2015

Universidad de la República
Facultad de Medicina
Departamento de Inmunobiología

Metodología Científica II

Bloqueo de la coestimulación negativa en la respuesta inmune antitumoral.

Br. Guillermo Sebastián Souza Cores,

Br. Marcos Rodríguez Russi,

Br. Luis Adrián Echart Yanibelli,

Br. Gustavo Alberto Silva Castro,

Br. Gustavo Alfredo Fajardo Calabuig

Docente Orientador:

Profesor Agregado Dr. Marcelo Hill.

Octubre de 2015

Contenido

Resumen 1
Prólogo. 2
Conceptos generales de inmunología 3
Receptores CTLA-4 y PD-1 4
Las características distintivas del cáncer. 6
Inmunoedición en el cáncer 7
Mecanismo de inmunidad antitumoral 8
Mecanismo de evasión inmunitaria de los tumores 8
Indolamina 2,3-dioxigenasa y tolerancia inducida por tumor 9
Melanoma 10
Bloqueo de CTLA-4 de la experimentación a la clínica. 11
Evaluación clínica del bloqueo de CTLA-4 12
Primeros ensayos de ipilimumab en humanos (anti-CTLA-4) en el tratamiento del melanoma. 12
Estudios de Ipilimumab en otros tipos de canceres no melanoma. 12
Estudios que llevaron a la aprobación en EEUU (FDA) y Europa del Ipilimumab para el 14
Estudios de combinación y/o comparación de fármacos 17
Conclusiones y perspectivas 20
Agradecimientos 22
Bibliografía 23

Resumen

La fisiología del sistema inmunitario consiste en la defensa contra amenazas vehiculizadas por agentes infecciosos y no infecciosos (tumores, trasplantes y toxinas). Muchas de sus respuestas son mediadas por células como por ejemplo los Linfocitos T (LT). Estas son activadas mediante el reconocimiento de antígenos y de un proceso denominado coestimulación. Las moléculas coestimuladoras que se analizarán son CTLA-4 y PD-1. La función de la primera es limitar el umbral de activación y atenuar la proliferación de los LT específicos; la función de la segunda es proporcionar una señal de freno que limita la función efectora de los LT.

El sistema inmune puede controlar las células cancerosas a través de un proceso conocido como inmunovigilancia. Sin embargo con el paso del tiempo los tumores evolucionan logrando evadir este control inmunológico, mediante un proceso denominado edición. Diferentes estudios demuestran que la inmunoedición también se produce como consecuencia de la inmunoterapia en pacientes con cáncer, mostrando así la necesidad de apuntar a múltiples antígenos tumorales durante el tratamiento.

En este trabajo realizará una revisión sobre la evolución en las últimas décadas de diferentes tratamientos antitumorales, considerando varios estudios y ensayos clínicos que registran diferentes resultados en cuanto a la supervivencia de los pacientes, basándonos en el tratamiento del melanoma y de algunos otros tipos de cáncer.

Palabras clave:

Inmunoterapia, inmunoedición, cáncer, CTLA-4, ipilimumab, melanoma.

Prólogo.

Los tratamientos actuales que son ofrecidos a los pacientes con melanoma metastásico en Uruguay, en donde la realidad muestra que al día de hoy la sobrevida es en torno a los 12 meses, se basan en la quimioterapia. Los tratamientos de inmunoterapia con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 aún no están presentes en nuestro país por lo cual los pacientes que quieren contar con ellos deben autofinanciárselos trayéndolos del exterior a precios que rondan los 80000 U$S la dosis de ipilimumab (anti-CTLA-4) y de 15000 U$S la dosis de pembrolizumab (anti-PD-1).

En este último tiempo se ha dado relevancia en los congresos de oncología a la administración de pembrolizumab en relación al ipilimumab ofreciendo un futuro más alentador en el tratamiento con una mejor tasa de superviviencia global.

Una visión optimista en nuestro medio apunta a la inclusión en un futuro no muy lejano de este grupo de fármacos en los tratamientos que financia el Fondo Nacional de Recursos (FNR), ver recuadro 1.

Fondo Nacional de Recursos: Misión, funcionamiento y beneficiarios.

"Es una institución creada por el decreto Ley 14.897 con un carácter de persona pública no estatal, que brinda cobertura financiera a procedimientos de medicina altamente especializada y a medicamentos de alto costo para toda la población residente en el país y usuaria del Sistema Nacional Integrado de Salud."

"En el caso de los procedimientos cubiertos estos se efectúan a través de los Institutos de Medicina Altamente Especializada (IMAE) que son prestadores públicos o privados, que cuentan con la habilitación del Ministerio de Salud Pública para su realización."

"Pueden ser beneficiarios del FNR aquellas personas que acrediten tener residencia en el país y cuenten con una cobertura formal de salud: usuario del sistema público de asistencia, beneficiario a través del Fondo Nacional de Salud (FONASA) o afiliado de una institución de Asistencia Médica Privada o Seguro Integral como aportante individual."

"El FNR se financia con el aporte de distintos organismos. El FONASA realiza los aportes mensuales de las personas cubiertas por este sistema. Las instituciones de asistencia o seguros privados aportan por sus afiliados que no son FONASA, mientras que el Ministerio de Economía y Finanzas se hace cargo del costo de los procedimientos de los pacientes que se atienden en servicios estatales. En el caso de los entes autónomos, servicios descentralizados y administraciones departamentales estos cubren la atención de aquellas personas cuya asistencia está directamente a su cargo."

Recuadro 1. Fondo Nacional de Recursos

Conceptos generales de inmunología

La función fisiológica del sistema inmunitario consiste en la defensa contra microorganismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede desencadenar una respuesta inmunitaria. La defensa contra los microorganismos tiene lugar a través de las primeras reacciones correspondientes a la inmunidad innata y las respuestas posteriores a cargo de la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) aporta la primera línea de defensa frente a los microbios. Está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos preparados para responder con rapidez, una vez producida la infección. Estos mecanismos solo reaccionan ante los microrganismos y responden básicamente de la misma manera cada vez que se repite. Los principales componentes son: barreras físicas y químicas como epitelios y sustancias antimicrobianas, células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales (NK), proteínas sanguíneas como los factores del sistema del complemento y otras proteínas denominadas citosinas que regulan y coordinan muchas de las acciones celulares de la inmunidad innata. La inmunidad adaptativa debe su nombre a que aparece como respuesta a una infección y se adapta a la misma. Tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias microbianas y no microbianas y de reaccionar frente a ellas. Los principales componentes son los linfocitos y sus productos de secreción, anticuerpos (1).

