



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**MANUEL EMÍLIO FERNANDES CAMPOS COROA**

**A IMUNOLOGIA DO MELANOMA: EVOLUÇÃO E  
APLICAÇÃO TERAPÊUTICA**

**ARTIGO DE REVISÃO**

**AREA CIENTÍFICA DE DERMATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DO DOUTOR RICARDO  
JOSÉ DAVID COSTA VIEIRA**

**MARÇO 2014**

***A imunologia do Melanoma: Evolução e  
Aplicação terapêutica***

**Autor: Manuel Emílio Fernandes Campos Coroa**

Trabalho realizado sob orientação do  
Doutor Ricardo José David Costa Vieira

Estudante do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra

*E-mail:* [coroaofc@gmail.com](mailto:coroaofc@gmail.com)

*Trabalho apresentado à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Medicina, sob orientação científica do Doutor Ricardo José David Costa Vieira*

## Índice

Introdução.....	7
Material e Métodos.....	10
Imunoterapia – Conceito .....	11
Imunoterapia – História.....	13
Caraterísticas da resposta imunológica contra o melanoma.....	16
Opções terapêuticas.....	23
Citocinas .....	26
Interferons .....	26
IL-2.....	29
Vacinas.....	32
Vacinas de células inteiras ou de lisados celulares .....	32
Vacinas de células dendríticas .....	33
Vacinas de Gangliosídeos .....	35
Vacinas de antigénios Tumorais .....	35
Anticorpos monoclonais .....	38
Anticorpos anti-CTLA-4.....	39
Terapia anti-PD1 .....	42
Terapia celular adotiva.....	44
Linfócitos T.....	44
Terapias combinadas.....	47
Associação da imunoterapia anti-CTLA-4 e anti-PD-1 .....	48
Associação da imunoterapia anti-CTLA-4 e inibidor BRAF.....	48
Perspetivas futuras .....	48
Conclusão .....	52
Bibiografia.....	55

**Lista de abreviaturas**

AJCC- American joint committee on cancer

BCG- Bacillus Calmette-Guérin

CAR- Chimeric antigen receptor

CMH- Complexo major de histocompatibilidade

CTLA4- Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DAMPs - Damaged-associated molecular pattern molecules

IDO - Indolamina-2,3-dioxigenase

EMA – European medicines agency

EORTC- European organization for research and treatment of cancer

FDA - Food and drug administration

GM-CSF- Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

IFN- Interferão

IL- Interleucina

HLA- Human leucocyte antigen

LAG-3- Lymphocyte activation gene 3

LAK- Lymphokine-activated killer

JAK-STAT- Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

MAGE-1 - Melanoma-associated antigen-1

MAPK- Mitogen-activated protein kinase

NK- Natural killer

PD-1- Programmed cell death-1

TH- T Helper cell

Tim-3- T cell immunoglobulin mucin-3

TILs- Tumor infiltrating lymphocytes

TLR- Recetor toll-like

TRAIL- TNF-related apoptosis-inducing ligand

TCR- T cell receptor

TGFbeta- Transforming growth factor beta

TNF- Tumor necrosis factor

Tregs- Regulatory T cells

TRP- Tyrosinase-related protein

VIH- Vírus da imunofediciência humana

VEGF - Vascular endothelial growth factor

**Resumo:**

Esta revisão pretende dar uma perspetiva global da imunoterapia no melanoma, começando por uma abordagem geral da reação imune, que nos permitirá perceber os possíveis caminhos da imunoterapia.

O sistema imune adquirido envolve o processamento e apresentação das partículas do antígeno aos linfócitos T pelas células dendríticas no contexto dos antígenos humanos linfocitários (HLA), também conhecidos como antígenos de histocompatibilidade. Esta interação é regulada por recetores de membrana, moléculas de co-expressão e moléculas reguladoras que limitam a auto-imunidade. Uma vez ativadas os linfócitos T são responsáveis pela imunidade celular e os linfócitos B pela imunidade humoral, com a participação de células T *helper* e supressoras, células T memória, células T citotóxicas, células *natural killer*, células T reguladoras que ajudam a limitar a auto-imunidade.

A imunologia tumoral é um complexo equilíbrio entre o reconhecimento imunológico do *self* e do *non-self* e os processos adaptativos das células tumorais que as ajudam a escapar do reconhecimento imune e tem como objetivo estimular, aumentar, ou suprimir vários aspetos do sistema imune.

O melanoma metastático tem sido um alvo da imunoterapia há mais de quatro décadas. As tentativas para desenvolver imunoterapias eficazes para o tratamento de doentes com melanoma metastático, incluem três categorias principais: estimulação inespecífica do sistema imune, imunização ativa usando vacinas anti-tumorais, e imunoterapia adotiva celular. Abordagens inespecíficas incluem a estimulação da reatividade imune, quer por uma estimulação do sistema imune geral (como com a administração da IL-2) ou pelo bloqueio de mecanismos inibitórios (como com o uso do

anticorpo anti-CTLA-4). A imunização ativa com vacinas anti-tumorais é uma abordagem terapêutica atrativa, no entanto, nenhuma vacina desenvolvida até agora, conseguiu mediar a regressão de melanomas metastizados de forma clinicamente significativa e reprodutível. A terapia celular adotiva constitui uma forma promissora de imunoterapia e envolve a transferência de células imunes com atividade anti-tumoral para os doentes com cancro.

**Palavras-chave:** melanoma, imunologia, imunoterapia, citocinas, vacinas, anticorpos monoclonais, terapia celular adotiva.

**Abstract:**

*This review aims to provide a general overview of immunotherapy in melanoma, beginning with a general approach of the immune reaction in order to give insights into the possible targets for therapy.*

*The adaptative immune system involves processing and presentation of antigen particles to T-lymphocytes by dendritic cells in the context of human lymphocyte antigens (HLA), also known as histocompatibility antigens. This interaction is regulated by membrane receptors, coexpression molecules, and checkpoint molecules that limit autoimmunity. Once activated, T-lymphocytes provide cellular immunity and B-lymphocytes humoral immunity, with the participation of helper and suppressor T-cells, memory T-cells, cytotoxic T-cells, natural killer cells, regulatory T-cells that help limit autoimmunity. Cancer immunology is a complex balance between immune recognition of self and non-self, and adaptative processes by cancer cells that help them evade immune recognition, and involves stimulation, augmentation, or suppression of various aspects of the immune system.*

*Metastatic melanoma has been a target of immunotherapy for more than four decades.*

*Attempts to develop effective immunotherapies for the treatment of patients with metastatic melanoma fall into three major categories: nonspecific stimulation of the immune system, active immunization using cancer vaccines, and adoptive cell transfer immunotherapy. Nonspecific approaches include the upregulation of immune reactivity either by general immune stimulation (such as the administration of interleukin-2) or the blockade of inhibitory influences (such as the use of an anti-CTLA4 antibody). Active immunization with cancer vaccines is an attractive therapy approach, however, no approach has yet been developed that can reproducibly mediate the regression of*

*metastatic melanomas at clinically meaningful levels. Adoptive cell transfer immunotherapy is a promising form of immunotherapy and involves the transfer of immune cells with antitumor activity into cancer patients.*

**KeyWords:** *melanoma, imunologia, immunotherapy, cytokines, vacines, monoclonal antibodies, adoptive T-cell therapy*

## **Introdução**

O Melanoma é um tumor maligno com histogénese nos melanócitos e que surge principalmente na pele, muito embora se possa desenvolver em regiões extra-cutâneas contendo melanócitos, como a úvea, as leptomeninges ou mucosas de órgãos internos como a gastro-intestinal, a respiratória ou a genito-urinária, podendo ser pigmentado ou não. É causador de 90% das mortes provocadas por cancro cutâneo.

Os dados epidemiológicos conhecidos mostram que, nos últimos anos, a sua incidência e mortalidade tem aumentado de forma sustentada. A taxa de sobrevida correlaciona-se fortemente com o estadio da doença no momento do diagnóstico. Enquanto nos estadios iniciais, os melanomas são facilmente tratados por cirurgia, o prognóstico dos doentes com melanoma metastizado é mau, com uma sobrevida média de cerca de 7 meses e uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 10%.

Pretende-se com este trabalho a elaboração de uma revisão bibliográfica que sirva de apoio a todos os interessados neste tema, fornecendo informação atualizada, resumida e de rápido acesso acerca da imunoterapia do melanoma, bem como apontar, com base nos artigos consultados, aqueles que poderão ser os caminhos futuros desta modalidade terapêutica.

### **Porquê a Imunoterapia?**

O melanoma humano é possivelmente o melhor exemplo de um tumor imunogénico. As suas células exibem múltiplos antigénios e epítomos peptídeos que podem ser detetados pelo sistema imune do hospedeiro. Os doentes com melanoma são capazes de responder a esses antigénios e epítomos quer através de mecanismos humorais quer celulares.

A experiência clínica permite corroborar esta teoria, sendo os factos observados os seguintes:

- Os melanomas primários por vezes sofrem regressão parcial ou completa espontaneamente,
- A ocorrência de despigmentação *vitiligo-like* e halo-nevos num pequeno grupo de doentes,
- Aumento da prevalência de melanoma em doentes imunodeprimidos,
- Alguns casos de sucesso com os ativadores da resposta imunológica IFN- $\alpha$ 2b e IL2
- Terapêuticas emergentes mostrando respostas clínicas à terapia com anticorpos anti-CTLA-4 (ipilimumab) e
- Os melanomas primários frequentemente apresentam exuberantes infiltrados linfocitários.

No entanto, apesar do recrutamento e ativação de células imunes, o sistema imune dos doentes com melanoma não consegue na maioria dos casos impedir o crescimento e disseminação das células tumorais, pois estas respostas estão sujeitas a mecanismos de regulação concebidos para controlar a sua magnitude e duração, o que pode ser uma condicionante na resposta anti-tumoral. Também as células de melanoma têm mecanismos de contornar o sistema imune que incluem, entre outras, a inibição das moléculas alvo e a elaboração de citocinas imunossupressoras.

