

Monika Pilecka^{1,2}, Anna Brzozowska^{2,3},
Maria Mazurkiewicz^{2,3}

¹ Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej
Człowieka, Uniwersytet Medyczny
w Lublinie

² Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej im.
Św. Jana z Dukli w Lublinie
Katedra Onkologii Klinicznej, Uniwersytet
Medyczny w Lublinie

Address for correspondence/
Adres do korespondencji:
Monika Pilecka
I Oddział Radioterapii Onkologicznej
Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej
im. Św. Jana z Dukli
ul. K. Jaczewskiego 7, 20-090 Lublin
e-mail: monikapilecka88@gmail.com

Received: 06.05.2015

Accepted: 01.06.2015

Published: 26.06.2015

STATISTIC STATYSTYKA

Word count Liczba słów 2304/1965

Tables Tabele 0

Figures Ryciny 0

References Piśmiennictwo 30

Programmed death receptor PD-1 as a potential target in anticancer therapy

Receptor programowanej śmierci PD-1 jako potencjalny cel w terapii przeciwnowotworowej

Review article/Artykuł poglądowy

Summary

Nowadays, an improved understanding of the molecular mechanisms ruling the host immune response to tumors has led to the identification of checkpoint signaling pathways involved in limiting the anticancer immune response. One of the most significant checkpoint pathways responsible for mediating tumor-induced immune suppression is the programmed death-1 (PD-1) pathway, which is normally involved in promoting tolerance and preventing tissue damage during chronic inflammation. The programmed death-1 receptor is upregulated in activated T lymphocytes and inhibits T-cell function upon binding to its ligands B7-H1 (PD-L1) and B7-DC (PD-L2). Many solid tumors express PD ligand 1 (PD-L1) and this is often associated with a worse prognosis. Tumor-infiltrating lymphocytes from patients with cancer typically express PD-1 and have impaired antitumor functionality. Proof-of-concept has come from several preclinical studies in which blockade of PD-1 or PD-L1 enhanced T-cell function and tumor cell lysis. Three monoclonal antibodies against PD-1, and one against PD-L1, have reported phase 1 data. All four agents have shown encouraging preliminary activity, and those that have been evaluated in larger patient populations appear to have encouraging safety profiles. If subsequent investigations confirm the initial results, it is conceivable that agents blocking the PD-1/PD-L1 pathway will prove valuable additions to the growing armamentarium of immunotherapeutic agents.

Key-words: Programmed death receptor PD-1, anti-cancer therapy, melanoma

Streszczenie

Ciągle doskonalona o nowe doniesienia i przesłanki wiedza na temat molekularnych mechanizmów rządzących odpowiedzią immunologiczną ustroju na nowotwór prowadzi do identyfikacji „gorących punktów” (ang. *checkpoint*- punkt krytyczny) na ścieżkach sygnałowych zaangażowanych w ograniczanie immunologicznej odpowiedzi anty-nowotworowej ustroju. Jednym z rozpoznawanych jako najbardziej kluczowe punktem, odpowiedzialnym za pośredniczenie w powstawaniu indukowanej nowotworzeniem supresji układu immunologicznego, jest ścieżka receptora programowanej śmierci PD-1, która w warunkach prawidłowych odpowiada za tolerancję immunologiczną ustroju i zapobiega niszczeniu tkanek w warunkach przewlekłych zapaleń. Receptor programowanej śmierci PD-1 wykazuje nadmierną ekspresję w aktywowanych limfocytach T i hamuje funkcje tych limfocytów do momentu związania ze swoimi ligandami B7-H1 (PD-L1) i B7-DC (PD-L2). Wiele nowotworów litych wykazuje ekspresję ligandu PD-1 (PD-L1) co często koreluje z gorszym rokowaniem. Limfocyty naciekające guz wyizolowane od pacjentów z nowotworem, który typowo wykazuje ekspresję PD-1 posiadają upośledzone mechanizmy antynowotworowe. Dowody takie płyną z analizy kilku badań przedklinicznych, w których blokada PD-1 lub PD-L1 poprawiała funkcje limfocytów T i podnosiła skuteczność lizy komórek nowotworu. Aktualnie trzy przeciwciała monoklonalne przeciwko PD-1 oraz jedno przeciw PD-L1 przeszły fazę pierwszą badań. Wszystkie cztery czynniki wykazują wstępnie obiecujące właściwości, a ewaluacja na szerszej grupie badanych przynosi zachęcające informacje odnośnie bezpieczeństwa leków. Jeśli kolejne doniesienia potwierdzą wstępne rezultaty, czynniki blokujące szlak PD-1/PD-L1 staną się wartościową pozycją w arsenale leków immunoterapeutycznych w walce z nowotworami.

