes. By blocking this inhibition, exhausted T lymphocytes that inhabit the tumour microenvironment regain the effector phenotype and commence a renewed attack on neoplastic cells. Immunotherapy based on the blockade of the PD-1/PD-L1 signalling axis has shown significant potential in clinical trials. In the Republic of Croatia, this type of immunotherapy has entered clinical practice in the case of several solid tumours, primarily melanoma, triple-negative breast cancer, non-small cell lung cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. In this thesis, the details related to the effect of the PD-1/PD-L1 axis on the immunoediting of the tumour and the clinical implications of its blockade are discussed.

**Key words:** tumour microenvironment; immunoediting; immunotherapy; PD-1; PD-L1

# 1 Uvod

Solidni tumori definirani su kao abnormalne mase tkiva koje ne sadrže ciste te nemaju tekuću komponentu. Neoplastične stanice koje se nalaze unutar samih tumora mogu pokazivati benigno ili maligno ponašanje. Iako su najčešće opisivani upravo pomoću neoplastičnih stanica tumori su sastavljeni od mnoštva različitih stanica, razvijenog ekstracelularnog matriksa i vaskularnih struktura. Među stanice koje tvore tumor ubrajamo i mnoge imunološke stanice, čije međudjelovanje s neoplastičnim stanicama uvjetuje tumorski rast, njegovu invazivnost i potencijal za metastaziranjem (1). Iako se odnos tumora i imunološkoga sustava intenzivno istražuje kroz protekla tri desetljeća, ideja o utjecaju imunološkog sustava na tumore stara je više od 150 godina. Kao oca imunoterapije smatramo američkog kirurga Williama Coleya, koji je 1893. godine svojim onkološkim pacijentima, pretežno oboljelima od sarkoma, injicirao toplinom inaktivirane bacile bakterija *Streptococcus pyogenes* i *Serratia marcescens*. Coleyjevi toksini, kako ih je sam nazvao, imali su izrazito pozitivan učinak u preživljenju određenih pacijenata, ali činjenica da su rezultati bili sporadični te da je uskoro u kliničku praksu kod onkoloških bolesnika uključena radioterapija

zaustavili su daljnji napredak u istraživanju kliničkih mogućnosti osi tumor-imunološki sustav (2, 3). Imunološki odgovori na transplantirane tumore u murinih modela i klinički prikazi pacijenata koji su uz melanome uz komorbiditet autoimune bolesti pokazivali spontano povlačenje tumora i poboljšanje kliničke slike sredinom dvadesetog stoljeća ponovno su pobudili interes u imunološki sustav u sklopu dijagnostičke obrade i terapijskih mogućnosti onkoloških bolesnika. Finalno je priznaje imunoterapija dobila 2018. godine, kada su James P. Allison i Tasuku Honjo postali dobitnici Nobelove nagrade iz medicine za otkriće tumorske terapije preko inhibicije negativnih imunoloških regulatora. Danas se imunoterapija promatra kao četvrti stup u liječenju onkoloških bolesti, pridruživši se kemoterapiji, radioterapiji i kirurškom liječenju. Bazična i klinička istraživanja u centar imunoterapije smjestili su T limfocite. Tumorsko cijepljenje (4), adoptivna T stanična transplantacija (5) i blokada signalnih puteva glavni su načini na koje se manipulacijom T staničnog odgovora pokušava liječiti onkološke bolesnike. Cilj ovog diplomskog rada upravo je prikazati ulogu blokade staničnog puta PD-1/PD-L1 na T stanični odgovor u solidnim tumorima.

## 2 Međuodnos tumora i imunološkog sustava

### 2.1 Tumorski mikrookoliš

Tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*, TME) složen je sustav neoplastičnih stanica i njima bliske okoline. Čine ga promijenjene tumorske stanice i nepromijenjene stromalne stanice te ekstracelularni matriks (ECM) koji objedinjuje sustav. Jedna od jednostavnijih prezentacija TME je putem koncepta *seed and soil*, odnosno neoplastične stanice kao sjemena, a njenog okoliša kao tla koje podržava i omogućuje sjemenu da ostvari svoj puni potencijal (6).

#### 2.1.1 Građevne stanice i uvjeti u tumorskom mikrookolišu

ECM je nestanična komponenta TME sastavljena od vode, minerala, kolagena, proteoglikana, elastina i drugih specijaliziranih strukturalnih proteina te u nekim tumorima ECM čini i do 60% tumorske mase(7). Njegova je uloga pružiti potporu tumorskom tkivu i stvoriti barijeru od tkiva domaćina. ECM je dinamična struktura koja je u kontinuiranom međuodnosu s ostalim komponentama TME, ali i s okolnim tkivom. Te promjene su primarno opisane kroz remodeliranje, stvaranje i razaranje građevnih proteina poput fibronektina, kolagena I, III i IV (8). Prilikom formiranja TME, remodeliranje ECM jedan je od prvih koraka. Tumorski je ECM po mnogočemu drugačiji od onoga u normalnome tkivu, s povećanom proizvodnjom kolagena tipa I i III te smanjenom proizvodnjom kolagena tipa IV. Ujedno se u nekih tumorima, poput karcinoma dojke, primjećuje povećana proizvodnja kolagena tip V koji smanjuje duljinu i stupanj organiziranosti kolagenskih struktura u samom TME. U karcinomu jajnika ujedno je smanjena proizvodnja kolagena tip IV, koji je od izuzetne važnosti za stvaranje bazalnih membrana (9, 10). Za ove promjene kolagenskih struktura u samom TME potrebne su ranije promjene u translacijskoj i posttranslacijskoj fazi stvaranja kolagena. Primijećena je povećana aktivnost lizil hidrosilaza (LOX) koja je poglavito povećana u dezmoplastičnim tumorima (11).

Izgradnja tog sustava nema samo strukturalnu ulogu, već su istraživanja pokazala kako kolagensko križno povezivanje i odlaganje povećava integrinsko signaliziranje što dovodi do tumorske proliferacije (12). ECM je obilježen i glikozaminoglikanskom hijaluronskom kiselinom, proteoglikanima i laminima koji se, za razliku od normalnog tkiva, u tumorima prožimaju cijelo područje strome (13). Međudjelovanje svih komponenti ECM, a pogotovo kolagena i hijaluronske kiseline stvara od TME kruće tkivo od okolnog te mu pruža izvrsne biofizičke uvjete koje podržavaju daljnji tumorski rast. Silna krutost koju stvara takav dinamičan sustav strukturalnih proteina proizvodi pritisak, odnosno stres koji je podijeljen na solidni i na tekući. Solidni stres je rezultat remodeliranja i stvaranja kompaktne mase primarno od kolagena. Pokazano je kako samo taj fizikalni čimbenik može dodatno mutageno utjecati na neoplastične stanice (14). Kao rezultat kompaktnije i čvršćeg povezivanja kolagena, ali i drugih strukturalnih proteina unutar ECM, dolazi do kolabiranja krvnih i limfnih žila, čiji tekući sadržaj biva zarobljen unutar ECM-a i tako stvara dodatan tekući stres (15). Enzimi koji su primarno odgovori za promjenu ECM-a su matriks metaloproteinaze (MMP) čija je aktivnost često izrazito povećanja u aktivnom tumorskom tkivu.

Stanice koje izlučuju MMP-ove su zapravo miofibroblasti, nastali alternacijom fibroblasta u tumorskome tkivu. U fiziološkim uvjetima su fibroblasti nespecijalizirane stanice kojima je uloga povezivati tkivnu stromu preko regulacije ECM, upale i proliferacije i diferencijacije parenhimskih stanica. Ako nakon aktivacije fibroblasta ne dođe do njihove apoptoze ili povratka u stanje mirovanja razvijaju se patološka stanja poput tkivne fibroze i razvoja kronične upale. Upravo se to događa u tumorima, koji su zbog kontinuiranog angažmana fibroblasta dobili naziv *rana koje ne cijele* (16, 17). Te aktivirane fibroblaste koji nastanjuju tumore nazivamo s tumorima povezani fibroblasti (engl. *cancer associated fibroblast*, CAF) koji su uključeni u sve razvojne stadije tumora, od početaka nastanka

TME, do tumorskog metastaziranja (18).

U velikom broju solidnih tumora CAF-ovi su najbrojnije stromalne stanice, a njihova uloga ne staje samo u osiguravanju strukturalnih uvjeta za preživljavanje i razvoj tumora, već imaju i metaboličku, imunosupresivnu i mutagenu funkciju, ostvarujući sve kroz komunikaciju s ostalim komponentama TME (19). Remodelirajući ECM i mehanički djeluje kao predvodnik proširenja tumora primarno kroz sekreciju mitogenih faktora rasta poput FGF i IGF-1, te uključivanje u NF- $\kappa$ B inhibitorni signalni put. Ujedno, kroz djelovanje TGF- $\beta$  iz CAF-a nastaju mostovi koji omogućuju tumorskim stanicama da infiltriraju domaćinovo tkivo, pritom prolazeći kroz epitelno-mezenhimalnu tranziciju (EMT) (20). Prilikom inicijalne aktivacije nativnih fibroblasta i njihovog pretvaranja u CAF-ove djeluju mnogi faktori rasta i faktori upale, ali i okolno kruto tkivo koje nastaje zbog promjena u ECM. CAF nastaje primarno od nativnih okolnih fibroblasta, ali i od drugih stromalnih stanica. Kako im je nastanak heterogen, i same stanice su heterogene te još nije definiran jedan marker za CAF, već ih razlikujemo prema fenotipskim i funkcionalnim razlikama. Tako kod CAF-ova primjećujemo visoke razine prikazivanja  $\alpha$ -SMA, FAP, FSP1, vimentina, PDRGR-a i drugih strukturalnih molekula, koje ne pronalazimo, barem ne u toj mjeri, u nativnim stromalnim stanicama (21, 22). CAF subtipovi također imaju i važnu prognostičku vrijednost (23).

Adipozno tkivo koje okružuje tumor važna je komponenta TME jer ima ulogu u napredovanju tumorskog tkiva, ali i metaboličku funkciju u samom TME. Kao i u slučaju ECM-a i CAF-ova, adipociti koji nastanjuju tumor genotipski, a shodno tome i fenotipski se razlikuju od adipocita u fiziološkom tkivu. Prema raspodjeli, broj adipocita se povećava prema rubnim dijelovima TME, a masne su nakupine unutar samih adipocita smanjene u središtu, s obzirom na rub TME(24). Osim metaboličke i strukturne uloge, adipociti čine i hormonski aktivno tkivo lučenjem leptina, adiponektina i drugih adipokina, koji imaju primarno metaboličku funkciju, ali i proangiogene učinke te održavanje stanja upale (25). Važno je napomenuti kako i fiziološko adipozno tkivo, koje se nalazi u primarnom sijelu, potiče progresiju

tumora, što je pogotovo vidljivo na primjeru karcinoma dojke (26).

Stanje koje je karakteristično za TME je hipoksija, praćena niskom koncentracijom glukoze i niskim pH. U više od polovice solidnih tumora izmjereni  $pO_2$  iznosio je manje od 5 mmHg. Iako protivno logici za fiziološko tkivo, tumorske su se stanice adaptirale na takvo okruženje te isto iskoristile u svoju korist (27). Hipoksija potiče lučenje HIF-1 $\alpha$  faktora, koji uz to što promovira transkripciju gena zaslužnih za prelazak s aerobnog na anaerobni mehanizam, potiče angiogenezu. Angiogeneza je jedna od glavnih karakteristika tumorskoga tkiva. Potaknuta je primarno VEGF faktorom koji stimulira proliferaciju endotelnih stanica, povećava vaskularnu permeabilnost dovodeći do edema i promjena ECM-a koji rezultiraju stvaranjem novih krvnih žila - neovaskularizacijom. Angiogenezom, promjenom postojećih okolnih krvnih žila i vaskulogenezom putem regrutacije endotelijalnih prekursora iz koštane srži nastaju nove krvne žile koje značajno se razlikuju od domaćinovih, i po građi i po funkcionalnosti. Protok krvi u takvim krvnim žilama nije konstantan, već krv navire u prostore koji su najviše zahvaćeni hipoksijom. Tako stvoren začarani krug hipoksije i reoksigenacije koja segmentalno zahvaća tumorsko tkivo pogodna je za tumorski rast i razvoj (28).

Metabolizam TME je, kao i njegov sastav, izrazito heterogen. Uzrok heterogenosti krije se u lokalnim uvjetima u TME, primarno hipoksiji i acidozi, te nemogućnosti nutrijenata da ispravno pokrivaju područje u lošije organiziranoj vaskulaturi. Autonomni faktori neoplastičnih stanica i vanjski uvjeti također uvjetuju metabolizam unutar TME. Neoplastične stanice tako energiju dobivaju putem glikolize, oksidativne fosforilacije, kroz metabolizam aminokiselina i putem lipidnog metabolizma. Hipoksični uvjeti potiču stanice da pređu na glikolizu, koja iako je manje energetska učinkovita od oksidativne fosforilacije, omogućuje neoplastičnim stanicama veći unos drugih supstrata koji su potrebni za ubrzano stanično dijeljenje, poput nukleotida, aminokiselina i lipida, takozvani glikolitički fluks (29). Oksidativni tumori, zbog dovoljne oksigenacije,

zadržavaju oksidativnu fosforilaciju, pri kojoj je aktivacija mitohondrija od izrazite važnosti poglavito za kataplerotične puteve (30). Metabolizam aminokiselina, poglavito glutamina i serina, igra važnu ulogu u kontroli reakcija redukcije u TME i u pomoći glikolitičkom fluksu (31). Kako hipoksija utječe na prelazak na metabolizma zasnovanog na glikolizi, potiče i lipidni metabolizam. Lipidni je metabolizam najvidljiviji u slučajevima tumora dojke i jajnika, kojima je primarno sijelo već okruženo adipoznim stanicama. U tim su tumorima značajke lipidne sinteze poput povećane koncentracije sintaze masnih kiselina (FASN) ili acetil-CoA sintetaze 2 (ACSS2) povezani s tumorskom progresijom (32).

Metaboličke promjene ne zahvaćaju samo neoplastične stanice, već i netumorske stanice. Primarno su zahvaćeni CAF-ovi, u kojima je opisan obrnut Warburgov fenomen. Prelazak na aerobnu glikolizu uzrokuje u CAF-ovima proizvodnju i naknadno izlučivanje ketonskih tijela, laktata i piruvata koje neoplastične stanice preuzimaju i koriste za vlastitu proizvodnju energije (33).

### 2.1.2 Imunološke stanice u tumorskom mikrookolišu

Uz navedene neoplastične stanice, stromalne stanice i ECM jedna od glavnih karakteristika TME-a je i prisutnost upalnih, odnosno imunoloških stanica. Izrazita raznovrsnost imunoloških stanica opisuje se kroz poseban podsustav unutar TME-a, a to je tumorski imuno-mikrookoliš (TIME). Te stanice možemo podijeliti s obzirom na podrijetlo i s obzirom na funkciju. S obzirom na podrijetlo te stanice dijelimo na stanice mijeloidne loze i na stanice limfoidne loze. Stanice mijeloidne loze uključuju s tumorom povezane makrofage (engl. *tumor associated macrophage*, TAM) i tipa M1 i tipa M2, monocite, granulocite, od mijeloida nastale supresorske stanice (engl. *myeloid-derived suppressor cell*, MDSC) i dendritičke stanice (DC), neutrofile i broje druge. Limfoidnu komponentu čine tumor infiltrirajući limfociti (engl. *tumor infiltrating lymphocyte*, TIL) uključujući i B i T stanice, te NK stanice.

S tumorima povezani makrofagi (TAM) uključuju dva tipa stanica - M1 makrofage i

M2 makrofage. Makrofagi u tumorima nastaju sazrijevanjem monocita, u najvećem broju od tkivnih embriogenih makrofagnih preteča (MΦ) koje se samostalno obnavljaju, neovisno o koštanoj srži (34). O fenotipu kojeg će makrofag poprimiti i o njegovoj kasnijoj funkciji ovisi stanje u TME. M1 fenotip pokazuje antitumorsko djelovanje secernirajući TNF- $\alpha$  i uz to na staničnoj membrani pokazujući dodatne TNF/TNF-R receptore. Uz to secerniraju i reaktivne kisikove i dušikove spojeve što je ključno za domaćinovu obranu od tumora i tumorsko ubijanje (35).

Većina makrofaga koji su prisutni u TME ima imunosupresivno i protumorsko djelovanje te oni pokazuju M2 fenotip. Za indukciju ovoga fenotipa potrebno je okruženje faktorima rasta pogotovo M-CSF te IL-4, IL-10, IL-13 i IL-21 te aktivin A, kao i kortikosteroidi i prostaglandini te vitamin D (36). Njihovo je imunosupresivno djelovanje plod proizvodnje IL-10, prostaglandina E2 (PGE2) te transformirajućeg faktora rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (37). Uz imunosupresivno djelovanje M2 makrofagi promoviraju neoangiogenezu sekrecijom VEGF te podupiru tumorsku progresiju i invaziju. Visoka je koncentracija makrofaga u tumoru povezana sa sumnjom na metastaziranje i na lošu prognozu (38).

Dendritičke su stanice, kao što je opisano u aktivaciji T limfocita, najvažnija vrsta antigen prezentirajućih stanica (APC) koje su nužne za inicijaciju antigen specifične imunosti. DC stanice nalazimo lokalno u TME te one napuštaju TME i dolaze u regionalne limfne čvorove gdje angažiraju i aktiviraju T limfocite. Osim s T limfocitima, DC stanice ulaze u interakciju i s NK stanicama i s B limfocitima (39). Njihovo je djelovanje tako izrazito antitumorsko, a velik udio zrelih DC stanica u TME jedan je od najsnažnijih znakova preživljavanja i boljeg ishoda u više grupa tumorskih pacijenata (40). U životinjskim modelima i u tumorskih pacijenata pokazano kako protumorsko okruženje, primarno TGF- $\beta$ , IL-6 i IL-10 te CCL2, CXCL1 i CXCL5, negativno utječe na razvoj i sazrijevanje DC stanica, zaustavljajući ih u niži razvojnoj fazi i onemogućavajući migraciju u limfne čvorove (41).

Neutrofile koji nastanjuju TME, analogno makrofagima, nazivamo s tumorima povezanim neutrofilima (engl. *tumor-associated*

*neutrophiles*, TAN). Sličnost se nastavlja jer su također prepoznata dva fenotipa TAN-ova - N1 i N2 tipovi. N1 tip pokazuje antitumorsko djelovanje kroz toksično djelovanje kisikovih radikala i povećane ekspresije faktora tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), povećanja intracelularne adhezijske molekule 1 (ICAM-1) i pojačavanja djelovanja FAS. N2 tip neutrofila ima imunosupresivno djelovanje, zaustavljajući djelovanje T limfocita i secernirajući protumorske faktore poput CCL2, CCL5, neutrofilnu elastazu i katepsin G (42). Za razliku od makrofaga čiji je fenotip determiniran uvjetima u kojima se nalazi unutar TME, razlike u N1 i N2 tipu neutrofila najvjerojatnije su vremenske, odnosno radi se o različitim fazama razvoja istih stanica. N2 tip neutrofila izrazito podsjeća na granulocitne ili polimorfonuklearne MDSC (G-MDSC) (43).

Od mijeloida nastale supresorske stanice (MDSC) su nezrela heterogena skupina stanica koje naziv dobiva zbog svojeg protumorskog i imunosupresivnog djelovanja. Oko 80% MDSC-a su granulocitnog tipa te liče na N2 tip neutrofila, dok je ostatak monocitnog tipa te morfologijom i fenotipu sličan M2 tipu makrofaga (44). Njihovo je imunosupresivno djelovanje primarno usmjereno na T stanice i provodi se kroz brojne mehanizme poput sekrecije kisikovih radikala, dušikovog oksida i tumor-promovirajućih faktora poput PGE2 (45).

TAM i DC pokazuju izrazitu intrinzičnu plastičnost. Naime, one mogu križno komunicirati i djelovati jedne na druge. U imunosupresivnom TME mijeloidni progenitori i mijelociti se mogu alternirati iz DC u MDSC stanice, a M1 makrofagi u M2 makrofage (46, 47). Vrijedi i analogno, pri čemu kroz djelovanje NK i CTL stanica M2 makrofagi ili su pretvoreni u M1 ili ih zamjenjuju regrutirani M1 makrofagi.

NK stanice su od izrazitog značaja u antitumorskom odgovoru imunološkog sustava. Definiramo ih kao CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> stanice u ljudi, a u cirkulaciji čine 10 do 15% limfocita. U TME NK stanice dolaze primarno preko kemokina koje izlučuju DC stanice. Njihova je uloga dvojaka. Lučeći proupalne citokine i kemokine, poput IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, GM-CSF and CCL5, promoviraju antitumorski okoliš. Uz to mogu prezentirati i križno predstavljanje antigena CTL-ovima i time osnažiti T stanični antitumorski

odgovor (48). NK stanice također imaju sposobnost induciranja apoptoze u tumorskim stanicama putem otpuštanja perforina i granzima, ali je primijećeno kako je to djelovanje u solidnim tumorima znatno smanjeno (49, 50).

Uloga limfocita B u TME nije u potpunosti poznata. Infiltrirajuće B limfocite u TME se povezuje s boljom prognozom u karcinomu dojke (51). Iako je opisan ovaj klinički pozitivni utjecaj B limfocita na imunološki odgovor prema tumoru, neke studije ukazuju na to da B limfociti posjeduju protumorski potencijal, proizvodnjom citokina koji angažira MDSC i pojačava angiogenezu. Na taj način B limfociti umanjuju odgovor CTL-a (52).

### 2.1.3 T limfociti u tumorskom mikrookolišu

T limfociti najvažnije su imunološke stanice u TIME. Zaslužne su za najsnažnije regulatorno i efektorsko djelovanje unutar tumora, a to mogu pripisati svojoj heterogenosti.