O conhecimento acumulado ao longo destes anos sobre os epítomos e antigénios associados ao melanoma, métodos de imunização e tecnologias para a obtenção de células T antigénio-específicas naturais ou por engenharia genética, produziram numerosas estratégias imunoterapêuticas como citocinas, anticorpos monoclonais, vacinas e terapia celular T adotiva para o melanoma, que apesar de não terem obtido resultados consistentes, mostraram alguns casos de respostas completas duradouras, que representam uma esperança na investigação continuada na imunoterapia do melanoma.

Pretende-se com este trabalho colocar à disposição de todos os interessados nesta matéria uma base de revisão bibliográfica recente e atualizada, com vista a simplificar o processo de pesquisa e acesso a informação de qualidade. Além disto, com base nos conhecimentos adquiridos e no cruzamento dos dados obtidos, serão retiradas algumas conclusões e apontadas aquelas que, à luz do conhecimento atual, serão os passos de futuro no âmbito desta modalidade terapêutica.

## **Material e Métodos**

Para a realização deste trabalho, efetuou-se uma pesquisa de artigos publicados em revistas das áreas de Dermatologia e Oncologia indexadas nas bases de dados da Pubmed, Clinicalkey e b-ON. Os termos de pesquisa usados foram “melanoma”, “imunoterapia”, “imunologia” em combinação. Os artigos foram selecionados de acordo o seu grau de credibilidade e fator de impacto. A sua informação foi posteriormente cruzada no sentido de aumentar a exatidão das conclusões retiradas, bem como verificar a veracidade e validade dos dados contidos em cada um deles.

## Imunoterapia – Conceito

A imunoterapia, também designada terapia biológica ou bioterapia, utiliza o sistema imune para combater doenças como o cancro.

O sistema imune é capaz de distinguir o próprio (*self*) do não-próprio (*non-self*), e de vigorosamente atacar o não-próprio. Tem ainda capacidade para distinguir o próprio do próprio modificado, tal como acontece com as células tumorais que, função das aberrações genéticas, apresentam moléculas de superfície alteradas que podem ser detetadas imunologicamente. Especialmente desafiante é o facto de as células tumorais em cada doente, terem o mesmo material genético básico das restantes células. Consequentemente os mecanismos celulares que nos protegem da auto-imunidade, podem limitar o reconhecimento de células tumorais autólogas.

Na vigilância imunológica anti-tumoral podem distinguir-se três fases distintas: eliminação, equilíbrio e evasão. O sistema imune é capaz de reconhecer e eliminar tumores subclínicos, mas em determinado momento é atingido um equilíbrio, com respostas apenas parcialmente eficazes e o tumor permanece *in situ*. Infelizmente muitos tumores saem desta fase de equilíbrio e tornam-se clinicamente aparentes (1).

A progressão de um tumor não depende apenas das características das células tumorais, mas também das características do hospedeiro, em particular da sua capacidade de desenvolver uma resposta imune. Do ponto de vista clínico existem várias evidências de que o nosso sistema imune tem realmente capacidade de controlar o crescimento tumoral:

- Os doentes com imunodeficiências congénitas ou adquiridas como a infeção VIH têm um risco aumentado de neoplasias,

- Os doentes transplantados com terapêuticas imunossupressoras têm também um risco aumentado de neoplasias,
- A regressão tumoral parcial ou completa espontânea é um fenómeno descrito em vários tipos de tumor, como é o caso do melanoma.

O objetivo da imunoterapia é compreender os mecanismos pelos quais o cancro é capaz de fugir ao sistema imune e terapeuticamente intervir em pontos críticos para promover respostas imunes anti-tumorais, podendo ser usadas, entre outros, vacinas, citocinas e anticorpos monoclonais.

## **Imunoterapia – História**

Há mais de um século, que surgiu a teoria de que o sistema imune tem um papel importante na luta contra o cancro.

Em 1891, mesmo antes do sistema imune ser bem conhecido, William Coley, um cirurgião de Nova Iorque injetava diretamente toxinas de *Streptococos* e *Serratia marcesens* (toxina de Coley) em tumores irresssecáveis para induzir uma resposta imune e a conseqüente redução tumoral. Estas experiências foram desenvolvidas a partir da observação de um doente, que na sequênciã de dois episódios de erisipela, se viu curado de um tumor considerado inoperável pelos médicos.

Esta foi a primeira demonstração presente na literatura médica que o sistema imune podia ser usado para matar células tumorais (2). Os seus sucessos, no entanto, eram esporádicos, difíceis de reproduzir e sem uma fundamentação teórica sólida, motivo pelo qual caíram em descrédito.

Em 1909 Paul Ehrlich realizou várias experiências em que imunizava ratos com tecido tumoral necrótico e posteriormente transplantava tecido tumoral viável. Em quase 50% dos ratos a imunização prévia protegia do crescimento tumoral, no entanto Ehrlich, com os poucos conhecimentos imunológicos da época, não conseguiu demonstrar que essa era uma resposta anti-tumoral específica e não uma simples rejeição alogénica.

Na década de 50 descobriu-se que as células tumorais eram reconhecidas pelo nosso sistema imune.

Na década de 60 Burnet propôs que os linfócitos verificavam continuamente nos tecidos a presença de células modificadas, provavelmente pela identificação de antígenos associados ao tumor.

No entanto, apesar destes avanços na vigilância imunológica anti-tumoral, até à década de 80 a imunoterapia era considerada ineficaz e irreproduzível e a classe médica continuava a confiar na cirurgia, na radioterapia e por último na quimioterapia para o tratamento do cancro.

Na década de 90 três descobertas mudaram a face da imunoterapia:

- A descoberta de antígenos tumorais imunogénicos que seriam reconhecidos e combatidos pelo sistema imune. O primeiro de muitos antígenos associados ao melanoma reconhecido pelas células T, foi o MAGE-1 (*melanoma-associated antigen E-1*) em 1991, seguido da descoberta de muitos outros antígenos, alguns dos quais apresentados às células T por moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH) tipo II, mas na maioria estimulando células T CD8+, no contexto de moléculas do CMH tipo I,
- A demonstração de que as células malignas são geneticamente muito instáveis,
- A descoberta de células T auto-reativas no sangue que podem atuar contra células próprias (*self*) modificadas.

De forma ainda mais convincente, em 1995 foi descoberto que as células dendríticas podem induzir imunidade celular T tumor-específica e regressão de metástases de melanoma quando adequadamente ativadas e re-injetadas.

O melanoma em particular é um tumor muito imunogénico, tal como demonstrado num trabalho de 1999 que identificou células T circulantes que reconheciam especificamente os antigénios associados ao tumor nas células de melanoma, motivo pelo qual muitas tentativas para induzir uma resposta imune contra o cancro foram testadas no melanoma (3).

## **Caraterísticas da resposta imunológica contra o melanoma**

As respostas imunes contra o melanoma envolvem dois mecanismos diferentes, mas inter-relacionados: a imunidade inata e a imunidade adquirida (específica).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa, enquanto o sistema imune adquirido age como uma segunda linha, protegendo também contra a re-exposição ao mesmo agressor.

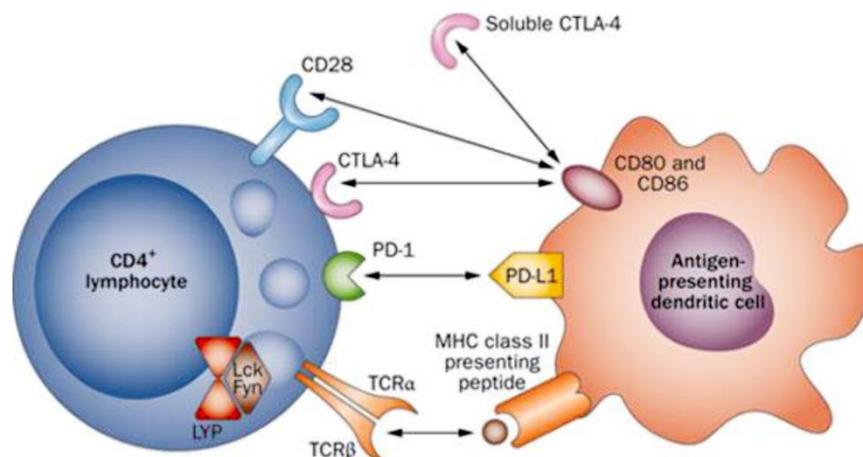
O sistema imune adquirido requer algum tempo para reagir contra um organismo invasor, enquanto o sistema imune inato inclui sistemas de defesa que, na maior parte, estão constitucionalmente presentes.

O sistema imune adquirido é específico para um antígeno e reage somente contra o organismo que induz a resposta, possuindo memória imunológica em caso de reexposição. Em contraposição, o sistema imune inato não é específico para um antígeno e reage da mesma maneira para uma variedade de organismos (ex: inflamação).

A resposta imune inata tem como objetivos eliminar agentes patogénicos, iniciar a resposta imune adquirida envolvendo os linfócitos T e B e iniciar a reparação tecidual.

As células dendríticas fazem a ponte entre o sistema imune inato e o adquirido. Quando o sistema imune inato é ativado, as células dendríticas migram para os gânglios linfáticos locais, onde apresentam o antígeno internalizado a linfócitos T específicos (fig. 1).

**Figura 1:** Interações moleculares entre as células apresentadoras de antígeno e os linfócitos T



Nat. Rev. Endocrinol. doi:10.1038/nrendo.2011.245

A ativação de diferentes recetores *Toll-like* (TLR) nas células dendríticas desencadeia diferentes perfis de citocinas e diferentes respostas imunológicas.

Os TLR 4, 5 ou 11 levam à produção de IL12 pelas células dendríticas, o que canaliza as células T para um perfil TH1 capaz de promover respostas anti-tumorais. Os recetores 1, 2 ou 6 levam à produção de IL10, que por sua vez canaliza as células T para um perfil TH2, incapaz de promover respostas anti-tumorais.

A resposta imunitária é iniciada por citocinas (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ ) e por DAMPs (*damaged-associated molecular pattern molecules*) libertados por células tumorais necróticas ou por células normais lesadas durante a progressão do tumor. Estas células promovem o recrutamento de células da imunidade inata (células NK, células NKT, células T  $\gamma\delta$ , macrófagos e células dendríticas) e da imunidade adquirida (linfócitos T

CD4 e CD8). As células NK e os macrófagos ativam-se mutuamente através da produção de IFN $\gamma$  e IL-12. (4).