La diferenciación de los linfocitos T (LT) vírgenes en células efectoras de la inmunidad celular, precisa el reconocimiento del antígeno y la coestimulación (2). Cada LT presenta en su superficie celular un receptor (RCT) que al unirse al péptido tumoral presentado por la célula presentadora de antígenos (CPA), proporciona la señal inicial para la activación del LT. La segunda señal para la activación se denomina de coestimulación porque actúa junto al antígeno para estimular a los LT. La vía coestimuladora mejor caracterizada en la activación de las células T implica a la molécula de superficie de los LT CD28, que se une a las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que se expresan sobre las CPA activadas. Esta coestimulacion proporciona señales que potencian muchas respuestas de los LT al antígeno, como la supervivencia celular, la producción de citocinas como interleucina-2 (IL-2) y la diferenciación de los LT vírgenes en linfocitos efectores y de memoria. Además, los LT activados expresan CD40-ligando (CD40-L) en su superficie, que se une a CD40 de las CPA y proporciona señales que potencian la expresión de los coestimuladores B7 en las CPA (3).

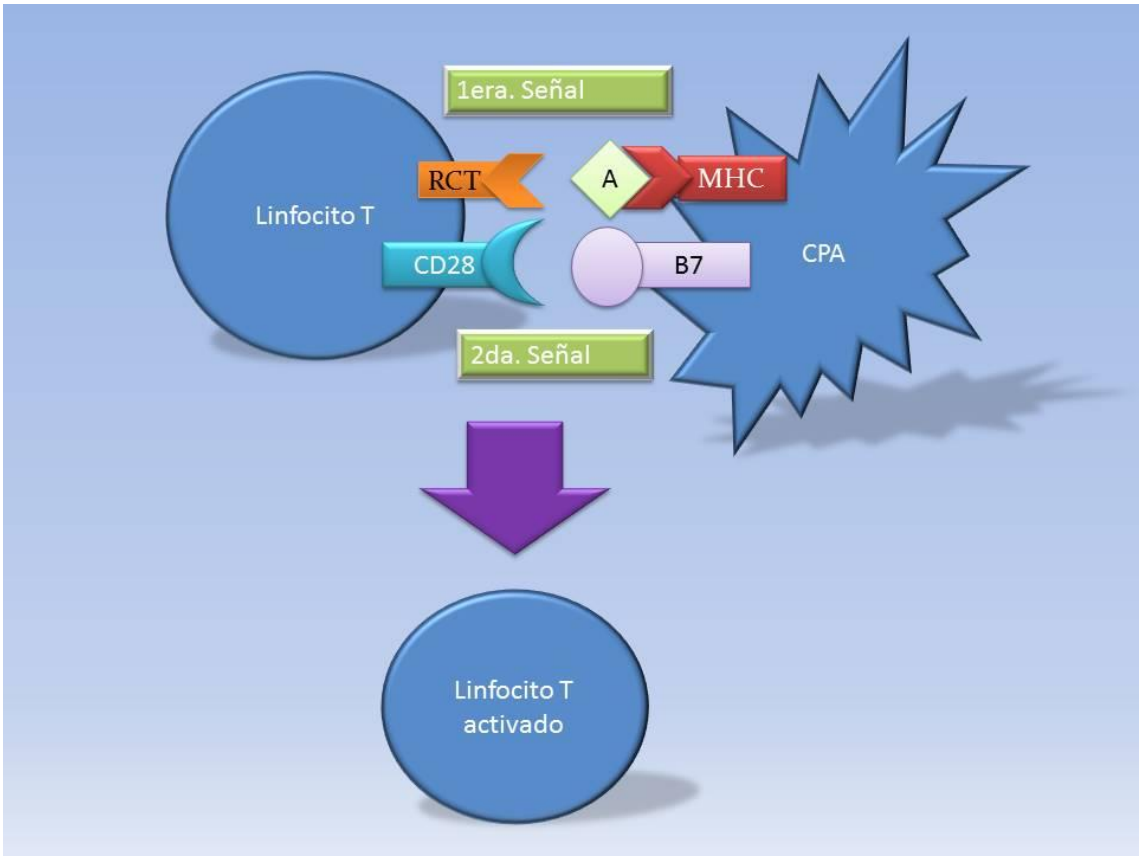

Fig 1. La activación de las células T requiere dos señales, ocurre solo después de la interacción del receptor de célula T (RCT) y el antígeno (A) en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad MHC (1era Señal) más la coestimulación de CD28 (2da. Señal).

Receptores CTLA-4 y PD-1

Tras el descubrimiento y caracterización de CD28, los esfuerzos de investigación se centraron en la identificación de otros coestimuladores adicionales que podrían contribuir a la activación de los LT. El receptor CTLA-4, también conocido como la molécula CD152, fue inicialmente identificado como un gen expresado por LT citotóxicos activados. CTLA-4 comparte una significativa homología con la molécula CD28 y también con su sitio de unión a B7. Las interacciones entre CTLA-4 y los ligandos B7 contrarrestan las señales coestimuladoras mediadas por CD28 y perjudican la activación de los LT. B7-1 parece ser el ligando principal para CTLA-4, formando interacciones multivalentes que entregan señales inhibitorias a los LT.

Poco después de que las funciones inhibitorias de CTLA-4 fueron descubiertas, a mediados de la década de los 90 se realizaron estudios con anticuerpos anti CTLA-4, encontrando mejoras en el rechazo de carcinoma de colon y del fibrosarcoma transplantado en modelos murinos. Los efectos antitumorales del bloqueo de CTLA-4 se han extendido a otros numerosos modelos de tumores murinos, incluyendo el carcinoma de próstata, carcinoma de células renales y los linfomas (4).

El otro receptor inhibidor de la familia CD28 que tiene cada vez más interés en los LT es PD-1. Es inducido en las células T, linfocitos B y los monocitos después de la activación de estas células. PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, que son homólogos con B7-1 y B7-2, y son inducidos en las células dendríticas activadas, los monocitos y otros tipos celulares. Se ha visto en estudios que ratones con inactivación del gen PD-1 presentan miocardiopatía autoinmune o un síndrome seudo-lúpico, dependiendo de la cepa del ratón, lo que establece la participación de PD-1 en la auto tolerancia (5).

La expresión de PD-1 en infiltrados tumorales linfoides, junto con la expresión de PD-L1 de numerosos tipos de tumores, sugieren que la vía podría estar implicada en la evasión inmune por canceres humanos (4).

