

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA



## Facultad de Farmacia

# AVANCES EN INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DE PIEL

Juan Manuel Filter Rull

Universidad de Sevilla



Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

**AVANCES EN INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DE PIEL**

Juan Manuel Filter Rull

Aula 0.4

4 de Julio del 2016

Departamento: BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Tutor: Antonio José Herrera Carmona

Tipología del proyecto realizado: Bibliográfico

## 1. RESUMEN

El cáncer es actualmente la principal causa de muerte a escala mundial. Estos últimos años ha habido una mejoría en la medicina, en la cirugía y, en general, en el estado de salud de la población, lo que conlleva a un aumento de la esperanza de vida de las personas. Esto hace que se multiplique la probabilidad de padecer cáncer.

Para combatir esta enfermedad, se ha dedicado mucho esfuerzo e inversión en la investigación de nuevos y mejores tratamientos para los diferentes tipos de cáncer. Poco a poco se están descubriendo tratamientos más específicos y más eficaces. El cáncer de piel es uno de los más relevantes y el melanoma uno de los más agresivos. Actualmente no hay un tratamiento completamente eficaz y sin efectos adversos. Por eso, se está trabajando en varias líneas de investigación para poder conseguir un tratamiento ideal. Una de esas líneas de investigación es la inmunoterapia, que se basa en ayudarse del sistema inmune para tratar el cáncer.

Hay varios tipos de inmunoterapia: inhibidores del antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y muerte programada 1 (PD-1); interleuquina 2 (IL-2); interferón  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) y vacunas de células dendríticas.

En este trabajo veremos cómo se están abandonando los tratamientos radio y quimioterapéuticos tradicionales y la importancia que están adquiriendo los anticuerpos monoclonales y la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer de piel.

También revisaremos los últimos avances en los diferentes tipos de inmunoterapias y las expectativas que hay de cada uno de ellos.

Palabras claves: Anticuerpos monoclonales - Cáncer de piel - Inmunoterapia - Melanoma

## 2. ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. ÍNDICE	2
3. INTRODUCCIÓN	4
3.1. ¿A qué llamamos cáncer?	4
3.2. Cáncer de piel	4
3.3. Melanoma	5
3.4. Factores de riesgo del melanoma	6
3.5. Hay diferentes tipos de melanoma maligno	7
3.6. Regla del ABCDE	7
3.7. Tratamientos actuales	8
3.8. Inhibidores de la vía proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)	9
3.9. Quimioterapia y Radioterapia tradicionales	10
4. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN	11
5. METODOLOGÍA	11
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
6.1. Anticuerpos Terapéuticos	12
6.1.1. Nomenclatura	14
6.1.2. Mecanismo de acción	14
6.1.3. Anti-CTLA4	15
6.1.3.1. Tremelimumab	17
6.1.3.2. Ipilimumab	17
6.1.4. Anti PD-1R	20
6.1.4.1. Pembrolizumab	21
6.1.4.2. Nivolumab	21
6.1.4.3. Lambrolizumab	21
6.1.4.4. Avances de los anti PD-1R	22
6.2. Citoquinas	23
6.2.1. Interleuquina 2	24
6.2.2. Interferón $\alpha$	25
6.2.3. Las nuevas citoquinas	25
6.3. Vacunas de células dendríticas	26

6.3.1. Células dendríticas contra el cáncer	26
6.3.2. Estado actual	30
6.4. Tratamientos de uso actual	30
7. CONCLUSIONES	31
8. BIBLIOGRAFÍA	33

### **3. INTRODUCCIÓN**

Una de las principales causas de mortalidad en la actualidad es el cáncer, con más de 14 millones de casos nuevos por año a nivel mundial. Se estima que en dos años esta cifra se elevará a los 35 millones. Si nos centramos en España, cada año se detectan más de 215.000 pacientes con cáncer.

#### **3.1. ¿A qué llamamos cáncer?**

El cáncer se origina debido a la acumulación de daños en las células o por mutaciones genéticas. Cada célula de nuestro organismo puede mutar y producir un tumor; éste puede ser benigno, con su crecimiento limitado y permaneciendo en el mismo lugar, o maligno, lo que se conoce como cáncer, es decir, un crecimiento descontrolado de células que invaden otros tejidos. Produce nuevos vasos sanguíneos a través de los cuales se alimenta y puede crecer en otros lugares del cuerpo, alejados de donde se originó.

Se han propuesto tres etapas para explicar la aparición de los tumores y su relación con el sistema inmune (Barrio, 2009):

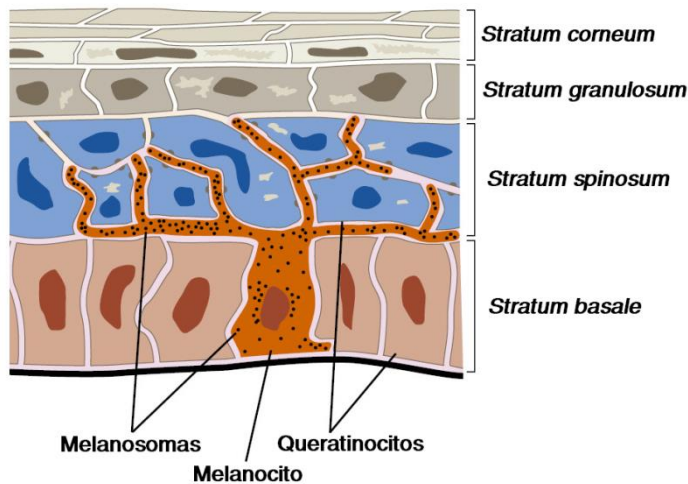
- Fase de eliminación: el sistema inmune es capaz de detectar y destruir las células neoplásicas.
- Fase de equilibrio: las células tumorales mantienen un equilibrio dinámico con el sistema inmune, pero se empiezan a generar variantes neoplásicas mutadas. Esta fase es la más larga y puede prolongarse incluso años.
- Fase de escape: las variantes tumorales que sobreviven se vuelven resistentes al reconocimiento y/o a la eliminación por los efectores inmunes (Kirkwood y cols., 2008) y crecen indiscriminadamente hasta generar un tumor clínicamente detectable (Koebel y cols., 2007).

#### **3.2. Cáncer de piel**

Entre los diferentes tipos de cáncer, el de piel es, con gran diferencia, el tipo más común. Los datos más recientes disponibles indican que aproximadamente se diagnostican 5,4 millones de casos de cáncer de piel al año. La muerte a causa de estos cánceres es poco común. Hay varios tipos de cáncer de piel pero el más relevante es el melanoma.

### 3.3. Melanoma

El melanoma conforma solo el 1% de los casos de cáncer de piel, pero es causa de la gran mayoría de muertes por este tipo de cáncer. Debido a ello, en la actualidad se busca mejorar los tratamientos para el melanoma ya que es el cáncer de piel más agresivo y mortal.



**Figura 1. Esquema de la piel.** La epidermis se compone de varias capas: la capa córnea (*stratum corneum*), capa granular (*stratum granulosum*), capa espinosa (*stratum spinosum*) y capa basal o germinal (*stratum basale*). Contiene queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y células inflamatorias. Las células que producen melanosomas se denominan melanocitos. Los melanocitos son unas células que derivan de la cresta neural y migran hacia la epidermis y el folículo piloso durante la embriogénesis y que tienen melanosomas, un orgánulo que contiene melanina, un pigmento absorbente de la luz solar (Google commons).

Consiste en una transformación maligna de los melanocitos (Figura 1), que ocurre en individuos genéticamente predispuestos así como en individuos genéticamente normales. Puede originarse a partir de nevus previos (en el 50% de los casos) o de forma espontánea. Los nevus melanocíticos son neoplasias benignas producidas por la proliferación de nevocitos, melanocitos modificados que pierden su forma dendrítica y tienden a retener pigmento. Por lo general, se forma en la piel que se expuso a la luz solar, pero se puede presentar en cualquier región anatómica que presente melanocitos, como la piel, las mucosas, la cavidad bucal, los ojos, el ano y los genitales.

Existen tres pasos histológicos principales en el desarrollo y progresión del melanoma:

1. En etapas tempranas se localiza en la epidermis, con diseminación radial.
2. Después se convierte en un melanoma microinvasor con extensiones microscópicas a la dermis papilar superficial.
3. En la tercera etapa, progresa en una fase vertical hacia la dermis profunda, adquiriendo además potencial metastásico (Miller y Mihm, 2006).

### 3.4. Factores de riesgo del melanoma

Implica interacciones entre factores ambientales y microambientales, daños en el ADN, inactivación de genes supresores tumorales, activación de oncogenes, acumulación de alteraciones genéticas e interacciones entre genes. La interacción entre estos factores deriva en una alteración de la homeostasis de la piel. Los factores de riesgo son la radiación solar, el fenotipo cutáneo, la situación geográfica, la presencia de nevus, la herencia, las hormonas y el embarazo, la inmunosupresión, la edad y el sexo.

Algunos de estos daños y mutaciones incluyen:

-Activación anormal de la vía de señalización de la MAPK (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases, o proteína quinasa activada por mitógenos): estimula el crecimiento celular en el melanoma, resultado de mutaciones en el gen *BRAF* (gen que elabora la proteína B-Raf, que participa en el envío de señales en las células y en el crecimiento de estas), en la mayoría de los casos activando las serina-treonina quinasa que estimulan los pasos posteriores en esta vía. Normalmente *BRAF* (que provoca una proliferación celular descontrolada) aumenta la expresión de la quinasa *INK4A* para limitar el crecimiento hiperplásico, pero en el melanoma está mutado y no se detiene esta proliferación (Haass y cols., 2005).

- Una mutación en el gen *CDKN2A*, que codifica para dos proteínas supresoras tumorales, p16 y p19, se ha identificado como responsable del desarrollo del 15-40% de los melanomas familiares.

- Una mutación en otro gen de supresión tumoral, el gen homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*) se atribuye al 25-50% de casos de melanomas no familiares. Provoca la supervivencia celular al inhibir la apoptosis mediante la activación del antagonista de muerte celular linfoma de células B-2 (Haass y cols., 2005).

- Alteraciones en las cadherinas, las integrinas y las metaloproteinasas se producen también en los casos que se vuelven invasores y metastásicos. La pérdida de la cadherina E y la expresión de la cadherina N, así como la expresión de la integrina  $\alpha V\beta 3$  con la consiguiente expresión de la metaloproteinasa 2, que degrada el colágeno de la membrana basal de la epidermis, permiten la extensión de las células malignas (Haass y cols., 2005).



### 3.5. Hay diferentes tipos de melanoma maligno

El melanoma de extensión superficial es el tipo más frecuente de melanoma maligno, con un 70% de los casos. Se localiza preferentemente en extremidades inferiores y en el tronco. Se origina como una lesión pequeña de color marrón negruzco, a veces con decoloración focal azulada; tiene un crecimiento radial. La fase invasiva de crecimiento vertical se traduce en la aparición de un nódulo después de meses o años de evolución.

El melanoma nodular (sobre el 15 % de los melanomas malignos). Tiene preferencia en extremidades inferiores y tronco. Tiene una fase de crecimiento vertical, hasta formar una lesión nodular de color homogéneo azul negruzco, violáceo o rojo amarronado, que puede ocasionar una úlcera sangrante. Invade los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos, por los cuales se disemina a distancia, produciendo metástasis.