As células NK reconhecem a ausência de expressão das proteínas do CMH na superfície das células alvo, incluindo as células de melanoma que ou perdem a expressão CMH ou exprimem níveis muito baixos das moléculas CMH. Os ligandos para o recetor das células NK, continuam indefinidos, com exceção para os ligandos do recetor de ativação NKG2D, expresso quer pelas células NK, quer pelas células T NK, que parecem ser as proteínas de *stress* MICA/B e ULBPs. Deste modo é consensualmente aceite que os recetores das células NK primariamente reconhecem células em *stress*, tal como as células tumorais, provocando a sua apoptose através da proteína membrana TRAIL, da perforina e da geração de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (4).

As células T detetam o antígeno através de moléculas do CMH. Os linfócitos T CD4+ são ativados através de moléculas do CMH II expressas nas células dendríticas, enquanto os CD8+ através de moléculas do CMH I.

Após a apresentação inicial, uma minoria de células T (5 a 10%) adquire memória com uma resposta mais intensa e rápida em caso de reencontro com o antígeno quando comparadas com as células T *naíves*.

Na imunoterapia tumoral a existência de células com memória, potencialmente pode diminuir o risco metastático e prevenir a recidiva tumoral após uma resposta inicial, bem como diminuir o risco de um segundo tumor.

Os genes mutados ou não mutados, expressos especificamente pelos tumores como os antígenos das células germinativas (proteínas da superfamília MAGE e NY-ESO-1), ou os antígenos específicos de diferenciação do tecido onde o tumor teve

origem, no caso do melanoma, antígenos de diferenciação melanocítica (MART-1, gp100, tirosinase, TRP1, TRP2 e MELOE-1) podem todos servir como antígenos tumorais.

Os produtos dos genes mutados são exclusivamente expressos pelas células tumorais, e por consequência reduzindo o risco de efeitos secundários autoimunes. No entanto, como estas mutações também são específicas de cada doente, não podem ser transpostas para um grupo mais alargado, já que pode existir um elevado grau de heterogeneidade entre cada doente.

Os antígenos de células germinativas são proteínas imunogénicas expressas nas células reprodutoras (gâmetas) e são expressas em diferentes tipos de tumores. A presença de células T dirigidas contra estes antígenos não irá desencadear autoimunidade, já que estes genes normalmente não são expressos por células somáticas.

Os antígenos de diferenciação melanocítica são também expressos por melanócitos normais, pelo que a imunoterapia dirigida contra estes antígenos pode associar-se a vitiligo.

Os antígenos tumorais, expressos pelo tumor, são captados pelas células dendríticas. As células dendríticas necessitam de ser ativadas por peptídeos microbianos e citocinas pro-inflamatórias; na ausência destes estímulos pode desencadear-se uma reação oposta, isto é de tolerância por depleção das células T ou pela ação de linfócitos Tregs (3).

Os sinais de ativação podem partir das células tumorais necróticas ou ser administrados com objetivos terapêuticos, usando ligandos dos recetores *Toll-like* ou anticorpos agonistas. Estes antígenos poderiam ser administrados através de uma

vacina terapêutica, na forma de proteínas ou peptídeos sintéticos, lisados de células tumorais ou vetores virais codificando antígenos tumorais.

Estas células dendríticas ativadas vão processar o antígeno capturado, migrar para o gânglio linfático e apresentá-lo através das moléculas de superfície do CMH II, interagir com as células T e desencadear uma resposta imunológica.

A interação entre CMH/antígeno com o receptor das células T (TCR) necessita de um sinal co-estimulatório com origem em ligandos da membrana plasmática das células dendríticas, que irão interagir com receptores estimuladores ou inibidores nas células T, ou com origem em citocinas secretadas. No tumor, as células T ativadas irão reconhecer os antígenos e combater as células tumorais.

No entanto, o tumor tem mecanismos de defesa que incluem:

- Inibição da maturação das células apresentadoras de antígenos, pela redução das moléculas co-estimuladoras e consequente redução da ativação das células T,
- diminuição da expressão de antígenos tumorais tornando-se menos imunogénico,
- a presença de linfócitos T-regs e células supressoras com origem mieloide no tecido tumoral,
- a secreção de fatores supressivos das células T como a IL6, IL10, VEGF e TGF $\beta$  e
- o aumento da expressão de ligandos com funções inibitórias nas células T como o CTLA-4 e o PD-1.

Todas as respostas imunológicas passam por uma fase de contração após uma fase de amplificação. O processo de ativação e expansão celular T, após a exposição aos antígenos tumorais, está sujeito a mecanismos regulatórios internos, como forma de evitar uma expansão clonal T contínua e os consequentes efeitos indesejáveis de um processo inflamatório crônico.

Estes mecanismos são muito úteis nos processos infecciosos, no entanto, não ajudam no caso da imunidade tumoral.

No contexto de uma estimulação antigénica crónica pelos antígenos tumorais, as células T tornam-se disfuncionais, desenvolvendo um fenómeno designado por “exaustão”, regulando em alta a expressão de recetores inibitórios como o CTLA4, enquanto no microambiente tumoral as células de melanoma e as células apresentadoras de antígeno exprimem ligandos inibitórios como o PD-L1. Várias moléculas foram identificadas (ex: PD1, TIM3) como marcadores de “exaustão”.

Além das respostas imunitárias específicas, o desenvolvimento de inflamação crónica é extremamente importante para a progressão do melanoma, uma vez que condiciona a ocorrência de novas mutações. As células imunitárias que infiltram os tumores libertam citocinas pró-inflamatórias, controlando a proliferação, a sobrevivência celular, a angiogénese e a invasão. Por esta razão, talvez a presença de infiltrado linfocitário tumoral (TIL), apesar de traduzir uma resposta imunitária ativa contra o melanoma, não tenha demonstrado ser um fator preditivo independente de sobrevivência livre de doença ou de sobrevivência global (4).

De uma forma global a resposta imune pode dividir-se numa fase de ativação, representada pela ativação das células dendríticas e sua interação com os linfócitos T no

gânglio linfático, e uma fase efetora representada pela invasão de linfócitos T ativados e selecionados a nível do tumor e a eliminação das células expressando os antígenos tumorais. Em ambas as fases existem mecanismos imunológicos de controlo, para prevenir reações contra as células *próprias* (*self*). Muitos desses mecanismos de controlo usam interações ligando-recetor que podem ser quer de estimulação, quer de inibição. Os tumores podem ativar a inibição pela sobre-expressão de ligandos para os recetores inibitórios nas células T, como por exemplo o ligando PD-1.

O alvo da imunoterapia é não apenas potenciar as respostas imunes normais, mas também combater os mecanismos de fuga que as células tumorais usam para escapar à imunorregulação.

Atendendo à heterogeneidade na genética e no comportamento das células tumorais, um alvo terapêutico específico pode não ser expresso por todas as células tumorais, pelo que pode ser necessário recurso a terapias combinadas permitindo o ataque simultâneo de múltiplos alvos com efeitos sinérgicos.

## Opções terapêuticas

O tratamento do melanoma avançado inclui a cirurgia, a imunoterapia, a terapia alvo, a radioterapia e a quimioterapia, dependendo do estadio da doença.

Alguns fármacos citostáticos demonstraram algum grau de atividade no tratamento do melanoma maligno, sendo a dacarbazina considerada a molécula de referência. Foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) em 1975, no entanto o seu efeito é mínimo nos doentes com doença metastática, com taxas de resposta de 6 a 20% com durações médias de 6 a 8 meses (5).

No melanoma, a **quimioterapia** pode ser sistémica (oral ou endovenosa) ou regional, de que é exemplo a perfusão regional hipertérmica, para o tratamento de metástases cutâneas localizadas aos membros. O fluxo de sangue, de e para o membro, é interrompido durante algum tempo, permitindo que a maioria do fármaco atinja diretamente o tumor; desta forma, grande parte da quimioterapia permanece nesse membro. Adicionalmente, o membro pode ser sujeito a uma hipertermia que amplifica o efeito do citostático.

Recentemente foi aprovada a primeira **terapia alvo** para o melanoma metastizado, o vemurafenib, em doentes portadores da mutação BRAF<sup>v600</sup>. A mutação BRAF mais comum no melanoma resulta da substituição do aminoácido Valina por um Ácido Glutâmico na posição 600 da proteína (BRAF<sup>V600E</sup>).

O vemurafenib é um inibidor da tirosina cinase oncogénica BRAF<sup>v600</sup>, presente em cerca de 50% dos doentes com melanoma, que mostrou melhorias objetivas em 48% dos doentes tratados, apesar de a taxa de respostas duradouras ser baixa (0,9%) (6).

O sucesso do vemurafenib estimulou uma investigação mais intensiva sobre os mecanismos moleculares da patogénese do melanoma e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas dirigidas a moléculas específicas da via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), que desempenha um papel chave no desenvolvimento do melanoma.

A estratégia de inibição da via da MAPK, através do BRAF ou do MEK, continua a ser investigada com outras drogas como o dabrafenib, muito similar ao vemurafenib, e o trametinib, inibidor de MEK, cuja utilização em combinação permite ultrapassar as resistências desenvolvidas ao vemurafenib e inclusive com menores efeitos secundários que com a utilização do vemurafenib isolado (7).

Alternativas terapêuticas para o melanoma avançado têm tido o seu foco na área da **imunoterapia** dada a comprovada capacidade natural do melanoma em induzir repostas imunológicas.

Os agentes imunoterapêuticos podem atuar através de um ou mais mecanismos:

- estimular a resposta antitumoral do hospedeiro, aumentando o número de células efectoras ou produzindo um ou mais mediadores solúveis (por exemplo, linfocinas),
- diminuir os mecanismos supressores do hospedeiro,
- alterar as células tumorais aumentando sua imunogenicidade ou torná-las mais suscetíveis à lesão pelos processos imunológicos.