T limfociti koji posjeduju CD4 marker poznati su i kao pomoćnički T limfociti (engl. *T helper*, T<sub>H</sub>). Uz tradicionalne uloge u imunološkim odgovorima protiv patogenih mikroorganizama, nova istraživanja dokazuju važnost CD4<sup>+</sup> T limfocita i njihovu ulogu u antitumorskim odgovorima (53). Određene CD4<sup>+</sup> stanice posjeduju i izravan utjecaj u inhibiciji tumorskog rasta i u progresiji koja je neovisna od indirektna, pomoćničke uloge. Oprečno tome, CD4<sup>+</sup> stanice mogu promovirati tumorski rast i progresiju (54). Ta dvostruka uloga T<sub>H</sub> stanica ovisna je o citokinskom miljeu koji obilježava TIME te o diferencijaciji stanica, novopridošlih i postojećih, u razne podtipove T<sub>H</sub>. Ta regrutacija specifičnih T<sub>H</sub> podtipova u TIME pokazala je korelaciju s prognozom bolesti i imunoterapijskim učinkom (55).

T<sub>H</sub>1 stanice su važne u preoblikovanju imunološkog odgovora protiv raka. Povezuju urođenu i stečenu imunost, jer IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  koje luče T<sub>H</sub>1 također inducira antitumorsku, citotoksičnu aktivnost u TAM-ovima. Dio citokina koje proizvode T<sub>H</sub>1 nalazi se i u cirkulaciji, a njihov pronalazak je povezan s boljim kliničkim ishodom (56)

T<sub>H</sub>2 imaju slabiju antitumorsku aktivnost od T<sub>H</sub>1 stanica, ali njihova funkcija u TIME, za razliku o konzistentne antitumorske T<sub>H</sub>1, ovisi o



citokinskom miljeu u kojemu se nalaze (57). U mnogim TIME raznih solidnih tumora je opisana promjena iz  $T_H1$  u  $T_H2$  (58). Kako omjer  $T_H2:T_H1$  raste stvara se imunološki infiltrat koji se naziva *wound healing* i koji je loš prognostički indikator (59).

$T_H17$  stanice, slično kao i  $T_H2$  stanice, imaju dualnu prirodu. Antitumorska aktivnost se pokazuje kroz regrutaciju DC stanica i pojačavanje njihovog angažmana u antigen specifičnoj imunosti. U karcinomu jajnika infiltracija  $T_H17$  korelira s većom količinom CTL (60). Lučenjem IL-17  $T_H17$  također mogu pokazati imunosupresivno i protumorsko djelovanje, jer IL-17 pozitivno djeluje na MDSC te promovira migraciju i invaziju tumorskih stanica potičući u njima karakteristike matičnih stanica, što je prikazano u karcinomu pluća (61). U kolorektalnom karcinomu, visoke koncentracije IL-17 su povezane s lošom prognozom (62).

Tri tipa stanica koje su slabije istražene su  $T_H9$ ,  $T_H22$  te  $T_{FH}$ . Prva pokazuje izrazito snažan antitumorski učinak djelujući na mastocite, DC i CTL stanice (63).  $T_H22$  pokazuje protumorski učinak promovirajući proliferaciju i potičući karakteristike slične matičnim stanicama kroz aktivaciju STAT-3 signalnog puta (64).  $T_{FH}$  u solidnim tumorima povezujemo s antitumorskim funkcijama (65).

Tumorsko se izbjegavanje imunološkog odgovora zasniva na regrutaciji imunosupresivnih stanica u TIME, a među najvažnijim inhibitornim stanicama su i  $T_{Reg}$ .  $T_{Reg}$  definirane su  $CD4^+CD25^{high}$  uz koje se prikazuje i FoxP3. Iako u zdravih ljudi čine do 10% stanica, u tumorima se nalaze u puno većem postotku, gdje podržavaju tumorski rast i progresiju (66). Djelovanje  $T_{Reg}$  ovisno je o IL-10, IL-35 i TGF- $\beta$  i usmjereno je na inhibiciju CTL, DC, NK stanica i B stanica te smanjuje imunoinducirajuće djelovanje IL-2 (67). U velikog broja solidnih tumora primjećuje se povećanje  $T_{Reg}$ , koje u TIME dolaze kroz signalizaciju od strane tumorskih stanica, primarno CCL22(55). Slično kao i kod imunoloških stanica mijeloidne loze, dio  $T_{Reg}$  populacije regrutiran je kroz promjenu efektorskih T limfocita u  $T_{Reg}$  kroz interakciju s DC i visoke koncentracije TGF- $\beta$  i IDO. DC se tako predstavljaju kao ključan imunomodulator u TIME (68).

Glavnim efektorskim stanicama smatraju se CTL (engl. *cytotoxic T lymphocyte*)  $CD8^+$  T limfociti. Nakon aktiviranja od strane DC u limfnim čvrvima aktivirane  $CD8^+$  T stanice se upućuju prema tumorima gdje, uz ovisnost o IL-2, postaju terminalno diferencirani i pokazuju visoku citotoksičnost. Citotoksičnost CTL-a se bazira na ispuštanju granzima, FAS liganda i perforina u imunološke sinapse. To djeluje kroz dva odvojena puta FAS liganda koji inducira apoptozu putem kaspaza 3 i 8 te perforina koji otvarajući kanale na ciljnim stanicama također inducira apoptozu (69). Velik dio  $CD8^+$  T limfocita koji se nalaze u TIME su memorijske stanice koje su okarakterizirane markerima CD103 i E-kadherinom, favorizirajući poziciju u epitelijalnim tumorskim regijama sa smanjenom cirkulacijom u perifernoj krvi (70). Na djelovanje CTL-a snažno utječe i metabolizam unutar TME, koji ih dovodi u stanje iscrpljenosti.

## 2.2 Imunološko uređivanje tumora

Znanstvenici su kroz proteklo stoljeće pretpostavljali kako između imunološkog sustava i tumora postoji međuodnos. Smatrali su kako imunološki sustav štiti čovjeka od tumora koji se kontinuirano razvijaju, što je i usustavljeno u ideji imunološkog nadzora sredinom 20. stoljeća. Nakon što murini pokusi nisu potvrdili ideju ona je napuštena sve do ranih 1990-ih. Sofisticiraniji mišji modeli u kojima su bili onemogućeni sustavi poput IFN- $\gamma$  signalizacije, perforina ili RAG-2 te u kojima su se u većoj mjeri razvili tumori nego li u kontrolnoj skupini ponovno su pobudili sumnju u uključivanje imunološkog sustava u oblikovanje tumora (71). Na tragu tih pronalazaka stvorena je teorija o imunološkom uređivanju tumora (engl. *immunoediting*) (72).

Teorija imunološkog uređivanja nalaže kako su tumori oblikovani od strane imunološkog sustava, što rezultira selektivnim rastom varijanti koje su bolje opremljene za borbu protiv imunološkog sustava. Prvi puta predstavljen 2002. godine od strane Dunn i sur., koncept je objašnjavao kako imunološki sustav može na tumor djelovati i protumorski i antitumorski u međugri između dva sustava. Koncept je raspoređen kroz tri prostorno-vremenska okoliša i opisuje se kroz tri *E* odnosno uklanjanje (engl. *elimination*), ravnotežu

(engl. *equilibrium*) i bijeg (engl. *escape*) koji zajedno opisuju sve događaje za vrijeme imunološkog odgovora na tumor (73).

Proces imunološkog uklanjanja tumora je najbliži originalnom konceptu tumorskog nadzora. U samim začetima tumorigenog procesa, u kojem je klonalna ekspanzija neoplastične stanice mala i nije došlo do stvaranja svih ranije opisanih komponenti tumorskog mikrokoliša, imunološke stanice pokreću reakciju protiv neoplastičnih stanica. Za taj početni odgovor zaslužne su i stanice stečene i stanice urođene imunosti, primarno CTL i NK stanice. U napadu sudjeluju i T<sub>Reg</sub> stanice i DC koje moderiraju odgovor na neoplastične stanice. Sve je to moguće jer su tumori, odnosno neoplastične stanice, izazito imunogene. Iako je imunološko uklanjanje tumora dokazano samo na murinim pokusima, primarno zbog kompliciranosti istraživanja klinički nemanifestnih tumora, noviji podaci dobiveni iz istraživanja na primateljima transplantata koji su ijtrogeno imunodeficientni potvrđuju ovu teoriju (74).

Zbog heterogenosti okoliša, ali primarno zbog genetske nestabilnosti koja krasí neoplastične stanice razvijaju se novi klonovi neoplastičnih stanica koji pokazuju manju imunogenost i koji postaju otporni na dosadašnje imunološke reakcije. Ta se faza naziva fazom ravnoteže primarno jer dolazi do uništenja starih, na imunološki odgovor neotpornih neoplastičnih stanica te do ekspanzije novih, na imunološki odgovor otpornih neoplastičnih stanica. Drugi je razlog činjenica da sam tumor i imunološki sustav ulaze u stanje gdje jedan drugome ne omogućuju daljnji napredak. Upravo tako imunološki sustav uređuje tumore, mehanizmom negativne selekcije, mehanizmom sličnim odabiru zadovoljavajućih T limfocita. Dolazi do smirivanja tumorskog rasta i razvoja, a tumor, ako je i bio klinički očit, ulazi u stanje remisije. Promijenjeni uvjeti vaskularizacije i građe TME održavaju stanje mirovanja u tumorima, ali kako faza ravnoteže napreduje, tumori postaju manje imunogeni (75). Kada se uvjeti poboljšaju u korist tumora, on prelazi u sljedeću fazu imunološkog bijega.

Imunološki bijeg konačni je stadij u imunološkom uređivanju tumora, u kojem tumor na mnoge načine bježi i sakriva se od svih vidova

imunološkog odgovora.

## 2.3 Tumorski bijeg od imunološkog odgovora

### 2.3.1 Poremećaji u predstavljanju antigena

Ključan korak za aktivaciju CTL je predstavljanje antigena od strane APC, najčešće DC. Tumorski specifični antigeni su šarolika skupina proteina koja može biti onkoviralna ili neoantigenska, odnosno produkt genetskih mutacija unutar samih neoplastičnih stanica. U tom slučaju specifična imunost na te antigene do sada nije formirana (76). Antigeni koje povezujemo s tumorima mogu biti i oni koji su vremenski ili anatomski sakriveni, poput antigena matičnih stanica u slučaju s melanom povezanim antigenom, ili zbog povećanja izražavanja s tumorima povezanih antigena poput HER2 u karicnomu dojke (77). Povećan stupanj mutacija je u slučaju tumora opisan kroz tumorsko mutacijsko opterećenje (engl. *tumour mutation burden*, TMB).

Smanjen TMB, odnosno smanjena proizvodnja novih antigena od strane tumora, povezana je sa smanjenom prezentacijom antigena na MHC tip I molekulama, dakle sa smanjenim prepoznavanjem tumorskih neoantigena kao tuđih i sukladnog ubijanja od strane CTL. Kroz kliničke studije prikazan je bolji rezultat u oporavku i preživljenju kod pacijenata s višim TMB (78), što dovodi do zaključka da nizak TMB igra ključnu ulogu u imunološkom bijegu tumorskih stanica.

Uz to što je smanjen broj prikazanih tumor-specifičnih antigena u mnogim hematološkim i solidnim tumorima, zabilježene su abnormalnosti u MHC tip I molekuli, zbog koje tumori mogu izbjeći djelovanje CTL citotoksičnosti. Poremećaj je zabilježen i u murinim pokusima i u kliničkim slučajevima, gdje težina varira od smanjene ekspresije MHC I molekule na površini tumora do potpunog nestanka (79). Poremećena ekspresija MHC tip I rezultat je poremećaja u sintezi nekih od proteina potrebnih za procesuiranje antigena. U slučaju mutacije u  $\beta$ 2-mikroglobulinu, dijelovima procesuirajućeg puta kao i u slučaju gubitka heterozigotnosti na MHC I lokusu te su promjene ireverzibilne. U epigenetski uvjetovanim poremećajima prezentiranja antigena, poput metilacije DNK na MHC lokusu promjene su

reverzibilne (80, 81).

Dendritičke stanice (DC) odgovorne su za ispravno aktiviranje CTL i u TME i u limfnim čvorovima, kako je opisano ranije. Nekolicina čimbenika koje povezujemo s imunosupresivnim TME dovodi do inhibicije DC, primarno lipidi, IL-6 koji inhibira maturaciju DC preko STAT3 puta te ponajviše IL-35. IL-35 suprimira funkcijsko sazrijevanje dendritičkih stanica monocitnog tipa, smanjujući ekspresiju HLA-DR, CD83 i nužnih kostimulacijskih molekula poput CD40, CD80 i CD86 (82).

Mutacija gena u neoplastičnim stanicama može dovesti do fenomena koji se naziva T-stanična isključivost (engl. *T-cell exclusion*) u kojem je T stanično praćenje i infiltracija T stanica u TME inhibirano bez promjene u načinu prikazivanja antigena. Taj je fenomen povezan s mutacijama u  $\beta$ -katenin/Wnt signalnom putu i MAPK signalnom putu (83).

### 2.3.2 Imunosupresivno okruženje unutar tumorskog mikrookoliša

Iako su tumorske stanice neorganizirane, stvarajući nekoherentna tkiva u vidu TME i ne imajući korisnu funkcionalnu značajnost u velikom je broju tumora primijećeno lučenje citokina poput CCL22 koji regrutiraju T<sub>Reg</sub> stanice i CCL2, CCL5, CCL7, CCL8 i CXCL12 koji regrutiraju TAM-ove i diferenciraju ih prema M2 tipu (84). T<sub>Reg</sub> i M2 stanice su, kako je ranije opisano, glavne odgovorne za održavanje imunosupresivne klime u TME, pogotovo u fazama ravnoteže i bijega imunološkog uređivanja. Neoplastične stanice također zajedno s T<sub>Reg</sub> luče IL-10 i TGF- $\beta$ , koji uz to što perpetuiraju protumorsko i imunosuprimirajuće djelovanje, promovirajući rast i razvoj tumora te djelovanje T<sub>Reg</sub> i kasnije suprimiranje CTL, DC i APC, djeluju i kao loši prognostički čimbenici i mogu biti pronađeni u mnogim TME solidnih tumora (85). Uz IL-10 i TGF- $\beta$  imunosuprimirajući faktor sličnog djelovanja je i PGE2 (37).

Kako bi T limfociti uopće infiltrirali TME, efektorske stanice moraju doputovati do njega putem krvnih ili limfnih žila. Kao što je ranije opisano, faktori poput VEGF potiču stvaranje novih, abnormalnih krvnih žila koje onemogućuju ispravnu infiltraciju i ekstrasvazaciju efektorskih

T limfocita pomoću fizikalne barijere. Uz novonastalu fizikalnu barijeru smanjuje se i broj adhezijskih molekula potrebnih za infiltraciju CTL poput VCAM-1 i ICAM-1 te povećava broj Fas-L u prisutnosti IL-10 i PGE2 koji direktno uništavaju CD8<sup>+</sup> T limfocite (86).

Uz angiogenu funkciju VEGF u TME je zamijećena i angiogena funkcija adenzina koji je često prisutan u visokim količinama u TME. Metabolit koji nastaje enzimatskom aktivnošću CD39 i CD73, proizveden i od tumorskih stanica i od strane T<sub>Reg</sub> uz angiogenu pokazuje i imunosupresivnu ulogu limitirajući TIL (87). Kisikovi i dušikovi radikali (ROS i RNS) koji su produkt nekih od protumorskih članica TIME oslabljuju interakciju između TCR i p-MHC smanjujući efektivnost CTL i uz to limitiraju infiltraciju TIL (88).

Imunosupresivan okoliš djeluje i na metabolizam CTL u TIME. Za potrebe proliferativne i funkcionalne sposobnosti TIL potrebne su esencijalne aminokiseline čija dostupnost je smanjena u TME. Arginaza i NOS, enzimi koji se u TME nalaze u povećanim količinama (85), kataboliziraju L-arginin koji je potreban za TCR  $\zeta$  lanac i na taj način se smanjuje aktivnost T limfocita (89). Snažnije djelovanje posjeduje indolamin 2,3 - dioksidogenaza 1 (IDO), također izražena u visokim dozama u TME, koja razgrađuje L-triptofan u kinnurenin i druge metabolite. Slično kao i L-arginin i L-triptofan je nužan za djelovanje CTL, a metaboliti pokazuju suprimirajuće, čak toksično, djelovanje na T limfocite i na populacije NK stanica i B limfocita (90).

### 2.3.3 Inhibitorne kontrolne točke

Nakon aktivacije T limfocita na njegovoj se površini povećava izražajnost CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), koji se veže na B7 molekulu mnogo snažnije i dugotrajnije od CD28. CD28 je kostimulacijska molekula nužna za potpunu efektorsku funkciju CTL, tako da vezanje CTLA-4 za B7 uzrokuje imunosupresivan učinak (91). Mehanizam je višestruk, supresijom signalnih puteva koji naivne T limfocite pretvaraju u efektorske i povećanom proizvodnjom IDO (92).

Limfocit aktivacijski gen-3 (engl. *lymphocyte activation gene-3*, Lag-3) inhibitorni je koreceptor

koji se nalazi na površini aktiviranih CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> kao i na T<sub>Reg</sub> stanicama u tumorima . Prepoznati ligandi uključuju MHC II, galektin-3 i protein sličan fibrogenu (FGL-1) koji se nalaze na tumorskim stanicama, a vezanje s njima smanjuje proizvodnju protuupalnih citokina i zaustavlja proliferaciju T limfocita (93). Lag-3 moguće je pronaći s drugim koinhibitornim kontrolnim točkama, primarno s PD-L1. Dvostruka blokada djeluje sinergistički (94).

T stanični imunoglobulin-3 (Tim-3) negativni je regulator imunološkog odgovora koji se nalazi na IFN- $\gamma$  proizvedeći CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T limfocitima, NK stanicama, T<sub>Reg</sub>, mastocitima i mijeloidnim stanicama. Pokazano je kako se Tim-3 nalazi u povećanoj količini u mnogim tipovima tumora i povezan je s lošom prognozom (95). Nakon vezanja za ligande poput galektina-9, fosfatidilserina ili visokomobilnog proteina grupe B1 (HMGB1) dolazi do blokade efektorskih T limfocita i pojačavanje učinka T<sub>Reg</sub> te osnaživanja učinka MDSC. Kao i Lag-3, Tim-3 se često pojavljuje s PD-L1 u TME (96).

T stanični imunoglobulin i ITIM domena (TIGIT) se pojavljuje na efektorskim T limfocitima kao i na T<sub>Reg</sub> te NK stanicama. Veže se na dva liganda, CD155 i CD112 koje nalazimo

na tumorskim stanicama unutar TME. Vezanje TIGIT na ligande dovodi do antitumorskog imunološkog odgovora. Na CTL djeluje tako da suprimira proliferaciju, proizvodnju citokina i blokira metabolizam i slično djeluje na NK stanice , dok na TReg djeluje pozitivno (97). TIGIT ima veću pojavnost u većini tumora na T lifocitima, a on je kao i ranije navedeni koinhibitori povezan s lošijom prognozom (98). Kao i ranije navedeni koinhibitori često nije jedini koinhibitor na CTL (99).

Ig supresor T stanične aktivacije V-domene (engl. *V-domain Ig suppressor of T cell activation*, VISTA) je koinhibitorska molekula koja se pojavljuje na T<sub>Reg</sub>, efektorskim T stanicama, DC, makrofagima kao i na tumorskim stanicama. Ligand joj je VSIG-3, a interakcija inhibira T staničnu proliferaciju i smanjuje proizvodnu proupalnih citokina poput IL-2, IL-17 i IFN- $\gamma$  (100). U kiselom mediju se VISTA veže na PSGL-1 i tako blokira T stanično djelovanje (101).

Najvažniji koinhibitorska molekula na T stanicama koja kojom se regulira djelovanje TIL je PD-1 koji je opisan ranije. Vezanjem na PD-L1 i PD-L2 kojeg nalazimo u TME dolazi do suprimiranja učinka T limfocita.

## 3 PD-1/PD-L1 signalni put

### 3.1 Izražavanje PD-1 na T limfocitima

*Programmed cell death protein 1* odnosno PD-1 (CD279) molekula je koja se pojavljuje na staničnoj membrani nekolicine imunoloških stanica, najzamjetnije na površini CD8<sup>+</sup> T limfocita. Otkrivena je 1992. godine, a djelovanje joj je primarno u perifernoj toleranciji i kontrolira adekvatan odgovor na antigen. Kodirajući gen *Pdcd1* nalazi se na 2q37 i stvara 55 kDa transmembranski protein s 288 aminokiselina. Izvanstanični dio tvori N-terminalna domena koja je nalik na Ig-V, transmembranska domena nastavlja se na citoplazmatsku koja završava tirozinskim bazama na C-terminalnom i na N-terminalnom kraju, koje definiraju imunoreceptorske na tirozinu bazirajuće inhibitorne motive (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) (102, 103).

PD-1 povezan je primarno s aktiviranim T limfocitima i smatra ga se značajkom efektorske T stanice (104). Naime, prilikom aktivacije naivnih T limfocita i vezanja kompleksa p-MHC na TCR, pokreće se kaskada signalnih puteva koja otvara puni efektorski potencijal T limfocita. Jedan od signalnih puteva ovisan je o Ca<sup>2+</sup> i pokreće kalcineurinski put, što aktivira i NFATc1. NFATc1 se snažno veže na CR-C promotorsku regiju *Pdcd1* gena i djeluje kao prvi korak u aktivaciji ekspresije PD-1 (105). S NFATc1 najčešće kao aktivatori ekspresije djeluju AP-1 signalni put (106) i Notch signalni put (107). Izražavanje PD-1 u T limfocitima je i ograničeno u slučaju akutnih imunoloških odgovora, a inhibicija ekspresije regulirana je putem T-bet puta (*T-box expressed in T cells*) i Blimp-1 puta (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) (108, 109) koji se uključuju unutar tjedan dana od aktivacije T limfocita i ograničavaju PD-1 nakon akutnog imunološkog odgovora.