El melanoma lentigo maligno (representa un 4-10 % de los casos). Se localiza en áreas expuestas como la cara, el cuello, los brazos y las manos. Es debido a una exposición solar acumulada. Se observa como una mácula con distintos tonos de marrón oscuro, negro o azul. El crecimiento radial finalmente se convierte en crecimiento vertical con la aparición de un nódulo sobreelevado.

El lentiginoso acral (10 % de los casos). Se presenta como una mácula hiperpigmentada de bordes irregulares y color habitualmente negro o azul. Puede desarrollar un componente nodular, una úlcera o sangrar cuando existe invasión vertical. Se localiza en planta y palmas, en el lecho ungueal (entre la uña y la carne del dedo) y en las mucosas.

También se pueden dar otros como el melanoma bucal, el melanoma del tracto digestivo superior, el melanoma ocular y, en las mujeres, el melanoma vulvar.

### 3.6. Regla del ABCDE

Una vez descritos los diferentes tipos de melanomas, estos se pueden detectar en base a la llamada regla del ABCDE, que representa las diferentes características clínicas que hacen sospechar malignidad en una lesión pigmentada de la piel (Friedman y cols., 1985):

- **A**simetría: no tiene forma regular definida.
- **B**ordes irregulares.
- **C**olor (y variaciones).

- **Diámetro:** lesiones nuevas mayores de 6-8 mm o lesiones preexistentes mayores de 2,5 cm de bordes mal definidos y con cambios.
- **Elevación o ulceración:** las lesiones que presentan ulceración, hemorragia o áreas elevadas indican mayor riesgo de profundidad.

Cuando una lesión presenta una de las anteriores características, está indicado realizar biopsia para confirmar su malignidad.

Además, el principal factor de pronóstico del melanoma es la profundidad de la lesión, clasificada por Breslow (Breslow, 1970).

- I. In situ.
- II. < 0,75 mm.
- III. 0,75 mm – 1,5 mm.
- IV. 1,5 - 4 mm.
- V. > 4 mm.

A mayor número de Breslow, peor pronóstico tendrá dicho melanoma.

### **3.7. Tratamientos actuales**

El melanoma a menudo se puede detectar tempranamente y la mayoría de los casos son fácilmente curables mediante la cirugía en una etapa inicial. El problema viene cuando el melanoma se encuentra en una etapa más avanzada, habiéndose vuelto irreseccable (cáncer que no se puede extirpar, porque envuelve un órgano vital) o metastásico.

Actualmente, el tratamiento del cáncer se centra en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La primera opción siempre es la extirpación quirúrgica; si esta no se puede llevar a cabo, por los motivos antes mencionados, el cáncer se tratará farmacológicamente.

Es importante destacar que el melanoma, una vez diseminado, es una enfermedad altamente resistente a los tratamientos antineoplásicos convencionales. La dacarbazina (DTIC) era el tratamiento estándar para los enfermos con melanoma metastásico (la FDA la aprobó en 1975) (Tabla 1) con una tasa de respuesta objetiva únicamente del 10-20% y de respuesta completa menor al 5%, de solo 6-8 meses de duración. Por ello, se han investigado nuevas estrategias terapéuticas (Lutzky, 2010). Posteriormente, se aprobó el IFN- $\alpha$ -2b en altas dosis en 1996 y la IL-2 en 1998. En 2008, se realizó un metaanálisis de 2.000 pacientes con melanoma metastásico que participaban en estudios en fase II con diferentes tratamientos. La mediana de supervivencia global fue de 6,2 meses, con un 25% de supervivencia global al año y 1,7

meses de supervivencia libre de progresión de la enfermedad. Este pronóstico desalentador ha sido la razón de la búsqueda intensiva de tratamientos que logren mejorar esta supervivencia.

**Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del melanoma.**

Fármaco	Año de aprobación	Indicaciones
DTIC	1975	Melanoma metastásico
IFN- $\alpha$ -2b	1996	Terapia adyuvante en pacientes con alto riesgo de recurrencia después del tratamiento quirúrgico
Aldeisleukin (IL-2)	1998	Melanoma metastásico
IFN- $\alpha$ -2b pegilado	2011	Terapia adyuvante poscirugía para tratar la diseminación linfática
Ipilimumab	2011	Melanoma irreseccable o metastásico
Vemurafenib	2011	Melanoma irreseccable o metastásico con mutación BRAF V600E
Dabrafenib	2013	Melanoma irreseccable o metastásico con mutación BRAF V600E
Trametinib	2013	Melanoma irreseccable o metastásico con mutación BRAF V600E o BRAF V600K
Dabrafenib + trametinib*	2014	Melanoma irreseccable o metastásico con ciertas mutaciones en BRAF

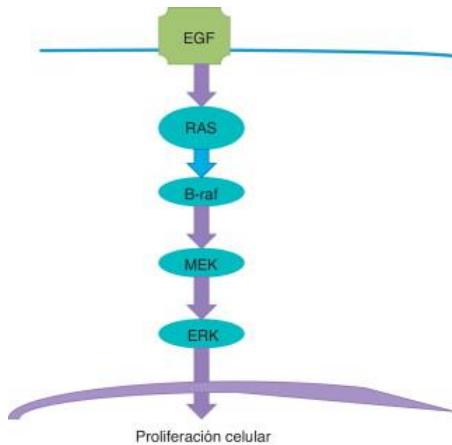
Las opciones de tratamiento sistémico son muy amplias. Estos son los que ha ido aprobando a lo largo de los años (Ayala-Cortés y cols., 2014).

Actualmente, aunque el arsenal terapéutico es muy amplio, los tratamientos sistémicos más relevantes son:

- La quimioterapia convencional.
- La terapia molecular (inhibidores de la vía proteína quinasa activada por mitógenos MAPK).
- La terapia inmunomoduladora (IL-2, IFN- $\alpha$ , CTLA-4 y PD-1).
- Otros, entre los que se encuentran los inhibidores de la angiogénesis, los moduladores de la apoptosis celular, las vacunas y la radioterapia.

### **3.8. Inhibidores de la vía proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)**

Constituyen actualmente, junto con los anticuerpos monoclonales, el tratamiento de primera línea frente al melanoma cutáneo. El receptor del factor de desarrollo epitelial (EGF) recibe la señal para estimular el desarrollo y activa la proteína RAS (Figura 2). Esta activa a la proteína B-Raf, la cual a su vez activa a la proteína MAPK (MEK), que hace que el ERK estimule en el núcleo celular a los genes que son responsables del desarrollo y la proliferación celular. Este es un proceso fisiológico que es el responsable de la proliferación celular cuando ésta es necesaria, y que se detiene cuando ya no lo es.



**Figura 2. Vía de señalización de EGF.** La vía de la tirosina-quinasa se inicia en el receptor del factor epitelial de desarrollo (EGF) de la membrana celular y pasa por una serie de pasos hasta el núcleo: EGF recibe la señal para estimular el desarrollo y activa la proteína RAS la cual activa a la proteína B-Raf, que activa a la proteína MAPK (MEK), y esta hace que el ERK estimule en el núcleo celular a los genes que son responsables del desarrollo y la proliferación celular (Nieweg y Gallegos-Hernández, 2015).

El problema surge cuando ocurre una mutación en el gen que es el responsable de producir la proteína B-Raf. Esto se traduce en que la estimulación de MEK persiste y este, a su vez, continúa estimulando a ERK, el cuál estimula a los genes encargados de la proliferación celular. El resultado es una célula cancerosa que continúa dividiéndose.

Una molécula llamada Vemurafenib se une a la proteína maliciosa B-Raf y la hace inefectiva, la proliferación celular se detiene y las células tumorales entran en apoptosis. Varios estudios han demostrado que esta molécula es efectiva contra el melanoma cutáneo (Sosman y cols., 2012; Chapman y cols., 2011). Desafortunadamente, las respuestas no son duraderas; la media de duración de la respuesta es de 6 meses.

Otros fármacos que actúan en esta vía son Dabrafenib y Trametinib. Dabrafenib es un inhibidor de *BRAF* y Trametinib es un inhibidor de MEK, aprobados en 2013, indicados en melanomas irresecales o metastásicos con *BRAF* mutado. Actúan de forma similar al Vemurafenib. Cobimetinib es otro fármaco en estudio que actúa sobre el gen *BRAF* mutado. Estos fármacos están aún en estudio y en la actualidad son una de las terapias más usadas contra el melanoma cutáneo (junto con los anticuerpos monoclonales).

### 3.9. Quimioterapia y radioterapia tradicionales

Se están dejando de lado poco a poco ya que son muy tóxicas, porque actúan por lo general inhibiendo la multiplicación celular de forma inespecífica. En la actualidad se buscan nuevos tratamientos para curar el cáncer, más específicos y sin tantas reacciones adversas. Ahí es donde entra en juego la inmunoterapia; ésta comprende varios tratamientos que buscan la

estimulación o mejora del sistema inmunitario con el fin de rechazar y destruir tumores, contando con una elevada especificidad celular.

#### **4. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN**

Los objetivos del presente trabajo consisten en revisar el panorama actual del cáncer de piel y el melanoma, determinar los tratamientos actuales, explicar qué es la inmunoterapia y sus diferentes tipos, observar los posibles tratamientos en un futuro y ver las expectativas futuras de la inmunoterapia en el tratamiento del melanoma.

#### **5. METODOLOGÍA**

La presente revisión bibliográfica se ha realizado utilizando como principal herramienta de búsqueda la base de datos PubMed/Google Academy/Medline, usando los siguientes criterios de búsqueda: Cancer, melanome, skin cancer, cancer treatments e immunotherapy. Mediante éstas búsquedas, se seleccionaron los artículos de mayor interés y más actualizados.

Posteriormente, se organizó y se cribó la información. Se realizaron sucesivas búsquedas introduciendo términos más específicos como antibodies, monoclonal antibodies, dendritic cell vaccines, cytokines, Ipilimumab, Nivolumab, Tremelimumab, Lambrolizumab y Pembrolizumab, con el objetivo de obtener artículos más específicos y que profundizaran sobre los tratamientos contra el cáncer de piel.

De la totalidad de artículos encontrados se seleccionaron los más actuales y de mayor relevancia en el tema, si bien también han sido incluidos artículos más antiguos pero de gran importancia en la investigación de la inmunoterapia.

#### **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

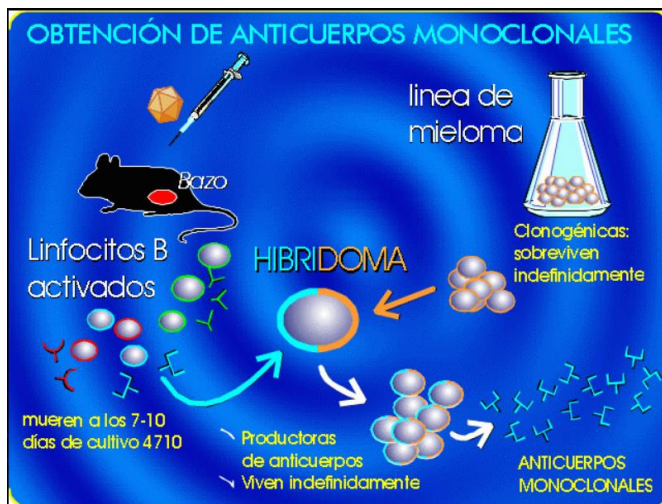
La inmunoterapia contra el cáncer cuenta con diferentes tratamientos tales como los anticuerpos monoclonales (CTLA-4 y PD-1), la terapia de vacunas de células dendríticas, citoquinas, radioterapia (no convencional), los inhibidores de la angiogénesis y los moduladores de la apoptosis celular.