CTLA-4 y PD-1 son dos receptores inhibitorios de células T con mecanismos diferentes de acción, mientras CTLA-4 impone un umbral limitando la activación y atenúa la proliferación de los LT específicos de tumores, PD-1 funciona principalmente como una señal de freno que limita la función efectora de las células T dentro de un tumor (4). El bloqueo selectivo de estos puntos de control inhibitorios naturales, podría proporcionar un medio de liberación de los frenos en la activación de células T y el desarrollo de respuestas antitumorales potentes. De hecho, los anticuerpos que bloquean los receptores inhibitorios CTLA-4 o PD-1 han demostrado su capacidad para mejorar los resultados en los pacientes con al menos alguno tipo de cáncer (4). Dado que los mecanismos y los sitios de acción de estos receptores son diferentes el bloqueo combinado de ambas moléculas es posible, dando una respuesta más potente.

Además es importante destacar el papel que juegan las células T reguladoras (Treg) que también expresan CTLA-4, las cuales serían responsables de la inhibición extrínseca sobre las células T convencionales. Las células Treg FOXP3+ CD25+ CD4+, que son abundantes en los tumores son cruciales para el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica. La expansión local y diferenciación de algunas subpoblaciones de Treg suprime fuertemente la activación y expansión de células T efectoras específicas del antígeno tumoral. Algunos estudios demostraron que el número de células Treg FOXP3+ disminuyó tras el tratamiento con anticuerpos anti-CTLA4, hecho que además fue correlacionado con un beneficio clínico de los pacientes (6). Uno de ellos el ipilimumab que bloquea CTLA-4, ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en el 2011 para su uso en pacientes con melanoma (7).

Las características distintivas del cáncer.

En el año 2000 Hanahan y Weinberg realizan un trabajo en el cual analizan la existencia de una serie de funciones biológicas que caracterizan a los canceres. En ese artículo se describen seis características (8):

- Mantenimiento de la señalización proliferativa: lo que le permite tener una capacidad de proliferación crónica mediante la desregulación de señales que promueven el crecimiento.
- Evasión de los supresores de proliferación: las células cancerosas tienen la capacidad de eludir los programas que regulan negativamente la proliferación celular. Estos programas se activan ante el daño excesivo en el genoma o ante la presencia de metabolitos que son requeridos por la célula y se encuentran en niveles subóptimos, un ejemplo de estos genes supresores de tumores son los que codifican la proteína TP53.
- Resistencia a la muerte celular: se ha visto en estudios que la apoptosis es atenuada en aquellos tumores que tienen alto grado de malignidad y en los que son resistentes a las terapias.
- Inmortalidad replicativa: las células cancerosas requieren un potencial replicativo ilimitado con el fin de generar tumores macroscópicos. Las células no cancerosas pasan solo a través de un número limitado de ciclos de división y crecimiento. Se ha visto que los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas tendrían implicancia en la capacidad ilimitada de proliferación. La telomerasa, una ADN polimerasa, que añade telómeros en los extremos del ADN se expresa en un 90% de células inmortalizadas, mientras que es casi ausente su presencia en el resto de las células.
- Inducción de la angiogénesis: los tumores como el resto de los tejidos necesitan nutrirse así como eliminar sus desechos. En el proceso de esta neovasculatura estarían involucradas moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). La angiogénesis se induce en etapas muy tempranas del desarrollo del cáncer, contribuyendo en muchos casos a la etapa pre-maligna microscópica de la progresión del tumor.
- Activación de la invasión y metástasis: los carcinomas en el transcurso de su evolución progresan a grados más altos de malignidad, ello se ve reflejado por la invasión y metástasis. Las células cancerosas desarrollan alteraciones en su forma, en la unión a otras células y a la matriz extracelular. Las células cancerosas tienen una pérdida de E-cadherina, una de las principales moléculas que interviene en la adhesión de célula a célula. También se sabe que otro molécula como la N-cadherina, que participa en la

migración de neuronas y células mesenquimales durante el proceso organogénesis, está aumentada en muchos células de canceres invasivos.

Estos mismos autores hacen en el año 2011 una revisión de su artículo donde agregan dos características distintivas más involucradas en la patogénesis del cáncer (8):

- Capacidad de reprogramar el metabolismo celular: se ha visto que las células cancerosas pueden limitar el metabolismo de la glucosa a solo la glucolisis evitando el pasaje del piruvato formado a la mitocondria para la fosforilación oxidativa. Esta limitación lleva a una menor eficiencia energética, la cual es compensada por una mayor expresión de transportadores de glucosa GLUT-1 que aumentan la glucosa en el citoplasma. Esta dependencia de la glucolisis puede ser aún mayor en las condiciones de hipoxia en las que se desarrollan muchos tumores. El aumento de la glucolisis permite el desvío de intermediarios glicolíticos hacia diversas rutas biosintéticas, como las que permiten generar nucleósidos y aminoácidos para generar macromoléculas y orgánulos, que pueden ser usados para el ensamble de nuevas células.
- La habilidad de las células cancerosas para evadir la respuesta inmunológica: las células cancerosas pueden desactivar los componentes del sistema inmune, por ejemplo, paralizando la infiltración de células T y NK por medio de secreción de factores inmunosupresores. También pueden reclutar células inmunosupresoras, como las células T reguladoras o las células supresoras de origen mieloide (MDSC).

Inmunoedición en el cáncer.

El sistema inmune puede controlar las células cancerosas a través de un proceso conocido como inmunovigilancia del cáncer. Sin embargo, los tumores evolucionan con el tiempo de tal manera que se escapan del control inmunológico, en un proceso denominado edición (9). El sistema inmune no solo protege contra el desarrollo de cáncer, sino también moldea el carácter de los tumores. Ésta inmunomodulación del cáncer se compone de tres fases:

1) Fase de eliminación: donde las células transformadas son destruidas por el sistema inmune competente.

2) Fase de equilibrio: las células tumorales que logran sobrevivir entran en una fase de equilibrio donde se produce la edición.

3) Fase de escape: las células tumorales moldeadas inmunológicamente comienzan a crecer progresivamente, estableciendo un microambiente tumoral inmunosupresor (10).

Algunos estudios ofrecen evidencias de que la inmunoedición también se produce como consecuencia de la inmunoterapia en pacientes con cáncer. Lo cual muestra la necesidad de apuntar a múltiples antígenos tumorales durante la inmunoterapia del cáncer, con el fin de

prevenir las consecuencias de la progresión de células tumorales, que carecen de expresión de antígenos específicos del tumor (10).