Tumore i kronične infekcije obilježava trajna povišena ekspresija PD-1 na površini CD8<sup>+</sup> T limfocita (110). Razlog tomu je produljena ekspozicija TCR na p-MHC što dovodi do

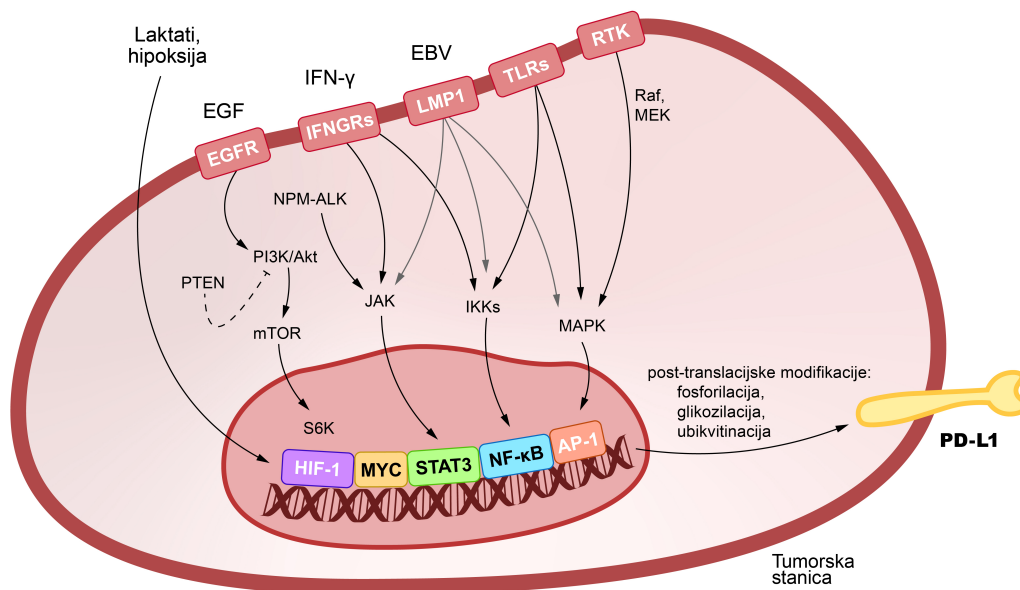
aktivacije FoxO1 signalnog puta koji dokida djelovanje T-bet i nadjačava djelovanje Blimp-1 inhibitora ekspresije PD-1 (111). Na izražaj PD-1 djeluje i okoliš u kojemu se nalazi T limfocit, što je dokazano kroz pojačano i produljeno izražavanje PD-1 u slučaju povećane koncentracije IL-6 i IL-12 koje aktiviraju STAT3 i STAT4 signalne puteve i pojačavaju PD-1 ekspresiju (112). Na izražajnost PD-1 u uvjetima kronične izloženosti antigenu ulogu ima i demetilacija CpG dinukleotida u promotorskoj regiji *Pdcd1* gena koja sadrži dodatna mjesta za NFAT i vezno mjesto ovisno o interferonima (ISRE). Na izražaj PD-1 utjecaj imaju i posttranslacijske promjene poput ubikvitinacije, citokinske okoline, pogotovo TGF-β i IL-10 i promjena metabolizma koja obilježava aktivirane T limfocite (113).

### 3.2 Regulacija izražavanja PD-L1 i PD-L2 u tumorskom mikrokolišu

PD-L1, zajedno s PD-L2, ligand je PD-1 kontrolne točke na aktiviranim T limfocitima. Kao što je ranije opisano, ovaj put inhibicije djelovanja TIL jedan je od osnovnih puteva imunosupresije u TME. Iako se prvotno smatralo kako je imunosupresija jedna od značajki koja je svojstvena velikom broju solidnih tumora, primijećeno je kako je imunosupresivan okoliš zapravo odgovor na imunološki napad kojeg tumori doživljavaju u prve dvije faze imunološkog uređivanja, te da nastaje prilagodiva otpornost (engl. *adaptive resistance*) (72).

PD-L1 je kodiran od strane *Pdcd1* gena koji se nalazi na kromosomu 9p24.1.2 i 1999. godine je opisan kao treći član obitelji B7 proteina. Puna duljina PD-L1 kodirana je unutar sedam eksona i odgovara proteinu od 40kDa i 290 aminokiselina. To je tip 1 transmembranskog proteina i sastoji se od ekstracelularnih domena koje su slične IgV i IgC, hidrofobnog transmembranskog dijela i citoplazmatskog repa koji se sastoji od 30 aminokiselina.

Nekoliko studija pokazalo je kako je količina



Slika 1: Regulacija transkripcije PD-L1 u tumorskim stanicama. Transkripcija PD-L1 počinje nakon aktivacije nekoliko signalnih puteva, primarno EGF/PI3K/AKT/MTOR koje suprimira PTEN, RTK/Ras/Raf/MEK/ERK signalni put, IFN- $\gamma$ /JAKs signalni put koji uključuje NPM-ALK mutirani geni EBV aktiviran LMP1 te TLRs/Myd88/Traf6/IKKs. Hiposkičan i laktatom obogaćen tumorski mikrookoliš direktno djeluje na povećanje transkripcije PD-L1. Prema Wang i sur. (114).

B7-H1, odnosno PD-L1, izražaja u tumorskim lezijama snažno povezana s CD8<sup>+</sup> T limfocitnom infiltracijom i djelovanjem IFN- $\gamma$  (115) (slika 1). Infiltracija CD8<sup>+</sup> T limfocita povezana je i s povećanom količinom FoxP3<sup>+</sup> TReg i MDSC stanica, te s većom aktivnošću ranije opisanih imunosupresivnih enzima, primarno IDO, iNOS i arginaze, kao i reaktivnih kisikovih spojeva (116). Ta su istraživanja pokazala kako je imunosupresija u tumorima mnogo kompleksnija od same povećane ekspresije inhibitora kontrolnih točaka, nego uključuje događaje i u neoplastičnim i u stromalnim stanicama TME. Model koji objašnjava povećanu izražajnost PD-L1 u TME inicijatore je podijelio na primarne, neimunološke i sekundarne, imunološke. Neimunološki se sastoje od genskih promjena, kontroli na bazi mikro RNA, promjenama uvjetovanim onkogenim transkripcijama i putevima te posttranslacijskoj modulaciji i prometovanju (117).

PD-L1 (CD274) kodiran je genom koji se nalazi na 9p24.1, a genske manipulacije na tom lokusu najčešće dovode do povećavanja ekspresije PD-L1 u hematološkim i solidnim tumorima, dok je izražaj PD-L2 mnogo veći u hematološkim

tumorima (118). Poremećaji u JAK2, DSBs i strukturne varijacije u 3' netranslatirana regija (engl. *untranslated region*, UTR) također na genetskoj razini povećavaju ekspresiju PD-L1 u tumorima. Epigenetski faktori poput metilacije i acetilacije histona također su zaslužni za dio povećane ekspresije PD-L1 (119). U slučaju 3' UTR-a primijećen je velik broj mikro RNA (miRNA) koji se veže na 3' UTR PD-L1 mRNA i na taj način reguliraju izražajnost PD-L1. miR zapravo suprimiraju izražajnost PD-L1, ali pod djelovanjem IFN- $\gamma$  miR-513 miRNA molekula je blokirana i na taj način pojačava izražajnost PD-L1. Proimunološki citokini poput TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  djeluju suprotno na miR-155, te putem njega dovode do supresije PD-L1 (120). Otkriven je velik broj drugih miRNA molekula koje imaju suprimirajuće djelovanje na izražavanje PD-L1 (121).

Onkogeni putevi i transkripcijski faktori, uz to što su jedni od glavnih pokretača tumorigeneze, pokazuju veliku ulogu u povećanju izražajnosti PD-L1 u tumorskim stanicama. MYC gen pojačano je izražen u većini ljudskih tumora, a pokazano je kako njegova povećana ekspresija povećava izražajnost PD-L1 u ne-sitnostaničnom

karcinomu pluća, melanomu i hematološkim tumorima (122). MYC se veže direktno na PD-L1 promotor, što rade i drugi transkripcijski faktori poput STAT3, RELA i STAT1 (123). Hipoksija, koja je ranije opisana kao jedna od temeljnih značajki TME, inducira HIF-1 $\alpha$  i HIF-2 $\alpha$  koji oboje dokazano fizički djeluju na promotorsku regiju PD-L1 koja odgovara na hipoksiju (124). Indukcija PD-L1 pokazana je i u slučaju aktivacija PI3k-Akt, MEK-ERK i ALK signalnih puteva u velikom broju solidnih tumora. Posttranslacijska modifikacija u vidu ubikvitinacije, deubikvitinacije, glikozilacije i fosforilacije također uvjetuje izražajnost PD-L1 u tumorskim stanicama (121).

Uz ranije navedene, tumoru intrinzične, mehanizme povećanja izražajnosti PD-L1 jedan od glavnih uzroka je prilagodiva rezistencija, stvorena nakon imunološkog napada. Citokin koji zaslužuje najviše pažnje u ovom slučaju je IFN- $\gamma$ , proupalni citokin koji je jedna od značajki tip 1 imunološkog odgovora koji je dominantan u fazama uklanjanja imunološkog uređivanja. Pozitivno djelovanje na PD-L1 primijećeno je ne samo u tumorskom tkivu, nego i u zdravom tkivu, pogotovo na imunološki privilegiranim mjestima (125). IFN- $\gamma$ , kao i ostali interferoni IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$ , djeluje tako da potiče ponajviše JAK/STAT1 signalni put, ali i MAK14, CRK i PI3K za koje je pokazano da pozitivno djeluju na promotorsku regiju PD-L1 gena (126). Kao što je ranije navedeno, IFN- $\gamma$  djeluje i preko mikro RNA kontrole, putem miR-513. Iako inače djeluje imunosupresivno TGF- $\beta$  pokazuje dvojaku ulogu pri prikazivanju PD-L1, potičući je u dendritičkim stanicama i suprimirajući ju u tubularnim epitelnim stanicama i monocitima. Uz navedene citokine, pokazano je kako skoro svaka molekula u TME djeluje na izražajnost PD-L1.

### 3.3 Djelovanje PD-L1 na T limfocite u tumorskom mikrookolišu

Aktivirani T limfociti, s povećanom izražajnošću PD-1 na staničnoj membrani, u TME dolaze u kontakt s PD-L1 ili s PD-L2 i tada mijenjaju svoju konformaciju. Dolazi do promjene položaja PD-1 koji se smještaju u središte imunološke sinapse u c-SMAC (engl. *central supramolecular*

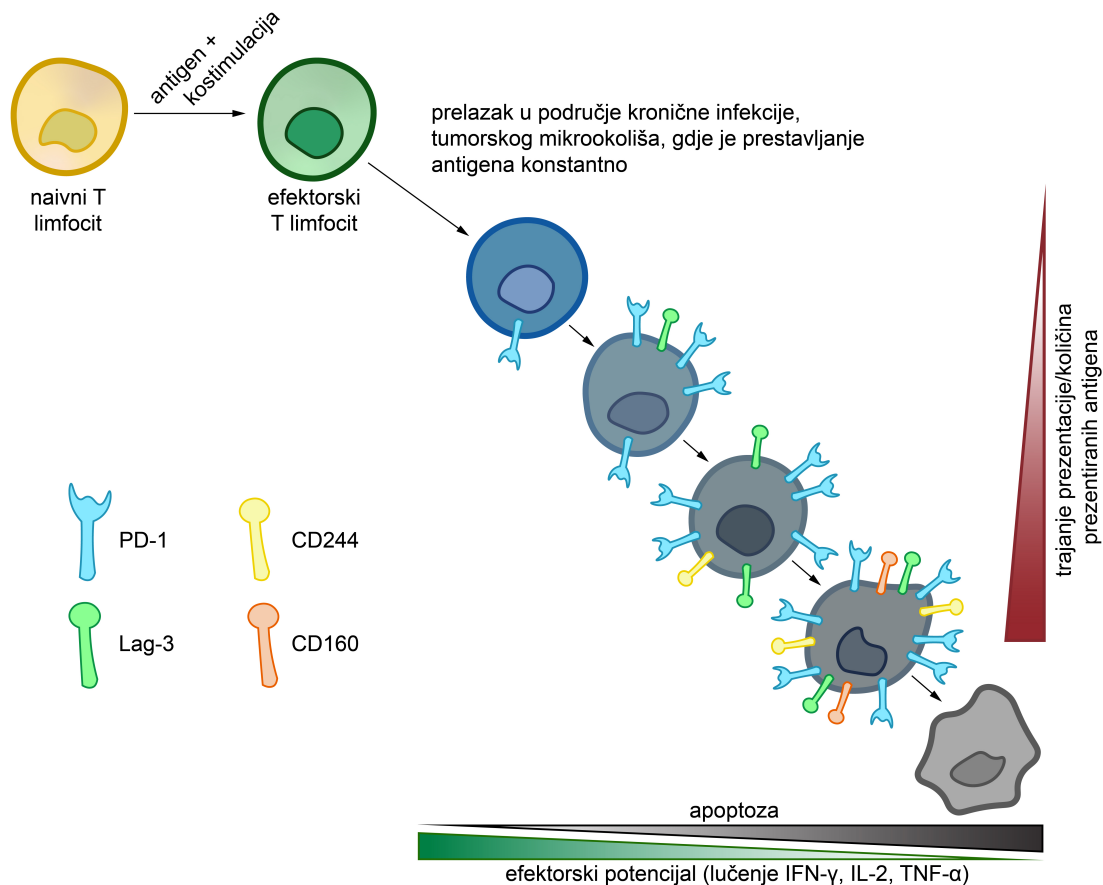
*activation cluster*). Citoplazmatski dio PD-1 postaje fosforiliziran putem obitelji Src kinaza i ti fosforilizirani ITIM motivi služe kao mjesto vezanja tirozinske fosfataze SHP-2 (127). Angažiranje SHP-2 u blizini TCR smanjuje njegovu djelotvornost, pogotovo u slučajevima Lck provođene fosforilacije ZAP70. Ujedno zahvaća signalne puteve nizvodno, pogotovo PI3K-AKT, RAS, ERK, VAV i fosfolipazu C $\gamma$  (128).

RAS-MEK-ERK i PTEN-PI3K-AKT su dva važna signalna puta koja su zahvaćena ligacijom PD-1 (129). PTEN je serin-treonin fosfataza koja djeluje protiv PI3K-Akt signalnog puta, a njena je aktivnost povećana putem aktivacije PD-1 puta preko CK2. U slučaju MEK-ERK-MAP signalnog puta, ligacija PD-1 dovodi do inhibicije fosfolipaze C $\gamma$ . Svi ovi događaji dovode do nizvodnog slabijeg djelovanja transkripcijskih faktora i do inhibicije proliferacije, aktivacije, preživljavanja, i do minimiziranja citokinske produkcije i citotoksičnih sposobnosti aktiviranih T stanica (130).

### 3.4 Iscrpljeni T limfociti

Iscrpljenost (engl. *exhaustion*) stanje je T limfocita koje je opisano smanjenom proliferacijom, povećanom izražajnošću inhibitorynih receptora poput PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4 i TIGIT i smanjenom proizvodnjom IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  i granzima (slika 2). Iscrpljeni T limfociti postaju značajka TME u kroz faze ravnoteže i imunološkog bijega, te postaju dominantna skupina CD8<sup>+</sup> T limfocita u TME. Kao glavni znak T stanične iscrpljenosti pokazala se upravo ekspresija PD-1. U istraživanjima koja su proučavala stanje iscrpljenih T limfocita u TME primijećeno je kao istovremena ekspresija PD-1 i druge ko-inhibitorne molekule, primarno CTLA-4, obilježava stanice s najvećim stanjem iscrpljenosti. Uz PD-1 i CTLA-4 i drugi ranije navedeni koinhibitorni putevi sudjeluju u regulaciji stanja T limfocita. Upravo okolina koja okružuju ove stanice je najzaslužnija za njihov fenotip, metabolizam i funkcionalnost (132).

Mehanizmi dovođenja CD8<sup>+</sup> T limfocita u stanje iscrpljenosti su višestruki. Prilikom samog aktiviranja CD8<sup>+</sup> limfocita u TME, T stanicama je predstavljeno tkivo niže imunogenosti, a TCR



Slika 2: Shema nastanka iscrpljenih T limfocita. Nakon inicijalnog podražaja i kostimulacije efektorski T limfociti u kroničnim upalama i tumorskom mikrookolišu hijerarhijski postaju sve iscrpljeniji. Gube efektorsku sposobnost, a izražajnost inhibitorskih receptora se povećava. Prema Wherry, E. (131).

imaju sniženi afinitet za tumor-specifične antigene (133). Kao što je ranije objašnjeno, u tumorskom tkivu mehanizmi predavljanja antigena često poremećeni što, zajedno s imunosupresivnom citokinskom klimom koja je često značajka TME, onemogućuje potpunu aktivaciju T stanica, iz naivnih u efektorske. Većina efektorskih T stanica koje infiltriraju TME već su aktivirane u sekundarnim limfnim organima i pokazuju efektorski fenotip  $CD44^{high}CD62L^{low}$  (134). Dolaskom u TME te stanice počinju pokazivati fenotip iscrpljenih T limfocita. Razlog tomu je interakcija PD-1 i njegovih liganda, dakle u TME solidnih tumora najčešće PD-L1, kao i drugih koinhibitornih kontrolnih točaka sa njihovim ligandima. Kao nužan uvjet vrijedi kronična ekspresija p-MHC prema TCR efektorske stanice što dovodi do kronične ekspresije PD-1 molekule na površini T limfocita i na račun toga ligacije PD-1 s PD-L1 koja onemogućava djelovanje T

limfocita.

Posredno i neposredno djelovanje na T staničnu iscrpljenost imaju i stanice koje u TME održavaju imunosupresivno stanje, pogotovo  $T_{Reg}$ , MDSC, DC i M2 tip makrofaga, mehanizmima koji su objašnjeni ranije. Osim interakcija na razini međustanične komunikacije iscrpljenosti pridonose i promjena metabolizma nakon ligacije PD-1/PD-L1 te metabolički uvjeti u samom TME. Naime, metaboličke i nutritivne restrikcije koje su postavljene pred efektorske T limfocite u TME smanjuju glikolitički metabolizam i time efektorski kapacitet stanica. Vežanje PD-L1 sudjeluje u promjeni metabolizma kroz inhibiciju ranije opisanih signalnih puteva. Pošto ti signalni putevi sudjeluju i u važnim metaboličkim procesima prerade ugljikohidrata, aminokiselina i nukleotida iscrpljeni T limfociti pokazuju suprimiranu glikolizu i smanjenu oksidativnu



fosforilaciju. Za razliku od CTLA-4 koji suprimira i metabolizam masti, prilikom ligacije PD-L1 u T limfociti pojačan je metabolizam masti, povećanjem aktivnosti karnitin palmitil transferaze (CPT1A) i adipocitne triglicerid lipaze (135). Primijećeno je kako je regulator mitohondrijske biogeneze PPAR- $\gamma$  koaktivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) ključna molekula u regulaciji T stanične iscrpljenosti. Djelovanjem na AKT signalni put, PD-1 može smanjiti izražajnost PGC1 $\alpha$  te tako smanjiti mitohondrijsku masu i uzrokovati morfološke i funkcionalne defekte (136).

Uz metaboličko reprogramiranje, T stanice su zahvaćene i metaboličkim proizvodima neoplastičnih stanica. Hipoglikemija djeluje neposredno, aktivirajući pojačavajući PD-1 izražajnost i smanjujući izražajnost fosfoenolpirovata (PEP) i sarko/ER Ca<sup>2+</sup>-ATPaze (SERCA) koja potiču aktivaciju efektorskih funkcija u T limfocitima. Hipoglikemija također potiče diferencijaciju stanica prema T<sub>Reg</sub> (137). Kao rezultat anaerobnog metabolizma i snažnog glukoznog toka u neoplastičnim stanicama, TME biva ispunjen laktatima koji, osim što inhibiraju funkciju citotoksičnih T limfocita, mijenjaju fenotip M1 makrofaga u imunosupresivni M2 te induciraju arginazu (138). Arginaza zajedno sIDO također funkcionalno onesposobljava T limfocite, kao što je opisano ranije. Od značaja je i hipoksija koja djeluje na NFATc1 signalni putem HIF-1 $\alpha$  te povećava PD-L1 izražajnost na tumorskim stanicama (139).

### 3.5 Mehanizmi djelovanja inhibitora PD-1 i PD-L1

Blokiranjem signalnog puta u kojem sudjeluju PD-1 i njegov ligand u TME PD-L1 moguće je povećati funkcionalnost i snagu odgovora CD8<sup>+</sup> odgovora protiv tumora. Dokidanjem signalizacije koju PD-1 dobiva od svog liganda, moguće je ponovno uspostaviti aktivnost iscrpljenih T limfocita, obrnuti ranije navedene mehanizme kojima se smanjuje njihova učinkovitost i istima omogućiti djelovanje protiv neoplastičnih stanica, uz daljnju povećanu izražajnost PD-L1 u TME (140).

Klinički modeli ukazuju na to da blokada PD-1 signalne osi pokazuje najveći učinak u

tumorima koji su već pretrpjeli svoj prvotni imunološki napad putem CD8<sup>+</sup> T limfocita te u kojima postoje iscrpljeni antigen specifični TIL-ovi, utihnute djelovanjem PD-L1 i PD-L2 (141). Klinički odgovor na anti-PD-1 prikazan je i u nekim tumorima s niskom, čak i bez, ekspresijom PD-L1 (PD-L1 negativni tumori) što upućuje na činjenicu da vjerojatno nije potrebna ranija tumorska infiltracija i imunološki napad od strane T limfocita. Prvi koji pokazuju znakove proliferacije i pojačanja funkcije su CXCR5<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T limfocit. Nadalje, primijećeno je kako iscrpljeni T limfociti pokazuju poseban fenotip, koji je ovisan o stupnju i duljini trajanja iscrpljenosti, a ta heterogenost dovodi do heterogenosti u načinu odgovora na blokadu PD-1 molekule (142). Iako blokada PD-1 primarno djeluje na CD8<sup>+</sup> T stanice, za efektivno djelovanje nakon blokade nužne su CD4<sup>+</sup> T stanice (143). Na temelju djelovanja anti-PD-1 u kontekstu virusnih infekcija vjeruje se da T<sub>H</sub> stanice pomažu u proliferaciji CD8<sup>+</sup> T stanica i u ulasku antitijela u periferna tkiva (144). Kao što je naglašeno ranije, važna stavka prilikom djelovanja PD-L1 ligacije na PD-1 je promjena metabolizma u CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Nakon blokiranja PD-1 metabolizam CD8<sup>+</sup> T limfocita vraća se u stanje aktiviranosti, što također utječe na osnaživanje T staničnog odgovora u TME (145). Zbog ubikvitarnosti PD-L1 u TME blokada PD-L1 uzrokuje gotovo identične rezultate kao i blokada PD-1. Razlike postoje, ali mehanizam kojim točno djeluje blokada bilo PD-1 bilo PD-L1 nije u potpunosti poznat i shvaćen (146).