Los inhibidores de la angiogénesis actúan sobre alguno de las múltiples compuestos angiogénicos sobreexpresados en el melanoma, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la IL-8. Sin embargo, al comparar pacientes tratados con

inhibidores de la angiogénesis y sin éstos, no se encontró ninguna diferencia significativa en la progresión libre de enfermedad (Kim y cols., 2012). Con los fármacos para la apoptosis celular tampoco se ha demostrado ninguna diferencia significativa en la supervivencia (Bedikian y cols., 2006). Actualmente, se usa la radioterapia con un enfoque diferente al tradicional ya que se trata a los pacientes con radioterapia como un potencial activador del sistema inmunológico.

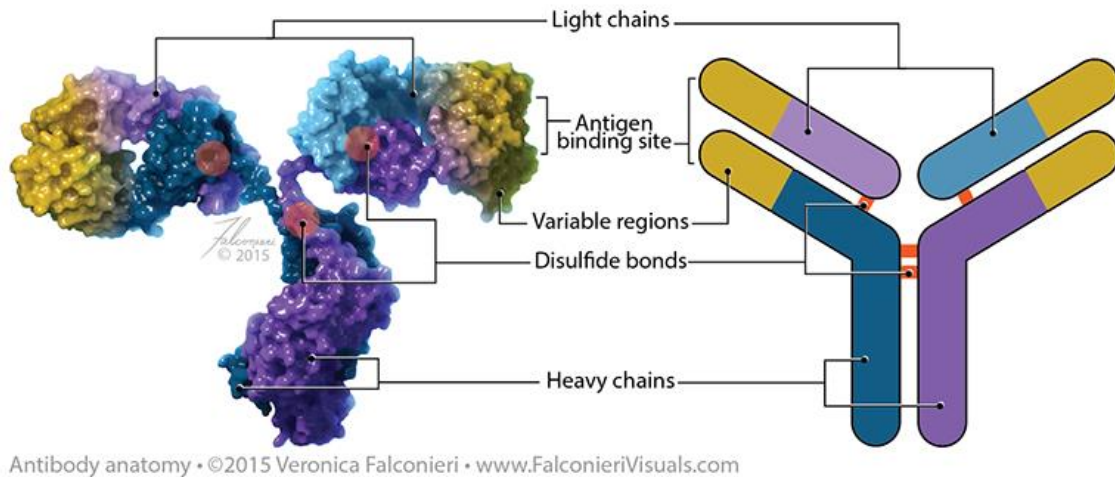
### 6.1 Anticuerpos terapéuticos

Los anticuerpos son proteínas séricas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y poseen la capacidad de unirse de manera específica a otras moléculas. En épocas pasadas se utilizaban anticuerpos “policlonales”, derivados del plasma sanguíneo, en las que se encontraba enriquecida la especificidad deseada. En 1975, gracias a los avances en las técnicas de biología molecular y a los conocimientos generados en el área de la inmunología, Köhler y Milstein descubrieron un método de producción de anticuerpos monoclonales que ha hecho que se reemplazara en la mayoría de aplicaciones a los policlonales (Figura 3). En 1994, se autorizó el primer anticuerpo para uso clínico.



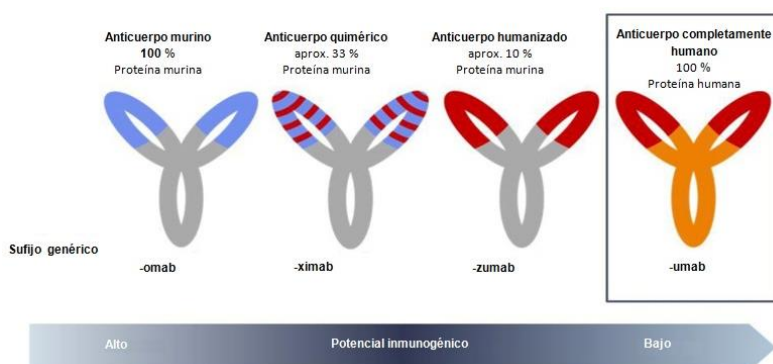
**Figura 3. Método de producción de anticuerpos monoclonales.** Si un antígeno se inyecta en el cuerpo de un mamífero, las células B de su sistema inmune empezarán a producir anticuerpos para ese antígeno. Para producir anticuerpos monoclonales, primero se extraen células B de un animal que ha sido expuesto al antígeno. Estas células B son fusionadas en con células tumorales de mieloma múltiple que pueden crecer indefinidamente en cultivo celular. Son los hibridomas, y se multiplican rápidamente produciendo gran cantidad de anticuerpos. Si el animal se expuso solo a un antígeno, se producirá solo un tipo específico de anticuerpo monoclonal (Google commons).

Los anticuerpos juegan un papel importante en la restauración de la inmunocompetencia. Actualmente se combinan los anticuerpos monoclonales, en dosis bajas, con quimioterapia o radioterapia, resultando potenciadores de estos tratamientos (Torrella y Noris-García, 2004). Los anticuerpos son sintetizados por linfocitos como respuesta a un antígeno específico. Estas inmunoglobulinas constan de dos cadenas pesadas y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuro formando una “Y”. En su porción más externa se encuentra la región variable, que es la que reconoce y se une al antígeno, siendo altamente específica (Figura 4).



**Figura 4. Estructura de un anticuerpo.** Los anticuerpos son glicoproteínas del tipo gamma globulina y tienen típica forma de Y. En la parte morado-azulada se observan las cadenas pesadas (Fracción constante) con dominios, mientras que en amarilla se muestran las cadenas ligeras (Fracción variable). El anticuerpo reconoce al antígeno mediante su región variable. (Google commons)

Los primeros anticuerpos desarrollados inoculando un antígeno en ratones, llamados murinos, no fueron muy efectivos debido a su alta inmunogenicidad que llevaba a un alto riesgo de reacciones de hipersensibilidad y al desarrollo de anticuerpos anti-anticuerpos murinos que disminuían rápidamente su efectividad. El desarrollo de la biotecnología, más específicamente la técnica del hibridoma, llevó a poder generar anticuerpos más puros, quiméricos (en los que una porción de la proteína es humana y la otra de una especie diferente), humanizados (en los que casi toda la molécula es humana y solo pequeños fragmentos de la secuencia de aminoácidos proviene de otra especie) y completamente humanos (Figura 5). Este proceso progresivo de humanización de los anticuerpos monoclonales es necesario para reducir su inmunogenicidad.



**Figura 5. Terminología de los anticuerpos según su grado de humanización.** El uso de los anticuerpos monoclonales, que van desde completamente murinos a totalmente humanos, ha evolucionado en el tiempo. El potencial inmunogénico de los anticuerpos humanos que se usan preferentemente en la actualidad es muy bajo comparado con los anticuerpos murinos que se utilizaban inicialmente. Se recoge la terminología utilizada (Google commons).

### 6.1.1. Nomenclatura

Según su procedencia y el uso para el que fueron diseñados, los anticuerpos terapéuticos siguen una nomenclatura particular establecida (Figura 6). Así, el nombre de todos ellos termina con el sufijo “mab”, para referirse a que se trata de un “anticuerpo monoclonal” (del inglés **monoclonal antibody**). Si el origen del anticuerpo es el ratón (la gran mayoría de los anticuerpos monoclonales de primera generación son de esta especie), se le antepone la letra “o” (por ejemplo, tositumomab). Si es quimérico, se le antepone la sílaba “xi” (por ejemplo, rituximab). Si es humanizado, se le antepone la sílaba “zu” (por ejemplo, alemtuzumab). Finalmente, si el anticuerpo proviene de secuencias de ADN enteramente humanas se le antepone la letra “u” (por ejemplo, Ipilimumab). También hay otros como -i- (de mono), -e- (de hámster) y -a- (de rata). Asimismo, si el anticuerpo fue diseñado contra un blanco tumoral, a los dos sufijos anteriores se antepone la sílaba “tu” (por ejemplo, tositumomab, rituximab, alemtuzumab). También se le añade, según la enfermedad o el grupo destinatario, -ba(c)- si es bacteriano, -ci(r)- si es cardiovascular, -li(m)- si es inmunomodulador y -vi(r)- si es vírico. Además se le puede añadir otra sílaba, según el tumor al que trate.

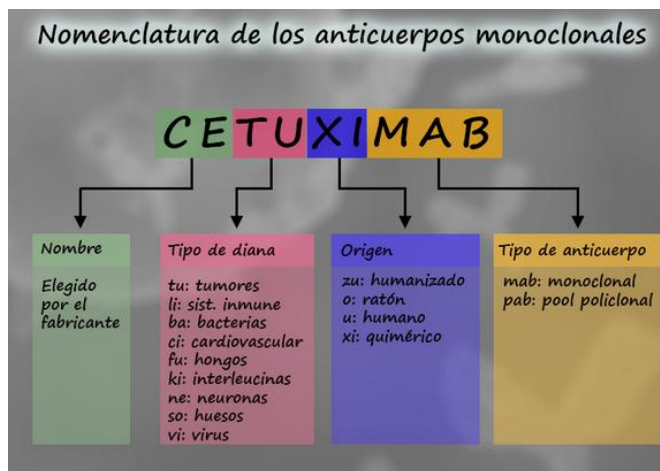


Figura 6. Nomenclatura de los anticuerpos monoclonales utilizados en la terapia. La nomenclatura de los anticuerpos monoclonales depende del tipo de anticuerpo que se trate, del origen, del tipo de diana y del nombre de fantasía que le asigne el fabricante (Google commons).

### 6.1.2. Mecanismo de acción

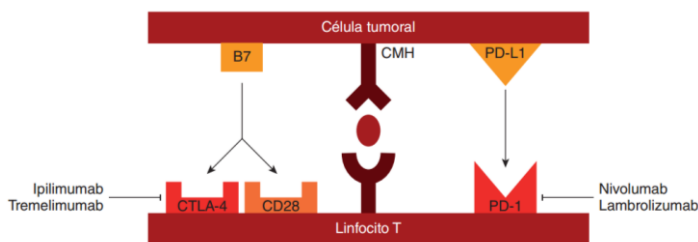
Los anticuerpos monoclonales ejercen su actividad antitumoral de distintas maneras, siendo las más importantes:

- La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos llevada a cabo por células *natural killer* o monocitos/macrófagos.
- La citotoxicidad mediada por complemento.
- Alterando señales de transducción.



-Bloqueando el receptor de un factor de crecimiento o mediante inmunoconjugados, que es el concepto de “bala mágica” llevado a su máxima expresión: un anticuerpo monoclonal altamente específico asociado a un agente citotóxico con el fin de amplificar la respuesta antitumoral en esa célula neoplásica en particular; estos agentes pueden ser quimioterápicos, citoquinas, radioisótopos o toxinas.