Os principais tipos de imunoterapia atualmente usados no tratamento do cancro incluem:

- anticorpos monoclonais, desenhados para atacar uma parte muito específica da célula tumoral,
- vacinas para desencadear uma resposta imune contra as células tumorais. Habitualmente pensamos nelas para prevenir infeções em doentes saudáveis, mas algumas vacinas podem ser usadas para prevenir ou tratar o cancro,
- Imunoterapias não específicas que estimulam o sistema imune de uma forma geral, resultando numa maior atividade contra as células tumorais

A imunoterapia pode ainda ser **local**, quando administrada diretamente no tecido a tratar ou **sistémica**, útil em neoplasias avançadas.

A imunoterapia pode também ser classificada **ativa** ou **passiva**, de acordo com as substâncias utilizadas e os seus mecanismos de ação.

Na imunoterapia **ativa**, administram-se substâncias estimulantes e restauradoras da função imunológica (**imunoterapia não específica**) ou vacinas de células tumorais (**imunoterapia específica**), com a finalidade de intensificar a resistência ao crescimento tumoral.

A **imunoterapia ativa não específica** utiliza imunomoduladores como o BCG (bacilo de *Calmette-Guérin*, a bactéria da vacina contra a tuberculose), levamisol, isoprinosina e *Corynebacterium parvum* (bactéria semelhante à da difteria).

Na **imunoterapia ativa específica** utilizam-se vacinas e soros produzidos a partir de cultura de células tumorais do próprio doente (imunoterapia autóloga) ou de outro doente com neoplasia semelhante (imunoterapia heteróloga).

A **imunoterapia passiva específica celular**, utiliza células efectoras específicas, ativadas *ex vivo*, e posteriormente diretamente transfundidas num doente (**terapia adotiva**), e a **humoral** utiliza anticorpos livres ou conjugados com citocinas ou radioisótopos contra as células tumorais.

Na **imunoterapia passiva inespecífica** utilizam-se citocinas, com o objectivo de proporcionar capacidade imunológica de combate à doença. São exemplos de substâncias utilizadas na imunoterapia passiva: interferão e interleucina-2.

A primeira imunoterapia a mostrar respostas duradouras nos doentes com melanoma metastizado, em monoterapia ou associado à dacarbazina foi a citocina IL-2.

## **Citocinas**

Citocinas são pequenas moléculas proteicas usadas pelas células do sistema imunológico para comunicarem entre si.

## **Interferons**

Os **Interferons** (IFNs) representam um grupo pleiotrópico de citocinas descritas em 1957, capazes de induzir a síntese de centenas de proteínas diferentes da via *JAK-*

*STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription)*, usada pelas células para transmitir informação extra-celular para o núcleo.

Os IFNs são glicoproteínas que apresentam atividade antitumoral e antiviral, que podem ser derivados dos leucócitos (IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) ou dos fibroblastos (IFN- $\beta$ ), ou sintetizados em bactérias por técnicas genéticas recombinantes.

A sua ação antitumoral deve-se ao reforço da apresentação antigénica tumoral, bem como à sua ação anti-proliferativa, anti-angiogénia e pro-apóptica. Outros efeitos incluem aumento da expressão de moléculas de adesão no tumor e células efectoras, aumento do número de células NK, estimulação da produção de outras citocinas e aumento da citotoxicidade linfocitária.

O **interferão alfa (IFN- $\alpha$ )** foi a primeira citocina recombinante a ser usada no melanoma, quer na forma *standard* quer na forma peguilada. Na forma peguilada a ligação do IFN- $\alpha$  ao polietilenoglicol aumenta a sua semivida, tendo como vantagem poder ser administrado apenas uma vez por semana, enquanto a formulação *standard* é administrada três vezes por semana.

O **IFN- $\alpha$**  em altas doses continua a ser o esquema de referência no tratamento adjuvante nos doentes com melanoma operável de alto risco. Os doentes com melanomas mais espessos (AJCC IIB-C) e os doentes com doença ganglionar microscópica (IIIA) ou clinicamente evidente ou com metástases em trânsito (IIIB-C) têm um risco aumentado de recidiva e morte. Nos doentes de alto risco de recidiva/metástases, o tratamento adjuvante com **IFN- $\alpha$**  em altas doses após a excisão cirúrgica radical demonstrou melhorar quer a sobrevivência livre de doença quer a sobrevivência global, motivo pelo qual é o único tratamento adjuvante aprovado.

O esquema em altas doses do **IFN- $\alpha$**  inclui uma fase de indução com duração de 1 mês (20 UM/m<sup>2</sup> endovenoso 5 dias por semana durante 4 semanas), seguido de uma fase de manutenção com duração de 1 ano (10 UM/m<sup>2</sup> subcutâneo três vezes por semana durante 48 semanas) mostrou os resultados mais consistentes e com maiores aumentos sobrevida livre de doença quer a sobrevivência global, como demonstrado em várias metanálises (8).

Numerosos ensaios testaram doses menores de IFN- $\alpha$  administradas por períodos mais longos, na esperança de alcançar os mesmos resultados obtidos com as altas doses e com redução da toxicidade. No entanto, nenhum destes ensaios com doses alternativas mostrou benefícios na sobrevivência global.

A EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*) conduziu um ensaio de fase III para avaliar o papel do tratamento prolongado (5 anos) com baixa dose de IFN- $\alpha$ 2b peguilado, uma formulação de IFN- $\alpha$ 2b com maior biodisponibilidade, como tratamento adjuvante. Os resultados, recentemente publicados mostraram que a taxa de doentes livres de doença aos 7 anos, no grupo dos tratados com IFN- $\alpha$ 2b peguilado foi de 39,1% contra 34,6% no grupo observacional, sugerindo que o tratamento prolongado com IFN- $\alpha$ 2b peguilado pode retardar a recidiva tumoral. Não se verificaram diferenças na sobrevivência global entre os dois grupos. Melanomas primários ulcerados e com baixa carga tumoral correlacionaram-se positivamente com melhor resposta e podem servir como fatores preditivos da sensibilidade ao IFN- $\alpha$ 2b no futuro (9).

No entanto o seu uso está associado a numerosos efeitos secundários, que têm de ser cuidadosamente monitorizados, sendo os mais frequentes os sintomas gripais por

vezes com febre muito elevada, toxicidade hematológica, elevação das transaminases, náuseas, astenia e problemas psiquiátricos com depressão e mesmo ideação suicida.

## **IL-2**

IL-2 é um fator de crescimento major que induz a proliferação de células linfoides, tendo um importante papel regulação imunológica. A sua principal atividade anti tumoral resulta da sua capacidade de induzir ativação e proliferação das células T.

A **Interleucina-2** (IL-2) aumenta a proliferação e a sobrevivências das células T e estimula a diferenciação de células T *naíves* em células T efectoras e memória. A IL-2 também é essencial na homeostasia das células T reguladoras (Tregs), que podem influenciar negativamente a resposta imune antitumoral.

Os estudos iniciais utilizaram altas doses de IL-2 recombinante (600000 a 720000 UI/Kg endovenoso de 8/8h nos dias 1 a 5 e 15 a 19), isoladamente ou em combinação com células LAK (*lymphokine-activated killer*).

Uma revisão de oito ensaios clínicos de fase II, em doentes com melanoma metastático em tratamento com altas doses de IL-2 mostraram uma resposta em apenas 16% dos doentes com uma duração média de 9 meses, mas uma pequena fração (5%) teve uma resposta completa e duradoura (10). Com base nestes resultados a IL-2 foi aprovada pela FDA em 1998, mas nunca o foi na Europa.

Um estudo randomizado comparando a quimioterapia em associação com IL-2 (bio-quimioterapia) com a quimioterapia isoladamente não mostrou benefício no grupo de doentes com melanoma metastático tratados com IL-2 (11).

Fatores que podem prever uma boa resposta incluem os doentes com metástases cutâneas ou subcutâneas, linfocitose após a terapêutica e o desenvolvimento de vitiligo. Níveis séricos elevados de VEGF e fibronectina e LDH estão, pelo contrário, associados a ausência de resposta clínica à IL-2 e a diminuição da sobrevivência global, pelo que poderão ser usados como biomarcadores de exclusão dos doentes não respondedores (12).

O tratamento intensivo com IL-2 em altas doses está associado a significativa toxicidade. O seu uso em altas doses é limitado pelos efeitos secundários graves, incluindo toxicidade gastro-intestinal, cardiovascular, renal, hepática, neurológica e o desenvolvimento de sépsis. Em particular a síndrome de extravasamento capilar com a acumulação de líquido a nível hepático e pulmonar está associado a mortalidade significativa.

Para tentar minimizar os efeitos adversos diferentes esquemas terapêuticos, incluindo doses mais baixas de IL-2 foram testadas, mas apenas altas doses tinham um efeito nos doentes com melanoma (13).

Felizmente os seus efeitos secundários tornaram-se mais previsíveis e manejáveis à medida que a experiência com IL-2 foi aumentando. Os resultados duradouros registados em doentes selecionados, sugere que a IL-2 ainda possa ser uma abordagem terapêutica possível nos doentes com melanoma metastizado.

A falta de eficácia da IL-2 pode ser devida a outros efeitos imunes como a redução no número de células dendríticas e a expansão de populações Tregs o que pode desencadear tolerância imunológica e inibição da resposta antitumoral.

Com o objetivo de diminuir a sua toxicidade a IL-2 foi também usada em injeções intralesionais, com respostas tumorais locais, mas sem resposta ao nível das metástases não tratadas.

O uso de anticorpos como guias moleculares é uma estratégia para fazer chegar as citocinas ao local do tumor. As **imunocitocinas** são proteínas de fusão constituídas por um anticorpo dirigido contra um antígeno tumoral da superfície celular e uma citocina imunoestimuladora. Recentemente foi desenvolvida uma imunocitocina L19-IL-2 com resultados promissores, encontrando-se a decorrer dois estudos de fase II com a utilização da combinação L19-IL-2 /dacarbazina e com a utilização intratumoral de L19-IL-2. A metade L19 liga-se à fibronectina nos neovasos tumorais e a metade IL-2 ativa localmente as células NK e os macrófagos, induzindo respostas imunes citotóxicas contra as células tumorais, reduzindo assim a angiogénese e o crescimento tumoral (14).