Wei i sur. predlažu tri modela kroz koje inhibicija kontrolnih točaka, bilo PD-1/PD-L1 osi, bilo CTLA-4 ili drugih kontrolnih točaka povećava imunološki odgovor T limfocita. Prvi model pretpostavlja da blokada kontrolnih točaka omogućuju pozitivnu kostimulaciju u razinama jednakima onima prije iscrpljivanja T limfocita. Drugi se model zasniva na smanjenju potrebnog afiniteta TCR prema p-MHC koji omogućuje snažniji odgovor, dok treći opisuje osnaživanje kostimulacijskih signala i stvaranje odgovora koji je snažniji od onoga bez blokade. Modeli nisu međusobno isključivi, ali omogućuju kvalitetno razmišljanje i odabir puta prilikom istraživanja i dalje nepoznatih mehanizama djelovanja blokade PD-1 i PD-L1 (147).

## 4 Imunoterapija PD-1 i PD-L1 inhibitorima

### 4.1 Inhibitori PD-1 i PD-L1 u kliničkoj praksi

Primijećena potentnost blokade PD-1/PD-L1 osi u T limfocitima koji infiltriraju TME isprobana je u kliničkoj praksi. Najznamenitiji lijekovi su blokatori PD-1 molekule nivolumab i pembrolizumab te blokatori PD-L1 atezolizumab, durvalumab i avelumab. Klinička istraživanja za određena sijelima objašnjena su niže, dok je više detalja i njihova primjena u Republici Hrvatskoj prikazana u tablici 1.

Nivolumab i pembrolizumab su monoklonalna protutijela koja se visokim afinitetom vežu na PD-1. Pripadaju IgG4 klasi i molekularne su težine 156 odnosno 149 kDa (148, 149). Ni jedno ni drugo ne aktiviraju komplementarnu kaskadu koja dovodi do citotoksičnosti (CDC) niti posjeduju sposobnost stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelu (ADCC) (150). Direktno zahvaćaju i blokiraju PD-1 vezno mjesto pri čemu im je epitop izrazito sličan (151). Pembrolizumab pokazuje veći afinitet za vezno mjesto na PD-1 od nivolumaba, te stvara stabilnije veze brže od nivolumaba (152, 153). Ujedno pembrolizumab zahvaća 100% PD-1 na 1mg/kg, dok je kod nivolumaba zabilježena vrijednost od 85% za 10mg/kg (154). Farmakokinetički su lijekovi slični s volumenom distribucije od 8L i minimalnom distribucijom van plazme (155).

Protutijela koja se vežu na PD-L1 su atezolizumab, durvalumab te avelumab, težine od otprilike 150 kDa i klase IgG1 (156, 157). Među njima samo avelumab može inducirati ADCC koji mu omogućava dodatnu djelotvornost putem indukcije NK stanica (158). Epitopi ovih protutijela su različiti, s određenim stopama preklapanja (159). Durvalumab i atezolizumab pokazuju sličan afinitet, dok je afinitet avelumaba veći od oba ranije spomenuta (160). Volumen distribucije svih lijekova je sličan i kreće se u rasponu od 3.45 do 6.9 L (161, 162).

#### 4.1.1 Melanom

Melanomi su se dugi period vremena držali za jedine izrazito imunogene tumore. Ti stavovi

su se bazirali na činjenicama da su opisane spontane regresije primarnih tumora, pri čemu je TME bio ispunjen infiltrirajućim T limfocitima (163). Ujedno u otprilike 5% pacijenata opisani su *melanomi bez primarnog sijela* u kojih je metastaza klinički izražena, ali je primarno sijelo vjerojatno uništeno u fazi uništenja imunološkog uređivanja (164).

Ova su zapažanja iskorištena u kliničke svrhe te su na prijelazu tisućljeća provedene studije u kojima se pacijentima s melanomom davala terapija visokih doza IL-2 (engl. *high-dose IL-2*, HD IL-2) koja je uz veliki broj nuspojava i nezadovoljavajuć ORR (engl. *objective response rate*) i dalje u malog broja pacijenata pokazala izrazitu potettnost i održanu regresiju u trajanju od 10 godina. Na temelju tih pronalazaka, ali i daljnjih istraživanja, u kliničku su uporabu 2010. godine pušteni lijekovi koji onesposobljavaju dvije kontrolne točke - ipilimumab koji je protutijelo protiv CTLA-4 te pembrolizumab koji djeluje protiv PD-1.

Krovna organizacija u SAD-u - FDA, odobrila je uporabu prvog protutijela koji se veže na PD-1 pembrolizumaba u rujnu 2014. godine pod indikacijom metastatskog melanoma koji je ranije liječen ipilimumabom. Ovo odobrenje temelji se na kliničkoj studiji KEYNOTE-001, a kasnije studije poput CHECKMATE-037 prikazala su slične rezultate (165, 166). U prvoj studiji se promatrala efikasnost i sigurnost dvije doze pembrolizumaba, 2 mg/kg i 10 mg/kg, danih intravenski (i.v.) svaka tri tjedna. Pacijenti koji su primali terapiju bili su refraktorni na ipilimumab. Konačni rezultati pokazali su kako većina tretiranih pacijenata pokazuje značajno poboljšanje u periodu od 6 mjeseci te je samo 12% pacijenata pokazalo teže nuspojave, što je u skladu s ranijim kliničkim istraživanjima anti-PD-1 terapije (167). Druga studija uspoređivala je djelovanje drugog anti-PD-1 lijeka nivolumaba u usporedbi s kemoterapijom, dakarbazinom ili kombinacijom karboplatine i paklitaksela. Rezultati su pokazali viši ORR i niži stupanj težih nuspojava. Kasnije studije u pacijenata koji nisu ranije bili tretirani ipilimumabom i bez *BRAF*

mutacije pokazala su još bolje rezultate (168).

Anti-PD-1 terapija je pokazala superiornost nad anti-CTLA-4 terapijom i zbog bolje tolerancije i zbog bržeg nastupa djelovanja, koje je bilo od posebne važnosti u pacijenata s višim stadijem bolesti (169).

#### 4.1.2 Karcinom pluća nemalih stanica

Karcinom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*, NSCLC) čini oko 85% tumora pluća pri čemu je u većine pacijenata dijagnosticiran u stadijima sa smanjenim uspjehom izlječenja. Metastatski je NSCLC tumor kojemu je često potreban multidisciplinarni pristup, s kirurškom terapijom koja pokazuje najveće stope uspjeha u početnim stadijima bolesti. Dugogodišnja istraživanja terapiju

su usmjeravala na kemoterapiju baziranu na docetakselu i cisplatinu, radioterapiji te raznim protutijelima, što na okolne čimbenika u TME što na signalne puteve unutar neoplastičnih stanica, ERK i ALK poput bevacizumaba i gefitiniba, erlotiniba i ceritiniba (170).

Paralelnim istraživanjima na inhibitorima kontrolnih točaka ostvareni su uspjesi i na ranije liječenim pacijentima i na pacijentima koji nisu imali ranije terapije. Ono što je specifično za NSCLC je njegova heterogenost, po pitanju TMB i po pitanju ekspresije PD-L1 u TME (171). O ovisnosti uvjeta unutar TME i odgovora na terapiju PD-1 i/ili PD-L1 inhibitorima više kasnije.

U ožujku 2015. godine nivolumab postaje prvi inhibitor kontrolne točke kojega FDA

Tablica 1: Lijekovi koji djeluju kao blokatori osi PD-1/PD-L1; \* indikacije za lijekove u Republici Hrvatskoj kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim lijekovima

Meta	Djelatna tvar	Tvorničko ime (proizvođač)	Ig izotip	Indikacije*
PD-1	nivolumab	Opdivo (Bristol-Myers Squibb)	ljudsko IgG4 monoklonsko protutijelo	melanom, rak pluća nemalih stanica, karcinom bubrežnih stanica, klasični Hodgkinov limfom, planocelularni rak glave i vrata, karcinom urotela
	pembrolizumab	KEYTURDA (Merck)	humanizirano IgG4 monoklonsko protutijelo	melanom, rak pluća nemalih stanica, karcinom bubrežnih stanica, klasični Hodgkinov limfom, planocelularni rak glave i vrata, karcinom urotela
PD-L1	atezolizumab	Tecentriq (Roche)	humanizirano IgG1 monoklonsko protutijelo	urotelni karcinom, rak pluća nemalih stanica, trostruko negativan karcinom dojke
	durvalumab	IMFINZI (AstraZeneca)	ljudsko IgG1 monoklonsko protutijelo	rak pluća nemalih stanica
	avelumab	Bavecino (Merck)	ljudsko IgG1 monoklonsko protutijelo	metastatski karcinom Merkelovih stanica, karcinom bubrežnih stanica

odobrava za uporabu u slučaju metastatskog skvamoznog NSCLC koji je napredovao nakon prve linije kemoterapije. Prva studija koja je promatrala uspješnost anti-PD-1 lijeka je CHECKMATE-017, u kojoj je nivolumab uspoređivan s docetakselom. Pacijentima je davana doza nivolumaba od 3mg/kg svaka dva tjedna. Uz to što je ispunjen primarni cilj, a to je povišenje ukupnog preživljenja (engl. *overall survival*, OS) s 6.0 mjeseci u pacijenata kojima je indiciran docetaksel na 9.2 mjeseca u pacijenata koji su primali nivolumab te je median preživljenja bez progresije produljen za 0.7 mjeseci, pokazan je i manja stopa opasnosti od čak 41% manje u skupini koja je primala nivolumab nego u slučaju primjene docetaksela (172). U slučaju neskvamoznih NSCLC provedena je studija pokazala slične rezultate, s posebnim promatranjem pacijenata koji su imali ERK i ALK mutacije. Ono što je važno za naglasiti je kako je u prvoj studiji primijećena mnogo manja ovisnost o TME i izražajnosti PD-L1. U drugoj studiji, iako izražajnost PD-L1 u nekih pacijenata nije bila značajna, nivolumab je pokazao rezultate jednake docetakselu (173).

Na temelju uspješnih rezultata nivolumaba u prve faze KEYNOTE-001 studije provedena su istraživanja na pembrolizumabu, u pacijenata koji su ranije bili tretirani za NSCLC i imali PD-L1 ekspresiju veću od 1%. Nakon sjajnih rezultata koji su ovisi o izražajnosti PD-L1 u TME u listopadu 2015. godine FDA je odobrio uporabu pembrolizumaba u pacijenata koji su ranije bili tretirani kemoterapijom na bazi platine i koji su iskazivali minimalno 1% PD-L1, što je s obzirom na referiranu studiju KEYNOTE-010 bilo čak 80% pacijenata (174). Godinu danas kasnije, na temelju KEYNOTE024 studije pembrolizumab je odobren kao prva linija terapije u pacijenata s metastatskim NSCLC koji imaju izražajnost PD-L1 veću od 50% (175). Sekundarnom analizom KEYNOTE-001 studije pokazano je kako pacijenti koji su ranije zračeni imaju bolje rezultate nego nezračeni nakon aplikacije pembrolizumaba (176).

Uz ranije navedena protutijela koja se vežu na PD-1 u NSCLC djelovanje pokazuju i protutijela na PD-L1, u prvom redu atezolizumab. Zbog pokazanih rezultata naspram karboplatine s paklitakselom, i to u kombinaciji

s bevacizumabom, FDA je omogućio korištenje atezolizumaba u metastatskom NSCLC u svih pacijenata, jer nije primijećena ovisnost o izražajnosti PD-L1 u TME (177). Obećavajuće rezultate su pokazali i drugi inhibitori PD-L1 - durvalumab i avelumab (178).

#### 4.1.3 Karcinomi urološkog sustava

Karcinom bubrežnih stanica (engl. *renal cell carcinoma*, RCC) tumor je koji se u ranijim stadijima bolesti uspješno liječi kirurški, ali metastatski se oblik (mRCC) dugo vremena smatrao nelječivim. Krajem prošlog tisućljeća imunološka terapija koristila se u slučaju mRCC u obliku HD IL-2 te *offlabel* bolus IFN- $\alpha$ , ali su obje terapije napuštene zbog znatnih nuspojava koje su uzrokovale (179).

U studenome 2015. godine FDA je odobrio korištenje nivolumaba u slučajevima naprednog RCC u pacijenata koji su ranije primili antiangiogene lijekove, primarno bevacizumab. U fazi III CHECKMATE-025 kliničkog testiranja opisani pacijenti su primali 3mg/kg nivolumaba i.v. svaka 2 tjedna, dok je kontrolna skupina primala everolimus koji je bio standard terapije u tome trenutku (180). Median OS znatno je unaprijeđen u slučaju nivolumaba 25.0 naspram 19.6 (HR 0.72,  $p = .002$ ) te bolji ORR 25% naspram 5% u slučaju everolimusa ( $p = .001$ ). Uz navedenu skupinu s nivolumabom smanjen je broj nuspojava te je poboljšana kvaliteta života (181). Ono što je također primijećeno je da ishod terapije nije ovisio o izražajnosti PD-L1 u TME (182).

U slučaju karcinoma mokraćnog mjehura, napredak kemoterapije prestao je prije tridesetak godina otkada se ista zasniva na cisplatinu u pacijenata koji zadovoljavaju uvjete. U posljednje vrijeme odobrena je terapija blokatorima PD-L1 atezolizumabu, durvalumabu i avelumabu (156, 183, 184) te blokatorima PD-1 nivolumabu i pembrolizumabu (185).

#### 4.1.4 Karcinom dojke

Karcinom dojke najčešći je oblik tumora u žena diljem svijeta, a o njegovoj ozbiljnosti govori i statistika vezana za rak dojke u Republici Hrvatskoj i Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke (186). Trenutno je liječenje raka dojke usmjereno na određene

tipove raka dojke s obzirom na izražavanje staničnih hormonskih receptora. Estrogeni receptor (ER), progesteronski receptor (PR) i receptor za epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2) mogu biti izraženi na površini neoplastičnih stanica, i s obzirom na izražajnost pacijenticama prepisujemo hormonalnu terapiju ili HER2 usmjerenu terapiju. Trostruko negativni karcinom dojke (engl. *triple-negative breast cancer*, TNBC) se tradicionalno liječi putem kemoterapije pošto ne postoji usmjerena terapija, a u sve je fenotipove uključeno i kirurško liječenje (187). Veliki problem s dosadašnjom terapijom je što mnoštvo žena doživi relaps bolesti koji je povezan s visokim mortalitetom.

Karcinomi dojke razlikuju se fenotipski među pacijenticama, ali velika stavka po kojoj se razlikuju su i zastupljenost TIL-ova, TMB i izražajnost PD-L1 (188). Po toj je heterogenosti sličan karcinomu pluća. O tim faktorima više kasnije.

Vezano za efikasnost djelovanja pembrolizumaba u metastatskom TNBC provede su tri kliničke studije, KEYNOTE-012 u kojoj su neki od pacijenata bili TNBC s PD-L1 ekspresijom  $\geq 1\%$  (189), KEYNOTE-086 u kojoj su također promatrani metastatski TNBC pacijenti podijeljeni u dvije kohorte - ranije tretirane u kojima se nije promatrala ekspresija PD-L1 i ranije netretirane s ekspresijom PD-L1  $\geq 1\%$  (190) te KEYNOTE-014 (PANACEA) u kojoj se proučavala učinkovitost pembrolizumaba u kombinaciji s trastuzumabom (anti-HER2) u HER2<sup>+</sup> pacijentica (191). U svim studijama primijećeni su bolji stupnjevi ORR, CR (engl. *complete response*) i PR (engl. *partial response*) u pacijentica koje su primale pembrolizumab (sam ili u kombinaciji s drugim lijekom) nego u kontrolnim skupinama.

Budući da je monoterapija inhibitorima PD-1/PD-L1 osi pokazala kliničku limitiranost, nekoliko studija u kojima je zajedno korišten inhibitor kontrolne točke i kemoterapija, pokazale su mnogo bolje rezultate u usporavanju napretka bolesti i ukupnom preživljavanju pacijentica. Studija KEYNOTE-355 koja se nastavlja na ranije studije pembrolizumaba u pacijentica s metastatskim TNBC istraživala je uspješnost kombinacije pembrolizumaba i nab-paklitaksela (engl. *nanoparticle albumin-bound paclitaxel*).

Kombinirana je terapija pokazala značajno poboljšanje u ukupnom preživljenju u pacijentica s metastatskim i neoperabilnim TNBC koje ranije nisu tretirane, nego što je bio slučaj u kontrolnoj skupini koja je bila tretirana isključivo nab-paklitakselom (192).

Slični rezultati su prikazani i u studiji u kojoj se koristio atezolizumab, inhibitor PD-L1, IMpassion130. Pacijentice s lokalnim, neresektabilnim ili metastatskim TNBC tretirane su s kombinacijom atezolizumaba i nab-paklitaksela. Median preživljenja bez progresije bolesti povišen je za nešto manje od dva mjeseca u skupini koja je primala kombiniranu terapiju (193). Čimbenik od izuzetnog značaja u ovoj studiji bila je ekspresija PD-L1 u TME, što je izraženo u mnogi istraživanjima i bit će pojašnjeno kasnije. Postoje indikacije da bi drugo anti-PD-L1 protutijelo - avelumab pokazalo klinički benefit (194).

## 4.2 Prediktivni čimbenici i biomarkeri

Iako su lijekovi koji funkcioniraju na blokadi PD-1/PD-L1 osi pokazali veliku učinkovitost u kliničkim istraživanjima, samo dio pacijenata pokazuje značajno poboljšanje kliničkog stanja. Razlike u odgovoru razlikuju se među tumorima različitih sijela, ali i među tumorima istih sijela, različitih fenotipa (195) Objektivni odgovor u pacijenata koji su primili blokator PD-1 rijetko prelazi 40% (167). Uz to, u znatnoj stopi pacijenata je primijećen nastanak težih nuspojava, 16 do 37% uz PD-1 blokadu i 12 do 24% uz blokadu PD-L1 (196). O nuspojavama više u nastavku teksta.

Ranije spomenute kliničke studije promatrale su i izražajnost PD-L1 u TME. Kao što je ranije opisano, izražajnost PD-L1 dinamična je i ovisi o imunološkom odgovoru protiv samoga tumora. Nakon blokade kontrolne točke izmoreni T limfociti mogu pokrenuti imunološki odgovor i potaknuti antitumorsko djelovanje imunološkog sustava. Na temelju te hipoteze imunohistokemijski je evaluirana izražajnost PD-L1 u TME te je dovedena u korelaciju s uspješnošću imunoterapije blokadom kontrolnih točaka (197). FDA je već odobrio dijagnostički postupak provjeravanja stanja PD-L1 u TME

prilikom liječenja NSCLC putem nivolumaba ili pembrolizumaba (198). Ali izražajnost PD-L1 u TME se nije pokazala kao savršen prediktor odgovora na imunoterapiju inhibitorima kontrolnih točaka, dijelom jer nije dokazana korelacija u uznapredovalim slučajevima NSCLC i karcinoma bubežnih stanica, dijelom jer je u nekim slučajevima pokazan adekvatan odgovor uz minimalnu ekspresiju PD-L1 (199).

Kao sljedeći kandidat za biomarker uspješnosti liječenja tumora imunoterapijom inhibicijom kontrolnih točaka promatralo se tumorsko mutacijsko opterećenje (TMB). Povišeni TMB povećava šanse proizvodnje neoantigena, stvarajući tako imunogenije područje u TME, što omogućuje efektorskim T limfocitima da povećaju metu i da adekvatnije zbrinjavaju tumorske stanice (200). U nekolicini studija izražajnost TMB je dovedena u korelaciju s efektivnošću terapije (201), ali problem je u činjenici da je TMB kvantitativna veličina, bez poznatog *cut-off*-a, a ne binarna vrijednost koja može dati jednoznačnu informaciju (202). Uz to visok TMB pokazao je veliku prediktivnu vrijednost samo kada je bio uparen s visokom stopom heterogenosti tumorskih neoantigena (203).

Limfociti koji infiltriraju tumore, uz to što su najodgovornije stanice za antitumorsko imunološko djelovanje, smatraju se za važne prediktore odgovora na inhibitore kontrolnih točaka (204). Smatra se kako je količina ranije pristiglih CD8<sup>+</sup> T limfocita u TME te novopristiglih CD8<sup>+</sup> T limfocita u korelaciji s odgovorom na terapiju (205). Na temelju infiltracije T limfocita stvoren je *Immunoscore*, odnosno indeks koji ima snažnu prognostičku ulogu u predviđanju odgovora na imunoterapiju inhibitorima kontrolnih točaka (206).