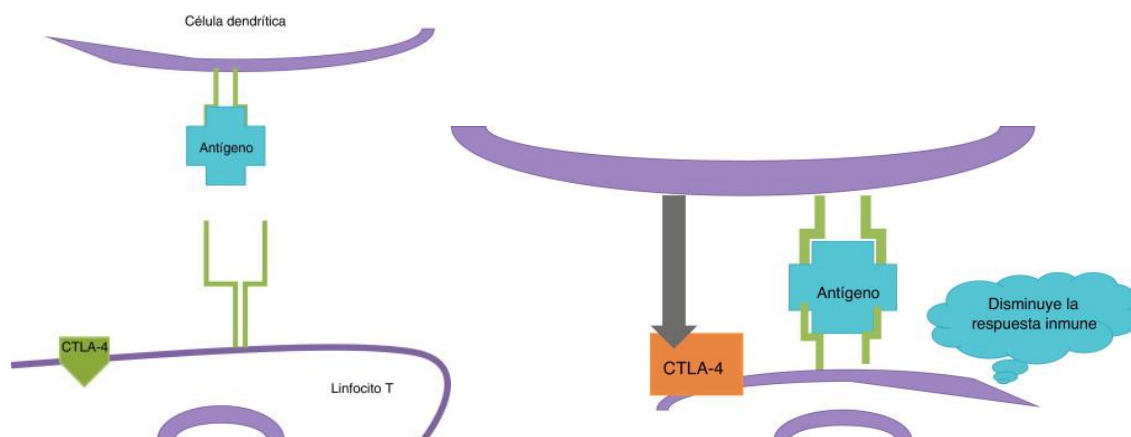
En la actualidad, se comercializan al menos 7 anticuerpos como medicamentos anti-tumorales para el tratamiento de tumores sólidos y otros tantos están en espera de ser aprobados (Figura 7). Todos ellos deben pasar por rigurosos procesos de control de calidad, bioseguridad y eficacia terapéutica antes de ser autorizados para su utilización. Aun así, algunos de estos anticuerpos han sido retirados del mercado o restringido su uso en casos determinados debido a reacciones adversas que solo fueron evidentes luego de su aplicación a gran escala. Se está investigando en estas nuevas terapias para que puedan ser utilizadas de manera idónea como alternativas menos tóxicas y más eficaces en el difícil manejo de las neoplasias.



**Figura 7. Mecanismos de acción anti PD-1R y anti CTLA-4.** Posible mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales anti PD-1R y los anti CTLA-4. B7 y PD-L1 de la célula tumoral interaccionarían con los receptores CTLA-4 y PD-1R del linfocito, respectivamente (Ayala-Cortés y cols., 2014).

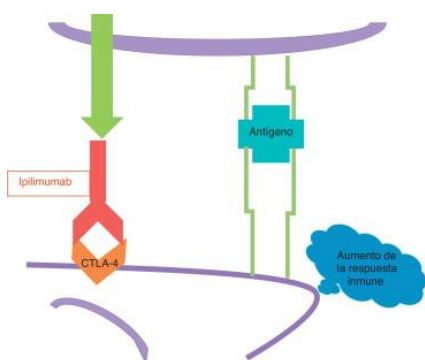
### 6.1.3. Anti-CTLA4 (del inglés Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4)

CTLA4 fue descubierto en la década de 1980. El CTLA4 (una proteína de membrana, expresada de manera constitutiva en la superficie de una población de linfocitos T CD4+ denominados reguladores, Treg (Moosmann y Heinemann, 2007), que se expresa de nuevo en la membrana de los linfocitos T efectoras de la inmunidad, una vez que estos son activados) es miembro de una superfamilia de inmunoglobulinas que actúa como regulador negativo del sistema inmune (Figura 8) y juega un papel clave en la inhibición de la inmunidad antitumoral (Pierard y cols., 2012). Es decir, a través de CTLA-4, los linfocitos T activados reciben una señal de regulación negativa de la activación y proliferación linfocitaria, “apagándolos” una vez que su función ya no es necesaria (Teft y cols., 2006).



**Figura 8. Presentación del antígeno del melanoma al linfocito T.** Las células dendríticas presentan el antígeno del melanoma a las células T (izquierda). Iniciada la respuesta inmune, la célula dendrítica activa a los linfocitos T-citotóxicos asociados al antígeno 4 (CTLA-4). CTLA-4 inhibe la respuesta inmune (derecha) (Nieweg y Gallegos-Hernández, 2015).

De este modo, CTLA-4 actúa eficazmente como un mecanismo molecular de control del sistema inmunitario para evitar el reconocimiento de células del organismo como antígenos (autoinmunidad) y así ayuda al mantenimiento de un estado fisiológico de tolerancia. CTLA-4 no representa un marcador de la célula tumoral, por lo que no se utiliza para la aplicación de terapia dirigida, sino para inmunoterapia. Dicho bloqueo puede romper la tolerancia periférica e inducir una respuesta antitumoral (Eggermont y Schadendorf, 2009) mediante la estimulación de las vías de activación intracelular encaminadas a iniciar la activación y proliferación de células T, así como promoviendo la liberación de IL-2 (Mansh M, 2011). Algunos anticuerpos monoclonales se fijan a los CTLA-4, bloquean los CTLA-4 y evitan que sean activados; es decir, bloquean la inhibición del sistema inmune contra estas células tumorales (Figura 9).



**Figura 9. Bloqueo de CTLA-4 por Ipilimumab.** El anticuerpo monoclonal Ipilimumab bloquea los CTLA-4. Esto detiene el efecto inhibitorio de CTLA-4 y estimula la respuesta inmune (Nieweg y Gallegos-Hernández, 2015).

Dos anticuerpos IgG monoclonales totalmente humanos anti-CTLA4; Ipilimumab (MDX-010) y Tremelimumab (CP-675 206) (Eggermont y Schadendorf, 2009), se han probado solos y en combinación en ensayos clínicos de fase II y III, desde 2001 y 2002, respectivamente

(Eggermont y Schadendorf, 2009). El patrón y la duración de la respuesta inmune asociada a estas nuevas modalidades difieren de los relacionados con citoquinas y agentes citotóxicos (Kirkwood y cols., 2008).

#### **6.1.3.1. Tremelimumab**

Es un anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 completamente humano, que tiene la capacidad de unirse específicamente a CTLA4 y bloquear su función (Ribas, 2008). A diferencia de Ipilimumab, Tremelimumab es de isotipo IgG2 y ha sido ensayado para tratar (en monoterapia o combinado) a pacientes con melanoma metastásico (Ribas y cols., 2005), cáncer metastásico de colon y recto, pulmón, mama, riñón y hepatocelular. Los estudios en fase clínica iniciales de Tremelimumab demostraron toxicidad aceptable y eficacia similar al Ipilimumab, con regímenes de 10 mg/kg mensuales y 15 mg/kg en dosis trimestrales del anticuerpo con una supervivencia media de 10,3 y 11 meses, respectivamente (Eggermont y Schadendorf, 2009). Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos sugerían que Tremelimumab probablemente se convertiría en otra arma útil para la lucha contra el cáncer. Sin embargo, los estudios en la fase III demostraron que fallaba en el beneficio de su uso frente a la quimioterapia convencional; es decir, que no ha demostrado un aumento significativo en la supervivencia (Millward y cols., 2013). Debido a esto, el uso del fármaco se abandonó (Pierard y cols., 2012).

#### **6.1.3.2. Ipilimumab (YERVOY®, de Bristol-Myers Squibb)**

Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal perteneciente a la subclase IgG1 de las inmunoglobulinas humanas que se une de manera específica y selectiva a la molécula CTLA-4 y bloquea su función (Takahashi y cols., 2000; Keler y cols, 2003). Al hacerlo, Ipilimumab se comporta como un inmunoestimulante que facilita la aparición de respuestas inmunitarias dirigidas contra antígenos propios presentes en la superficie de las células tumorales. En otras palabras, Ipilimumab no está dirigido en contra de, ni ataca al tumor, sino que proporciona las condiciones necesarias para que el sistema de defensa del paciente se active y desarrolle una respuesta anti-tumoral.

Inicialmente, los resultados de un estudio en 72 pacientes con melanoma avanzado que fueron tratados con Ipilimumab en monoterapia o en combinación con DTIC (Dacarbazina) mostraban una supervivencia global de 11,5 y 13 meses, respectivamente, pero lo más importante fue que el 10% de los pacientes demostró supervivencias mayores a cuatro años (Hersh y cols., 2011; Lee y cols, 2012). Posteriormente se continuó su estudio en diferentes ensayos clínicos. En un estudio en fase II, con diferentes dosis y combinado con una vacuna con dos péptidos de

antígeno glicoproteína 100 (gp100) de melanoma, se encontró una tasa de respuesta global del 13%. En otro estudio se demostró una mejoría de la supervivencia global de 676 pacientes con HLA-A\*0201 y melanomas avanzados previamente tratados; los pacientes fueron divididos en tres grupos y se les administró Ipilimumab en combinación con una vacuna peptídica gp100, Ipilimumab como monoterapia o gp100 como monoterapia. Los resultados mostraron una media de supervivencia de 10 meses en los grupos que incluyeron Ipilimumab ± gp100 frente a 6,4 meses en el de gp100 como monoterapia, así como una reducción del 36% en el riesgo de progresión de la enfermedad en el grupo de Ipilimumab comparado con el de gp100. El 60% de los pacientes del grupo de Ipilimumab mantuvieron su respuesta durante dos años frente al 17,4% del grupo de Ipilimumab más gp100 y ninguno en el de gp100 como monoterapia. También se ha estudiado en pacientes sin tratamiento previo; 502 pacientes con melanoma fueron aleatorizados para recibir Ipilimumab más DTIC o DTIC como monoterapia; los resultados demostraron una supervivencia global significativamente superior en el grupo de Ipilimumab (11,2 frente a 9,1 meses), con una supervivencia mayor a un año en el 47,3% frente a 36,3% y a los tres años en el 20,8% frente a 12,2% (Robert y cols., 2011; Hodi y cols, 2010). Es decir, la utilización de Ipilimumab en un estudio de fase III resultó en una mejoría de la supervivencia de pacientes con melanoma metastásico, lo que condicionó su aprobación para esta indicación.