A **Interleucina-21** (IL-21) aumenta a atividade citolítica das células NK, induz a ativação das células T citotóxicas CD8+ e tem um papel primordial na regulação das células T *helper* 17 (Th 17) (15).

Num estudo recente multicêntrico obteve-se uma resposta parcial em 22,5% com uma duração média de 5,3 meses, inferior à observada com a IL-2 (8,9 meses) ou com o ipilimumab (19,3 meses). Está a decorrer um ensaio usando a a IL-21 recombinante associada ao ipilimumab em doentes com melanomas irresecáveis nos estádios III/IV (16).

## Vacinas

### Vacinas de células inteiras ou de lisados celulares

As células tumorais de melanoma têm sido testadas pelas suas propriedades imunogénicas numa grande variedade de esquemas de vacinação.

As vacinas de células tumorais utilizam quer as células tumorais inteiras obtidas de amostras de tumor a fresco ou criopreservado, irradiadas antes do tratamento, para interromper a propagação tumoral, quer componentes subcelulares obtidos a partir de lisados das células do melanoma. Em vez de se focarem em antígenos tumorais específicos, muitos investigadores têm utilizado produtos derivados do tumor, dada a heterogeneidade dos tumores, o número de mutações no melanoma metastático e a incapacidade de conhecer todos os possíveis antígenos a atingir.

As vacinas podem ser obtidas de células tumorais autólogas ou alogénicas.

Nas vacinas autólogas, os doentes são imunizados com os seus próprios antígenos. Um ensaio clínico de uma vacina de células tumorais autólogas irradiadas mostrou uma taxa de resposta de 9%, e um período livre de doença em média de 4,5 meses (17).

Outros estudos clínicos avaliaram combinações de vacinas de células tumorais autólogas com outros adjuvantes não específicos como o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) ou *Corynebacterium parvum* ou citocinas pro-inflamatórias, como o GM-CSF (*granulocytic macrophage colony stimulating factor*). Combinações de células tumorais autólgas conjugadas com BCG e haptenos como o 2,4-dinitrofenol também foram ensaiadas com resultados clínicos modestos.

As vacinas de células alogénicas são preparadas a partir de múltiplas linhagens celulares e não das próprias células tumorais do doente. Isto permite a manipulação das células tumorais, para exprimirem vários antígenos associados ao tumor, que podem induzir uma resposta imune mais abrangente. Estas vacinas são mais fáceis de preparar, padronizar e produzir, podendo ter uma maior aplicação clínica.

Canvaxin™ foi desenvolvida como uma vacina polivalente obtida a partir de 3 linhagens de células de melanoma alogénicas irradiadas, exprimindo múltiplos antígenos. Os resultados dos estudos de fase II mostraram aumento da sobrevivência aos 5 anos, no entanto, não confirmados nos estudos de fase III, tendo sido descontinuada (18).

Melacine™, uma preparação liofilizada de células tumorais alogénicas lisadas obtidas a partir de duas linhagens celulares foi testada quer isoladamente, quer em combinação com IFN- $\alpha$ 2b, com aparentes benefícios clínicos, quando comparada com a quimioterapia apenas (19). No entanto, mais uma vez, estes resultados não foram confirmados nos estudos de fase III, apesar de um subgrupo de doentes HLA-A2 e HLA-C3 positivos, poderem beneficiar desta vacina (20).

### **Vacinas de células dendríticas**

A função das células dendríticas no microambiente tumoral está alterada, motivo pelo qual têm sido desenvolvidos tratamentos, para superar o efeito imunossupressor do tumor, usando a sua manipulação *ex vivo*, para criar uma população de células dendríticas potentes, capazes de estimular uma resposta celular T robusta e duradoura.

As células dendríticas podem ser produzidas a partir de monócitos circulantes ou a partir de *stem cells* hematopoiéticas CD34+ circulantes. As células dendríticas são posteriormente “carregadas” com peptídeos tumorais específicos que irão processar e apresentar.

Várias abordagens foram utilizadas:

- utilização de um *cocktail* peptídico para estimular as células dendríticas,
- utilização de lisados tumorais autólogos ou alogénicos,
- utilização de células dendríticas portadoras de RNAm que codifica antigénios,
- utilização de células dendríticas portadoras de vetores virais.

Apesar de a primeira opção poder ser facilmente produzida em larga escala e poder ser modificada para aumentar a eficácia, o seu uso é limitado porque apenas um pequeno número de péptidos pode ser usado na vacina e só podem ser usadas em doentes com determinados tipos de HLA.

O uso de lisados tumorais permite o uso de múltiplos epítomos, com uma ativação celular T mais alargada. A utilização de amostras derivadas do doente (autólogas) é apelativa, já que irá desencadear respostas imunes relevantes para os antigénios expressos pelo tumor do doente; no entanto, esta técnica é limitada porque requer um grande volume de massa tumoral para a sua preparação.

A estimulação *ex-vivo* das células dendríticas resulta em respostas imunes e clínicas quantificáveis, sem toxicidades que condicionem as doses, no entanto, a resposta clínica global tem sido baixa (21).

Até à data não existe nenhuma terapia com células dendríticas aprovada no melanoma, no entanto, foi recentemente aprovado pela FDA o Provenge™ para o carcinoma da próstata.

### **Vacinas de Gangliosídeos**

Os gangliosídeos são glicoesfingolípídeos presentes na superfície das células de melanoma e capazes de induzir uma resposta imune humoral. Além disso a presença do anticorpo anti ganglísideo GM2 (sem vacinação) tem sido associada a uma maior sobrevivência em doentes com melanoma. No entanto os estudos de fase III com a administração da vacina GM2, não confirmaram os resultados preliminares.

### **Vacinas de antígenos Tumorais**

Numerosos antígenos de melanoma foram identificados:

- antígenos de diferenciação melanocítica ex: gp-100, Melan-A/MART-1, TRP-1 e TRP-2,
- antígenos das células germinativas ex: MAGE-A3, NY-ESO-1 e
- antígenos próprios mutados ex:  $\beta$ - catenina,

e uma grande variedade de estratégias de vacinação foram estudadas para ativar o sistema imune para reconhecer e destruir as células de melanoma exprimindo esses antígenos.

Devido ao facto de as células tumorais serem geneticamente heterogêneas, um alvo terapêutico específico pode não ser expresso em todas as células tumorais. Por exemplo os antígenos das células germinativas só são expressos por 5 a 50% das células T, motivo pelo qual a vacinação contra esses antígenos não iria atingir todas as células tumorais. Mesmo se certos antígenos, como os antígenos de diferenciação melanocítica, são homoganeamente expressos pelas células tumorais, algumas células desenvolvem estratégias adicionais para contornar o tratamento, como diminuir a expressão das proteínas alvo o que sugere uma vez mais a necessidade de terapias de combinação para o ataque simultâneo de múltiplos alvos com efeitos sinérgicos.

As vacinas obtidas a partir de antígenos podem ser classificadas em:

- vacinas peptídicas ou proteicas que transportam o antígeno misturado com adjuvantes
- vacinas contendo plasmídeos de DNA que transportam genes codificando o antígeno
- vacinas virais ou bacterianas recombinantes
- vacinas de células dendríticas

As vacinas peptídicas ou proteicas podem ser univalentes, quando dirigidas para um antígeno HLA específico, ou polivalentes, quando usam múltiplos antígenos ou epítomos antigénicos. Várias técnicas têm tentado aumentar a capacidade imunogénica das vacinas peptídicas, para tentar ultrapassar a anergia celular T e a tolerância do

hospedeiro aos antígenos tumorais, administrando-as em associação com citocinas, como a IL-2, IFN- $\alpha$ 2b e GM-CSF, com recetores agonistas *Toll-like* ou emulsificadas com adjuvantes (22).

Num estudo de fase III, 185 doentes com melanoma metastizado, foram aleatoriamente randomizados em dois grupos: um recebendo altas doses de IL-2 isoladamente e o outro em associação com gp100. A associação mostrou uma taxa de resposta objetiva aumentada (16% versus 6%) e uma sobrevida global aumentada (17,8 versus 11,1 meses). Este é o primeiro estudo de fase III a mostrar que uma vacina pode melhorar a imunoterapia com IL-2 no melanoma (23).

Esta mesma vacina, no entanto não melhorou a eficácia do ipilimumab, sugerindo que o impacto da vacina depende da imunoterapia co-administrada.

MelQbG10 é uma vacina que contém um fragmento modificado da proteína Melan-A / MART-1, um antígeno de diferenciação melanocítica, associado a oligonucleótidos imunoestimuladores. Estão a decorrer estudos prospetivos randomizados comparativos para verificar se os resultados promissores das fases I e II se confirmam (24).

As vacinas de DNA permitem a expressão do antígeno imunizante ao longo do tempo, já que elas dependem da capacidade da célula para transcrever genes codificados a partir do DNA administrado ao hospedeiro. Um exemplo é Allovectin-7®, veiculando um plasmídeo que codifica o HLA-B7 e a  $\beta$ -2 microglobulina, formando um CMH-I, que como sabemos tem expressão diminuída ou ausente no melanoma, que no entanto não conseguiu mostrar vantagens em relação à quimioterapia (dacarbazina e temozolamida) num ensaio de fase III (25).

Vários vetores virais recombinantes estão em investigação com o objetivo de aumentar as respostas imunes anti-tumorais, com particular interesse no vírus *vaccinia* e outros *pox* vírus, bem como na *Listeria monocytogenes*. Estas vacinas são de difícil utilização pela formação de anticorpos neutralizantes.

Infelizmente, até à data os estudos têm mostrado fracas respostas imunológicas e consequentemente fracas respostas clínicas.