La intervención terapéutica a menudo falla debido a la plasticidad de las células en el microambiente tumoral. Son mejores los enfoques que implican combinaciones que se dirigen a múltiples vías que pueden resultar sinérgicas (10).

Mecanismo de inmunidad antitumoral

El concepto de vigilancia inmunitaria nos dice que "una función fisiológica del sistema inmunitario es reconocer y destruir clones de células transformadas, antes de que se conviertan en tumores y matar a los tumores después de que se hayan formado" (11). Hoy es bien conocido que tanto el sistema inmunitario innato como el adaptativo reaccionan frente a los tumores. Frecuentemente la respuesta inmunitaria no basta para erradicar el tumor, son varios los posibles factores que podrían determinar que esto suceda: la baja inmunogenicidad (dado que los tumores proceden de células del propio individuo), que la velocidad de crecimiento del tumor supere la capacidad del sistema inmunitario, y los mecanismos especializados que tienen los tumores para evadir la respuesta inmunitaria (12).

El mecanismo por el cual se da la respuesta inmunitaria específica necesitaría que las células tumorales o sus antígenos sean ingeridos por las CPA y expresados sus péptidos en la superficie de estas células, unidos a moléculas MHC de clase I, para que posteriormente sean reconocidas por los LT CD8+ que se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL). La CPA también expresan en su superficie MHC de clase II que presentan antígenos a los linfocitos T CD4+ cooperadores que ayudarían a la respuesta inmune mediante la producción de citocinas para el desarrollo de CTL (13). Es aquí donde se ponen en juego los mecanismos de eliminación de la inmunoedición.

Mecanismo de evasión inmunitaria de los tumores

Existen una variedad de mecanismos por los cuales los tumores evaden la respuesta inmunitaria. Se pueden dividir en mecanismos intrínsecos y extrínsecos. Dentro de los mecanismos intrínsecos están:

* La participación de moléculas como CTLA-4 y PD-1 que disminuyen la respuesta inmunitaria. Este aspecto se expone en primera instancia porque son los modelos que están siendo utilizados en la clínica en los centros de referencia más avanzados en el tema.

* La pérdida de antígenos que desencadenen respuestas inmunitarias, debido al desarrollo de mutaciones por el acelerado índice mitótico e inestabilidad genética.

* El enmascaramiento del antígeno por el aumento en las moléculas de glucocáliz cubriendo a estas células.

*La no inducción de respuestas inmunitarias importantes al carecer las células tumorales de moléculas coestimuladoras y moléculas del MHC-II. Las células tumorales transfectas con genes que codifican los coestimuladores B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) son capaces de provocar respuestas inmunitarias celulares intensas.

* La secreción de productos por parte de las células tumorales, que suprimen la respuesta inmunitaria. Estas sustancias inmunosupresoras que se secretan en grandes cantidades, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), inducen la proliferación y las funciones efectoras de los linfocitos y macrófagos.

En cuanto a los mecanismos extrínsecos tenemos:

* La acción de los macrófagos alterando el microambiente tisular y suprimiendo la respuesta del linfocito T.

* La regulación que ejercen los linfocitos T reguladores (Treg) para suprimir la respuesta inmunitaria. Los linfocitos Treg suprimen las respuestas de linfocitos T a los tumores en modelos murinos y pacientes, aumentando la cantidad de linfocitos reguladores en los infiltrados celulares de distintos tumores. La eliminación de estos linfocitos en ratones potencia la inmunidad antitumoral reduciendo el crecimiento tumoral.

* La supresión ejercida por las MDSC sobre las respuestas antitumorales innatas y específicas. Estas células son inducidas por mediadores proinflamatorios tumorales y suprimen las respuestas innatas de los linfocitos, secretando peroxinitrito, arginasa e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que catabolizan el triptófano necesario para la proliferación de los LT (14).

Comprendiendo los mecanismos de evasión inmunitaria de los tumores será un desafío para intervenciones futuras en relación a la inmunogenicidad y maximización de las respuestas inmunitaria del anfitrión.

Es aquí donde se ponen en juego los mecanismos de escape de la inmunoedición.

Indolamina 2,3-dioxigenasa y tolerancia inducida por tumor

La IDO es una enzima que cataliza la etapa limitante de la velocidad de la degradación del aminoácido triptófano a lo largo de la vía de la quinurenina. Las funciones biológicas de la IDO serían suprimir la respuesta inmunológica para que ésta no sea excesiva y provoque daño en el anfitrión (15).

Desde el punto de vista de la inmunología tumoral la participación de la IDO sirve como un mecanismo tumoral que contribuye a la tolerancia inducida por el tumor, creando un entorno de tolerancia inmunológica en el tumor y los ganglios linfáticos de drenaje. Esto se produce por la

supresión directa de las células T y la mejora de la inmunosupresión mediada por Treg local (15). La IDO puede ser expresada por varios tipos celulares en respuesta a la inflamación. Dentro del sistema inmune cierto conjunto de APC serían más competentes para la expresión de la IDO cuando son sometidos a estímulos proinflamatorios o expuestas a señales de células T activadas. La expresión de la IDO en estas células competentes está estrechamente regulada por señales de maduración y activación específicas (15). Otro aspecto importante es que la expresión de la IDO podría ser regulada en las propias células tumorales, en respuesta a mediadores inflamatorios locales como el interferón gamma (IFNγ) (15).

La IDO y las enzimas de la vía de la quinurenina producen metabolitos que tienen capacidad inmunosupresora. Estos metabolitos suprimen la proliferación de células T in vitro y causan apoptosis de células T, pudiendo afectar también a células NK (15).

Además el estrés celular impuesto por el agotamiento local de triptófano también parece mediar algunos de los efectos inmunosupresores de la IDO (15). En este sentido se ha reconocido a la quinasa 2 de control general no desrepresora (GCN2) como una molécula de señalización que permite a las células T responder a condiciones de estrés creada por la IDO. La insuficiencia de cualquier aminoácido (tal como ocurre cuando IDO agota el triptófano) activará la actividad quinasa GCN2 e inicia una vía de señalización corriente abajo, esto resulta en la represión de la mayoría de la traducción de proteínas. Se ha visto en estudios que ratones que carecen de GCN2 son resistentes a la inhibición de la proliferación inducida por la IDO y no adquieren el estado de anergia, normalmente inducido por la exposición a la IDO (15).

Parece probable que tanto la vía GCN2 y la función de la vía de los metabolitos actúen sinérgicamente para crear los efectos biológicos de la IDO (15).