Ipilimumab fue autorizado en 2011 por las agencias reguladoras de medicamentos de EE.UU (FDA) y Europa (EMA) para su aplicación en pacientes adultos que padecen melanoma avanzado (metastásico o irresecable), y que han recibido (EE.UU y Europa) o no (sólo EE.UU) tratamiento previo (Graziani y cols., 2012). Adicionalmente, Ipilimumab se ha estudiado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de próstata, pulmón, riñón y de pacientes con linfoma. En todos estos casos, la administración del medicamento se ha restringido a individuos que presentan un estado avanzado de la enfermedad. Como se indicó al inicio, son dos los principales mecanismos de acción de este fármaco. En primer lugar, Ipilimumab actúa bloqueando al receptor CTLA-4 por lo que activa a los linfocitos T, facilitando la proliferación, expansión y posterior diferenciación de los clones de linfocitos T que se encuentran bajo estimulación antigénica en un momento dado (Fife y Bluestone, 2008). Además, la unión de Ipilimumab a CTLA-4 en la superficie de los linfocitos T impide uno de los principales mecanismos de inmunorregulación que utiliza esta población celular, como es la inducción de cambios fenotípicos (disminución de la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80 y CD86) (Oderup y cols, 2006) y metabólicos (incremento del catabolismo del triptófano y producción asociada de quinureninas) en las células presentadoras de antígeno (APC) (Mellor y

Munn, 2004). Todo esto conduce a una modificación cualitativa del microambiente donde se realiza la presentación antigénica a los precursores de las poblaciones de linfocitos T efectores de la inmunidad. Ello trae como consecuencia una disminución del estado de activación de estas poblaciones efectoras, siendo incluso posible que estas adquieran un fenotipo regulatorio. Al impedir la puesta en marcha de estos mecanismos mediados por CTLA-4, Ipilimumab contribuye a la aparición de respuestas inmunitarias dirigidas contra las células tumorales. En los ensayos clínicos realizados hasta ahora o en curso, la administración de Ipilimumab ha ocasionado un incremento significativo del intervalo libre de enfermedad y de la supervivencia promedio (6,4 meses en el grupo no tratado frente a 10,1 meses en el grupo tratado con Ipilimumab, en el estudio utilizado para la aprobación por los organismos reguladores) (Graziani y cols., 2012), así como también del número de pacientes que experimentan regresión parcial o total de la enfermedad (Bashey y cols., 2009). Hoy en día, Ipilimumab está indicado en combinación con Nivolumab como terapia de primera línea y como segunda línea en monoterapia (con estadiaje (PS) de 0 a 2) para el tratamiento de pacientes con melanoma maligno metastásico o irreseccable. Se administra bajo la forma de una infusión intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas (3 mg/kg; 4 dosis). Ahora bien, según lo explicado anteriormente resulta claro que la administración de Ipilimumab a un ser humano conlleva un riesgo: el desarrollo de respuestas inmunitarias en contra de antígenos presentes en tejidos y órganos sanos del individuo. Efectivamente, los principales efectos adversos que se han observado tras la administración de Ipilimumab a pacientes con cáncer son de esta naturaleza.

Los efectos secundarios graves parecen ocurrir más a menudo con este medicamento que con los inhibidores de PD-1. Colectivamente, estos efectos se han agrupado en la literatura anglosajona bajo el término "IRAE" (Immune-Related Adverse Event); su severidad suele ser leve o moderada (aunque se han dado casos de tal gravedad que incluso se vio comprometida la vida del paciente), y los tejidos/órganos más comúnmente afectados son la piel (erupción, prurito y vitiligo) y el tracto gastrointestinal (colitis y diarrea), pero también se han documentado procesos inflamatorios de origen inmunitario que se manifiestan como episodios de hepatitis, uveítis y endocrinopatías de las glándulas pituitaria, tiroideas o adrenal. La mayoría de los ensayos clínicos ha reportado una incidencia importante de IRAE en los pacientes tratados con Ipilimumab (Graziani y cols., 2012), estimándose que entre seis y siete de cada diez pacientes a los que se administre el medicamento experimentará alguna forma de IRAE (Bashey y cols., 2009). Lo usual es que estos efectos aparezcan durante la aplicación del

tratamiento (a las pocas semanas de su inicio), pero también se han observado casos en los que aparecen meses después, incluso después de la finalización del tratamiento.

En cuanto al manejo clínico de los IRAE, depende del tipo y la severidad (Kaehler y cols., 2010). Ello va a determinar por un lado la continuación o suspensión temporal o definitiva de la administración del fármaco, y por otro la medicación adicional a utilizar: esteroides en forma local o sistémica, y en casos muy severos agentes inmunosupresores como el micofenolato mofetilo, la ciclosporina, o el anticuerpo monoclonal anti-TNF Infliximab (que ha mostrado utilidad en pacientes con procesos inflamatorios del tracto gastrointestinal que no responden a la terapia con esteroides) para ayudar a resolver rápidamente la sintomatología producida. En atención a lo anterior, otra consideración importante acerca del uso de Ipilimumab es la selección y seguimiento adecuados del paciente que se considere candidato para esta inmunoterapia.

La experiencia acumulada indica que la respuesta del tumor al tratamiento con Ipilimumab difiere de la que se observa regularmente con los agentes quimioterapéuticos clásicos, e incluso con otros medicamentos usados en terapia dirigida. En primer lugar, un número apreciable de estudios ha documentado que el tratamiento con Ipilimumab puede ir acompañado de un aparente crecimiento tumoral inicial, que luego es reemplazado por una respuesta (parcial o total) retardada pero duradera (Graziani y cols., 2012). Además, se dispone ya de criterios de respuesta adaptados a los tratamientos que se califican como “inmunoterapia anti-tumoral”. Adicionalmente, se ha reportado que los pacientes que muestran una mejor respuesta anti-tumoral suelen ser los que también padecen reacciones autoinmunitarias más severas.

#### **6.1.4. Anti PD-1R**

El receptor de muerte programada (*programmed death receptor 1*) denominado PD-1 forma parte de la familia de moléculas B7: CD28, una familia de moléculas co-estimuladoras que regulan la activación de las células T y la tolerancia inmunológica. Por lo tanto, el anti-PD-1R puede jugar un papel importante al romper la tolerancia ante las células neoplásicas (Eggermont y Schadendorf, 2009). Este receptor se expresa principalmente en las células T, pero también puede hacerlo en los monocitos, células B, células T asesinas naturales y células dendríticas. En los tejidos normales, este receptor actúa como un punto de control para el reconocimiento de las células como propias, evitando las reacciones autoinmunes por parte de las células T. Si el receptor no se une a sus ligandos, PD-L1 y L2, ocurre un estado inmunológico normal por parte de las células T; sin embargo, cuando está unido se inhibe la proliferación de

las células T, la secreción de citoquinas y la citotoxicidad de las células, generando una inmunosupresión caracterizada por la anulación de la función inmunológica de las células T (Kono, 2014).

En el caso de los tumores malignos, el ligando PD-L1 expresado por las células tumorales se une a PD-1R de las células T desencadenando una cascada inhibitoria del TCR (*T Cell antigen Receptor*), bloqueando funciones efectoras y suprimiendo la respuesta inmunológica, mermando la capacidad de estas células T para hacer frente al tumor (Freeman y cols., 2000). La expresión de PD-L1 por parte de las células malignas puede darse a consecuencia de la presencia de citoquinas producidas por las células T, lo que se denomina resistencia inmune adaptativa, que es un mecanismo de protección que tienen las células malignas contra la respuesta inmune del paciente.

#### **6.1.4.1. Pembrolizumab (Keytruda®)**

En el caso del tratamiento del melanoma, en septiembre de 2014 la FDA aprobó el uso de Pembrolizumab, sólo con un estudio en fase I. Es un anticuerpo monoclonal contra el receptor PD-1R, constituyendo la primera terapia dirigida a este blanco inmunológico aprobada para el tratamiento del cáncer, y en su primera indicación contra el melanoma metastásico (Poole, 2014). Este se une al receptor PD-1R y evita la unión de sus ligandos PD-L1 y PD-L2, lo que garantiza que las células T se armen contra el tumor. Sin embargo, para que el tratamiento sea efectivo, es necesaria la presencia de células del sistema inmune en la periferia del tumor. Este anticuerpo se administra por vía endovenosa cada tres semanas y como principales efectos secundarios se describen fatiga, tos, prurito, náuseas, neumonitis y hepatitis. Ha demostrado una reducción del cáncer en el 24% de pacientes incluidos en el estudio y con un efecto que puede durar entre 1,5 a 8,5 meses. Además, se produjo un 38% de respuestas en pacientes con melanoma metastásico (Hamid y cols., 2013).

#### **6.1.4.2. Nivolumab (Opdivo®)**

También fue aprobado en 2014, por la FDA para la misma indicación que Pembrolizumab, basado en resultados similares (Topalian y cols., 2012). Actualmente, se está evaluando su efecto.

#### **6.1.4.3. Lambrolizumab**

Dentro de este grupo de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 se encuentran también Lambrolizumab. Anteriormente conocido como MK-3475, Lambrolizumab es un anticuerpo

que se dirige a PD-1; en un ensayo clínico de fase I se ha indicado que podría ser una terapia altamente eficaz para el melanoma avanzado.

Lambrolizumab ha demostrado tasas de respuesta del 38%, con una duración media de 11 meses (Hamid y cols., 2013), en pacientes con melanomas avanzados, como primera línea de tratamiento o después del uso de Ipilimumab (Wolchok y cols., 2013).

#### **6.1.4.4. Avances de los anti-PD-1**

Por el momento se están realizando estudios en fase III en cáncer de pulmón, así como carcinoma renal, cáncer de mama triple negativo, Hodgkin refractario y otros tumores sólidos y hematológicos con resultados prometedores.

El cáncer de mama triple negativo es difícil de tratar y sólo se dispone de la quimioterapia convencional (muy tóxica), ya que tiene pocas opciones de tratamiento adyuvante. Se presentó un estudio en diciembre de 2014 en fase Ib sobre el uso de Pembrolizumab en pacientes con cáncer de mama triple negativo. Se evaluaron 27 pacientes con cáncer de mama triple negativo avanzado y con receptor PD-L1 positivo. Si bien fue una muestra poco numerosa, los resultados comunicados son esperanzadores: una paciente logró una respuesta completa con el tratamiento, cuatro tuvieron respuesta parcial y en siete la enfermedad se mantuvo estable. La obtención de respuesta antitumoral en el 18% de las pacientes es un resultado muy alentador, teniendo en cuenta que el cáncer de mama no se ha considerado hasta el momento una neoplasia potencialmente tratable con inmunoterapia ya que el infiltrado inmune es mucho menor que en otros tipos de cáncer como el melanoma y el cáncer de pulmón. Se ha visto que la expresión de PD-L1 es significativamente mayor en el cáncer de mama triple negativo comparado con los otros tipos; además, los tumores de mama que expresan PD-L1, que son aproximadamente el 20%, tienen mayor infiltración de CD8<sup>+</sup>, lo que convierte a este tipo de tumores en blanco terapéutico para fármacos que activen la respuesta inmune de la paciente como es el caso de Pembrolizumab (Mittendorf y cols., 2014). Se espera que este fármaco sea el futuro tratamiento para este tipo de cáncer de mama y posiblemente para el de piel.

Dada la mayor selectividad del eje PD-1/PD-L1, es previsible que su bloqueo induzca una mayor actividad antitumoral con menos efectos adversos que el bloqueo de CTLA-4 (Pardoll, 2012). Aun así, los efectos secundarios de estos medicamentos pueden incluir cansancio, tos, náusea, comezón, sarpullido en la piel, disminución del apetito, estreñimiento, dolores en las articulaciones y diarrea.



Otros efectos secundarios más graves pueden ocurrir con menos frecuencia. Como estos medicamentos funcionan eliminando el freno del sistema inmunológico del organismo, algunas veces el sistema inmunológico comienza a atacar otras partes del cuerpo, lo que puede causar problemas graves e incluso fatales en los pulmones, los intestinos, el hígado, las glándulas productoras de hormonas, los riñones y otros órganos.