Na temelju toga O'Donnell i sur. opisali su četiri tipa tumorskog mikrokoliša, a tipovi odgovaraju odgovoru na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka (207). Tip 1 TME opisuju visok TMB i visok stupanj upalnog izražaja (engl. *inflammation gene signature*) koji korelira s visokom izražajnošću PD-L1 u TME. U ove tumore spada većina karcinoma pluća, jajnika, želudca i cerviksa te melanomi (208). U ovim tumorima postoji imunološki odgovor koji je funkcionalno inhibiran, zaustavljen. Upravo

takvi tumori, koji posjeduju visok stupanj TMB-a i izražajnost PD-L1 najbolje odgovaraju na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka (209). Tip 2 TME prikazuje niske količine TMB i ima odsutan upalni izražaj. Najčešće su u ovu skupinu uključeni karcinomi gušterače, jajnika i dio kolorektalnih karcinoma (210). Takvi su tumori lišeni imunološkog odgovora te se za TME istih upotrebljava izraz imunološke pustinje (engl. *immune-desert*) (211). Zbog manjka infiltrirajućih T limfocita, pri čemu je krivac najvjerojatnije poremećaj u APC, ovaj tip tumora pokazuje izrazito smanjen odgovor na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka (212). Tip 3 TME ima veću izražajnost TMB od tipa 2, ali manju od tipa 1, te izrazito nisku do nikakvu izražajnost upalnog izražaja. Manjak upalnog izražaja se pripisuje manjku infiltrirajućih T limfocita, a tome shodno dolazi i do slabijeg odgovora na anti-PD-1 ili anti-PD-L1 terapiju (208). Najčešće u ovu skupinu ubrajamo tumore urotela, poput karcinoma mokraćnog mjehura i neke tumore gušterače (213). Tip 4 TME opisan je kroz nisku izražajnost TMB, ali visokim upalnim izražajem koji ga čini povoljnim za imunoterapiju, ali trenutno djelotvornost nije poznata. U ovu skupinu spadaju karcinom prostate i neki karcinomi dojke (214).

Uz navedene, kao prediktivni čimbenici promatraju se tumorske mutacije, mikrobiota, ali i karakteristike pacijenta poput dobi, spola i metaboličkog stanja (202).

### 4.3 Rezistencija na djelovanje inhibitora PD-1 i PD-L1

Ranije navedeni postoci odgovora na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka opisuju ne samo stanje s pitanjem prediktivnih čimbenika kao binarnih staničnih determinatora uspješnosti terapije, već i dinamičnog i aktivnog razvoja rezistencije na terapiju. Opisan postupak imunološkog uređivanja i prilagodive otpornosti tumora na imunološki napad najvjerojatnije su u pozadini promjene tumorskog fenotipa i razvoja rezistencije na terapiju (215).

Rezistencija na djelovanje inhibitora kontrolne točke može biti primarna i sekundarna. Primarna rezistencija je opisana u pacijenata koji ne pokazuju nikakav odgovor na primijenjenu

terapiju. Mehanizmi primarne rezistencije odgovaraju onima imunološkog bijega tumora i ranije opisanim neimunogenim tumorskim mikrookolišima.

Sekundarna, odnosno stečena, rezistencija je ona koja nastaje u pacijentima koji inicijalno pokazuju stanovit odgovor na primijenjenu imunoterapiju, ali kasnije tumor nastavlja s progresijom, a ponovno primjenjivanje terapije više nije od koristi. Iako ti mehanizmi liče na ranije navedene mehanizme primarne rezistencije, postoje razlike.

Iscrpljeni T limfociti, upravo oni koji provode najveću efektorsku funkciju prilikom primjene inhibitora kontrolnih točaka, epigenetskim promjenama mogu u potpunosti izgubiti funkciju. Naime iako su se prvotno u mogućnosti modificirati i preuzeti efektorski fenotip kroz vrijeme njihov kromatin postaje nedostupan i postaju otporni da daljnje remodeliranje i pokretanje funkcije (216). Ova pojava u T limfocitima je povezana i s TMB, pri čemu ako TMB ostane visok, s visokom heterogenošću izraženih antigena, a ponovno uključeni T limfociti ne uspiju do kraja izvršiti efektorsku funkciju, oni ponovno postaju iscrpljeni, ovoga put trajno i bez mogućnosti reagiranja na terapiju (217). Ono što je također problematično je što djelovanje PD-1 ili PD-L1 inhibicije u T limfocitima pokreće efektorski fenotip, a ne memorijski koji je dugovječniji i otporniji (218).

Pokretanje inhibicije PD-1 i PD-L1 ujedno može uzrokovati nove poremećaje u tumorskom prezentiranju antigena. Naime, novi upalni odgovor može u neoplastičnim stanicama melanoma pokrenuti novu diferencijaciju, stanice fenotipski približiti matičnima i pritom smanjiti ekspresiju tumorskih antigena. Istih onih antigena koje su inicijalno prezentirane T limfocitima prvog imunološkog odgovora (219). Isti razvoj događaja primijećen je i u skupini pacijenata s NSCLC koji su tretirani inhibitorima kontrolnih točaka (220). U melanomima je ujedno zamijećeno ponovno mutiranje gena koji kodiraju  $\beta$ 2-mikroglobulin, time onemogućujući potrebno predstavljanje antigena efektorskim T limfocitima (221). Ista studija Zaretskya i sur. pokazala je kako su moguće mutacije koje neoplastične stanice čine neosjetljivima na djelovanje IFN- $\gamma$  i time smanjuju izražaj i PD-L1 i MHC molekula

tipa I.

## 4.4 Nuspojave PD-1 i PD-L1 inhibicije

Djelovanje blokade kontrolnih točaka nije ograničeno samo na TME, te s obzirom na to nastaju nuspojave vezane uz imunološki sustav (engl. *immune-related adverse events*, irAEs) uzrokovane nepoželjnom aktivacijom imunološkog sustava u fiziološkim tkivima. Te nuspojave mogu zahvatiti samo jedan organ, ali zabilježeni su slučajevi zahvaćanje više organa simultano. U studijama koje su proučavale utjecaj inhibitora kontrolnih točaka, pri čemu je 68% pacijenata primalo terapiju protiv PD-1, a ostatak protiv CTLA-4, u više od polovice pacijenata zamijećene su nuspojave, a u 15% su zamijećene u više organskih sustava. Kroz metaanalize je zabilježeno da 37% pacijenata koji primaju bilo anti-PD-1, bilo anti-PD-L1, terapiju nastaju irAEs, a u 10 do 20% pacijenata su primijećene i teže nuspojave (222).

### 4.4.1 Gastrointestinalni sustav i jetra

Nešto manje od 20% pacijenata koji su primali isključivo anti-PD-1 terapiju je pokazalo irAEs, dok je brojka bila viša u pacijenata koji su bili isključivo na anti-CTLA-4 i na kombiniranoj terapiji (223). Simptomi su uključivali krvave, proljevaste stolice, abdominalne bolove s povišenom temperaturom. Vrijeme nastupanja nuspojava variralo je od početka primanja terapije do nekoliko mjeseci nakon prestanka (224). Najčešće je nastajala klinička slika kolitisa, a biopsije uzete prilikom kolonoskopije su opisivale neutrofilnu infiltraciju i stvaranje mikroapscesa te limfocitnu infiltraciju epitela (225). Gornji dio probavne cijevi rjeđe je zahvaćen, uz ezofagitis i gastritis koji su praćeni mučninama i gubitkom teka.

Otprilike 5% pacijenata koji u primali isključivo blokatore PD-1 signalnog puta razvili su kliničku sliku hepatitisa, s nešto većim brojkama u kombiniranoj terapiji i onoj baziranoj samo na blokatorima CTLA-4. Simptomi poput umora, groznice i žutice prikazivali su se uz radiološke nalaze hepatomegalije i limfadenopatije (226), iako su u većini slučajeva zabilježeni samo povišeni jetreni

enzimi. Simptomi nastupaju najčešće 6 do 14 tjedana nakon primanja prve doze terapije (227).

#### 4.4.2 Endokrinološki sustav

Iako su češće prilikom terapije anti-CTLA-4, nuspojave vezane za anti-PD-1 terapiju zabilježene su u poremećajima hipofize, štitne žlijezde uz moguću akutnu prezentaciju adrenalne insuficijencije, dijabetesa melitusa tipa 1, hiperkalcemije i hipoparatiroidizma.

Hipofizitis može uzrokovati hipopituitarizam, što dalje vodi do centralnog hipotireoidizma, centralne insuficijencije adrenalne žlijezde i hipogonadotropnog hipogonadizma. Sve se to prezentira s umorom, mučninama i gubitkom apetita, što je u onkoloških pacijenata izrazito teško za prepoznati. Stoga je potrebno detaljno proučavati hormonalnu sliku u pacijenata (228).

U slučaju štitne žlijezde moguć je nastanak akutnog tireoiditisa unutar mjesec dana nakon inicijalne doze terapije, s kliničkom slikom hipertireoze koja progredira u hipotireozu (229). I u slučajnu adrenalne žlijezde irAEs su rijetki, te su simptomi slični disfunkciji hipofize.

Izrazito rijetka, ali moguća životno ugrožavajuća, irAE je nastanak dijabetesa melitusa tip 1. Iako patofiziologija nije u potpunosti poznata, pretpostavlja se da potaknuti CD8<sup>+</sup> T limfociti napadaju stanice koje pokazuju T1DM antigene GAD65. Klinička slika može biti slična kao i u pacijenata kojima je inače dijagnosticiran dijabetes melitus tip 1, sve do nastupa ketoacidoze (229).

#### 4.4.3 Koža

Kožne nuspojave su česte u slučaju terapije s anti-PD-1 i anti-PD-L1, zahvaćajući do 40% pacijenata (230). Simptomi se mogu prikazati rano od početka terapije, najčešće u obliku blagog osipa i pruritusa, sve do Stevens-Johnsonovog sindroma. Histološke su analize pokazale znatnu infiltraciju T stanica u koži (231). Uz navedene moguć je i nastanak vitiliga u pacijenata koji su na anti-PD-1 ili anti-PD-L1 terapiji. Vitiligo je primijećen u slučaju melanoma, s mnogo manje slučajeva kod pacijenata koji su liječeni od NSCLC. Kao i u slučaju osipa i pruritusa, vitiligo se pojavljuje simetrično na koži pacijenta (232).

Iako najčešće ne predstavljaju životu opasnost za pacijenta, kožne promjene u pacijenata

uzrokuju velike psihološke probleme i mogu utjecati na njihovu voljnost za daljnjom terapijom. Zanimljivo je napomenuti i kako su kože promjene dovedene u korelaciju s uspješnošću terapije (233).

#### 4.4.4 Mišićno-zglobni sustav

Reumatološki se simptomi najčešće pojavljuju najkasnije kod pacijenata na anti-PD-1 terapiji, a zahvaćaju čak njih 15%, najčešće u obliku blagog artritisa i mijaglije (234). Upalni znakovi poput oticanja zglobova, ukočenosti, boli i eritema upućuju na nastanak artritisa. Simptomi prate neku od ranije nastalih irAE, a možemo ih podijeliti u tri skupine; reaktivnu grupu koja imitira reaktivni artritis zahvaćajući velike zglobove s pridruženim uveitisom, grupu koja liči na reumatoidni artritis, zahvaćajući male zglobove šake i grupu koja oponaša seronegativni artritis zahvaćajući srednje i velike zglobove (235). U manje od 1% pacijenata primjećuje se i polimialgija koja bože biti od blage do životno ugrožavajuće (236).

#### 4.4.5 Središnji i periferni neurološki sustav

Neurološki irAE su rijetki, ali prilikom usporedbe svih inhibitora kontrolnih točaka češći su u pacijenata koji su na terapiji s anti-PD-1 i anti-PD-L1. Periferne neuropatije su češće i na njih treba posumnjati u trenucima kada pacijent navodi promjene u osjetu i parestezije. Kada te simptome udružimo s poremećajima bulbomotorike i diplopijom i slabošću treba posumnjati na Guillain-Barre sindrom(228). Dijagnostika uključuje MRI kralježnice te EMG (237) kojima se pokušava isključiti metastaze kao uzročnik simptoma.

Kao nuspojava u centralnom živčanom sustavu zamijećeni su encefalitis, meningitis i encefalopatije, prezentirane smetenošću, groznicom, spasticitetom i nistagmusom (238). Kao i u slučaju perifernih nuspojava, vrše se radiološke pretrage kojima se isključuju metastaze. Primijećena je korelacija s pojavnošću neuroloških irAE i pozitivnog ishoda terapije (239).



#### 4.4.6 Krvotvorni sustav

Za razliku od kemoterapije i radioterapije, terapija inhibitorima kontrolnih točaka rijetko uzrokuje mijelosupresiju ili citopeniju. Zabilježeni su slučajevi aplastične anemije i autoimune hemolitičke anemije te trombocitopenične purpore u pacijenata na anti-PD-1 terapiji,

najčešće unutar četvrtog mjeseca od početka terapije (240, 241).

#### 4.4.7 Srce, pluća i bubreg

Zabilježeni irAE u ovim organskim sustavima su izrazito rijetki. Opisani su Oligurija, hematurija i periferni edemi (242), suhi kašalj, bol u prsima (243) i sporadični slučajevi miokarditisa (244).

## 5 Zaključak

Molekule PD-1 i PD-L1 od izrazite su važnosti u reguliranju imunološkog odgovora. Snaga njihovog djelovanja opisana je i u tumorskom mikrookolišu, a taj način bijega solidnih tumora od domaćina onkološke bolesti čini posebno opasnim. Iskustva koja su stečena u posljednjem desetljeću vezana uz terapiju s anti-PD-1 ili anti-PD-L1 lijekovima, zajedno s drugim vidovima imunološke terapije, imunoterapiju su zasluženo postavili kao četvrti stup onkološkog liječenja. Samostalno ili u kombinaciji s drugim imunološkim terapijama i/ili radioterapijom, kemoterapijom i kirurškim liječenjem terapija koja cilja PD-1/PD-L1 os nudi novu nadu velikom broju pacijenata oboljelih od raznih vrsta tumora, koji postaju sve češći uzrok smrti širom svijeta.

# Zahvale

Želim zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Nataliji Dedić Plavetić na velikoj stručnoj pomoći pri izradi ovoga diplomskog rada te na izdvojenom vremenu i strpljenju. Ujedno mentorici želim zahvaliti na svim konstruktivnim kritikama u djelovanju i vođenju Studentske sekcije za onkologiju i imunologiju uz čiju pomoć je sekcija i osnovana i uz čije će mentorstvo nastaviti raditi.

Zahvaljujem i članovima Povjerenstva diplomskog rada doc. dr. sc. Borislavu Belevu i doc. dr. sc. Jasmini Marić Brozić na čitanju, komentarima i ocjeni diplomskog rada.

Cijeloj obitelji, majci Jasni, ocu Zdenku, bratu Bruni i djedu Iliji želim zahvaliti što su bili najveći oslonac, sve godine studija, što su razumjeli sve trenutke kada je bilo teško i što je pomoć s njihove strane uvijek bila bezuvjetna. Bez njih nikada ne bih mogao završiti studij medicine. Posebno želim zahvaliti pokojnoj baki Veronici koja me je naučila da uvijek gledam male ljude te da uvijek vidim ono najbolje u ljudima. Želim zahvaliti i svom psu Khanu na svim kasnonoćnim šetnjama koje su bile najbolji odmor od učenja.

Svim prijateljima koje sam upoznao u ovih šest godina i koji su stajali uz mene želim zahvaliti na prekrasnim uspomnama i ringišpilu emocija koje smo zajedno proživjeli na studiju. Ta ću prijateljstva baštiniti do kraja života. Ujedno želim zahvaliti svim ugostiteljskim objektima na Šalati koji su uvijek bili ondje kada sam trebao (veće) doze kofeina.

Zahvaljujem i L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X-zajednici cijeloga svijeta, jer bez njih ovaj diplomski rad ne bi bio moguć.

# Životopis

Rođen sam u Zagrebu 4. srpnja 1995. godine gdje sam pohađao i osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem u akademskoj godini 2014./2015.. Za vrijeme studija bio sam aktivan član Studentske sekcije za neuroznanost i Studentske sekcije za anesteziologiju, a akademske godine 2018./2019. s nekolicinom kolega osnivam Studentsku sekciju za onkologiju i imunologiju. Ujedno sam tijekom studija bio demonstrator na Zavodu za kemiju i biokemiju, pri Katedri za internu medicinu kao demonstrator kolegija Klinička propedeutika te pri Katedri za kirurgiju kao demonstrator kolegija Kirurgija. Izabran sam za člana Studentskog zbora Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u dva navrata, te sam obnašao tu dužnost u periodu od tri godine s početkom u akademskoj godini 2017./2018.. Kao član Studentskog zbora sudjelovao sam u organizaciji tri studentska kongresa CROSS, pri čemu sam kao potpredsjednik organizacijskog odbora CROSS 15 nagrađen rektorovom nagradom. Pasivno sam sudjelovao na raznim kongresima i stručnim skupovima, primarno na temu onkologije, anesteziologije i personalizirane medicine.

# Popis literature

- 1 Nicolas A. Giraldo, Rafael Sanchez-Salas, J. David Peske, Yann Vano, Etienne Becht, Florent Petitprez, Pierre Validire, Alexandre Ingels, Xavier Cathelineau, Wolf Herman Fridman, and Catherine Sautès-Fridman. The clinical role of the TME in solid cancer, jan 2019. ISSN 15321827.
- 2 Tobias A. Oelschlaeger. Bacteria as tumor therapeutics? *Bioengineered Bugs*, 1(2):146–147, 2010. ISSN 19491018. doi: 10.4161/bbug.1.2.11248.
- 3 Jonathan D Tward, Christopher J Anker, David K Gaffney, and Glen M Bowen. Radiation therapy and skin cancer. *Modern practices in radiation therapy*, pages 207–246, 2012.
- 4 Karlo Perica, Juan Carlos Varela, Mathias Oelke, and Jonathan Schneck. Adoptive T Cell Immunotherapy For Cancer. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 6(1):e0004, jan 2015. ISSN 2076-9172. doi: 10.5041/rmmj.10179.
- 5 Chunqing Guo, Masoud H. Manjili, John R. Subjeck, Devanand Sarkar, Paul B. Fisher, and Xiang Yang Wang. Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. In *Advances in Cancer Research*, volume 119, pages 421–475. Academic Press Inc., jan 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1.
- 6 Bethan Psaila and David Lyden. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews Cancer*, 9(4):285–293, 2009.
- 7 Cynthia E Weber and Paul C Kuo. The tumor microenvironment. *Surgical oncology*, 21(3):172–177, 2012.
- 8 Ruchi Malik, Peter I Lelkes, and Edna Cukierman. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends in biotechnology*, 33(4):230–236, 2015.
- 9 Julia K Bar, Piotr Grelewski, Andrzej Popiela, Leszek Noga, and Jerzy Rabczyński. Type iv collagen and cd44v6 expression in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with ki-67 and p53 immunoreactivity. *Gynecologic oncology*, 95(1):23–31, 2004.
- 10 Visar Ajeti, Oleg Nadiarnykh, Suzanne M Ponik, Patricia J Keely, Kevin W Eliceiri, and Paul J Campagnola. Structural changes in mixed col i/col v collagen gels probed by shg microscopy: implications for probing stromal alterations in human breast cancer. *Biomedical optics express*, 2(8):2307–2316, 2011.
- 11 Yulong Chen, Houfu Guo, Masahiko Terajima, Priyam Banerjee, Xin Liu, Jiang Yu, Amin A Momin, Hiroyuki Katayama, Samir M Hanash, Alan R Burns, et al. Lysyl hydroxylase 2 is secreted by tumor cells and can modify collagen in the extracellular space. *Journal of Biological Chemistry*, 291(50):25799–25808, 2016.
- 12 Kandice R Levental, Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N Lakins, Mikala Egeblad, Janine T Erler, Sheri FT Fong, Katalin Csiszar, Amato Giaccia, Wolfgang Weninger, et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5):891–906, 2009.
- 13 DV Maltseva and SA Rodin. Laminins in metastatic cancer. *Molecular Biology*, 52(3):350–371, 2018.
- 14 Triantafyllos Stylianopoulos. The solid mechanics of cancer and strategies for improved therapy. *Journal of biomechanical engineering*, 139(2), 2017.
- 15 Rakesh K Jain. An indirect way to tame cancer. *Scientific American*, 310(2):46–53, 2014.
- 16 Harold F Dvorak. Tumors: wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine*, 315(26):1650–1659, 1986.
- 17 Raghu Kalluri. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 16(9):582, 2016.
- 18 Krystyna A Gieniec, Lisa M Butler, Daniel L Worthley, and Susan L Woods. Cancer-associated fibroblasts—heroes or villains? *British journal of cancer*, page 1, 2019.
- 19 Matthew Kraman, Paul J Bambrough, James N Arnold, Edward W Roberts, Lukasz Magiera, James O Jones, Aarthi Gopinathan, David A Tuveson, and Douglas T Fearon. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$ . *Science*, 330(6005):827–830, 2010.
- 20 Raghu Kalluri and Robert A Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6):1420–1428, 2009.
- 21 Masako Yamashita, Tomoko Ogawa, Xinhui Zhang, Noriko Hanamura, Yumi Kashikura, Mitsuyuki Takamura, Misao Yoneda, and Taizo Shiraishi. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast cancer*, 19(2):170–176, 2012.
- 22 Janna Paulsson, Monika Ehnman, and Arne Östman. Pdgf receptors in tumor biology: prognostic and predictive potential. *Future Oncology*, 10(9):1695–1708, 2014.
- 23 Ana Costa, Yann Kieffer, Alix Scholer-Dahirel, Floriane Pelon, Brigitte Bourachot, Melissa Cardon, Philemon Sirven, Ilaria Magagna, Laetitia Fuhrmann, Charles Bernard, et al. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer cell*, 33(3):463–479, 2018.
- 24 Kristin M Nieman, Hilary A Kenny, Carla V Penicka, Andras Ladanyi, Rebecca Buell-Gutbrod, Marion R Zillhardt, Iris L Romero, Mark S Carey, Gordon B Mills, Gökhan S Hotamisligil, et al. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*, 17(11):1498, 2011.
- 25 Qiang Zhang, Li-jiang Sun, Zhi-gang Yang, Gui-ming Zhang, and Ri-cha Huo. Influence of adipocytokines in periprostatic adipose tissue on prostate cancer aggressiveness. *Cytokine*, 85:148–156, 2016.
- 26 Sneha Sundaram, Amy R Johnson, and Liza Makowski. Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *Journal of carcinogenesis*, 12, 2013.
- 27 Chenghu Liu, Shangxian Gao, Zhonghua Qu, and Lining Zhang. Tumor microenvironment: hypoxia and buffer capacity for immunotherapy. *Medical hypotheses*, 69(3):590–595, 2007.
- 28 RD Leek, RJ Landers, AL Harris, and CE Lewis. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *British journal of cancer*, 79(5):991–995, 1999.
- 29 Jiyeon Kim and Ralph J DeBerardinis. Mechanisms and implications of metabolic heterogeneity in cancer. *Cell Metabolism*, 30(3):434–446, 2019.
- 30 Emilie Obre and Rodrigue Rossignol. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 59:167–181, 2015.