Se ha visto en modelos experimentales que la presencia de IDO se correlaciona con un incremento de las células Treg que infiltran el tumor. Además, se demostró que las CPA que expresan IDO pueden favorecer la acumulación y activar las células Treg existentes o crear nuevas para suprimir potentemente las respuestas antitumorales de las células T (16).

Melanoma

Si bien el fin de esta monografía no es específico hacia el tratamiento del melanoma, la mayoría de los estudios y el impacto mayor de los resultados del bloqueo de la coestimulación se han visto en esta enfermedad, por eso nos parece indicado destacar su importancia.

El melanoma es un tumor maligno generado por los melanocitos, estas células se encuentran en la piel, mucosas, cápsula ganglionar, suprarrenal, meninges y retina pudiendo originarse el tumor en cualquiera de ellas (17). La incidencia de melanoma se ha triplicado en los últimos 20 años a nivel mundial; en Uruguay la incidencia ajustada por edad es de 5,56 casos cada 100000

habitantes en hombres para todo el Uruguay en el período 2007-2011 y de 3,88 en mujeres, la tasa de mortalidad ajustada por edad es de 1,77 cada 100000 habitantes en hombres y de 0,96 en mujeres en el año 2012, según datos publicados por la comisión honoraria de lucha contra el cáncer.

Fig 2. Melanoma en la piel de un paciente.

Bloqueo de CTLA-4 de la experimentación a la clínica.

En 1995 Tivol realiza un estudio con ratones deficientes en la expresión de CTLA-4. Estos ratones carentes de CTLA-4 desarrollaron esplenomegalia, linfadenopatía, además se vió infiltración multiorgánica con destrucción del tejido, muriendo a las 3-4 semanas de edad (18).

Estos estudios sugerían que CTLA-4 desencadena una apoptosis antígeno específica, lo que llevaba a la muerte de las células T. Además apoyaban el papel importante de CTLA-4 en la prevención de la activación de las respuestas inmunes, y la regulación mediada por CTLA-4 de las células T autorreactivas para tener un sistema inmunológico equilibrado (18).

En 1994 Linsley realiza estudios para comparar propiedades de unión y estimuladoras de CD80 y CD86 tanto frente a CTLA-4 como a CD28. Estos estudios demuestran que CTLA-4 es un receptor de alta afinidad tanto por B7-1 como por B7-2, mientras que CD28 es un receptor de baja afinidad (19).

En 1996 Leach comparo tres grupos de ratones a los cuales se les había inyectado células tumorales de carcinoma de colon y luego habían sido tratados un grupo con anticuerpo anti CTLA-4, otro con anti CD28 y el tercer grupo de control. Estos estudios mostraron que los ratones tratados con anti CTLA-4 aunque no mostraban respuestas curativas en todos los casos el bloqueo mejoraba significativamente el rechazo al tumor. Indicaban que la eliminación de señales inhibidoras en la vía coestimuladora podía mejorar la inmunidad anti-tumoral (20).

En 1998 Fallarino demuestra mediante un estudio que CTLA-4 puede inhibir potentemente la activación de las células T en ausencia de CD28, lo que indica que el antagonismo de una señal mediada por RCT es suficiente para explicar el efecto inhibitorio de CTLA-4 (21).

Evaluación clínica del bloqueo de CTLA-4

Primeros ensayos de ipilimumab en humanos (anti-CTLA-4) en el tratamiento del melanoma.

Ribas en el 2007 relata que el primer uso de un anti CTLA-4 en seres humanos es un resumen que describe el tratamiento de una dosis 3mg/kg de ipilimumab (en ese momento denominado MDX010) para un grupo de 17 pacientes. Este estudio mostró regresión tumoral en 2 de los 17 pacientes. El primer ensayo clínico se llevó a cabo en el Instituto del Cáncer Dana Farber en el cual se trataron a 7 pacientes con melanoma con una única dosis de 3 mg/kg no observándose respuestas tumorales objetivas. Informes de estudios de la Unidad de Cirugía del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos demostraron respuestas objetivas en 7 de 56 pacientes tratados con ipilimumab a una dosis de mg/ kg cada 3 semanas junto con dos vacunas de péptidos gp100 (22).

Estudios de Ipilimumab en otros tipos de canceres no melanoma.

Yang y colaboradores en 2007 realizaron un estudio de cohorte en pacientes mayores de 16 años con cáncer renal de células claras metastásico y sin ninguna terapia sistémica en las últimas tres semanas. En uno de los grupos 21 pacientes recibieron una dosis carga de 3 mg/kg de ipilimumab y dosis posteriores de 1 mg/kg. En otro grupo 40 pacientes recibieron todas las dosis de 3 mg/kg de ipilimumab. La duración de respuesta se mide desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de recaída. Hubo asociación altamente significativa entre mayor toxicidad autoinmune y regersion tumoral, hallando regresión tumoral en los 17 pacientes que presentaron toxicidad autoinmune (23).

En el año 2008 Hodi y colaboradores realizaron un estudio con anticuerpos anti CTLA-4 en un grupo de pacientes con melanoma y otro grupo de pacientes con cáncer de ovario. Los pacientes con carcinoma de ovario en estadio IV fueron un número de 9 que recibieron anti CTLA-4 a una dosis de 3 mg/kg, después de la vacunación con células tumorales autólogas modificadas para segregar GM-CSF (GVAX) meses previos (24).

Se observaron efectos significativos de antitumorales en una minoría de pacientes, uno de los pacientes logró una caída de los niveles de CA-125 (marcador tumoral) varios meses después de una dosis inicial de ipilimumab aunque no se mantuvo la respuesta, una segunda dosis resultó en una caída más rápida de los niveles de CA-125, nueve infusiones adicionales espaciadas a intervalos de 3 a 5 meses lograron el control de la enfermedad durante 4 años. Otros tres

pacientes lograron el control de la enfermedad por 6, 4 y 2 meses respectivamente medido en base a los niveles de CA-125 y criterios radiológicos (24).

Se observaron 2 casos de toxicidades inflamatorias de grado 3 gastointestinales, los siete pacientes restantes mostraron sólo toxicidades inflamatorias leves (24).