Si se presentan efectos secundarios graves, puede que sea necesario suspender el tratamiento y que el paciente reciba altas dosis de corticosteroides para suprimir su sistema inmunológico.

Otra vía de progreso en este campo es la combinación de varios de estos anticuerpos con el fin de potenciar su eficacia. Se ha ensayado el bloqueo de moléculas inhibitoras de los linfocitos T con el uso combinado de anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1 en pacientes con melanoma avanzado o metastásico, lográndose respuestas exitosas (Raval y cols., 2014).

Nivolumab (anti-PD-1) se ha combinado con Ipilimumab (anti-CTLA-4) en melanoma en varios estudios con buenos resultados en comparación con la monoterapia (Wolchok y cols., 2013), aunque con un incremento de la toxicidad (Postow y cols., 2015).

## **6.2. Citoquinas**

Las citoquinas son proteínas importantes en la función reguladora de las células del sistema inmune. El número de citoquinas identificadas sigue aumentando, pero las únicas que han demostrado eficacia terapéutica en el tratamiento del melanoma han sido el interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) y la interleuquina 2 (IL-2) (Torrella y Noris-García, 2004).

El interferón-alfa2b (IFN- $\alpha$ 2b) y la IL-2 han sido aprobados en los Estados Unidos para el tratamiento adyuvante y el tratamiento del melanoma metastásico, respectivamente, dado que producen un bajo pero reproducible beneficio clínico. Sin embargo, las citoquinas se deben administrar sistémicamente en grandes cantidades para que puedan alcanzar las concentraciones adecuadas que les permitan llevar a cabo su acción efectora. Estas dosis tan elevadas producen efectos tóxicos y marcan los límites de su utilización terapéutica (Torrella y Noris-García, 2004). Los principales efectos secundarios de la terapia con IFN e IL-2 son mielosupresión, náuseas, vómitos, anorexia, retención de líquidos e hipotensión (Torrella y Noris-García, 2004).

En la actualidad, se utilizan citoquinas recombinantes ya que así se obtienen las grandes cantidades que requieren estos tratamientos. Esto ha facilitado en gran medida su utilización

terapéutica por dos motivos principales: su disponibilidad en forma pura, y la posibilidad de fabricarlas en cantidades ilimitadas (Torrella y Noris-García, 2004).

### **6.2.1. Interleuquina 2**

La IL-2 es una glicoproteína, sintetizada y secretada principalmente por linfocitos T cooperadores (Th), como efecto de la activación mediada por mitógenos, o bien por la interacción del complejo TCR/CD3 con el complejo MHC en la superficie de las células presentadoras de antígeno. La respuesta de los linfocitos T a la activación es la inducción de la producción de IL-2 y la expresión de su receptor en la membrana, teniendo como consecuencia la expansión clonal de los linfocitos T específicos para el antígeno.

La IL-2 puede actuar estimulando la activación de otras células del sistema inmunológico, como los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, las células NK y los llamados linfocitos activados por citoquinas (LAK). Otros subtipos celulares influenciados por la IL-2 son los neutrófilos, los linfocitos T gamma-delta, y los monocitos. La IL-2 es la única citoquina aprobada para el tratamiento del melanoma estadio IV. Es esencial en el tratamiento del melanoma maligno metastásico (Eggermont y Schadendorf, 2009), para el que fue aprobada en enero de 1998 gracias a los resultados favorables en estudios en fase II, ya que produce respuestas completas y sostenidas en una pequeña proporción de los pacientes (Minor y cols., 2009).

La terapia con IL-2 a altas dosis ha logrado entre 15-20% de respuesta en melanoma metastásico y es capaz de producir una remisión completa y de larga duración en el 6% de los pacientes tratados, con una duración media de respuesta de nueve meses (Torrella y Noris-García, 2004). Su uso está limitado por una toxicidad importante, la mayoría de las veces simulando un choque séptico, por lo que se recomienda que se administre con el apoyo de médicos intensivistas (Eggermont y Schadendorf, 2009; Minor y cols., 2009).

El análogo recombinante humano de la IL-2 (rhIL-2), conocido como Aldesleukin (Proleukin®), ha demostrado efectos prometedores como fármaco antineoplásico por su capacidad para inducir la activación y la proliferación de las poblaciones celulares LAK y TIL.

Aunque su utilización ha resultado ser una de las estrategias más efectivas en el tratamiento del melanoma avanzado, no resulta apropiada para todos los pacientes sino que sólo se trata a pacientes mayores de edad con un buen estado general (López y cols., 2004).

### **6.2.2. Interferón $\alpha$**

Fue la primera citoquina recombinante disponible para tratar el melanoma metastásico y actualmente ha sido aprobado únicamente para el tratamiento adyuvante del melanoma en estadio III (Kim y cols., 2002). Fue aprobada en 1996 y en su forma pegilada en 2011. Tiene un efecto antiproliferativo, inmunomodulador e inhibidor de la angiogénesis. Esto se debe a que en los ensayos aleatorizados en los que se añadió IFN- $\alpha$  a la quimioterapia convencional no se pudo demostrar una mejora frente al tratamiento solo con quimioterapia; por eso no ha sido aprobado para su aplicación en el melanoma en etapa IV (Eggermont y Schadendorf, 2009).

En 2008, se informó que la terapia adyuvante de más de 5 años con IFN- $\alpha$ 2b pegilado tiene un efecto significativo y sostenido en la supervivencia libre de recaída en la etapa III (Eggermont y Schadendorf, 2009). En los ensayos clínicos en fase I y II, el tratamiento del melanoma metastásico con dosis altas de IFN- $\alpha$ 2b ha producido un 6% de respuestas completas y un 10% de respuestas parciales. La duración de las respuestas parciales fue de cuatro meses aproximadamente, mientras que algunas respuestas completas se han mantenido durante cinco años (Torrella y Noris-García, 2004).

En la actualidad se ha visto que produce un 15% de respuestas con una tasa menor al 5% de respuestas completas como monoterapia; se ha visto igualmente que confiere una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad, pero no en la mortalidad. Además, su uso está limitado a pacientes con tumores pequeños y la duración de la respuesta es, en promedio, de cuatro meses, por lo que se están desarrollando estudios en busca de mejores formas de administración y combinación con otros fármacos (Davar y cols., 2012).

### **6.2.3. Las nuevas citoquinas**

IL-15 e IL-21 son las dos citoquinas recientemente introducidas en los estudios clínicos de tratamiento para melanoma en estadios avanzados. Tienen similitud de secuencia con la IL-2 (Eggermont y Schadendorf, 2009).

La IL-15 estimula la proliferación de IL-2, dependiente de líneas de las células T, en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-IL-2. También interviene en actividades similares a la IL-2 (Eggermont y Schadendorf, 2009).

La IL-21 se produce por la activación de las células T CD4 y las células NK. La activación del receptor de la IL-21 lleva a múltiples efectos en las células T, incluidos la proliferación, diferenciación y activación de la producción de citoquinas y quimioquinas. La IL-21 tiene

efectos tanto en las células T CD8 como en las CD4, y sinergiza con la IL-15 en la inducción óptima y sostenida en la respuesta de las células T CD8 antígeno específicas. En contraste con la IL-2, la IL-21 no mejora la proliferación de las células T. La IL-21, por lo tanto, puede promover la autoinmunidad y la inmunidad antitumoral en pacientes con cáncer. La IL-21 está siendo investigada como monofármaco en pacientes con melanoma metastásico (Eggermont y Schadendorf, 2009).

### **6.3. Vacunas de células dendríticas**

Las células dendríticas (DC) fueron descubiertas por Steiman y Cohn en 1973 y deben su nombre a que pueden asumir una variedad de formas ramificadas y constantemente se extienden y retraen. Las células dendríticas se encargan de procesar material antigénico, en este caso células cancerosas, y exponerlo en su membrana plasmática a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para presentarlo a los linfocitos T colaboradores y citotóxicos, los cuales coordinan la respuesta inmune celular contra las células que presenten dicho antígeno.

En el estadio inmaduro, las DC destacan por su alta capacidad para la captura de antígenos, a través de endocitosis o fagocitosis y su procesamiento usando las vías endógenas o exógenas del MHC I o II, respectivamente, que seguirá con la presentación antígeno-específica a los linfocitos T, evento que las DC realizan paralelamente mientras llegan a su estadio maduro.

Las DC también producen varias citoquinas y quimioquinas, tales como IL-12, IFN- $\gamma$ , CCL5 y CCL21, que tienen una variedad de funciones inmunorreguladoras, donde destaca la estimulación de los linfocitos T. Además, las DC son importantes en la regulación de la inmunidad innata y en el mantenimiento de la tolerancia central a linfocitos T (Guindi y cols., 2012).

#### **6.3.1. Células dendríticas contra el cáncer**

Un mecanismo potencial del que escapan los tumores es la presentación de antígenos tumorales por las DC. Estudios *in vitro* demostraron que el sobrenadante de cultivo de líneas celulares cancerígenas contenía VEGF (factor de crecimiento endotelio vascular) que inhibía la maduración de las DC y que más bien incrementaba la proliferación de sus precursores CD34+ (Gabrilovich, 2004). También, otros estudios *in vitro* utilizando el sobrenadante de cultivo de líneas celulares cancerígenas y enfrentado a DC aisladas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), demostraron deficiencias en la maduración, pobre capacidad coestimuladora y de producción de IL-12, llevando a las DC a la muerte por apoptosis. Por esto

resulta interesante la estrategia de la generación de una vacuna de DC producida *in vitro* y reinoculada al mismo sujeto para evitar los mecanismos de escape inmune que muestran los tumores y que evaden la inmunovigilancia.

Se han generado varias vacunas celulares, principalmente en modelos murinos y algunas en humanos, cuya finalidad es introducir antígenos tumorales *ex-vivo* a las DC, obtenidas principalmente a partir de sangre periférica o médula ósea. Posteriormente, la estrategia ha sido inocular con la vacuna celular al mismo sujeto del cual se obtuvieron las DC, esperando que se pueda estimular a los linfocitos T y otras células inmunocompetentes antitumorales (Takahashi y cols., 2013).

Existen variantes de las vacunas de DC, como por ejemplo, la presentación cruzada (MHC-I y II) de DC cargadas con antígenos provenientes del lisado tumoral y del ARN mensajero del tumor, la cotransducción de estas DC con genes de antígenos tumorales o citoquinas como la IL-12 o ARN mensajero derivado del tumor completo, la generación de hibridomas por fusión de células leucémicas y DC y la pulsación o carga de las DC con péptidos antigénicos o lisados del tumor maligno, o tejidos premalignos, células apoptóticas y necróticas o antígenos revestidos con anticuerpos para que las DC puedan reconocerlas vía sus receptores Fc.