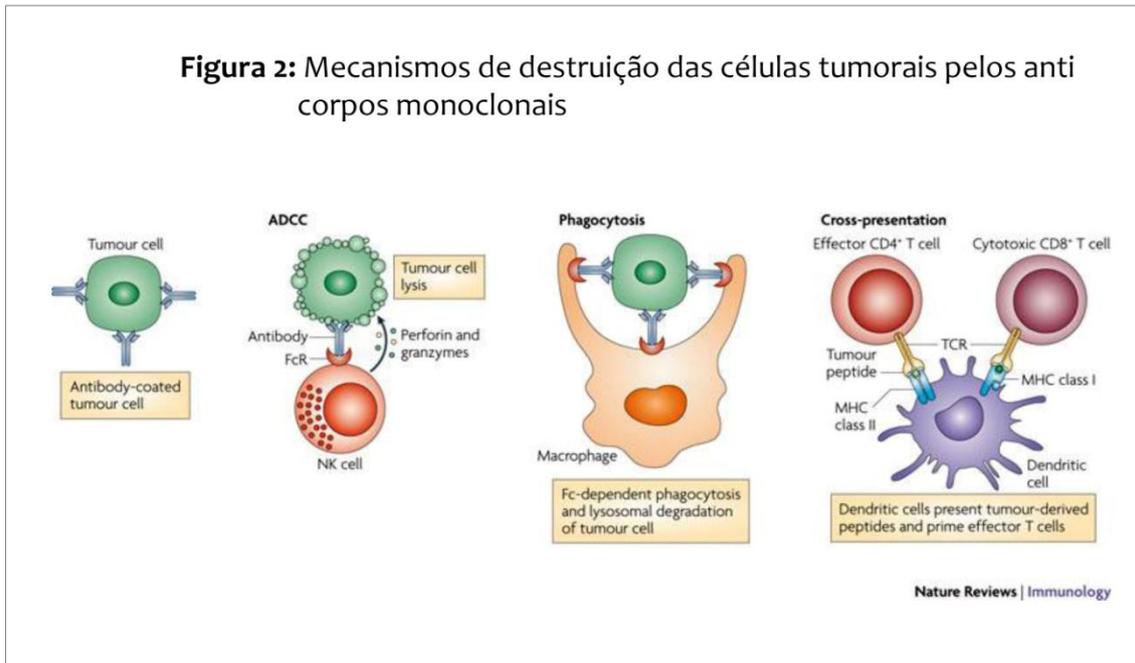
### **Anticorpos monoclonais**

Atingir os tumores com anticorpos constitui uma estratégia atrativa, já que estas moléculas são altamente específicas dos seus alvos e podem ter vários mecanismos de destruir as células tumorais – fig.2 (26):

- ativar vias de sinalização para induzir a paragem do crescimento tumoral,
- desencadear a apoptose,
- desencadear a citotoxicidade celular e/ou fagocitose,
- ativar o complemento,
- ligar-se a recetores Fc nas células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas para promover a apresentação de antígenos e a resposta imune adquirida contra as células tumorais.

Os anticorpos ligados a toxinas, radionuclídeos e citocinas foram concebidos, para fazer chegar especificamente estes agentes tóxicos à célula tumoral.

**Figura 2:** Mecanismos de destruição das células tumorais pelos anticorpos monoclonais



#### Anticorpos anti-CTLA-4

CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) é um dos recetores de inibição presente nas células T. Funciona como uma molécula co-inibitória, competindo diretamente com o CD28, na sua ligação à família de proteínas B7, inibindo a proliferação celular T.

Bloquear CTLA-4 com anticorpos anti-CTLA-4, potencia as respostas T e ativa a proliferação de células T específicas do tumor.

Ipilimumab e tremelimumab são dois anticorpos monoclonais humanos anti-CTLA-4, desenvolvidos e testados em ensaios clínicos. Apesar de em estudos iniciais o tremelimumab ter mostrado regressões tumorais objetivas e duradouras num subgrupo de doentes, foi posteriormente descontinuado por não ter mostrado vantagem nos estudos de fase III, relativamente às terapias já existentes (27).

Resultados mais encorajadores foram obtidos com o ipilimumab. A eficácia do ipilimumab foi evidenciada num ensaio randomizado de fase III envolvendo 676

doentes com melanomas irressecáveis nos estádios III ou IV, cuja doença tinha progredido durante tratamento previamente efetuado para doença metastática.

Os doentes foram tratados com ipilimumab e vacina peptídica gp100, ipilimumab apenas ou gp100 apenas. O objetivo do estudo era demonstrar o benefício da combinação do anticorpo e da vacina. Surpreendentemente, os resultados mostraram que a sobrevida global média foi de 6,4 meses para o grupo gp100, 10 meses no grupo ipilimumab mais gp100 e 10,1 meses no grupo do ipilimumab em monoterapia (28).

Este impacto positivo na sobrevivência global dos doentes com melanoma avançado levou à sua aprovação quer pela FDA, quer pela EMEA, na dose de 3mg/kg administrado de 3 em 3 semanas num total de 4 doses.

Um estudo posterior de fase III, comparando o tratamento com ipilimumab e dacarbazina *versus* dacarbazina apenas, também demonstrou a eficácia do ipilimumab, com uma melhoria da sobrevida global dos doentes tratados com ipilimumab e dacarbazina (11.2 meses versus 9.1 meses) e respostas duradouras num pequeno subgrupo de doentes (29).

Atualmente não existem biomarcadores que nos permitam identificar quais os doentes respondedores ao ipilimumab.

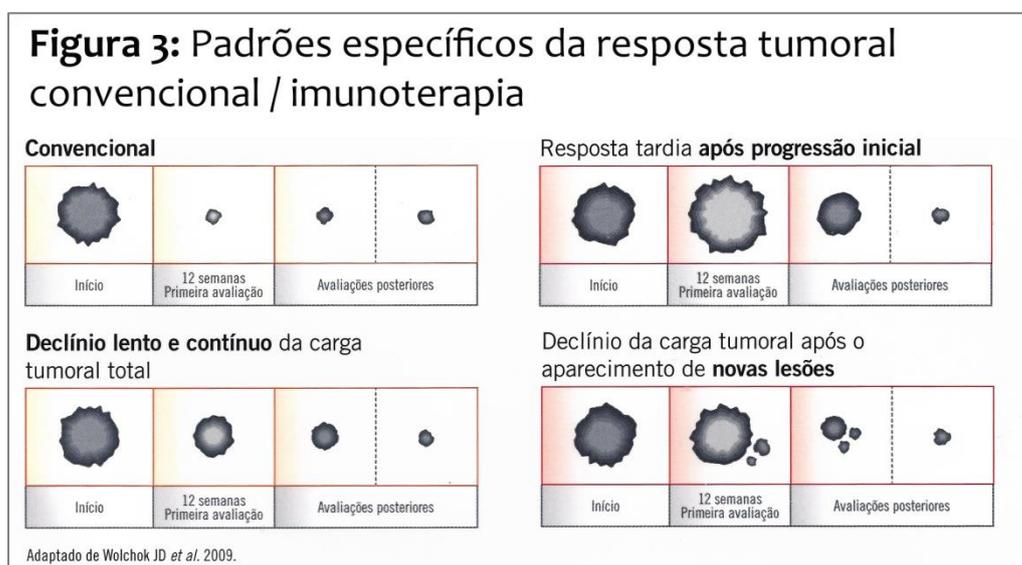
Acresce ainda que a atividade do ipilimumab em doentes com metástases cerebrais é semelhante à sua atividade nos doentes com melanoma avançado sem metástases cerebrais (30).

Os efeitos secundários, relacionados com a ativação imune, são com maior frequência cutâneos (prurido, exantema), digestivos (enterocolite), hepáticos (hepatite) e endócrinos (hipofisite, tiroidite). Em geral são transitórios e reversíveis; de acordo com

a sua intensidade pode ser necessário o recurso a corticoides ou outros imunossupressores como os inibidores TNF-alfa (infiximab) ou mesmo suspender o fármaco. Em particular a enterocolite pode ter consequências sérias se o tratamento adequado não é iniciado atempadamente. Um algoritmo foi desenvolvido para o tratamento da colite (educação do doente, vigilância doente e medico).

O seu modo de ação, potenciando reações imunes conduziu à criação de novos critérios de resposta imagiológicos, já que pode causar um aumento inicial do tamanho do tumor ou o aparecimento de novas lesões, relacionado com a inflamação local, consequente ao recrutamento de linfócitos T ativados (31), antes de a doença estabilizar ou mesmo regredir, o que motivou a definição de novos critérios de resposta relacionados com a resposta imune. Deve haver por isso cautela em abandonar o tratamento precocemente. As respostas podem demorar consideravelmente mais tempo a tornar-se evidentes, quando comparadas com a terapia citotóxica, prolongarem-se para além do fim do tratamento (Fig. 3).

Apesar de apenas uma minoria de doentes conseguir uma resposta completa, essas respostas parecem ser duradouras na maioria dos casos. Torna-se por isso crítico



definir biomarcadores preditores de uma resposta clínica, para evitar a exposição de um grande número de doentes, que não irão ter benefício clínico a um tratamento com frequentes e graves efeitos secundários e muito dispendioso.

Presentemente o ipilimumab tem indicação apenas para doentes em estadio IV ou estadio III irressecável.

O ipilimumab como terapia adjuvante está a ser testado em 2 ensaios de fase III a decorrer. Num deles o ipilimumab é comparado com o placebo após a ressecção de melanomas de alto risco no estadio III (NCT00636168) e no outro comparado com IFN- $\alpha$ -2b recombinante em altas doses (NCT01274338).

Terapias combinadas com ipilimumab e inibidor BRAF específico ou radioterapia ou outras terapias alvo estão ainda em estudo.

CTLA-4 é o primeiro numa lista crescente de pontos de regulação imunológicos, que incluem PD-1, *lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3), *T-cell immunoglobulin mucin-3* (TIM-3) entre outros. O desenvolvimento e testes clínicos de anticorpos para estas moléculas estão em diferentes fases de desenvolvimento

### **Terapia anti-PD1**

PD-1 (*programmed death protein*) é um recetor inibitório da célula T, que mediante interação com o ligando PD-1 nas células tumorais, evita a ativação da célula T. As células tumorais podem sobre-expressar o ligando PD-1 para escapar à vigilância imunológica. Os tecidos normais, exceto os macrófagos exprimem pouco ou mesmo

nenhum ligando PD-1 na sua superfície (32). Esta expressão tecidual específica sugere que atuar sobre a interação do PD-1 com o ligando PD-1 terá menos efeitos secundários auto-ímmunes do que por exemplo o bloqueio CTLA-4, com toxicidade auto-ímmune em 20-30% dos doentes.