Słowa kluczowe: receptor programowanej śmierci PD-1, terapia przeciwnowotworowa, czerniak

INTRODUCTION

With the growing number of cases of malignant cancers the 21st century medicine is faced not only with the problem of fast and effective diagnostics, but also primary prophylaxis, selecting high-risk groups and search for modern solutions for radical and palliative treatment. The modern molecular genetics analyses different pathogenetic courses, of which of importance for cancerogenesis seem to be: the inflammatory cytokines, infections, mutations and breaking off the immune's system supervision. The pre-cancerous condition examples are, among others: Barrett's esophagus, polyps of the large intestine, family polyp syndromes, primary sclerosing cholangitis, Crohn's disease, ulcerative colitis, chronic pancreatic. In cases of the above listed diseases the modern prophylaxis would be to identify the molecular factor/s for progression of pre-cancerous conditions to the invasive cancer stage, choosing the clinically applicable marker and introducing effective immunotherapy even before the diagnosis reading "*carcinoma in situ*". The currently used predictive methods (markers, antigens) are still not efficient enough for estimation of direction and dynamics of development of these changes[1].

The still perfected knowledge of molecular mechanisms behind organism's response to cancer leads us to identification of signal "hot spots" on the paths of engagement in the proper anti-cancerous immunological response. It turns out that the control of the developing immunological response is the crucial aspect of regulation of mechanisms of immunological system. This highly sensitive and multistage selection allows to destroy alien antigens and tolerate own antigens at the same time. There is the central tolerance, that allows to eliminate auto-reactive cells as early as in the growth stage and the peripheral tolerance that includes cells that became auto-reactive in later stages of development. In a situation in which the tolerance mechanisms are not tight or working in an inappropriate way, autoimmune disorders develop[2,3,4]. It was proven, that some of the autoimmune disorders predestine for development of cancers.

It was also proven, that apart from disturbances of immune tolerance the development of the cancerous process is also boosted if the pathologically changed cells adopt features, that allow them to modulate the immune response. Those cells can change their phenotype (*dysplasia*), generate antigens (cancer markers) and modulate the signals of their micro-environment in order to quit from immune system supervision.

It turns out, that the basis for both the disturbances of tolerance and modulation of immune response that lead to the preservation of pathologically changed/cancerous cells is formed by the disturbances of the PD-1 programmed cell-death-1 receptor and its ligands: PD-L1 (B7-H1) and PD-L2 (B7-DC).

WSTĘP

Wraz z rosnącą liczbą zachorowań na nowotworowy złośliwy medycyna XXI wieku staje nie tylko przed problemem szybkiej i skutecznej diagnostyki ale również profilaktyki pierwotnej, wyłaniania grup o wysokim stopniu narażenia oraz poszukiwania nowoczesnych rozwiązań w leczeniu radykalnym i paliatywnym. Nowoczesna genetyka molekularna w walce z nowotworami analizuje różnorodne szlaki patogenetyczne, z których istotne znaczenie w onkogenezie okazują się mieć: cytokiny zapalne, infekcje, mutacje oraz wyłamywanie się spod nadzoru immunologicznego. Przykładami stanów przednowotworowych są min.: metaplasja Barretta, polipy jelita grubego, zespoły polipowatości rodzinnej, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych, choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, przewlekłe zapalenie trzustki. W wyżej wymienionych przypadkach nowoczesnym wymiarem profilaktyki byłaby identyfikacja molekularnego czynnika/-ów progresji stanów przedrakowych do nowotworu inwazyjnego, wyłonienie markera klinicznie użytecznego i wdrożenie skutecznej immunoterapii jeszcze przed diagnozą „*carcinoma in situ*”. Bowiem stosowane obecnie metody predykcji (markery, antygeny) nie są wystarczająco skuteczne dla określenia kierunku i dynamiki rozwoju takich zmian [1].