Carthon y colaboradores en el año 2010 realizaron el primer ensayo clínico preoperatorio con el ipilimumab en 12 pacientes con carcinoma urotelial. El objetivo era examinar el perfil inmunológico en la sangre periférica y los tejidos tumorales correspondientes de los pacientes tratados con el fin de identificar biomarcadores clínicamente útiles. La población de estudio consistió en 12 pacientes (10 hombres y 2 mujeres) con carcinoma urotelial. Todos los pacientes eran candidatos a la cistectomía radical como tratamiento para su enfermedad. Seis pacientes recibieron 3 mg /kg de ipilimumab en dos dosis, con un intervalo de 3 semanas entre las dosis, y se programaron para cirugía de 4 semanas después de la última dosis del anticuerpo. Seis pacientes recibieron 10 mg/kg de anticuerpo en una dosis (1 paciente) o dos dosis (5 pacientes) antes de la cirugía. El estudio concluyó que la terapia anti-CTLA-4 tiene un perfil de seguridad tolerable en el entorno pre-quirúrgico y que un modelo preoperatorio puede ser utilizado para obtener los datos biológicos sobre las respuestas inmunes humanas, que se puede guiar de manera eficiente el seguimiento de los pacientes tratados en el entorno de enfermedad metastásica. La mayoría de los efectos adversos relacionados con el fármaco consistieron en toxicidades de grado medio (25).

Kwon, Drake y colaboradores en 2014 publicaron los resultados de un estudio clínico aleatorizado, doble ciego, de fase 3 (Tabla-1) en el cual se asignaron en una relación 1:1 a 799 pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata con metástasis que había progresado luego de recibir quimioterapia (docetaxel). Los pacientes recibían radioterapia e ipilimumab o placebo en una dosis de 10 mg/kg cada 3 semanas hasta un máximo de 4 dosis. Este estudio no encontró diferencias significativas de supervivencia global entre ambos grupos, aunque encontraron señales de actividad de la droga (reducción del antígeno prostático específico y mejora en la supervivencia libre de progresión (26).

Fase	*Objetivo*
Preclínica	*Estudiar las principales acciones farmacológicas del nuevo fármaco, conocer la toxicidad, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis. Analizar las características farmacocinéticas.*
1	*Comprobar seguridad del nuevo fármaco, determinar el intervalo de dosis segura. Se continúa estudiando aspectos farmacocinéticos como biodisponibilidad y cinética de eliminación. Se realiza en voluntarios sanos.*
2	*Demostrar la eficacia del fármaco. Delimitar intervalo de dosis terapéutica.*
3	*Verificar la eficacia y seguridad a corto y largo plazo en una mayor cantidad de pacientes. Se compara el fármaco con otros tratamientos actuales para la enfermedad.*
4	*Vigilar la aparición de efectos adversos no detectadas en las fases anteriores.*

Tabla-1. Fases del desarrollo de un nuevo fármaco

Estudios que llevaron a la aprobación en EEUU (FDA) y Europa del Ipilimumab para el tratamiento de melanoma metastásico

Un estudio determinante fue el que demostró la mejora de la supervivencia en pacientes con melanoma metastásico de estadio III o IV; diseñado como un estudio aleatorizado, doble ciego, de fase 3 (27).

En este estudio los pacientes fueron asignados al azar, en una relación 3:1:1, dándose ipilimumab, a una dosis de 3 mg por kilogramo, además de una vacuna de péptido gp100; ipilimumab más gp100 placebo; o gp100 más placebo ipilimumab. A todos se administra una vez cada 3 semanas durante cuatro tratamientos. Los análisis de supervivencia mostraron que las tasas de supervivencia global en el grupo de ipilimumab más gp100, el grupo de ipilimumab solo, y el grupo-gp100 fueron 43,6%, 45,6% y 25,3% a los 12 meses, el 30,0% , 33,2% y 16,3% a los 18 meses, y el 21,6%, 23,5% y 13,7% a los 24 meses respectivamente. . La tasa de respuesta objetiva (en inglés ORR), es decir, la suma de las respuestas completas y parciales, fueron de 5,7%, 10,9% y 1,5% respectivamente. El riesgo de progresión de la enfermedad tomando como referencia el grupo que recibió solo gp100 fue de -19% para el grupo de ipilimumab más gp100 y de -36% para el grupo de ipilimumab solo (27).

Los eventos adversos más comunes en el grupo que recibió ipilimumab solo fueron fatiga (42,0%), náuseas (35,1%) y diarrea (32,8%). En este mismo grupo los efectos adversos relacionados con la inmunidad se vieron en el 61,1% de los cuales un 14,5 % corresponden a efectos adversos de grado 3-4 (Tabla-3) (27).

El estudio concluyó que ipilimumab mejoró la supervivencia global comparada con gp100 solo, y que la eficacia de ipilimumab no mejoró con la adición de gp100 en pacientes con melanoma metastásico (27).

	Ipilimumab + gp 100	Ipilimumab (3mg/Kg)	gp100
Número de pac.	403	137	136
SG mediana	10m	10,1m	6,4
Tasa SG 1a	43,6%	45,6%	25,3%
Tasa SG 18m	30%	33,2%	16,3%
Tasa SG 2a	21,6%	23,5%	13,7%
Riesgo de progres.	-19%	-36%	---
ORR global	5,7%	10,9%	1,5%
Tasa control enf.	20,1%	28,5%	11,0%

Tabla-2. Basado en información de la referencia 27.

Grado	Gravedad del Evento Adverso
0	Ningún efecto adverso
1	Leve
2	Moderado
3	Severo
4	Potencialmente mortal o incapacitante
5	Muerte

Tabla-3. Escala de severidad de efectos adversos desarrollado por el National Institute of Cancer, CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events).

En 2011 Caroline Robert y colaboradores realizaron un estudio aleatorizado, doble ciego, de fase 3 en el que se administró ipilimumab (10 mg/kg) más dacarbazina en pacientes con melanoma metastásico en etapa III o IV no tratados previamente. Se seleccionaron al azar 502 pacientes en una proporción 1:1, un grupo con un total de 250 pacientes fueron tratados con ipilimumab más dacarbazina, y otro grupo de 252 pacientes con dacarbazina más placebo dado en las semanas 1, 4, 7, y 10, seguido por dacarbazina solos cada 3 semanas hasta la semana 22.

La supervivencia global fue significativamente mayor en el grupo que recibió ipilimumab más dacarbazina que en el grupo que recibió dacarbazina más placebo (11,2 meses frente a 9,1 meses, con mayores tasas de supervivencia en el grupo de ipilimumab con dacarbazina a 1 año (47,3% vs. 36,3%), a 2 años (28,5% vs. 17,9%) y 3 años (20,8% vs. 12,2%).

El riesgo de progresión de la enfermedad fue de -24% en el grupo de Ipilimumab más decarbazina en comparación con el de decarbazina solo (28).