A inibição PD-1/ligando PD-1 pode ser alcançada quer pelo uso de anticorpos anti-PD-1 ou anticorpos anti-ligando PD-1.

O Nivolumab é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína PD-1, que nos estudos de fase II mostrou uma sobrevivência global de 17 meses e 43% dos doentes estavam vivos aos 2 anos (33).

Os efeitos secundários auto-ímmunes foram menos frequentes que com o ipilimumab, e incluíram a pneumonite, vitiligo, colite, hepatite, hipofisite e tireoidite.

Neste momento estão a decorrer três estudos de fase 3 com o nivolumab em doentes com melanoma avançado:

- NCT01721746, que recruta doentes que progrediram sob ipilimumab e que são aleatoriamente colocados a fazer nivolumab ou quimioterapia com dacarbazina ou com a combinação carboplatina e o paclitaxel,
- NCT01721772, que recruta doentes sem tratamento prévio, BRAF negativos, aleatoriamente distribuídos por um grupo a fazer nivolumab e outro a fazer dacarbazina,
- NCT01844505, que recruta doentes sem tratamento prévio, aleatoriamente a fazer, ipilimumab, nivolumab ou a combinação das duas moléculas.

O Lambrolizumab é outro anticorpo monoclonal anti-PD1 que tem sido ensaiado quer em doentes já tratados com ipilimumab, quer em doentes *naíves*, sem que se verificasse diferença entre os dois grupos. A taxa de resposta global foi de 37%, com 13% de casos de toxicidade grau 3/4. Os efeitos secundários mais frequentes foram fadiga, exantema cutâneo, prurido e diarreia (34).

Dois ensaios estão em curso, um comparando o lambrolizumab com quimioterapia (NCT01704287) em doentes já tratados com ipilimumab e outro comparando lambrolizumab e ipilimumab em doentes *naíves*.

Os anticorpos monoclonais anti PD1-L1 mostraram também atividade clínica. BMS-936559 liga-se a PD1-L1, prevenindo a interação com o PD-1, está a ser testado num estudo de fase I/II, em 207 doentes com vários tumores, incluindo 55 com melanoma. Nestes, 17% tiveram uma resposta objetiva, com duração de pelo menos 1 ano (35).

MPDL3280A é outro anticorpo monoclonal que se liga a PD1-L1, em investigação, que nos estudos de fase I mostraram uma resposta global de 29%, com 43% dos doentes livres de progressão de doença às 24 semanas (36).

## **Terapia celular adotiva**

### **Linfócitos T**

O melanoma expressa antígenos tumorais reconhecidos pelas células T presentes quer no tumor, quer no sangue periférico. O objetivo da terapia celular

autóloga é a expansão de um clone de células relevantes antigénio específicas *ex vivo*, permitindo a administração aos doentes de células T altamente específicas do antigénio tumoral, após criar no recetor um ambiente ótimo que minimize a possível destruição destas células. Esta abordagem chama-se imunoterapia adotiva e em pequenos ensaios parece ter altas taxas de resposta mantidas, o que caracteriza a imunoterapia (37).

O uso destas terapias é, no entanto, limitado pelo seu custo, serem muito trabalhosas, requererem equipamento e técnicos especializados e serem específicas do doente.

Existem várias fontes e tipos de células T usadas na terapia adotiva que incluem:

- linfócitos que infiltram o tumor (TILs – *tumor infiltrating lymphocytes*) obtidos a partir de uma biopsia de melanoma e amplificados *ex vivo*, e posteriormente administrados novamente ao doente,
- linfócitos T obtidos do sangue periférico do doente e modificados por engenharia genética para exprimir um recetor antigénico quimérico (CAR- *chimeric antigen receptor*), que posteriormente são amplificados *ex vivo* e transfundidos novamente ao doente,
- linfócitos T obtidos do sangue periférico do doente e modificados por engenharia genética para exprimir um recetor recombinante de células T (TCR- *T cell receptor*), que reconhece um antigénio-associado ao melanoma, que posteriormente são amplificados *ex vivo* e transfundidos novamente ao doente.

Destas abordagens, a expansão dos *TILs* é a menos trabalhosa de produzir, apesar de requerer um procedimento invasivo para a sua obtenção. Esta fonte de

linfócitos T, também está associada a menor risco de auto-imunidade, já que estes linfócitos atuam sobre proteínas *self*-modificadas, que não são expressas nos tecidos normais (38).

No entanto, uma desvantagem desta técnica, é que num elevado número de doentes é impossível isolar TILs suficientes a partir de uma amostra de melanoma. Além disso esta técnica é individualizada e portanto muito demorada e cara o que limita a sua utilização em maior escala.

Após re-infusão os clones de células T reativos contra o tumor desaparecem rapidamente da circulação dos doentes; estratégias de linfodepleção como as que usam ciclofosfamida e fludarabina podem prolongar a vida das células infundidas e ainda eliminar Tregs. A manutenção destes linfócitos após a transferência adotiva habitualmente requer altas doses de IL-2 o que está associado a toxicidade significativa.

As taxas de resposta clínica nos doentes com melanoma metastizado tratados com TILs são impressionantes: aproximadamente 50% em vários estudos (37). O tratamento prévio destes doentes com linfodepleção está associado numa maior proporção de respostas e respostas mais duradouras.

No caso dos melanomas que não produzem TILs é necessário recorrer à engenharia genética para expandir linfócitos T específicos dos antígenos tumorais. A utilização do CAR tem a vantagem de ser independente das células apresentadoras de antígeno e do haplotipo HLA. No melanoma, pela fraca ou inexistente expressão de moléculas CMH, as suas células tornam-se “invisíveis” às APCs. Usando esta técnica, o antígeno é reconhecido pelo anticorpo, ativando a célula T.

O terceiro método tem a desvantagem do TCR ser específico para um antígeno apresentado numa molécula CMH específica, limitando o seu uso aos doentes com

aquele alelo HLA. Além disso, pode ainda ocorrer uma imuno-seleção das células que não exprimem esse antígeno e que não serão reconhecidas.

O uso da expansão de células T antígeno-específicas circulantes derivadas de leucócitos sanguíneos periféricos é atrativo já que a colheita das células é mais acessível do que a partir do tumor. Num estudo de fase II, clones de células T específicas Melan-A (MART-1) foram isolados do sangue periférico e expandidos e administrados com baixas doses de IL-2 e IFN- $\alpha$ . Seis em 14 doentes (43%), tiveram respostas clínicas objetivas e em 2 deles duradouras e completas, mas apenas doentes com doença cutânea ou ganglionar. Observou-se, no entanto, significativa toxicidade a nível dos órgãos contendo melanócitos, como despigmentações cutâneas agudas, uveíte, diminuição da audição e vestibulite (37).

## **Terapias combinadas**

As células T antígeno-tumorais específicas disfuncionais/exaustas presentes no sangue periférico e no tumor co-expressam múltiplos recetores inibidores, o que antecipa a necessidade de terapias combinadas, para bloquear essas múltiplas vias inibitórias e assim aumentar a resposta imune antígeno tumoral específica e reverter a disfunção celular T induzida pelo tumor. São assim necessárias terapias combinadas mais inteligentes, que influenciem múltiplas etapas da resposta imune para obter um efeito sinérgico.

Múltiplas combinações têm sido ensaiadas, de que são exemplo:

### **Associação da imunoterapia anti-CTLA-4 e anti-PD-1**

A combinação da imunoterapia anti-CTLA-4 com o ipilimumab e anti-PD-1 com o nivolumab, parece ter um maior nível de atividade anti-melanoma, que cada uma das moléculas isoladamente e com um perfil de toxicidade manuseável. Está em curso um ensaio de fase III estudando a combinação nivolumab e ipilimumab, comparado com cada uma destas moléculas isoladamente (NCT01844505).

### **Associação da imunoterapia anti-CTLA-4 e inibidor BRAF**

Como o ipilimumab e o vemurafenib mostraram ambos ser capazes de aumentar a sobrevivência global nos doentes com melanoma e têm mecanismos de ação diferentes, parece fazer sentido a sua associação. Existem razões para achar que os dois fármacos podem atuar de forma sinérgica, estando a decorrer um ensaio para avaliar a segurança e sobrevivência global da terapia combinada inibidora específica da cinase BRAF com ipilimumab em doentes portadores da mutação BRAF (NCT01400451).

### **Perspetivas futuras**

É provável que no futuro, mais investigação básica no sistema imune e nos mecanismos imunológicos de evasão tumoral possam revelar alvos terapêuticos adicionais.

Um deles é o **BTLA** (*B and T lymphocyte attenuator*), que como o PD-1 pertence à família B7/CD28 e é expresso por diferentes tipos celulares, incluindo células T, B, NKs e células dendríticas. O BTLA inibe a proliferação de células T e regula negativamente a homeostasia dos linfócitos T CD8+ e a produção de células T memória. Anticorpos monoclonais anti-BTLA estão a ser investigados em modelos pré-clínicos.

**LAG-3** (*lymphocyte activation gene 3*) é outro recetor inibidor expresso nos linfócitos T ativados CD4+ e CD8+. Nos tumores LAG-3 é expresso pelos linfócitos que infiltram o tumor (TILs), células NKT, NK e Tregs. LAG-3 liga-se ao CMH II presente nas células apresentadoras de antígeno e no melanoma, contribuindo para a progressão do melanoma, pelo que o seu bloqueio pode representar um potencial tratamento para o melanoma.

**Tim-3** (*T cell immunoglobulin and mucin domain 3*) é uma proteína transmembranar presente nas células Th-1, capaz de causar a morte celular T através da sua ligação ao ligando galectina-9. A galectina-9 é expressa por células apresentadoras de antígenos como os monócitos, macrófagos e células dendríticas e por alguns tumores incluindo o melanoma. Também a sua inibição pode ter um papel significativo no combate na resposta celular T anti-tumoral (39).