Ciągle doskonalona wiedza na temat molekularnych mechanizmów rządzących odpowiedzią organizmu na nowotwór prowadzi do identyfikacji „gorących punktów” sygnałowych na ścieżkach zaangażowanych w funkcjonowanie prawidłowej antynowotworowej odpowiedzi immunologicznej. Okazuje się, że kontrola rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej jest niezwykle istotnym aspektem regulacji mechanizmów układu odpornościowego. Ta wysoce czuła i wielostopniowa selekcja umożliwia niszczenie obcych antygenów i jednocześnie tolerancję na antygeny własne. Wyróżnia się tolerancję centralną, dzięki której już w fazie dojrzewania eliminowane są komórki autoreaktywne oraz tolerancję obwodową, której podlegają komórki, które nabyły autoreaktywność w późniejszych stadiach rozwoju. W sytuacjach gdy mechanizmy tolerancji pozostają nieszczelne lub działają nieprawidłowo dochodzi do rozwoju zaburzeń autoimmunologicznych [2,3,4]. Udowodniono, że niektóre z zaburzeń o podłożu autoimmunologicznym predysponują do rozwoju nowotworów.

Dowodzono również, że oprócz zaburzeń tolerancji immunologicznej do rozwoju procesu nowotworowego przyczynia się nabycie przez patologicznie zmienione komórki cech, które pozwalają im na modulację odpowiedzi immunologicznej. Komórki takie posiadają zdolność zmiany fenotypu (*dysplasia*), generowania antygenów (markery nowotworowe) oraz modulowania sygnałów swojego mikrośrodowiska celem ucieczki spod nadzoru immunologicznego. Okazuje się, że u podstaw, zarówno zaburzeń tolerancji jak i modulacji odpowiedzi immunologicznej prowadzących do utrzymywania się zmienionych patologicznie/nowotworowo komórek leżą zaburze-

The PD-1 (CD279) programmed death cell receptor, belonging to the CD28 family is the so called negative receptor localized on the surface of lymphocytes[5,6]. The negative receptors are activated in response to ligand during contact of the lymphocyte with the antigen presenting cell (APC) [7,8,9]. Their role is to generate a signal halting activation, proliferation and effective functions of lymphocytes, so as to prevent the lymphocyte from acquiring unwanted, auto-reactive or cancerous properties after its role in fighting antigen is finished. This receptor is responsible in preservation of tolerance, prevents auto-immune diseases from developing and also controls the damage of healthy tissues during infections[10]. In case the antigen stimulation lasts longer (prolonged infections, chronic inflammations) the prolonged and high expression of PD-1 on lymphocytes occurs. Those lymphocytes are called "exhausted" and their cytotoxic functions are impaired[11]. High expression of ligand and/or stimulation of PD-1 receptor expression may halt the anti-cancerous response; additionally the high expression level of PD-1 promotes the preservations of foci of chronic infections in the organism and increases the tolerance of alien antigens that contribute to the development of cancerous process[4, 10, 12, 13, 14, 15]. The essential importance of the PD-1/PD-1L path is a result of its common expression in the body and large possibility of induction, which makes the PD-1 receptor stand out from other CD28 family particles, including also the immunosuppressive CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*). [10, 13]

The use of antibodies aimed at the components of the PD-1/PD-1L path has a promising example of translation of research of immune system to the needs of therapy. The current progress in immune-therapy of cancers with use anti-PD-1 and PD-1L particles antibodies allows us to believe, that their use will ever growing in the future.