- 31 Christopher T Hensley, Ajla T Wasti, Ralph J DeBerardinis, et al. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 123(9):3678–3684, 2013.
- 32 Francesca Montenegro and Stefano Indraccolo. Metabolism in the tumor microenvironment. In *Tumor Microenvironment*, pages 1–11. Springer, 2020.
- 33 Stephanos Pavlides, Diana Whitaker-Menezes, Remedios Castello-Cros, Neal Flomenberg, Agnieszka K Witkiewicz, Philippe G Frank, Mathew C Casimiro, Chenguang Wang, Paolo Fortina, Sankar Addya, et al. The reverse warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle*, 8(23):3984–4001, 2009.
- 34 Martin Williams, Florent Ginhoux, Claudia Jakubzick, Shalin H. Naik, Nobuyuki Onai, Barbara U. Schraml, Elodie Segura, Roxane Tussiwand, and Simon Yona. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, 14(8):571–578, July 2014. doi: 10.1038/nri3712. URL <https://doi.org/10.1038/nri3712>.
- 35 Shweta Aras and M Raza Zaidi. Tameless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *British journal of cancer*, 117(11):1583–1591, 2017.
- 36 Alberto Mantovani, Antonio Sica, and Massimo Locati. New vistas on macrophage differentiation and activation. *European journal of immunology*, 37(1):14–16, 2007.
- 37 Pawel Kalinski. Regulation of immune responses by prostaglandin e2. *The Journal of Immunology*, 188(1):21–28, 2012.
- 38 Bin-Zhi Qian and Jeffrey W Pollard. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1):39–51, 2010.
- 39 Camille Guillerey, Nicholas D Huntington, and Mark J Smyth. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature immunology*, 17(9):1025–1036, 2016.
- 40 Jérémy Goc, Claire Germain, Thi Kim Duy Vo-Bourgais, Audrey Lupo, Christophe Klein, Samantha Knockaert, Luc de Chaisemartin, Hanane Ouakrim, Etienne Becht, Marco Alifano, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating cd8+ t cells. *Cancer research*, 74(3):705–715, 2014.
- 41 Adriana J Michielsen, Andrew E Hogan, Joseph Marry, Miriam Tosetto, Fionnuala Cox, John M Hyland, Kieran D Sheahan, Diarmuid P O’Donoghue, Hugh E Mulcahy, Elizabeth J Ryan, et al. Tumor tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PloS one*, 6(11):e27944, 2011.
- 42 Lingyun Wu, Sugandha Saxena, Mohammad Awaji, and Rakesh K Singh. Tumor-associated neutrophils in cancer: going pro. *Cancers*, 11(4):564, 2019.
- 43 Faustino Mollinedo. Neutrophil degranulation, plasticity, and cancer metastasis. *Trends in immunology*, 40(3):228–242, 2019.
- 44 Patrick L Raber, Paul Thevenot, Rosa Sierra, Dorota Wyczzechowska, Daniel Halle, Maria E Ramirez, Augusto C Ochoa, Matthew Fletcher, Cruz Velasco, Anna Wilk, et al. Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair t cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *International journal of cancer*, 134(12):2853–2864, 2014.
- 45 Nataša Obermajer and Pawel Kalinski. Key role of the positive feedback between pge2 and cox2 in the biology of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 1(5):762–764, 2012.
- 46 Siamon Gordon and Philip R Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews immunology*, 5(12):953–964, 2005.
- 47 G Solinas, G Germano, A Mantovani, and P Allavena. Tumor-associated macrophages (tam) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 86(5):1065–1073, 2009.
- 48 Guillaume Habif, Adeline Crinier, Pascale André, Eric Vivier, and Emilie Narni-Mancinelli. Targeting natural killer cells in solid tumors. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(5):415–422, March 2019. doi: 10.1038/s41423-019-0224-2. URL <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0224-2>.
- 49 Theresa L Whiteside and Ronald B Herberman. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Current opinion in immunology*, 7(5):704–710, 1995.
- 50 Ilia Voskoboinik, Mark J Smyth, and Joseph A Trapani. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 6(12):940–952, 2006.
- 51 Soizic Garaud, Laurence Buisseret, Cinzia Solinas, Chunyan Gu-Trantien, Alexandre de Wind, Gert Van den Eynden, Celine Naveaux, Jean-Nicolas Lodewyckx, Anaïs Boisson, Hughes Duvillier, et al. Tumor-infiltrating b cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. *JCI insight*, 4(18), 2019.
- 52 Peiling Tsou, Hiroyuki Katayama, Edwin J Ostrin, and Samir M Hanash. The emerging role of b cells in tumor immunity. *Cancer research*, 76(19):5597–5601, 2016.
- 53 Anna Passarelli, Francesco Mannavola, Luigia Stefania Stucci, Marco Tucci, and Francesco Silvestris. Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget*, 8(62):106132–106142, October 2017. doi: 10.18632/oncotarget.22190. URL <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22190>.
- 54 Mark J. Dobrzanski. Expanding roles for CD4 t cells and their subpopulations in tumor immunity and therapy. *Frontiers in Oncology*, 3, 2013. doi: 10.3389/fonc.2013.00063. URL <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00063>.
- 55 Jannie Borst, Tomasz Ahrends, Nikolina Bąbala, Cornelis J. M. Melief, and Wolfgang Kastentmüller. CD4 t cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 18(10):635–647, July 2018. doi: 10.1038/s41577-018-0044-0. URL <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0044-0>.
- 56 Jashodeep Datta, Erik Berk, Shuwen Xu, Elizabeth Fitzpatrick, Cinthia Rosembli, Lea Lowenfeld, Noah Goodman, David A Lewis, Paul J Zhang, Carla Fisher, Robert E Roses, Angela DeMichele, and Brian J Czerniecki. Anti-HER2 CD4 t-helper type 1 response is a novel immune correlate to pathologic response following neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), May 2015. doi: 10.1186/s13058-015-0584-1. URL <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0584-1>.
- 57 Maria Pia Protti and Lucia De Monte. Cross-talk within the tumor microenvironment mediates th2-type inflammation in pancreatic cancer. *OncoImmunology*, 1(1):89–91, January 2012. doi: 10.4161/onci.1.1.17939. URL <https://doi.org/10.4161/onci.1.1.17939>.
- 58 Perrine Bohner, Mathieu F. Chevalier, Valérie Cesson, Sonia-Christina Rodrigues-Dias, Florence Dartiguenave, Rodolfo Burruni, Thomas Tawadros, Massimo Valerio, Ilaria Lucca, Denise Nardelli-Haeffliger, Patrice Jichlinski,

- and Laurent Derré. Double positive CD4CD8 t cells are enriched in urological cancers and favor t helper-2 polarization. *Frontiers in Immunology*, 10, March 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00622. URL <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00622>.
- 59 Hae Lim Lee, Jeong Won Jang, Sung Won Lee, Sun Hong Yoo, Jung Hyun Kwon, Soon Woo Nam, Si Hyun Bae, Jong Young Choi, Nam Ik Han, and Seung Kew Yoon. Inflammatory cytokines and change of th1/th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific Reports*, 9(1), March 2019. doi: 10.1038/s41598-019-40078-8. URL <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40078-8>.
- 60 Ruirui Wang, Li Yang, Chaoqi Zhang, Ruijie Wang, Zhen Zhang, Qianyi He, Xinfeng Chen, Bin Zhang, Zhihai Qin, Liping Wang, and Yi Zhang. Th17 cell-derived IL-17a promoted tumor progression via STAT3/NF- $\kappa$ B/notch1 signaling in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(11): e1461303, August 2018. doi: 10.1080/2162402x.2018.1461303. URL <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1461303>.
- 61 Gabriela Bindea, Bernhard Mlecnik, Marie Tosolini, Amos Kirilovsky, Maximilian Waldner, Anna C. Obenaus, Helen Angell, Tessa Fredriksen, Lucie Lafontaine, Anne Berger, Patrick Bruneval, Wolf Herman Fridman, Christoph Becker, Franck Pagès, Michael R. Speicher, Zlatko Trajanoski, and Jérôme Galon. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*, 39(4):782–795, October 2013. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.003. URL <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.003>.
- 62 F Amicarella, M G Muraro, C Hirt, E Cremonesi, E Padovan, V Mele, V Governa, J Han, X Huber, R A Droese, M Zuber, M Adamina, M Bolli, R Rosso, A Lugli, I Zlobec, L Terracciano, L Tornillo, P Zajac, S Eppenberger-Castori, F Trapani, D Oertli, and G Izzi. Dual role of tumour-infiltrating t helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut*, 66(4):692–704, December 2015. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310016. URL <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310016>.
- 63 Li Cai, Yue Zhang, Yifei Zhang, Hongbing Chen, and Jinchun Hu. Effect of th9/IL-9 on the growth of gastric cancer in nude mice/p. *Oncotargets and Therapy*, Volume 12:2225–2234, March 2019. doi: 10.2147/ott.s197816. URL <https://doi.org/10.2147/ott.s197816>.
- 64 Ilona Kryczek, Yanwei Lin, Nisha Nagarsheth, Dongjun Peng, Lili Zhao, Ende Zhao, Linda Vatan, Wojciech Szeliga, Yali Dou, Scott Owens, Witold Zgodzinski, Marek Majewski, Grzegorz Wallner, Jingyuan Fang, Emina Huang, and Weiping Zou. IL-22CD4 t cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity*, 40(5):772–784, May 2014. doi: 10.1016/j.immuni.2014.03.010. URL <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.010>.
- 65 Chunyan Gu-Trantien, Sherene Loi, Soizic Garaud, Carole Equeter, Myriam Libin, Alexandre de Wind, Marie Ravoet, Hélène Le Buanec, Catherine Sibille, Germain Manfouo-Foutsop, Isabelle Veys, Benjamin Haibe-Kains, Sandeep K. Singhal, Stefan Michiels, Françoise Rothé, Roberto Salgado, Hugues Duvalier, Michail Ignatiadis, Christine Desmedt, Dominique Bron, Denis Larsimont, Martine Piccart, Christos Sotiriou, and Karen Willard-Gallo. CD4 follicular helper t cell infiltration predicts breast cancer survival. *Journal of Clinical Investigation*, 123(7):2873–2892, June 2013. doi: 10.1172/jci67428. URL <https://doi.org/10.1172/jci67428>.
- 66 Yosuke Togashi, Kohei Shitara, and Hiroyoshi Nishikawa. Regulatory t cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(6):356–371, January 2019. doi: 10.1038/s41571-019-0175-7. URL <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0175-7>.
- 67 Yoshihiro Ohue and Hiroyoshi Nishikawa. Regulatory t (treg) cells in cancer: Can treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*, 110(7):2080–2089, June 2019. doi: 10.1111/cas.14069. URL <https://doi.org/10.1111/cas.14069>.
- 68 Christian E. Bryant, Sarah Sutherland, Benjamin Kong, Michael S. Papadimitriou, Phillip D. Fromm, and Derek N.J. Hart. Dendritic cells as cancer therapeutics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 86:77–88, February 2019. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.015. URL <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.015>.
- 69 Pierre Golstein and Gillian M. Griffiths. An early history of t cell-mediated cytotoxicity. *Nature Reviews Immunology*, 18(8):527–535, April 2018. doi: 10.1038/s41577-018-0009-3. URL <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0009-3>.
- 70 David Masopust, Daniel Choo, Vaiva Vezys, E. John Wherry, Jaikumar Duraiswamy, Rama Akondy, Jun Wang, Kerry A. Casey, Daniel L. Barber, Kim S. Kawamura, Kathryn A. Fraser, Richard J. Webby, Volker Brinkmann, Eugene C. Butcher, Kenneth A. Newell, and Rafi Ahmed. Dynamic t cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(3): 553–564, February 2010. doi: 10.1084/jem.20090858. URL <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>.
- 71 Robert D Schreiber, Lloyd J Old, and Mark J Smyth. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024):1565–1570, 2011.
- 72 AJ Robert McGray and Jonathan Bramson. Adaptive resistance to cancer immunotherapy. In *Tumor Immune Microenvironment in Cancer Progression and Cancer Therapy*, pages 213–227. Springer, 2017.
- 73 Steven A Rosenberg and Nicholas P Restifo. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230):62–68, 2015.
- 74 Mariana Aris, María Marcela Barrio, and José Mordoh. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2012.
- 75 Alka Bhatia and Yashwant Kumar. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. *Cancer Microenvironment*, 4(2):209–217, 2011.
- 76 Chung-Han Lee, Roman Yelensky, Karin Jooss, and Timothy A Chan. Update on tumor neoantigens and their utility: why it is good to be different. *Trends in Immunology*, 39(7):536–548, 2018.
- 77 Vivian Goodell, James Waisman, Lupe G Salazar, Corazon dela Rosa, John Link, Andrew L Coveler, Jennifer S Childs, Patricia A Fintak, Doreen M Higgins, and Mary L Disis. Level of her-2/neu protein expression in breast cancer may affect the development of endogenous her-2/neu-specific immunity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(3):449–454, 2008.
- 78 Matthew D Hellmann, Margaret K Callahan, Mark M Awad, Emiliano Calvo, Paolo A Ascierto, Akin Atmaca, Naiyer A Rizvi, Fred R Hirsch, Giovanni Selvaggi, Joseph D Szustakowski, et al. Tumor mutational burden and efficacy of nivolumab monotherapy and in combination with ipilimumab in small-cell lung cancer. *Cancer Cell*, 33(5):853–861, 2018.

- 79 M Campoli and S Ferrone. HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene*, 27(45):5869–5885, October 2008. doi: 10.1038/onc.2008.273. URL <https://doi.org/10.1038/onc.2008.273>.
- 80 Margit H Lampen and Thorbald van Hall. Strategies to counteract MHC-i defects in tumors. *Current Opinion in Immunology*, 23(2):293–298, April 2011. doi: 10.1016/j.coi.2010.12.005. URL <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.12.005>.
- 81 Z K Klippel, J Chou, A M Towlerton, L N Voong, P Robbins, W I Bensinger, and E H Warren. Immune escape from NY-ESO-1-specific t-cell therapy via loss of heterozygosity in the MHC. *Gene Therapy*, 21(3):337–342, January 2014. doi: 10.1038/gt.2013.87. URL <https://doi.org/10.1038/gt.2013.87>.
- 82 Xi Chen, Shengnan Hao, Zhonghua Zhao, Jia Liu, Qianqian Shao, Fang Wang, Dong Sun, Ying He, Wenjuan Gao, and Haiting Mao. Interleukin 35: Inhibitory regulator in monocyte-derived dendritic cell maturation and activation. *Cytokine*, 108:43–52, 2018.
- 83 Sherene Loi, Sathana Dushyanthen, Paul A Beavis, Roberto Salgado, Carsten Denkert, Peter Savas, Susan Combs, David L Rimm, Jennifer M Giltmane, Monica V Estrada, et al. Ras/mapk activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: therapeutic cooperation between mek and pd-1/pd-11 immune checkpoint inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 22(6):1499–1509, 2016.
- 84 Naofumi Mukaida, So-ichiro Sasaki, and Tomohisa Baba. Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment. *Mediators of inflammation*, 2014, 2014.
- 85 Trina J Stewart and Mark J Smyth. Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(1):125–140, 2011.
- 86 Dai Fukumura, Jonas Kloepper, Zohreh Amoozgar, Dan G Duda, and Rakesh K Jain. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nature reviews Clinical oncology*, 15(5):325, 2018.
- 87 Silvia Deaglio, Karen M Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang-Fan Chen, Keiichi Enjoji, Joel Linden, Mohamed Oukka, et al. Adenosine generation catalyzed by cd39 and cd73 expressed on regulatory t cells mediates immune suppression. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6):1257–1265, 2007.
- 88 Tangying Lu and Dmitry I Gabrilovich. Molecular pathways: tumor-infiltrating myeloid cells and reactive oxygen species in regulation of tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 18(18):4877–4882, 2012.
- 89 Pascale Kropf, David Baud, Sara E Marshall, Markus Munder, Angelina Mosley, José M Fuentes, Charles RM Bangham, Graham P Taylor, Shanti Herath, Beak-San Choi, et al. Arginase activity mediates reversible t cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *European journal of immunology*, 37(4):935–945, 2007.
- 90 Peter Terness, Thomas M Bauer, Lars Röse, Christoph Dufter, Andrea Watzlik, Helmut Simon, and Gerhard Opelz. Inhibition of allogeneic t cell proliferation by indoleamine 2, 3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine*, 196(4):447–457, 2002.
- 91 Celine Boutros, Ahmad Tarhini, Emilie Routier, Olivier Lambotte, Francois Leroy Ladurie, Franck Carbone, Hassane Izzeddine, Aurelien Marabelle, Stephane Champiat, Armandine Berdelou, et al. Safety profiles of anti-ctla-4 and anti-pd-1 antibodies alone and in combination. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(8):473–486, 2016.
- 92 Yinghao Zhao, Wei Yang, Yuanyuan Huang, Ranji Cui, Xiangyan Li, and Bingjin Li. Evolving roles for targeting ctla-4 in cancer immunotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(2):721–734, 2018.
- 93 Yi Que, Zhixin Fang, Yuanxiang Guan, Wei Xiao, Bushu Xu, Jingjing Zhao, Huoying Chen, Xinke Zhang, Musheng Zeng, Yao Liang, et al. Lag-3 expression on tumor-infiltrating t cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival. *Cancer biology & medicine*, 16(2):331, 2019.
- 94 Srimoyee Ghosh, Geeta Sharma, Jon Travers, Sujatha Kumar, Justin Choi, H Toni Jun, Marilyn Kehry, Sridhar Ramaswamy, and David Jenkins. Tsr-033, a novel therapeutic antibody targeting lag-3, enhances t-cell function and the activity of pd-1 blockade in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 18(3):632–641, 2019.
- 95 Ruihan Tang, Manu Rangachari, and Vijay K Kuchroo. Tim-3: A co-receptor with diverse roles in t cell exhaustion and tolerance. In *Seminars in immunology*, volume 42, page 101302. Elsevier, 2019.
- 96 Michitaka Nakano, Mamoru Ito, Risa Tanaka, Kyoko Yamaguchi, Hiroshi Ariyama, Kenji Mitsugi, Tomoyasu Yoshihiro, Hirofumi Ohmura, Nobuhiro Tsuruta, Fumiyasu Hanamura, et al. Pd-1+ tim-3+ t cells in malignant ascites predict prognosis of gastrointestinal cancer. *Cancer science*, 109(9):2986–2992, 2018.
- 97 Benjamin L Solomon and Ignacio Garrido-Laguna. Tigit: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(11):1659–1667, 2018.
- 98 Hauke Stamm, Leticia Oliveira-Ferrer, Eva-Maria Grossjohann, Jana Muschhammer, Vanessa Thaden, Franziska Brauneck, Roman Kischel, Volkmar Müller, Carsten Bokemeyer, Walter Fiedler, et al. Targeting the tigit-pvr immune checkpoint axis as novel therapeutic option in breast cancer. *Oncoimmunology*, 8(12):e1674605, 2019.
- 99 Mengjie Wang, Jin Bu, Maohua Zhou, Jessica Sido, Yu Lin, Guanfang Liu, Qiwen Lin, Xiuzhang Xu, Jianmei W Leavenworth, and Erxia Shen. Cd8+ t cells expressing both pd-1 and tigit but not cd226 are dysfunctional in acute myeloid leukemia (aml) patients. *Clinical Immunology*, 190:64–73, 2018.
- 100 Kumuluzi Mulati, Junzo Hamanishi, Noriomi Matsumura, Kenji Chamoto, Nathan Mise, Kaoru Abiko, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Naoki Horikawa, Ryusuke Murakami, et al. Vista expressed in tumour cells regulates t cell function. *British journal of cancer*, 120(1):115–127, 2019.
- 101 Robert J Johnston, Linhui Julie Su, Jason Pinckney, David Critton, Eric Boyer, Arathi Krishnakumar, Martin Corbett, Andrew L Rankin, Rose Dibella, Lynne Campbell, et al. Vista is an acidic ph-selective ligand for psgl-1. *Nature*, 574(7779):565–570, 2019.
- 102 Mary E Keir, Manish J Butte, Gordon J Freeman, and Arlene H Sharpe. Pd-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 26:677–704, 2008.
- 103 Taku Okazaki, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, and Tasuku Honjo. A rheostat for immune responses: the unique properties of pd-1 and their advantages