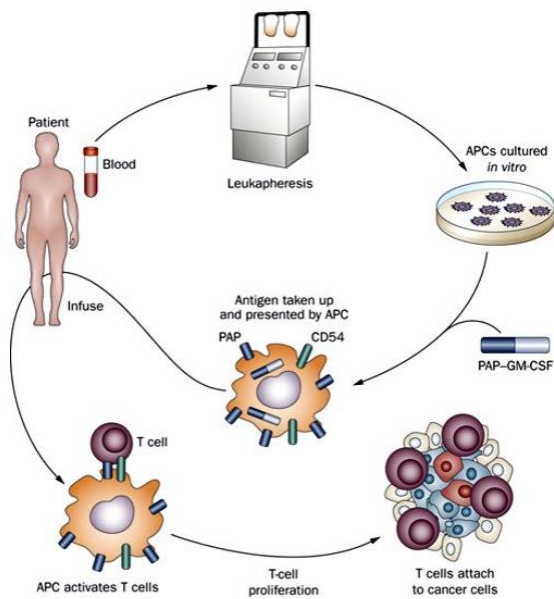
Otras inmunoterapias combinadas utilizan vacunas de DC y anticuerpos contra moléculas agonistas como 4-1BB, importante para la activación de linfocitos T; sin embargo, se debe tener cuidado con las dosis del anticuerpo, porque pueden ser inmunosupresoras. También se ha ensayado el bloqueo de moléculas inhibitoras de los linfocitos T con el uso combinado de anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-1 en pacientes con melanoma avanzado o metastásico, lográndose respuestas exitosas (Raval y cols., 2014).

Hay muchas vacunas celulares con DC en estudio y se han diseñado varios ensayos clínicos para evaluar la seguridad y eficacia de estas (Smith y Cerundolo, 2001); sin embargo, la respuesta obtenida hasta el momento no ha sido muy satisfactoria. La única vacuna celular autóloga (Sipuleucel-T) que ha sido aprobada por la FDA muestra una supervivencia de 4,3 meses. Esta vacuna es elaborada a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con cáncer de próstata.

### **Sipuleucal-T**

Para preparar una solución de células dendríticas activadas contra células cancerosas se lleva a cabo, en primer lugar, la recogida de células dendríticas del paciente (Figura 10). A continuación, se les incorpora a un medio con el lisado de una célula tumoral del mismo

paciente, el cual contiene péptidos tumorales específicos para dicho tumor. Igualmente, se añaden adyuvantes, es decir, una serie de sustancias que incrementan la respuesta antitumoral del sistema inmune. Su maduración *in vitro* se induce utilizando factores como GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-6, y prostaglandina E2 e IL-1. Finalmente, se le inyectan al paciente sus propias células dendríticas, las cuales están activadas de manera específica, preparadas para comenzar la respuesta inmune a través de los linfocitos T (Di Lorenzo y cols., 2011).



**Figura 10. Proceso de generación y acción de Sipuleucel-T.** A partir de una muestra de sangre del paciente, se produce la separación celular de las células dendríticas mediante las diferencias de densidad. Posteriormente, se cultivan las células dendríticas *in vitro* y se les inocula GM-CSF y PAP (enzima presente en altos niveles en las células prostáticas cancerosas). En la inducción, estas células adoptan el antígeno PAP, incrementando a su vez la expresión de la glucoproteína integral de membrana CD54, encargada de mediar la presentación y activación de los linfocitos T. Finalmente, se le inyecta esta solución de células dendríticas al paciente, las cuales activan a los linfocitos T para atacar a las células del tumor prostático con el antígeno PAP (Di Lorenzo y cols., 2011).

En este caso, se debe tener en cuenta que no sólo están incluidas las DC sino que también se encuentran linfocitos B (LB), linfocitos T (CD4 y CD8) y células NK, por lo que se podría generar una respuesta antitumoral policlonal. Esta misma vacuna celular, en combinación con fármacos anticancerígenos como abiraterona y/o prednisona, se encuentra en estudios de fase II, pero sin cambios significativos respecto al uso individual de la vacuna celular (Singh y Gulley, 2014).

A pesar de estas estrategias, la efectividad terapéutica de las vacunas de DC no ha sido satisfactoria, probablemente porque muchas de las condiciones fisiológicas a las que están sometidas no son reproducidas *in vitro*. Por ejemplo, es importante el estado de madurez de las DC, ya que en el estadio inmaduro tienen una alta capacidad de captura y procesamiento de antígenos, mientras que una vez maduras cambian esta capacidad por otra caracterizada por un alto grado de activación orientada a la presentación de antígenos a los linfocitos T. Cuando se diseña una vacuna de DC se debe conocer en profundidad su inmunobiología para imitar artificialmente el proceso fisiológico natural de estas células porque, paradójicamente, su uso en el tratamiento del cáncer también podría ser responsable de la inducción de enfermedades autoinmunes y mediadas por patógenos, reacciones alérgicas, rechazo de

injertos y fallos del sistema inmune. Por este motivo, algunos protocolos intentan utilizar DC maduras “jóvenes” generadas en 3 días de cultivo. Esto permitiría mejorar la primera señal de presentación de antígeno, la segunda señal coestimuladora y la tercera señal de producción de citoquinas inductoras de una respuesta antitumoral Th1/Tc1.

La clonación de antígenos asociados a melanoma o antígenos de línea germinal cancerígena de melanoma (por ej. MAGE-1 o -3) ha permitido la elaboración de vacunas peptídicas o proteicas, y muchas han sido evaluados en estudios clínicos de fase II.

Las vacunas peptídicas asociadas con adyuvante incompleto de Freund han sido poco inmunogénicas y no produjeron una respuesta inmune robusta (Smith y Cerundolo, 2001), aunque se han evaluado como tratamiento de primera línea para 68 pacientes con melanoma irresecable estadio III o melanoma en estadio IV. Como resultado, se observó que la combinación con adyuvantes producía mayores títulos de anticuerpos anti-MAGE-3, una inducción de células T más fuerte y algunas respuestas clínicas de larga duración (Eggermont y Schadendorf, 2009).

En noviembre de 2000, la primera vacuna terapéutica contra el melanoma, **Melacine**, fue lanzada para su uso comercial. Esta vacuna consiste en dos líneas celulares lisadas de melanoma, en combinación con un adyuvante y la pared celular de micobacterias. Los ensayos realizados con Melacine no mostraron ningún beneficio para la población total del estudio, pero se observó actividad exitosa en determinados pacientes (Eggermont y Schadendorf, 2009).

La vacuna alogénica **Canvaxin**, desarrollada a partir de tres líneas celulares, ha sido evaluada en grandes ensayos clínicos de fase III. En dichos estudios resultó que hubo una disminución de la supervivencia en pacientes que recibieron Canvaxin. La supervivencia a cinco años fue de 59% para los que recibieron la vacuna y 68% para pacientes tratados con placebo. En el estudio de fase IV, la supervivencia media fue de 32 meses para los pacientes tratados con Canvaxin y de 39 meses para los pacientes que recibieron placebo, con las respectivas tasas de supervivencia a cinco años de 40% y 45% (Eggermont y Schadendorf, 2009).

En 16 pacientes con melanoma metastásico (Nestle y cols., 1998), se evaluaron vacunas de DC cargadas con HLA-A2/tirosinasa, gp100, péptidos de melan-A, péptidos MAGE-A1/MAGEA-3 asociados a HLA-A1 y lisados tumorales. Las DC se inyectaron mensualmente hasta un máximo de diez inyecciones. Se encontraron respuestas parciales en 5 de 16 pacientes y respuestas

completas solo en dos pacientes; sin embargo, once pacientes desarrollaron hipersensibilidad de tipo retardado.

En estudios aleatorios de fase III, comparados con quimioterapia, las vacunas celulares **Allovectin-7, Canvaxin y Melacine** fallaron en mejorar la respuesta inmune y la supervivencia de los pacientes (Kirkwood y cols., 2008). Hasta el momento, no se han conseguido avances significativos en vacunas con células dendríticas.

### 6.3.2. Estado actual

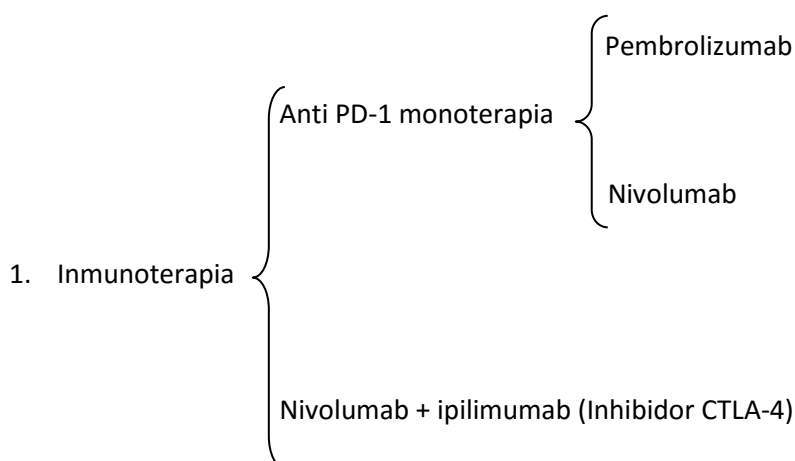
A pesar de que los avances en el estudio de los melanomas han permitido encontrar dianas terapéuticas potenciales para el uso de las vacunas celulares, aun no se ha encontrado ninguna realmente eficaz para tratar el cáncer.

Sobre el melanoma se han desarrollado aproximadamente 40 ensayos clínicos controlados de vacunas de células dendríticas en pacientes con melanoma metastásico. Sin embargo, la mayor dificultad que surge al analizar estos estudios es que no son comparables, ya que los antígenos utilizados y la técnica de cultivo de las células no son los mismos en todos los estudios (Eggermont y Schadendorf, 2009). Además, aun cuando se logre la activación de las células T con células dendríticas maduras y antígenos tumorales específicos, la respuesta suele ser transitoria y rara vez produce regresión de las metástasis tumorales o estabilización del tumor (Mocellin, 2012).

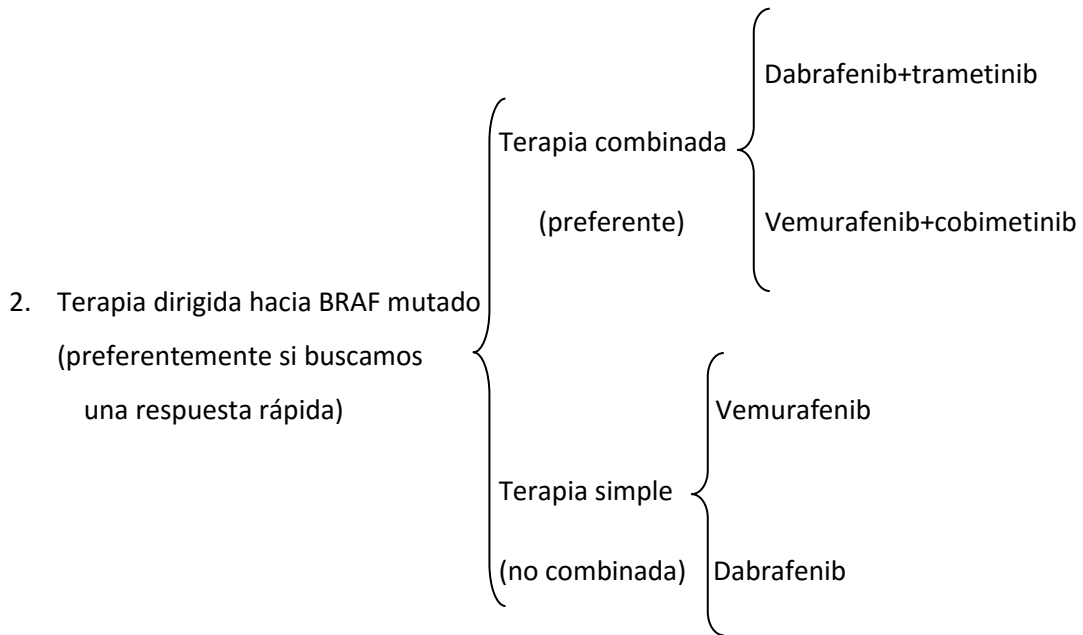
### 6.4. Tratamientos de uso actual

El tratamiento actual que siguen la mayoría de profesionales sanitarios para tratar el melanoma es el determinado por el NCCN (National Comprehensive Cancer Network).