Também a nível do **microambiente tumoral** existem fatores que inibem a resposta imune T ao melanoma, como o TGF- $\beta$ , IL-10 e óxido nítrico, que representam potenciais alvos terapêuticos.

O **TGF- $\beta$**  é secretado em larga escala pelas células de melanoma e possui propriedades imunossupressoras.

A **IL-10** é uma citocina imunossupressora secretada por vários tipos de tumores, incluindo o melanoma, capaz de suprimir as respostas T antigénio específicas pela diminuição da expressão das moléculas da CMH na superfície das células tumorais e capaz de inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias como o TNF, IFN- $\gamma$ , e IL-2 pelas células T.

A **indolamina-2,3-dioxigenase (IDO)** é uma enzima produzida no microambiente tumoral pelas células apresentadoras de antigénio e pelas células de melanoma, capaz de produzir agentes imunossupressores das células T.

A **Angiogénese** constitui uma etapa crítica para o desenvolvimento quer de tumores primários, quer de tumores metastáticos. O **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) é o mais importante promotor da angiogénese. A expressão imuno-histoquímica do VEGF foi identificada em 20 a 77% das células de melanoma primário (40).

A transição do melanoma da fase de crescimento horizontal, para a fase de crescimento vertical, é acompanhada pela indução da expressão da proteína VEGF, havendo uma relação entre a atividade angiogénica e o grau de agressividade do melanoma.

O melanoma é um tumor altamente vascularizado, e apesar de haver uma fundamentação teórica sólida para o uso de terapias anti-angiogénicas, os resultados práticos ficam aquém destas expectativas.

O bevacizumab é um anti-corpo monoclonal dirigido contra o VEGF, cuja utilização isolada ou em combinação, com outros agentes como o paclitaxel, a

dacarbazina ou o IFN- $\alpha$ 2b está longe de ser considerado um avanço na terapia do melanoma (41).

No entanto, até à data os ensaios com moléculas antiangiogénicas foram realizados em doentes com melanoma avançado. Teoricamente o mesmo tratamento deveria ser mais rentável se aplicado em fases iniciais, estando a decorrer um ensaio com doentes portadores de melanoma IIB, IIC e III randomizados em 2 grupos, um a fazer bevacizumab durante um ano, o outro apenas em observação.

A vacinação com moléculas de RNA mensageiro (RNAm) codificadas com antígenos associados a tumores é uma nova e promissora abordagem em que estão combinadas a apresentação antigénica e a estimulação imune (42).

Também a forma como os fármacos são administrados pode influenciar a sua eficácia. Com terapia localizada, maiores doses podem ser atingidas e combinações que não eram possíveis pelos efeitos secundários tornam-se possíveis. O recente exemplo das novas nanopartículas poliméricas, com IL-2 e um inibidor TGF- $\beta$  injetadas em ratos com melanomas mostram resultados promissores. Combinando estas duas moléculas a resposta imunológica do rato foi estimulada e as moléculas de defesa tumorais foram inibidas com o anti-TGF- $\beta$ . Esta combinação não tinha ainda sido possível pelos efeitos secundários sistémicos (43).

## Conclusão

O melanoma metastizado é uma doença resistente à quimioterapia clássica, com taxas de reposta inferiores a 10%.

Avanços recentes na biologia e genética molecular do melanoma traduziram-se em promissoras modalidades de tratamento, como o recentemente aprovado vemurafenib, inibidor BRAF, bem como os inibidores MEK dirigidos à cascata RAS-RAF-MAPK.

De igual modo, importantes avanços na compreensão da imunologia tumoral e dos mecanismos imunes de fuga conduziram ao desenvolvimento de novas estratégias clínicas na área da imunoterapia. A terapia individualizada para o cancro é o objetivo central e a imunoterapia é um meio racional para atingir esse fim.

As primeiras abordagens imunoterapêuticas para o melanoma incluíram, entre outros, BCG, IFN e IL-2, que apesar de terem revelado alguma eficácia, globalmente os seus resultados foram no entanto modestos. Mais significativos foram os resultados obtidos com a inibição do recetor CTLA-4, com o ipilimumab. Também a inibição da interação entre o ligando PD1 e o recetor PD1, quer através de anti-PD1 recetores ou anticorpos anti-ligando PD1 parecem apostas promissoras.

Mais recentemente as estratégias da imunoterapia assentam no conceito da especificidade (imunização ativa específica e terapia celular T adotiva). A terapia celular adotiva apresenta resultados promissores, limitados no entanto pelos custos e pelas dificuldades técnicas.

O aparecimento de inovadoras imunoterapias permite novas opções terapêuticas, baseadas na combinação de diferentes agentes imunológicos (ex: anti-CTLA-4 e anti-

PD-1), ou na combinação de imunoterapia e terapia alvo (ex: anti-CTLA-4 e inibidor BRAF), com potenciação dos resultados, mas com efeitos adversos significativos. Para selecionar e “desenhar” as combinações mais adequadas a cada doente e evitar expor doentes não-respondedores a efeitos secundários potencialmente graves seria fundamental a identificação de biomarcadores preditores de uma resposta clínica.

## Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, o Doutor Ricardo Vieira, pela disponibilidade e ajuda na realização deste trabalho.

## Bibliografia

1. Gavin PD, Allen TB, Hiroaki I, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat immunol* 2002; 3: 991-998.
2. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893; 105: 273-290.
3. Raaijmakers M, Rozati S, Goldinger SM, et al. Melanoma immunotherapy: historical precedents, recent successes and future prospects. *Immunotherapy* 2013; 5: 169-182.
4. Tese de doutoramento do Dr. Ricardo Vieira: Oncogénese e progressão do melanoma – Análise mutacional e estudo clínico retrospectivo (*in press*).
5. Serrone L, Zeuli M, Segal FM, et al. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res.* 2000; 19:21-34.
6. Dagroslov zikich, Jacob Schachter, Michal J Besser. Immunotherapy for the management of advanced melanoma: the next steps. *Am J Clin dermatol* (2013) 14: 261-72
7. Flaherty KT, Infante JR, Daud A et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* 2012; 367: 1694-703
8. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR et al. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and metaanalysis. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 493-501
9. Eggermont AMM, Suci S, Testori A, et al. Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated Oncol. 2012; 30: 3810-18.
10. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol.* 1999;17:2105-16.
11. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with

- cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J Clin Oncol*. 1999;17(3):968-75.
12. Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 2009 27:2645-52.
  13. Legha SS, Gianan MA, Plager C et al. Evaluation of interleukin-2 administered by continuous infusion in patients with metastatic melanoma. *Cancer*. 1996; 77: 89-96.
  14. Carnemolla B, Borsi L, Balza E, et al. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*. 2002; 99: 1659-65.
  15. Korn T, Bettelli E, Gao W et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature*. 2007; 448: 484-7
  16. Safety study of IL-21/Ipilimumab combination in the treatment of melanoma. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01489059>
  17. Lotem M, Peretz T, Drize O et al. Autologous cell vaccine as a post operative adjuvant treatment for high-risk melanoma patients (AJCC stages III and IV). *Br J Cancer* 2002; 86: 1534-39.
  18. Serono: Data And Safety Monitoring Board Recommends Discontinuation of Canvaxin(TM) Phase 3 Clinical Trial for Patients With Stage III melanoma. <http://www.prnewswire.com/>
  19. Sondak VK, Sosman JA. Results of clinical trials with an allogenic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 409-15.
  20. Sosman JA, Unger JM, Liu PY. Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogenic tumor vaccine: impact of HLA class I antigen expression on outcome. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2067-2075.
  21. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004 10 909-915.

22. Tacke PJ, Zeelenberg IS, Cruz LJ, et al. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood*. 2011; 118:6836-44.
23. Schwartzenuber DJ, Lawson DH, Richards JM et al. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2011; 364:2119-27.
24. Safety and Immunogenicity of CYT004-MelQbG10 Vaccine with and Without Adjuvant in Advanced Stage Melanoma Patients. <http://clinicaltrials.findthebest.com/1/3968>
25. A phase 3 pivotal trial comparing Allovectin-7 alone vs chemotherapy alone in patients with stage 3 or stage 4 melanoma. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00395070>.
26. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010 10:317-27.
27. Ribas A. Clinical development of the anti-CTLA-4 antibody tremelimumab. *Semin Oncol*. 2010; 37: 450-454
28. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711-723.
29. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364: 2517-2526.
30. Margolin K, Ernstoff MS, Hamid O. Ipilimumab in patients with melanoma and brain metastases: an open-label, phase 2 trial. *Lancet oncol* 2012; 13: 459-65.
31. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*. 2009 ; 15:7412-20.
32. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002; 8:793-800.

33. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2443-54
34. Hamid O, Robert C, Daud A et al. Safety and Tumor Responses with Lembroizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369: 134-144.
35. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2455.
36. Hamid O, et al. Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic melanoma (abstract #9010). American Society of Clinical Oncology 2013 meeting
37. Yang J. The adoptive transfer of cultured T cells for patients with metastatic melanoma. *Clinics in dermatology* 2013; 31: 209-219.
38. Junker N, Kvistborg P, Køllgaard T, et al. Tumor associated antigen specific T-cell populations identified in ex vivo expanded TIL cultures. *Cell Immunol*. 2012;273: 1-9.
39. Fourcade J, Zarour H. Strategies to reverse melanoma-induced T-cell dysfunction. *Clinics in Dermatology* 2013; 31: 251-56
40. Potti A, Moazzam N, Tendulkar K et al. Immunohistochemical determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in malignant melanoma. *Anticancer Res* 2003; 23:4023-6.
41. Vasiliki N, Stratigos A, Bafaloukos D et al. Antiangiogenic and antiapoptotic treatment in advanced melanoma. *Clinics in Dermatology* 2013; 31: 257-263.
42. Fotin-Mleczek M, Duchardt KM, Lorenz C, et al. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. 2011; 34: 1-15.
43. Park J, Wrzesinski SH, Stern E, et al. Combination delivery of TGF- $\beta$  inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat Mater*. 2012; 11:895-905.