Eventos adversos de grado 3 o 4 ocurrieron en el 56,3% de los pacientes tratados con ipilimumab más dacarbazina, en comparación con el 27,5% de los tratados con dacarbazina. y el placebo (P <0,001) No se registraron muertes relacionadas con las drogas o perforaciones gastrointestinales en el grupo de ipilimumab con dacarbazina (28).

	Ipilimumab + Dacarbazina	**Dacarbazina**
Nro. Pacientes	250	252
Sobrevida Global	11,2 m	9,1 m
Tasa de supervivencia 1a	47,3%	36,6%
Tasa de supervivencia 2a	28,5%	17,9%
Tasa de supervivencia 3a	20,8 %	12,2%
Riesgo de progresión enfermedad	-24%	---
Tasa de control de enfermedad (*)	33,2%	30,2%
Tasa de mejor respuesta global (*)	15,2%	10,3%
Mediana duración de la respuesta	19,3%	8,1%

Tabla-4. Basado en información de la referencia 28.

Estudios de combinación y/o comparación de fármacos

El 25 de Junio del 2015, Caroline Roberts y colaboradores publicaron los resultados obtenidos del estudio KEYNOTE-006, realizado del 18 de Setiembre de 2013 al 3 de Marzo de 2014. Este estudio consistía en un ensayo clínico controlado aleatorizado de fase 3, que compara los efectos de un fármaco bloqueador de PD-L1 (Pembrolizumab) con otro bloqueador de CTLA-4 (Ipilimumab), en pacientes con melanoma avanzado (no resecable o metastasico). Incluyeron un total de 834 pacientes de 16 nacionalidades diferentes y los dividieron en relación 1:1:1, 279 para recibir pembrolizumab 10 mg/kg cada 2 semanas, 277 para recibir pembrolizumab 10 mg/kg cada 3 semanas, y 278 para recibir ipilimumab 3 mg/kg cada 3 semanas (29).

Las tasas de supervivencia libre de progresión a los 6 meses fueron 47,3% para los pacientes que recibieron pembrolizumab cada 2 semanas, el 46,4% de los que recibieron pembrolizumab cada 3 semanas, y el 26,5% para los que recibieron ipilimumab. Estimaciones de la mediana de supervivencia libre de progresión fueron 5,5 meses, 4,1 meses y 2,8 meses respectivamente. Los cocientes de riesgo para la progresión de la enfermedad para pembrolizumab frente ipilimumab fueron 0,58 para el régimen de 2 semanas y 0,58 para el régimen de 3 semanas. El beneficio para la supervivencia libre de progresión fue evidente en los dos grupos pembrolizumab en comparación con ipilimumab. (29)

La aparición de eventos adversos de grado 3-5 eventos se produjeron en el 13,3%, 10,1% y 19,9% de los pacientes, respectivamente. El tiempo hasta el inicio del primer evento adverso de grado 3 a 5 fue mayor en los grupos pembrolizumab. La tasa de interrupción permanente de un fármaco del estudio debido a eventos adversos relacionados con el tratamiento fue menor en cada grupo pembrolizumab que en el grupo ipilimumab (4,0%, 6,9% y 9,4%, respectivamente) (29).

Las conclusiones del estudio fueron que el anti-PD-1 pembrolizumab prolonga la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global y tiene menos toxicidad de alto grado que ipilimumab en pacientes con melanoma avanzado (29).

	Pembrolizumab 10 mg/kg c/2sem	Pembrolizumab 10 mg/kg c/3sem	Ipilimumab 3 mg/kg c/3sem
Número pacientes	279	277	278
SLP 6m	47,3%	46,4%	26,5%
SG 1a	74,1%	68,4%	58,2% (*)
ORR	33,7%	32,9%	11,9%
Tasa de respuesta completa	5,0%	6,1%	1,4%
Tiempo medio de respuesta	86d	85d	87d

Tabla-4. Basado en información de la referencia 29.

En 2015 Larkin y colaboradores publicaron los resultados de un estudio en el que se realizó un ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego en 945 pacientes con melanoma metastásico con estadio III o IV fueron asignados en una proporción 1:1:1. Un grupo de 316 pacientes fueron tratados con nivolumab 3 mg/kg cada dos semanas cuatro dosis; otro grupo se le dio nivolumab 1 mg/kg más ipilimumab 3 mg/kg, 4 dosis, seguido de nivolumab 3 mg/kg cada 2 semanas; por último el tercer grupo recibió ipilimumab 3 mg/kg cada 3 semanas. La sobrevida libre de progresión fue de 6,9, 11,5 y 2,9 meses respectivamente. La tasa de respuesta objetiva (en inglés ORR) fue de 43,7%, 57,6% y 19,0% respectivamente. La respuesta completa fue de 8,9%, 11,5% y 2,2% respectivamente. El cambio de la carga tumoral fue de -34,5%, -51,9% y -5,9% respectivamente (30).

En base a estos resultados se concluyó que la sobrevida libre de progresión y la respuesta objetiva es mayor con nivolumab y con nivolumab más ipilimumab que con ipilimumab solo. Además el estudio de los efectos adversos de la combinación sugiere que puede ser usado con seguridad en muchos casos clínicos (30).

	Nivolumab	Nivolumab + Ipilimumab	Ipilimumab
Número de pacientes	316	314	315
SLP (Mdn)	6,9m	11,5m	2,9m
Mutación BRAF+		11,7m	
Mutación BRAF-		11,2m	
SLP (Mdn) PD-L1+	14m	14m	3,9m
ORR (PD-L1+)	57,5%	72,1%	21,3%
SLP (Mdn) PD-L1-	5,3m	11,2m	2,8m
ORR (PD-L1-)	41,3%	54,8%	17,8%
ORR	43,7%	57,6%	19,0%
Respuesta completa	8,9%	11,5%	2,2%
Cambio carga tumoral	-34,5%	-51,9%	-5,9%

Tabla-4. Basado en información de la referencia 30.

Conclusiones y perspectivas.

En la actualidad son innumerables los estudios realizados y proyectados en el marco de la búsqueda de fármacos destinados a combatir de forma efectiva las células malignas. Millones de dólares son invertidos anualmente en investigación en pos de lograr un avance significativo en esta lucha.Si bien es cierto que se han realizados enormes avances en el conocimiento de los mecanismos íntimos que llevan al desarrollo del cáncer, estamos lejos aún de alcanzar ese objetivo. Numerosos fármacos han sido estudiados y analizados sin logar hasta el momento un quiebre que incline la balanza a favor de una curación definitiva.