Tratamientos de primera línea:







Otras terapias de segunda línea:

3. Altas dosis de IL-2.
4. Bioquimioterapia.
5. Agentes citotóxicos.
6. Imatinib (en tumores con mutación en C-KIT)

## 7. CONCLUSIONES

El desarrollo de anticuerpos contra diferentes blancos tumorales, junto a los nuevos inhibidores farmacológicos de los receptores con actividad quinasa, ha abierto la esperanza de poder contemplar el cáncer como una patología crónica manejable y no como una enfermedad mortal. Debido a ello, las respuestas clínicas beneficiosas y los períodos libres de enfermedad han aumentado enormemente. Sin embargo, la terapia con anticuerpos dirigidos contra tumores sólidos presenta serias limitaciones. Por ejemplo, los beneficios de esta terapia no se han traducido en un incremento significativo del tiempo de supervivencia total de los pacientes, algunos de los aumentos en los períodos libres de enfermedad se cuentan en semanas o en pocos meses y existe una proporción importante de pacientes que desarrolla resistencia a los tratamientos o no responden en absoluto.

Altas dosis de IL-2 y de IFN- $\alpha$  producen un bajo pero reproducible beneficio clínico, aunque al administrarse en altas dosis producen, con frecuencia, efectos tóxicos.

La IL-2 es la única citoquina aprobada para el tratamiento del melanoma metastásico, debido a que produce respuestas completas y sostenidas en una pequeña proporción de los pacientes.

El IFN- $\alpha$  se ha aprobado únicamente para el tratamiento adyuvante del melanoma en estadio III.

En general, el uso de las citoquinas está limitado y tiene graves efectos adversos. Actualmente se están estudiando la IL-15 y la IL-21, dos citoquinas que se espera que sean una de las futuras terapias contra el cáncer.

Por otra parte, la efectividad terapéutica de las vacunas de células dendríticas no ha sido satisfactoria y aún no se han conseguido avances significativos. Además, conlleva la desventaja de que cuando se diseña una vacuna de DC se debe tener cuidado al imitar correctamente el proceso fisiológico natural de estas células, ya que de lo contrario su uso podría inducir enfermedades autoinmunes y mediadas por patógenos, reacciones alérgicas, rechazo de injertos y fallos del sistema inmune.

Probablemente la terapia con anticuerpos monoclonales es lo más cercano a la tan anhelada terapia individualizada, la *magic bullet* vislumbrada por Paul Ehrlich a principios del siglo XX. La biología molecular, en un futuro, permitirá la caracterización del perfil molecular de los tumores para poder predecir la respuesta y diseñar un tratamiento específico a la medida. Un mejor entendimiento de la respuesta inmune en el cáncer y de la relación entre un tumor y el sistema inmunológico del paciente llevará a encontrar tratamientos que utilicen los sistemas naturales de defensa del organismo para luchar contra las células malignas y eliminar el cáncer mediante nuestro sistema inmunológico.

Por otro lado, el alto costo que tienen los medicamentos utilizados en terapia dirigida, en comparación con los medicamentos usados en la quimioterapia convencional, impone un reto adicional. Por ejemplo, un año de tratamiento con anticuerpos monoclonales puede costar desde 100.000 a 400.000 euros al año por paciente (Goldenberg , 2012). A pesar de estas importantes limitaciones, el uso de estos nuevos medicamentos está aumentando. Las nuevas estrategias deben enfocarse entonces no solo en aumentar la efectividad de los anticuerpos y en la identificación de nuevos blancos terapéuticos, sino también en el abaratamiento de los costos de producción y distribución.

De las inmunoterapias, en realidad, solo contamos con las primeras evidencias favorables y se desconoce todavía qué impacto tendrán a largo plazo. Sin embargo, los primeros resultados son muy esperanzadores.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Ayala-Cortés AS, Garza-Rodríguez V, Ocampo-Candiani J. Current treatments for advanced stage melanoma. *Gac Med Mex.* 2014; 150(2): 145-55.

Barrio MM. Melanoma e inmunidad. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2009; 43(3): 351-355.

Bashey A, Medina B, Corringham S, Pasek M, Carrier E, Vrooman L, et al. CTLA4 blockade with ipilimumab to treat relapse of malignancy after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2009; 113(7): 1581-8.

Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2006; 24(29): 4738-45.

Breslow A. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Ann Surg.* 1970; 172(5): 902-8.

Chapman P, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26): 2507-16.

Davar D, Tarhini A, Kirkwood J. Adjuvant therapy for Melanoma. *Cancer J.* 2012; 18(2): 192-202.

Di Lorenzo G, Buonerba C, Kantoff PW. Immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011; 8(9): 551-61.

Eggermont AM, Schadendorf D. "Melanoma and immunotherapy". *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(3): 547-64.

Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral t-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008; 224: 166-82.

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192(7): 1027-34.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin.* 1985; 35(3): 130-51.

Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(12): 941-52.

Goldenberg MM. Pharmaceutical approval update. *PT.* 2012; 37(9): 499-502.

Graziani G, Tentori L, Navarra P. Ipilimumab: A novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res.* 2012; 65(1): 9-22.

Guindi C, Ménard M, Cloutier A, Gaudreau S, Besin G, Larivée P, et al. Differential role of NF- $\kappa$ B, ERK1/2 and AP-1 in modulating the immunoregulatory functions of bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *Cell Immunol.* 2012; 272(2): 259-68.

Haass N, Smalley K, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005; 18(3): 150-9.

Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013; 369(2): 134-44.

Hersh E, O'Day S, Powderly J, Khan KD, Pavlick AC, Cranmer LD, et al. A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *Invest New Drugs.* 2011; 29(3): 489-98.

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363(8): 711-23.

Kaehler KC, Piel S, Livingstone E, Schilling B, Hauschild A, Schadendorf D. Update on immunologic therapy with anti-CTLA-4 antibodies in melanoma: Identification of clinical and biological response patterns, immune-related adverse events, and their management. *Semin Oncol.* 2010; 37(5): 485-98.

Keler T, Halk E, Vitale L, O'Neill T, Blanset D, Lee S, et al. Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. *J Immunol.* 2003; 171(11): 6251-9.

Kim CJ, Dessureault S, Gabrielovich D, Reintgen DS, Slingluff CL. "Immunotherapy for Melanoma". *Cancer Control* 2002; 9(1): 22-30.

Kim KB, Sosman JA, Fruehauf JP, Linette GP, Markovic SN, McDermott DF, et al. BEAM: a randomized phase II study evaluating the activity of bevacizumab in combination with carboplatin plus paclitaxel in patients with previously untreated advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30(1): 34-41.

Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, et al. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26(20): 3445-55.

Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007; 450(7171): 903-7.

Kono K. Current status of cancer immunotherapy. *J Stem Cells Regen Med*. 2014; 10(1): 8-13.

Lee B, Mukhi N, Liu D. Current Management and novel agents for malignant melanoma. *J Hematol Oncol*. 2012; 5: 3.

López M, Escobar A, Alfaro J, Fodor M, Larrondo M, Ferrada C, et al. Avances en inmunoterapia celular contra el melanoma maligno. *Rev Med Chil*. 2004; 132(9): 1115-26.

Lutzky J. New therapeutic options in the medical management of advanced melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2010; 29(4): 249-57.

Mansh M. "Ipilimumab and Cancer Immunotherapy: a new Hope for Advanced Stage Melanoma". *Yale J Biol Med*. 2011; 84(4): 381-9.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(10): 762-74.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Mechanisms of Disease Melanoma. *N Engl J Med*. 2006; 355(1): 51-65.

Millward M, Underhill C, Lobb S, McBurnie J, Meech SJ, Gomez-Navarro J, et al. Phase I study of tremelimumab (CP-675 206) plus PF-3512676 (CPG 7909) in patients with melanoma or advanced solid tumours. *Br J Cancer*. 2013; 108(10): 1998-2004.

Minor DR, Moore AD, Kim AC, Kashani-Sabet AM, Venna BS, Wang W, et al. Prognostic factors in metastatic melanoma patients treated with biochemotherapy and maintenance immunotherapy. *Oncologist*. 2009; 14(10): 995-1002.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2(4): 361-70.

Mocellin S. Peptides in melanoma therapy. *Curr Pharm Des*. 2012; 18(6): 820-31.

Moosmann N, Heinemann V. Cetuximab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2007; 7(2): 243-56.

Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 1998; 4(3): 328-32.

Nieweg OE, Gallegos-Hernández JF. Cutaneous malignant melanoma and the new drugs. *Cir Cir*. 2015; 83(2): 175-80.

Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006; 118(2): 240-9.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(4): 252-64.

Pierard GE, Aubin F, Humbert P. Ipilimumab, a promising immunotherapy with increased overall survival in metastatic melanoma? *Dermatol Res Pract*. Vol 2012; Article ID 182157.

Poole RM. Pembrolizumab: first global approval. *Drugs*. 2014; 74(16): 1973-81.

Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015; 372(21): 2006-17.

Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, Drake CG, Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer*. 2014; 2:14.

Ribas A. Overcoming immunologic tolerance to melanoma: Targeting CTLA-4 with tremelimumab (cp-675,206). *Oncologist*. 2008; 13(4): 10-5.

Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, Pavlov D, Bulanhagui CA, Millham R, et al. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol*. 2005; 23(35): 8968-77.

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011; 364(26): 2517-26.

Singh BH, Gulley JL. Therapeutic vaccines as a promising treatment modality against prostate cancer: rationale and recent advances. *Ther Adv Vaccines*. 2014; 2(5): 137-48.

Smith C, Cerundolo V. Immunotherapy of melanoma. *Immunology*. 2001; 104(1): 1-7.

Sosman J, Kim K, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012; 366(8): 707-14.

Takahashi H, Okamoto M, Shimodaira S, Tsujitani S, Nagaya M, Ishidao T, et al. Impact of dendritic cell vaccines pulsed with Wilms' tumour-1 peptide antigen on the survival of patients with advanced non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer*. 2013; 49(4): 852-9.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000; 192(2): 303-10.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas Jn. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24: 65-97.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366(26): 2443-54.

Torrella A, Noris-García E. Inmunoterapia en melanoma. *Oncología* 2004; 27(3): 102-7.

Wolchok J, Kluger H, Callahan M, Postow M, Rizvi N. Nivolumab plus Ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013; 369(2): 122-33.