- for clinical application. *Nature immunology*, 14(12): 1212–1218, 2013.
- 104 Arlene H Sharpe and Kristen E Pauken. The diverse functions of the pd1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*, 18(3):153, 2018.
- 105 Kenneth J Oestreich, Hyesuk Yoon, Rafi Ahmed, and Jeremy M Boss. Nfatc1 regulates pd-1 expression upon t cell activation. *The Journal of Immunology*, 181(7):4832–4839, 2008.
- 106 Fernando Macian, Cristina López-Rodríguez, and Anjana Rao. Partners in transcription: Nfat and ap-1. *Oncogene*, 20(19): 2476–2489, 2001.
- 107 Ok Hyun Cho, Hyun Mu Shin, Lucio Miele, Todd E Golde, Abdul Fauq, Lisa M Minter, and Barbara A Osborne. Notch regulates cytolytic effector function in cd8+ t cells. *The Journal of Immunology*, 182(6):3380–3389, 2009.
- 108 Charly Kao, Kenneth J Oestreich, Michael A Paley, Alison Crawford, Jill M Angelosanto, Mohammed-Alkhatim A Ali, Andrew M Intlekofer, Jeremy M Boss, Steven L Reiner, Amy S Weinmann, et al. Transcription factor t-bet represses expression of the inhibitory receptor pd-1 and sustains virus-specific cd8+ t cell responses during chronic infection. *Nature immunology*, 12(7):663–671, 2011.
- 109 Peiyuan Lu, Benjamin A Youngblood, James W Austin, Ata Ur Rasheed Mohammed, Royce Butler, Rafi Ahmed, and Jeremy M Boss. Blimp-1 represses cd8 t cell expression of pd-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, 211(3):515–527, 2014.
- 110 Alison Crawford, Jill M Angelosanto, Charly Kao, Travis A Doering, Pamela M Odorizzi, Burton E Barnett, and E John Wherry. Molecular and transcriptional basis of cd4+ t cell dysfunction during chronic infection. *Immunity*, 40(2): 289–302, 2014.
- 111 Matthew M Staron, Simon M Gray, Heather D Marshall, Ian A Parish, Jonathan H Chen, Curtis J Perry, Guoliang Cui, Ming O Li, and Susan M Kaech. The transcription factor foxo1 sustains expression of the inhibitory receptor pd-1 and survival of antiviral cd8+ t cells during chronic infection. *Immunity*, 41 (5):802–814, 2014.
- 112 James W Austin, Peiyuan Lu, Parimal Majumder, Rafi Ahmed, and Jeremy M Boss. Stat3, stat4, nfatc1, and ctfc regulate pd-1 through multiple novel regulatory regions in murine t cells. *The Journal of Immunology*, 192(10):4876–4886, 2014.
- 113 Nicole E Scharping, Ashley V Menk, Rebecca S Moreci, Ryan D Whetstone, Rebekah E Dadey, Simon C Watkins, Robert L Ferris, and Greg M Delgoffe. The tumor microenvironment represses t cell mitochondrial biogenesis to drive intratumoral t cell metabolic insufficiency and dysfunction. *Immunity*, 45(2):374–388, 2016.
- 114 Yiting Wang, Huanbin Wang, Han Yao, Chushu Li, Jing-Yuan Fang, and Jie Xu. Regulation of PD-1: Emerging routes for targeting tumor immune evasion. *Frontiers in Pharmacology*, 9, May 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.00536. URL <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00536>.
- 115 Harriet M Kluger, Christopher R Zito, Meaghan L Barr, Marina K Baine, Veronica LS Chiang, Mario Sznol, David L Rimm, Lieping Chen, and Lucia B Jilaveanu. Characterization of pd-1 expression and associated t-cell infiltrates in metastatic melanoma samples from variable anatomic sites. *Clinical Cancer Research*, 21(13):3052–3060, 2015.
- 116 Jeffrey L Wong, Nataša Obermajer, Kunle Odunsi, Robert P Edwards, and Pawel Kalinski. Synergistic cox2 induction by ifn $\gamma$  and tnfa self-limits type-1 immunity in the human tumor microenvironment. *Cancer immunology research*, 4(4): 303–311, 2016.
- 117 Chong Sun, Riccardo Mezzadra, and Ton N Schumacher. Regulation and function of the pd-1 checkpoint. *Immunity*, 48 (3):434–452, 2018.
- 118 Margaretha GM Roemer, Ranjana H Advani, Azra H Ligon, Yasodha Natkunam, Robert A Redd, Heather Homer, Courtney F Connelly, Heather H Sun, Sarah E Daadi, Gordon J Freeman, et al. Pd-1 and pd-12 genetic alterations define classical hodgkin lymphoma and predict outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 34(23):2690, 2016.
- 119 Jong-Ho Cha, Li-Chuan Chan, Chia-Wei Li, Jennifer L Hsu, and Mien-Chie Hung. Mechanisms controlling pd-1 expression in cancer. *Molecular cell*, 76(3):359–370, 2019.
- 120 Daniel Yee, Kunal M Shah, Mark C Coles, Tyson V Sharp, and Dimitris Lagos. Microrna-155 induction via tnfa and ifn- $\gamma$  suppresses expression of programmed death ligand-1 (pd-1) in human primary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (50):20683–20693, 2017.
- 121 Luoyan Ai, Antao Xu, and Jie Xu. Roles of pd-1/pd-12 pathway: Signaling, cancer, and beyond. In *Regulation of Cancer Immune Checkpoints*, pages 33–59. Springer, 2020.
- 122 Eun Young Kim, Arum Kim, Se Kyu Kim, and Yoon Soo Chang. Myc expression correlates with pd-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 110:63–67, 2017.
- 123 Michaël Cerezo, Ramdane Guemiri, Sabine Druillenec, Isabelle Girault, Hélène Malka-Mahieu, Shensi Shen, Delphine Allard, Sylvain Martineau, Caroline Welsch, Sandrine Agoussi, et al. Translational control of tumor immune escape via the eif4f-stat1-pd-1 axis in melanoma. *Nature medicine*, 24(12): 1877–1886, 2018.
- 124 Yosra Messai, Sophie Gad, Muhammad Zaem Noman, Gwenael Le Teuff, Sophie Couve, Bassam Janji, Solenne Florence Kammerer, Nathalie Rioux-Leclerc, Meriem Hasmim, Sophie Ferlicot, et al. Renal cell carcinoma programmed death-ligand 1, a new direct target of hypoxia-inducible factor-2 alpha, is regulated by von hippel-lindau gene mutation status. *European urology*, 70(4): 623–632, 2016.
- 125 Stan de Kleijn, Jeroen D Langereis, Jenneke Leentjens, Matthijs Kox, Mihai G Netea, Leo Koenderman, Gerben Ferwerda, Peter Pickkers, and Peter WM Hermans. Ifn- $\gamma$ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of pd-1. *PLoS one*, 8(8):e72249, 2013.
- 126 Angel Garcia-Diaz, Daniel Sanghoon Shin, Blanca Homet Moreno, Justin Saco, Helena Escuin-Ordinas, Gabriel Abril Rodriguez, Jesse M Zaretsky, Lu Sun, Willy Hugo, Xiaoyan Wang, et al. Interferon receptor signaling pathways regulating pd-1 and pd-12 expression. *Cell reports*, 19(6):1189–1201, 2017.
- 127 Tadashi Yokosuka, Masako Takamatsu, Wakana Kobayashi-Imanishi, Akiko Hashimoto-Tane, Miyuki Azuma, and Takashi Saito. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit t cell receptor signaling by recruiting phosphatase shp2. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6):1201–1217, 2012.
- 128 Enfu Hui, Jeanne Cheung, Jing Zhu, Xiaolei Su, Marcus J Taylor, Heidi A Wallweber, Dibyendu K Sasmal, Jun Huang, Jeong M Kim, Ira Mellman, et al. T cell costimulatory receptor cd28 is a primary target for pd-1-mediated inhibition. *Science*, 355(6332):1428–1433, 2017.
- 129 Nikolaos Patsoukis, Julia Brown, Victoria Petkova, Fang Liu, Lequn Li, and Vassiliki A Boussiotis. Selective effects of pd-1



- on akt and ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit t cell proliferation. *Science signaling*, 5(230):ra46–ra46, 2012.
- 130 Tetsuya Honda, Jackson G Egen, Tim Lämmermann, Wolfgang Kastanmüller, Parizad Torabi-Parizi, and Ronald N Germain. Tuning of antigen sensitivity by t cell receptor-dependent negative feedback controls t cell effector function in inflamed tissues. *Immunity*, 40(2):235–247, 2014.
  - 131 E John Wherry. T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 12(6):492–499, May 2011. doi: 10.1038/ni.2035. URL <https://doi.org/10.1038/ni.2035>.
  - 132 Mohammad Davoodzadeh Gholami, Yousef Saeedi, Sahel Heydari, Johan Garssen, Reza Falak, et al. Exhaustion of t lymphocytes in the tumor microenvironment: significance and effective mechanisms. *Cellular immunology*, 322:1–14, 2017.
  - 133 Peter S Kim and Rafi Ahmed. Features of responding t cells in cancer and chronic infection. *Current Opinion in Immunology*, 22(2):223–230, April 2010. doi: 10.1016/j.coi.2010.02.005. URL <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.005>.
  - 134 K. E. Pauken, M. A. Sammons, P. M. Odorizzi, S. Manne, J. Godec, O. Khan, A. M. Drake, Z. Chen, D. R. Sen, M. Kurachi, R. A. Barnitz, C. Bartman, B. Bengsch, A. C. Huang, J. M. Schenkel, G. Vahedi, W. N. Haining, S. L. Berger, and E. J. Wherry. Epigenetic stability of exhausted t cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science*, 354(6316):1160–1165, October 2016. doi: 10.1126/science.aaf2807. URL <https://doi.org/10.1126/science.aaf2807>.
  - 135 Jesús Ogando, María Eugenia Sáez, Javier Santos, Cristina Nuevo-Tapióles, Marta Gut, Anna Esteve-Codina, Simon Heath, Antonio González-Pérez, José M. Cuezva, Rosa Ana Lacalle, and Santos Mañes. PD-1 signaling affects cristae morphology and leads to mitochondrial dysfunction in human CD8 t lymphocytes. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), June 2019. doi: 10.1186/s40425-019-0628-7. URL <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0628-7>.
  - 136 E. F. McKinney and K. G. C. Smith. Metabolic exhaustion in infection, cancer and autoimmunity. *Nature Immunology*, 19(3):213–221, February 2018. doi: 10.1038/s41590-018-0045-y. URL <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0045-y>.
  - 137 Nikolaos Patsoukis, Kankana Bardhan, Pranam Chatterjee, Duygu Sari, Bianling Liu, Lauren N. Bell, Edward D. Karoly, Gordon J. Freeman, Victoria Petkova, Pankaj Seth, Lequn Li, and Vassiliki A. Boussiotis. PD-1 alters t-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nature Communications*, 6(1), March 2015. doi: 10.1038/ncomms7692. URL <https://doi.org/10.1038/ncomms7692>.
  - 138 Oscar R. Colegio, Ngoc-Quynh Chu, Alison L. Szabo, Thach Chu, Anne Marie Rhebergen, Vikram Jairam, Nika Cyrus, Carolyn E. Brokowski, Stephanie C. Eisenbarth, Gillian M. Phillips, Gary W. Cline, Andrew J. Phillips, and Ruslan Medzhitov. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, 513(7519):559–563, July 2014. doi: 10.1038/nature13490. URL <https://doi.org/10.1038/nature13490>.
  - 139 I. B. Barsoum, C. A. Smallwood, D. R. Siemens, and C. H. Graham. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Research*, 74(3):665–674, December 2013. doi: 10.1158/0008-5472.can-13-0992. URL <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-0992>.
  - 140 Spencer C. Wei, Colm R. Duffy, and James P. Allison. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discovery*, 8(9):1069–1086, August 2018. doi: 10.1158/2159-8290.cd-18-0367. URL <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-18-0367>.
  - 141 Paul C. Tumeh, Christina L. Harview, Jennifer H. Yearley, I. Peter Shintaku, Emma J. M. Taylor, Lidia Robert, Bartosz Chmielowski, Marko Spasic, Gina Henry, Voicu Ciobanu, Alisha N. West, Manuel Carmona, Christine Kivork, Elizabeth Seja, Grace Cherry, Antonio J. Gutierrez, Tristan R. Grogan, Christine Mateus, Gorana Tomasic, John A. Glaspy, Ryan O. Emerson, Harlan Robins, Robert H. Pierce, David A. Elashoff, Caroline Robert, and Antoni Ribas. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528):568–571, November 2014. doi: 10.1038/nature13954. URL <https://doi.org/10.1038/nature13954>.
  - 142 Bertram Bengsch, Takuya Ohtani, Omar Khan, Manu Setty, Sasikanth Manne, Shaun O’Brien, Pier Federico Gherardini, Ramin Sedaghat Herati, Alexander C. Huang, Kyong-Mi Chang, Evan W. Newell, Niels Bovenschen, Dana Pe’er, Steven M. Albelda, and E. John Wherry. Epigenomic-guided mass cytometry profiling reveals disease-specific features of exhausted CD8 t cells. *Immunity*, 48(5):1029–1045.e5, May 2018. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.026. URL <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.026>.
  - 143 Matthew H. Spitzer, Yaron Carmi, Nathan E. Reticker-Flynn, Serena S. Kwek, Deepthi Madhireddy, Maria M. Martins, Pier Federico Gherardini, Tyler R. Prestwood, Jonathan Chabon, Sean C. Bendall, Lawrence Fong, Garry P. Nolan, and Edgar G. Engleman. Systemic immunity is required for effective cancer immunotherapy. *Cell*, 168(3):487–502.e15, January 2017. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.022. URL <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.022>.
  - 144 Norifumi Iijima and Akiko Iwasaki. Access of protective antiviral antibody to neuronal tissues requires CD4 t-cell help. *Nature*, 533(7604):552–556, May 2016. doi: 10.1038/nature17979. URL <https://doi.org/10.1038/nature17979>.
  - 145 Bertram Bengsch, Andy L. Johnson, Makoto Kurachi, Pamela M. Odorizzi, Kristen E. Pauken, John Attanasio, Erietta Stelekati, Laura M. McLane, Michael A. Paley, Greg M. Delgoffe, and E. John Wherry. Bioenergetic insufficiencies due to metabolic alterations regulated by the inhibitory receptor PD-1 are an early driver of CD8 t cell exhaustion. *Immunity*, 45(2):358–373, August 2016. doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.008. URL <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.008>.
  - 146 Haidong Tang, Yong Liang, Robert A. Anders, Janis M. Taube, Xiangyan Qiu, Aditi Mulgaonkar, Xin Liu, Susan M. Harrington, Jingya Guo, Yangchun Xin, Yahong Xiong, Kien Nham, William Silvers, Guiyang Hao, Xiankai Sun, Mingyi Chen, Raquibul Hannan, Jian Qiao, Haidong Dong, Hua Peng, and Yang-Xin Fu. PD-11 on host cells is essential for PD-11 blockade-mediated tumor regression. *Journal of Clinical Investigation*, 128(2):580–588, January 2018. doi: 10.1172/jci96061. URL <https://doi.org/10.1172/jci96061>.
  - 147 Asunción Martín-Ruiz, Carmen Fiuza-Luces, Esther Martínez-Martínez, Clemente F. Arias, Lourdes Gutiérrez, Manuel Ramírez, Paloma Martín-Acosta, María José Coronado, Alejandro Lucia, and Mariano Provencio. Effects of anti-PD-1 immunotherapy on tumor regression: insights from a patient-derived xenograft model. *Scientific Reports*, 10(1), April 2020. doi: 10.1038/s41598-020-63796-w. URL <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63796-w>.
  - 148 Vinay Prasad and Victoria Kaestner. Nivolumab and

- pembrolizumab: Monoclonal antibodies against programmed cell death-1 (pd-1) that are interchangeable. In *Seminars in oncology*, volume 44, pages 132–135. Elsevier, 2017.
- 149 Petros Fessas, Hassal Lee, Shinji Ikemizu, and Tobias Janowitz. A molecular and preclinical comparison of the pd-1–targeted t-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab. In *Seminars in oncology*, volume 44, pages 136–140. Elsevier, 2017.
  - 150 Changyu Wang, Kent B Thudium, Minhua Han, Xi-Tao Wang, Haichun Huang, Diane Feingersh, Candy Garcia, Yi Wu, Michelle Kuhne, Mohan Srinivasan, et al. In vitro characterization of the anti-pd-1 antibody nivolumab, bms-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer immunology research*, 2(9):846–856, 2014.
  - 151 Shuguang Tan, Hao Zhang, Yan Chai, Hao Song, Zhou Tong, Qihui Wang, Jianxun Qi, Gary Wong, Xiaodong Zhu, William J Liu, et al. An unexpected n-terminal loop in pd-1 dominates binding by nivolumab. *Nature communications*, 8(1):1–10, 2017.
  - 152 Human medicines european public assessment report (EPAR): Opdivo, nivolumab, melanoma,hodgkin disease,carcinoma, renal cell,carcinoma, non-small-cell lung, date of authorisation: 19/06/2015, revision: 24, status: Authorised. *Case Medical Research*, apr 2019. doi: 10.31525/cm-39973f. URL <https://doi.org/10.31525/cm-39973f>.
  - 153 Human medicines european public assessment report (EPAR): Keytruda, pembrolizumab, melanoma,hodgkin disease,carcinoma, non-small-cell lung, date of authorisation: 17/07/2015, revision: 21, status: Authorised. *Case Medical Research*, sep 2019. doi: 10.31525/cm-ac5652. URL <https://doi.org/10.31525/cm-ac5652>.
  - 154 Amita Patnaik, S Peter Kang, Drew Rasco, Kyriakos P Papadopoulos, Jeroen Elassaiss-Schaap, Muralidhar Beeram, Ronald Drengler, Cong Chen, Lon Smith, Guillermo Espino, et al. Phase i study of pembrolizumab (mk-3475; anti-pd-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research*, 21(19):4286–4293, 2015.
  - 155 Eleonora Rofi, Marzia Del Re, Elena Arrigoni, Mimma Rizzo, Lorenzo Fontanelli, Stefania Crucitta, Giulia Gianfilippo, Giuliana Restante, Stefano Fogli, Camillo Porta, Romano Danesi, and Manuela Schmidinger. Clinical pharmacology of monoclonal antibodies targeting PD-1 axis in urothelial cancers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, page 102891, April 2020. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102891. URL <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102891>.
  - 156 Brant A Inman, Thomas A Longo, Sundhar Ramalingam, and Michael R Harrison. Atezolizumab: a pd-1–blocking antibody for bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(8): 1886–1890, 2017.
  - 157 Kefang Liu, Shuguang Tan, Yan Chai, Danqing Chen, Hao Song, Catherine Wei-Hong Zhang, Yi Shi, Jun Liu, Wenjie Tan, Jianxin Lyu, et al. Structural basis of anti-pd-1 monoclonal antibody avelumab for tumor therapy. *Cell research*, 27(1): 151–153, 2017.
  - 158 Benjamin Boyerinas, Caroline Jochems, Massimo Fantini, Christopher R Heery, James L Gulley, Kwong Yok Tsang, and Jeffrey Schlom. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-pd-1 antibody avelumab (msb0010718c) on human tumor cells. *Cancer immunology research*, 3(10):1148–1157, 2015.
  - 159 Hyun Tae Lee, Ju Yeon Lee, Heejin Lim, Sang Hyung Lee, Yu Jeong Moon, Hyo Jeong Pyo, Seong Eon Ryu, Woori Shin, and Yong-Seok Heo. Molecular mechanism of pd-1/pd-1 blockade via anti-pd-1 antibodies atezolizumab and durvalumab. *Scientific reports*, 7(1):1–12, 2017.
  - 160 Shuguang Tan, Kefang Liu, Yan Chai, Catherine W-H Zhang, Shan Gao, George F Gao, and Jianxun Qi. Distinct pd-1 binding characteristics of therapeutic monoclonal antibody durvalumab. *Protein & cell*, 9(1):135–139, 2018.
  - 161 Dane R Liston and Myrtle Davis. Clinically relevant concentrations of anticancer drugs: a guide for nonclinical studies. *Clinical Cancer Research*, 23(14):3489–3498, 2017.
  - 162 Christopher R Heery, Geraldine O’Sullivan-Coyne, Ravi A Madan, Lisa Cordes, Arun Rajan, Myrna Rauckhorst, Elizabeth Lamping, Israel Oyelakin, Jennifer L Marté, Lauren M Lepone, et al. Avelumab for metastatic or locally advanced previously treated solid tumours (javelin solid tumor): a phase 1a, multicohort, dose-escalation trial. *The Lancet Oncology*, 18(5):587–598, 2017.
  - 163 Arielle Gray, Solomiya Grushchak, Kumaran Mudaliar, Stephanie Kliethermes, Kyle Carey, and Kelli A Hutchens. The microenvironment in primary cutaneous melanoma with associated spontaneous tumor regression: evaluation for t-regulatory cells and the presence of an immunosuppressive microenvironment. *Melanoma Research*, 27(2):104–109, 2017.
  - 164 Alfred E Chang, Lucy Hynds Karnell, and Herman R Menck. The national cancer data base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 83(8):1664–1678, 1998.
  - 165 Caroline Robert, Antoni Ribas, Jedd D Wolchok, F Stephen Hodi, Omid Hamid, Richard Kefford, Jeffrey S Weber, Anthony M Joshua, Wen-Jen Hwu, Tara C Gangadhar, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *The Lancet*, 384(9948):1109–1117, 2014.
  - 166 Jeffrey S Weber, Sandra P D’Angelo, David Minor, F Stephen Hodi, Ralf Gutzmer, Bart Neyns, Christoph Hoeller, Nikhil I Khushalani, Wilson H Miller Jr, Christopher D Lao, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-ctla-4 treatment (checkmate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The lancet oncology*, 16(4):375–384, 2015.
  - 167 Omid Hamid, Caroline Robert, Adil Daud, F Stephen Hodi, Wen-Jen Hwu, Richard Kefford, Jedd D Wolchok, Peter Hersey, Richard W Joseph, Jeffrey S Weber, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-pd-1) in melanoma. *New England Journal of Medicine*, 369(2):134–144, 2013.
  - 168 Caroline Robert, Georgina V Long, Benjamin Brady, Caroline Dutriaux, Michele Maio, Laurent Mortier, Jessica C Hassel, Piotr Rutkowski, Catriona McNeil, Ewa Kalinka-Warzocho, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without braf mutation. *New England journal of medicine*, 372(4): 320–330, 2015.
  - 169 Sylvia Lee and Shailender Bhatia. Immune checkpoints. In *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer*, pages 19–43. Elsevier, 2019. doi: 10.1016/b978-0-323-54948-6.00002-0. URL <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-54948-6.00002-0>.
  - 170 Christian Rolfo, Christian Caglevic, Mariacarmela Santaripa, Antonio Araujo, Elisa Giovannetti, Carolina Diaz Gallardo, Patrick Pauwels, and Mauricio Mahave. Immunotherapy in NSCLC: A promising and revolutionary weapon. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 97–125. Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/

978-3-319-53156-4\_5. URL [https://doi.org/10.1007/2F978-3-319-53156-4\\_5](https://doi.org/10.1007/2F978-3-319-53156-4_5).