El ipilimumab es un fármaco que demostró mejores beneficios que la terapia convencional para el tratamiento del melanoma metastásico, tanto a nivel de la sobrevida libre de progresión de la enfermedad como en la sobrevida global de los pacientes. Las respuestas en otros tipos de cánceres no han sido tan considerables como en el caso del melanoma, en muchos casos faltan estudios más grandes para poder conocer su real potencial terapéutico.

En los últimos años los anticuerpos anti PD-1 han demostrado ser superiores en cuanto a sobrevida global con respecto a los fármacos anti CTLA-4, así como también en los menores costos de tratamiento.

A partir de los estudios realizados desde la década del noventa hasta la aprobación de estos fármacos para el tratamiento del melanoma a principios de la segunda década del siglo XXI, se puede afirmar que la inmunoterapia para el tratamiento de algunos tipos de cánceres es una realidad que llegó para quedarse y que no tiene techo.

Más allá de los efectos positivos vistos por la utilización individual de los fármacos queda todo un camino fértil para la mejora por medio de la investigación a través de ensayos clínicos de terapias combinadas, como por ejemplo, la terapia de bloqueo negativo de la coestimulación junto con la inhibición sistémica de la IDO y/o con la terapia genómica, que potencialmente podrían dar resultados mucho más eficaces.

Aún quedan aspectos moleculares por dilucidar sobre los mecanismos de acción de los agentes inmunoterapeúticos en el proceso de regulación de las células T, estos conocimientos pueden permitir mejores terapias o más personalizadas para sacar el mejor provecho con los mínimos efectos adversos.

Estos estudios son ejemplos que demuestran como la investigación básica en modelos experimentales unido con la investigación clínica son fundamentales para avanzar en el conocimiento de mejores terapias.

Las perspectivas para que los fármacos inmunoterapéuticos sean utilizados en nuestro medio pasan por su inclusión dentro de los medicamentos financiados por el Fondo Nacional de

Recursos. Además de que se abaraten sus costos, ya sea porque se encuentra su utilización en patologías más frecuentes o que la patente del medicamento llegué a su vencimiento (que en el caso de los medicamentos mencionados será luego del año 2020) y otros laboratorios puedan producirlos más económicamente.

Agradecimientos

Queremos agradecer en primer lugar a nuestro tutor el Profesor Agregado Marcelo Hill quien con sus valiosos comentarios y sugerencias sobre la monografía nos permitió presentar un trabajo en las mejores condiciones. Así como también en la ayuda a la hora de acceder a material bibliográfico al cual no teníamos acceso. Además la buena predisposición para mantener las reuniones en las más cómodas condiciones en las instalaciones del Instituto Pasteur de Montevideo.

También agradecer al Oncólogo Luis Ubillos que nos cedió parte de su tiempo para mantener una charla sobre la realidad de los tratamientos del melanoma en Uruguay y así tener una mejor aproximación a la clínica de la enfermedad.

Bibliografía

1. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. sexta ed.: Elsevier; 2008. p. 3.

2. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. sexta ed.: Elsevier; 2008. p. 191.

3. Abbas A. In Inumnologia celular y molecular. sexta ed.: Elseiver; 2008. p. 195.

4. Intlekofer AB, and Thompson C. At the Bench: Preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. Journal of Leukocyte Biology. 2013 Julio; 94(1): p. 25-39.

5. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. sexta ed.: Elsevier; 2008. p. 201.

6. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Current Opinion in Immunology. 2014 Abril;: p. 1-7.

7. Sharma P, Allison J. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell. 2015 Abril 9; 161(2): p. 205-214.

8. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Marzo 4; 144(5): p. 646-674.

9. von boehmer L, Mattle M, Bode P, Landshammer A, Shaffer C, Nuber N, et al. NY-ESO-1–specific immunological pressure and escape in a patient with metastatic melanoma. Cancer Immunity. 2013 Julio.

10. Mittal D, Gubin M, Schreiber R, Smyth M. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. Current opinion in immunology. 2014 Abril 27;: p. 16-25.

11. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. séptima ed.: Elseiver; 2012. p. 389.

12. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. séptima ed.: Elsevier; 2012. p. 391.

13. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. séptima ed.: Elsevier; 2012. p. 397.

14. Abbas A. In Inmunologia celular y molecular. séptima ed.: Elsevier; 2012. p. 397-399.

15. Munn D, Mellor A. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. Journal of Clinical Investigation. 2007; 117(5): p. 1147-1154.

16. Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. The Journal of Experimental Medicine. 2013 junio 10; 210(7): p. 1389-1402.

17. Castel Rodó T. Diagnóstico de extensión y estrategia terapeútica en algunos tumores sólidos. In Farreras P, Rozman C. Medicina interna. 17th ed. Barcelona: Elsevier; 2012. p. 1101-1102.

18. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. Immunity. 1995 Noviembre; 3(5): p. 541-547.

19. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, LedBetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. Immunity. 1994 Diciembre; 1(9): p. 793-801.

20. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. Science. 1996 Marzo 22; 271(5256): p. 1734-1736.

21. Fallarino F, Fields PE, Gajewski TF. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. J Exp Med. 1998 Julio 6; 188(1): p. 205-210.

22. Ribas A. Anti-CTLA4 Antibody Clinical Trials in Melanoma. Update on cancer therapeutics. 2007; 2(3): p. 133-139.

23. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, et al. Ipilimumab (Anti-CTLA4 Antibody) Causes Regression of Metastatic Renal Cell Cancer Associated With Enteritis and Hypophysitis. Journal of immunotherapy. 2007; 30(8): p. 825-830.

24. Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A, et al. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. Proceedings of th National Academy of Science of the United States of America. 2008; 105(8): p. 3005-3010.

25. Carthon B, Wolchok JD, Yuan J, Kamat A, Ng Tang DS, Sun J, et al. Pre-operative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a pre-surgical clinical trial. Clinical cancer Research: An official journal of the american association for cancer research. 2010; 16(10): p. 2861-2871.

26. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJM, et al. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. The Lancet. Oncology. 2014; 15(7): p. 700-712.

27. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. The New England Journal of Medicine. 2010; 363(8): p. 711-723.

28. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. The new England Journal of Medicine. 2011 junio 30; 364: p. 2517-2526.

29. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. The New England Journal of Medicine. 2015 junio 25; 372(26): p. 2521-2532.

30. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. The New England Journal of Medicine. 2015 julio 2 ; 373(1): p. 23-34.