- 171 Naiyer A Rizvi, Matthew D Hellmann, Alexandra Snyder, Pia Kvistborg, Vladimir Makarov, Jonathan J Havel, William Lee, Jianda Yuan, Phillip Wong, Teresa S Ho, et al. Mutational landscape determines sensitivity to pd-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230):124–128, 2015.
- 172 Julie Brahmer, Karen L Reckamp, Paul Baas, Lucio Crinò, Wilfried EE Eberhardt, Elena Poddubskaya, Scott Antonia, Adam Pluzanski, Everett E Vokes, Esther Holgado, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(2):123–135, 2015.
- 173 Hossein Borghaei, Luis Paz-Ares, Leora Horn, David R Spigel, Martin Steins, Neal E Ready, Laura Q Chow, Everett E Vokes, Enriqueta Felip, Esther Holgado, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(17):1627–1639, 2015.
- 174 Roy S Herbst, Paul Baas, Dong-Wan Kim, Enriqueta Felip, José L Pérez-Gracia, Ji-Youn Han, Julian Molina, Joo-Hang Kim, Catherine Dubos Arvis, Myung-Ju Ahn, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, pd-1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (keynote-010): a randomised controlled trial. *The Lancet*, 387(10027):1540–1550, 2016.
- 175 Martin Reck, Delvys Rodríguez-Abreu, Andrew G Robinson, Rina Hui, Tibor Csósz, Andrea Fülöp, Maya Gottfried, Nir Peled, Ali Tafreshi, Sinead Cuffe, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for pd-1-positive non-small-cell lung cancer. *N engl J med*, 375:1823–1833, 2016.
- 176 Narek Shaverdian, Aaron E Lisberg, Krikor Bornazyan, Darlene Veruttipong, Jonathan W Goldman, Silvia C Formenti, Edward B Garon, and Percy Lee. 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(7):895–903, 2017.
- 177 Achim Rittmeyer, Fabrice Barlesi, Daniel Waterkamp, Keunchil Park, Fortunato Ciardiello, Joachim von Pawel, Shirish M Gadgeel, Toyooki Hida, Dariusz M Kowalski, Manuel Cobo Dols, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (oak): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*, 389(10066):255–265, 2017.
- 178 Sunyoung S. Lee and Grace K. Dy. The current status of immunotherapy in thoracic malignancies. In *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer*, pages 45–75. Elsevier, 2019. doi: 10.1016/b978-0-323-54948-6.00003-2. URL <https://doi.org/10.1016%2Fb978-0-323-54948-6.00003-2>.
- 179 Joseph I Clark, Michael KK Wong, Howard L Kaufman, Gregory A Daniels, Michael A Morse, David F McDermott, Sanjiv S Agarwala, Lionel D Lewis, John H Stewart, Ulka Vaishampayan, et al. Impact of sequencing targeted therapies with high-dose interleukin-2 immunotherapy: an analysis of outcome and survival of patients with metastatic renal cell carcinoma from an on-going observational il-2 clinical trial: Proclaimsm. *Clinical genitourinary cancer*, 15(1):31–41, 2017.
- 180 Robert J Motzer, Bernard Escudier, David F McDermott, Saby George, Hans J Hammers, Sandhya Srinivas, Scott S Tykodi, Jeffrey A Sosman, Giuseppe Procopio, Elizabeth R Plimack, et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 373(19):1803–1813, 2015.
- 181 David Cella, Viktor Grünwald, Paul Nathan, Justin Doan, Homa Dastani, Fiona Taylor, Bryan Bennett, Michael DeRosa, Scott Berry, Kristine Broglio, et al. Quality of life in patients with advanced renal cell carcinoma given nivolumab versus everolimus in checkmate 025: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(7):994–1003, 2016.
- 182 Michael R. Harrison, Megan A. McNamara, Tian Zhang, and Brant A. Inman. Urologic malignancies. In *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer*, pages 115–133. Elsevier, 2019. doi: 10.1016/b978-0-323-54948-6.00006-8. URL <https://doi.org/10.1016%2Fb978-0-323-54948-6.00006-8>.
- 183 Christophe Massard, Michael S Gordon, Sunil Sharma, Saeed Rafii, Zev A Wainberg, Jason Luke, Tyler J Curiel, Gerardo Colon-Otero, Omid Hamid, Rachel E Sanborn, et al. Safety and efficacy of durvalumab (medi4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(26):3119, 2016.
- 184 Renee N Donahue, Lauren M Lepone, Italia Grenga, Caroline Jochems, Massimo Fantini, Ravi A Madan, Christopher R Heery, James L Gulley, and Jeffrey Schlom. Analyses of the peripheral immunome following multiple administrations of avelumab, a human igg1 anti-pd-1 monoclonal antibody. *Journal for immunotherapy of cancer*, 5(1):20, 2017.
- 185 Susanne H Baumeister, Gordon J Freeman, Glenn Dranoff, and Arlene H Sharpe. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annual review of immunology*, 34:539–573, 2016.
- 186 Andrea Šupe Parun. Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke. *Hrvatski časopis za javno zdravstvo*, 7(28), 2014.
- 187 Nicholas J Robert, Hans-Peter Goertz, Pooja Chopra, Xiaolong Jiao, Bongin Yoo, Debra Patt, and Vincent Antao. Her2-positive metastatic breast cancer patients receiving pertuzumab in a community oncology practice setting: treatment patterns and outcomes. *Drugs-real world outcomes*, 4(1):1–7, 2017.
- 188 Frederik Marmé. Immunotherapy in breast cancer. *Oncology Research and Treatment*, 39(6):335–345, 2016. doi: 10.1159/000446340. URL <https://doi.org/10.1159%2F000446340>.
- 189 Rita Nanda, Laura QM Chow, E Claire Dees, Raanan Berger, Shilpa Gupta, Ravit Geva, Lajos Pusztai, Kumudu Pathiraja, Gursel Aktan, Jonathan D Cheng, et al. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase ib keynote-012 study. *Journal of Clinical Oncology*, 34(21):2460, 2016.
- 190 Sylvia Adams, Peter Schmid, Hope S Rugo, Eric P Winer, Delphine Loirat, Ahmad Awada, David W Cescon, Hiroji Iwata, Mario Campone, Rita Nanda, et al. Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mtnbc): Keynote-086 cohort a., 2017.
- 191 Sherene Loi, A Giobbie-Hurder, Andrea Gombos, Thomas Bachelot, Rina Hui, Giuseppe Curigliano, Mario Campone, Laura Biganzoli, Herve Bonnefoi, Guy Jerusalem, et al. Phase ib/ii study evaluating safety and efficacy of pembrolizumab and trastuzumab in patients with trastuzumab-resistant her2-positive advanced breast cancer: results from the panacea study (ibcsq 45-13/big 4-13/keynote-014). 2017.
- 192 Javier Cortes, David W Cescon, Hope S Rugo, Zbigniew Nowecki, Seock-Ah Im, Mastura Md Yusof, Carlos Gallardo, Oleg Lipatov, Carlos Henrique Barrios, Esther Holgado, et al. Keynote-355: Randomized, double-blind, phase iii study of pembrolizumab+ chemotherapy versus placebo+

- chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer., 2020.
- 193 Peter Schmid, Hope S Rugo, Sylvia Adams, Andreas Schneeweiss, Carlos H Barrios, Hiroji Iwata, Véronique Diéras, Volkmar Henschel, Luciana Molinero, Stephen Y Chui, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (impassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 21(1):44–59, 2020.
  - 194 Megan Kruse and Jame Abraham. Breast cancer. In *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer*, pages 157–167. Elsevier, 2019. doi: 10.1016/b978-0-323-54948-6.00008-1. URL <https://doi.org/10.1016%2Fb978-0-323-54948-6.00008-1>.
  - 195 Mizuki Nishino, Nikhil H Ramaiya, Hiroto Hatabu, and F Stephen Hodi. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(11):655, 2017.
  - 196 Michael A Postow, Robert Sidlow, and Matthew D Hellmann. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade. *New England Journal of Medicine*, 378(2):158–168, 2018.
  - 197 Francesco Passiglia, Giuseppe Bronte, Viviana Bazan, Clara Natoli, Sergio Rizzo, Antonio Galvano, Angela Listi, Giuseppe Cicero, Christian Rolfo, Daniele Santini, et al. Pd-11 expression as predictive biomarker in patients with nslc: a pooled analysis. *Oncotarget*, 7(15):19738, 2016.
  - 198 Jonathan J Havel, Diego Chowell, and Timothy A Chan. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 19(3):133–150, 2019.
  - 199 David P Carbone, Martin Reck, Luis Paz-Ares, Benjamin Creelan, Leora Horn, Martin Steins, Enriqueta Felip, Michel M van den Heuvel, Tudor-Eliade Ciuleanu, Firas Badin, et al. First-line nivolumab in stage iv or recurrent non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(25):2415–2426, 2017.
  - 200 Geoffrey T Gibney, Louis M Weiner, and Michael B Atkins. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*, 17(12):e542–e551, 2016.
  - 201 Robert M Samstein, Chung-Han Lee, Alexander N Shoushtari, Matthew D Hellmann, Ronglai Shen, Yelena Y Janjigian, David A Barron, Ahmet Zehir, Emmet J Jordan, Antonio Omuro, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature genetics*, 51(2):202–206, 2019.
  - 202 Xuan Kong. Discovery of new immune checkpoints: Family grows up. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pages 61–82. Springer Singapore, 2020. doi: 10.1007/978-981-15-3266-5\_4. URL [https://doi.org/10.1007%2F978-981-15-3266-5\\_4](https://doi.org/10.1007%2F978-981-15-3266-5_4).
  - 203 Nicholas McGranahan, Andrew JS Furness, Rachel Rosenthal, Sofie Ramskov, Rikke Lyngaa, Sunil Kumar Saini, Mariam Jamal-Hanjani, Gareth A Wilson, Nicolai J Birkbak, Crispin T Hiley, et al. Clonal neoantigens elicit t cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*, 351(6280):1463–1469, 2016.
  - 204 Elisabeth Brambilla, Gwénaél Le Teuff, Sophie Marguet, Sylvie Lantuejoul, Ariane Dunant, Stephen Graziano, Robert Pirker, Jean-Yves Douillard, Thierry Le Chevalier, Martin Filipits, et al. Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(11):1223, 2016.
  - 205 Guoying Zhou, Dave Sprengers, Patrick PC Boor, Michail Doukas, Hannah Schutz, Shanta Mancham, Alexander Pedroza-Gonzalez, Wojciech G Polak, Jeroen De Jonge, Marcia Gaspersz, et al. Antibodies against immune checkpoint molecules restore functions of tumor-infiltrating t cells in hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*, 153(4):1107–1119, 2017.
  - 206 Bernhard Mlecnik, Gabriela Bindea, Helen K Angell, Pauline Maby, Mihaela Angelova, David Tougeron, Sarah E Church, Lucie Lafontaine, Maria Fischer, Tessa Fredriksen, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity*, 44(3):698–711, 2016.
  - 207 Jake S O’Donnell, Michele WL Teng, and Mark J Smyth. Cancer immunoeediting and resistance to t cell-based immunotherapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 16(3):151–167, 2019.
  - 208 Chan-Young Ock, Bhumsuk Keam, Sehui Kim, Ju-Seog Lee, Miso Kim, Tae Min Kim, Yoon Kyung Jeon, Dong-Wan Kim, Doo Hyun Chung, and Dae Seog Heo. Pan-cancer immunogenomic perspective on the tumor microenvironment based on pd-11 and cd8 t-cell infiltration. *Clinical cancer research*, 22(9):2261–2270, 2016.
  - 209 Matthew D Hellmann, Tavi Nathanson, Hira Rizvi, Benjamin C Creelan, Francisco Sanchez-Vega, Arun Ahuja, Ai Ni, Jacki B Novik, Levi MB Mangarin, Mohsen Abu-Akeel, et al. Genomic features of response to combination immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer cell*, 33(5):843–852, 2018.
  - 210 Christine Feig, James O Jones, Matthew Kraman, Richard JB Wells, Andrew Deonarine, Derek S Chan, Claire M Connell, Edward W Roberts, Qi Zhao, Otavia L Caballero, et al. Targeting excl12 from fap-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-pd-11 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(50):20212–20217, 2013.
  - 211 Daniel S Chen and Ira Mellman. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637):321–330, 2017.
  - 212 Stefani Spranger, Riyue Bao, and Thomas F Gajewski. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*, 523(7559):231–235, 2015.
  - 213 Sanjeev Mariathasan, Shannon J Turley, Dorothee Nickles, Alessandra Castiglioni, Kobe Yuen, Yulei Wang, Edward E Kadel III, Hartmut Koeppen, Jillian L Astarita, Rafael Cubas, et al. Tgf $\beta$  attenuates tumour response to pd-11 blockade by contributing to exclusion of t cells. *Nature*, 554(7693):544–548, 2018.
  - 214 Elena García-Martínez, Ginés Luengo Gil, Asunción Chaves Benito, Enrique González-Billalabeitia, María Angeles Vicente Conesa, Teresa García García, Elisa García-Garre, Vicente Vicente, and Francisco Ayala de la Peña. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast cancer research*, 16(6):488, 2014.
  - 215 Padmanee Sharma, Siwen Hu-Lieskovan, Jennifer A Wargo, and Antoni Ribas. Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell*, 168(4):707–723, 2017.
  - 216 Mary Philip, Lauren Fairchild, Liping Sun, Ellen L Horste, Steven Camara, Mojdeh Shakiba, Andrew C Scott, Agnes Viale, Peter Lauer, Taha Merghoub, et al. Chromatin states

- define tumour-specific t cell dysfunction and reprogramming. *Nature*, 545(7655):452–456, 2017.
- 217 Alexander C Huang, Michael A Postow, Robert J Orlowski, Rosemarie Mick, Bertram Bengsch, Sasikanth Manne, Wei Xu, Shannon Harmon, Josephine R Giles, Brandon Wenz, et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-pd-1 response. *Nature*, 545(7652):60–65, 2017.
- 218 Christopher A Klebanoff, Luca Gattinoni, Douglas C Palmer, Pawel Muranski, Yun Ji, Christian S Hinrichs, Zachary A Borman, Sid P Kerkar, Christopher D Scott, Steven E Finkelstein, et al. Determinants of successful cd8+ t-cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice. *Clinical Cancer Research*, 17(16):5343–5352, 2011.
- 219 Nienke van Rooij, Marit M van Buuren, Daisy Philips, Arno Velds, Mireille Toebes, Bianca Heemskerk, Laura JA van Dijk, Sam Behjati, Henk Hilkmann, Dris El Atmioui, et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific t-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(32), 2013.
- 220 Valsamo Anagnostou, Kellie N. Smith, Patrick M. Forde, Noushin Niknafs, Rohit Bhattacharya, James White, Theresa Zhang, Vilmos Adleff, Jillian Phallen, Neha Wali, Carolyn Hruban, Violeta B. Guthrie, Kristen Rodgers, Jarushka Naidoo, Hyunseok Kang, William Sharfman, Christos Georgiades, Franco Verde, Peter Illei, Qing Kay Li, Edward Gabrielson, Malcolm V. Brock, Cynthia A. Zahnow, Stephen B. Baylin, Robert B. Scharpf, Julie R. Brahmer, Rachel Karchin, Drew M. Pardoll, and Victor E. Velculescu. Evolution of neoantigen landscape during immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *Cancer Discovery*, 7(3):264–276, dec 2016. doi: 10.1158/2159-8290.cd-16-0828. URL <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0828>.
- 221 Jesse M Zaretsky, Angel Garcia-Diaz, Daniel S Shin, Helena Escuin-Ordinas, Willy Hugo, Siwen Hu-Lieskovan, Davis Y Torrejon, Gabriel Abril-Rodriguez, Saleem Sandoval, Lucas Barthly, et al. Mutations associated with acquired resistance to pd-1 blockade in melanoma. *New England Journal of Medicine*, 375(9):819–829, 2016.
- 222 Laura Spiers, Nicholas Coupe, and Miranda Payne. Toxicities associated with checkpoint inhibitors—an overview. *Rheumatology*, 58(Supplement\_7):vii7–vii16, 2019.
- 223 S Cousin, J Seneschal, and A Italiano. Toxicity profiles of immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 181:91–100, 2018.
- 224 I Puzanov, A Diab, K Abdallah, CO Bingham, C Brogdon, R Dadu, L Hamad, S Kim, ME Lacouture, NR LeBoeuf, et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the society for immunotherapy of cancer (sitc) toxicity management working group. *Journal for immunotherapy of cancer*, 5(1):1–28, 2017.
- 225 Kyung Won Kim, Nikhil H Ramaiya, Katherine M Krajewski, Atul B Shinagare, Stephanie A Howard, Jyothi P Jagannathan, and Nageatte Ibrahim. Ipilimumab-associated colitis: Ct findings. *American Journal of Roentgenology*, 200(5):W468–W474, 2013.
- 226 Ahmed Mekki, Laurent Derclé, Philip Lichtenstein, Aurélien Marabelle, Jean-Marie Michot, Olivier Lambotte, Jérôme Le Pavec, Eleonora De Martin, Corinne Balleyguier, Stéphane Champiat, et al. Detection of immune-related adverse events by medical imaging in patients treated with anti-programmed cell death 1. *European Journal of Cancer*, 96:91–104, 2018.
- 227 Lavinia Spain, Stefan Diem, and James Larkin. Management of toxicities of immune checkpoint inhibitors. *Cancer treatment reviews*, 44:51–60, 2016.
- 228 Iosune Baraibar, Ignacio Melero, Mariano Ponz-Sarvisé, and Eduardo Castanon. Safety and tolerability of immune checkpoint inhibitors (pd-1 and pd-11) in cancer. *Drug safety*, 42(2):281–294, 2019.
- 229 David J Byun, Jedd D Wolchok, Lynne M Rosenberg, and Monica Girotra. Cancer immunotherapy—immune checkpoint blockade and associated endocrinopathies. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(4):195–207, 2017.
- 230 Jeryl Villadolid and Asim Amin. Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: update on management of immune-related toxicities. *Translational lung cancer research*, 4(5):560, 2015.
- 231 Jarushka Naidoo, DB Page, BT Li, LC Connell, K Schindler, ME Lacouture, MA Postow, and JD Wolchok. Toxicities of the anti-pd-1 and anti-pd-11 immune checkpoint antibodies. *Annals of Oncology*, 26(12):2375–2391, 2015.
- 232 Vincent Sibaud. Dermatologic reactions to immune checkpoint inhibitors. *American journal of clinical dermatology*, 19(3):345–361, 2018.
- 233 Michele Oritura, Ferdinando De Vita, Gennaro Galizia, Eva Lieto, Loredana Vecchione, Fabiana Vitiello, Erika Martinelli, and Fortunato Ciardiello. Correlation between efficacy and skin rash occurrence following treatment with the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab: a single institution retrospective analysis. *Oncology reports*, 21(4):1023–1028, 2009.
- 234 Merav Lidar, Eitan Giat, Daniela Garelick, Yuval Horowitz, Howard Amital, Yael Steinberg-Silman, Jacob Schachter, Ronnie Shapira-Frommer, and Gal Markel. Rheumatic manifestations among cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Autoimmunity reviews*, 17(3):284–289, 2018.
- 235 Jarushka Naidoo, Laura C Cappelli, Patrick M Forde, Kristen A Marrone, Evan J Lipson, Hans J Hammers, William H Sharfman, Dung T Le, Alan N Baer, Ami A Shah, et al. Inflammatory arthritis: a newly recognized adverse event of immune checkpoint blockade. *The oncologist*, 22(6):627, 2017.
- 236 Mehdi Touat, Thierry Maisonobe, Samuel Knauss, Omar Ben Hadj Salem, Baptiste Hervier, Karine Auré, Tali-Anne Szwebel, Nora Kramkimmel, Claire Lethrosne, Jean-Frédéric Bruch, et al. Immune checkpoint inhibitor-related myositis and myocarditis in patients with cancer. *Neurology*, 91(10):e985–e994, 2018.
- 237 Takamasa Nukui, Yurika Nakayama, Mamoru Yamamoto, Yoshiharu Taguchi, Nobuhiro Dougu, Hirofumi Konishi, Tomohiro Hayashi, and Yuji Nakatsuji. Nivolumab-induced acute demyelinating polyradiculoneuropathy mimicking guillain-barre syndrome. *Journal of the neurological sciences*, 390:115–116, 2018.
- 238 Morgan Burke, Melissa Hardesty, and Wayne Downs. A case of severe encephalitis while on pd-1 immunotherapy for recurrent clear cell ovarian cancer. *Gynecologic oncology reports*, 24:51–53, 2018.
- 239 Jess Louise Smith, Alexander M Menzies, Justine Vanessa Cohen, Margarida Mut Lioret, Alpaslan Ozgun, Lavinia Spain, John J Park, Douglas Buckner Johnson, Jennifer Leigh McQuade, Sophie Feng, et al. Neurotoxicity associated with anti-pd1 therapy: A multi-center case series., 2017.
- 240 Dinesh Atwal, Krishna P Joshi, Rahul Ravilla, and Fade Mahmoud. Pembrolizumab-induced pancytopenia: a case report. *The Permanente Journal*, 21, 2017.

- 241 Rachel R Comito, Lynette A Badu, and Nicholas Forcello. Nivolumab-induced aplastic anemia: a case report and literature review. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 25 (1):221–225, 2019.
- 242 Julie Belliere, Nicolas Meyer, Julien Mazieres, Sylvie Ollier, Serge Boulinguez, Audrey Delas, David Ribes, and Stanislas Faguer. Acute interstitial nephritis related to immune checkpoint inhibitors. *British journal of cancer*, 115(12): 1457–1461, 2016.
- 243 Myriam Delaunay, Jacques Cadranet, Amélie Lusque, Nicolas Meyer, Valérie Gounant, Denis Moro-Sibilot, Jean-Marie Michot, Judith Raimbourg, Nicolas Girard, Florian Guisier, et al. Immune-checkpoint inhibitors associated with interstitial lung disease in cancer patients. *European Respiratory Journal*, 50(2), 2017.
- 244 Douglas B Johnson, Justin M Balko, Margaret L Compton, Spyridon Chalkias, Joshua Gorham, Yaomin Xu, Mellissa Hicks, Igor Puzanov, Matthew R Alexander, Tyler L Bloomer, et al. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade. *New England Journal of Medicine*, 375 (18):1749–1755, 2016.