CHARACTERISTICS OF PD-1 RECEPTOR AND ITS LIGANDS FUNCTIONS

The CD28 (B7) family of signal particles, to which the PD-1 (CD279) programmed death receptor belongs, plays a crucial role in proper activation of T-lymphocytes in the cellular reaction. The particles of this family provide a critical signal in both activation and halting of T-lymphocytes. Through activation of lymphocytes they contribute to growth of their population, differentiation and increase in cytokines production; by negative signal they "extinguish" the functions of lymphocytes [14,16].

The PD-1 receptor was first described in 1990s by Ishida et al.[17]. Ever since that time there is intensive molecular research on the PD-1 expression in various cancers. There are currently promising reports of effects of pre-clinical trials with monoclonal antibodies halting the PD-1/PD-1L expression [10,18,19,20,21,22,23].

nia szlaku sygnałowego receptora programowanej śmierci PD-1 (ang. *Programmed cell-death-1 receptor*) i jego ligandów: PD-L1 (B7-H1) i PD-L2 (B7-DC). Receptor programowanej śmierci PD-1 (CD279), należący do rodziny CD28 jest tzw. negatywnym receptorem zlokalizowanym na powierzchni limfocytów [5,6]. Negatywne receptory ulegają pobudzeniu w odpowiedzi na ligand podczas kontaktu limfocyta z komórką prezentującą antygen (ang. *antigen presenting cell- APC*) [7,8,9]. Ich zadaniem jest generowanie sygnału hamującego aktywację, proliferację i funkcje efektorowe limfocytów, tak aby w momencie zakończenia roli limfocyta w zwalczaniu antygeny nie nabrał on cech niepożądanych, autoaktywnych lub nowotworowych. Receptor ten odpowiada za zachowanie tolerancji, zapobiega rozwojowi chorób autoimmunologicznych, a także kontroluje uszkodzenia tkanek zdrowych podczas infekcji [10]. W przypadkach utrzymywania się stanu stymulacji antygenem (przewlekłe infekcje, przewlekłe zapalenia) dochodzi do przedłużającej się i wysokiej ekspresji PD-1 na limfocytach. Limfocyty takie określane są mianem „wyczerpanych” (ang. *exhausted*), a ich funkcje cytotoksyczne są upośledzone [11]. Wysoka ekspresja liganda i/lub pobudzenie ekspresji receptora PD-1 może hamować odpowiedź przeciwnowotworową; dodatkowo wysoki poziom ekspresji PD-1 promuje utrzymywanie się ognisk przewlekłego zapalenia w organizmie i tolerancji na obce antygeny przyczyniając się do rozwoju procesu nowotworowego [4, 10, 12, 13, 14, 15]. Bardzo istotne znaczenie szlaku PD-1/PD-1L wynika z faktu jego powszechnej ekspresji w organizmie i dużej możliwości indukcji co zdecydowanie wyróżnia receptor PD-1 na tle innych cząsteczek z rodziny CD28, w tym także innej immunosupresyjnej cząsteczki CTLA-4 (ang. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*). [10, 13]

Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko składowym szlaku PD-1/PD-1L jest obiecującym przykładem translacji badań nad układem immunologicznym do celów terapeutycznych. Dotychczas dokonany postęp w dziedzinie immunoterapii nowotworów z zastosowaniem przeciwciał przeciwko cząsteczkom PD-1 oraz PD-1L pozwala sądzić, że ich wykorzystanie będzie coraz powszechniejsze w przyszłości.

CHARAKTERYSTYKA FUNKCJI RECEPTORA PD-1 I JEGO LIGANDÓW

Rodzina sygnałowych cząsteczek CD28 (B7), do której należy receptor programowanej śmierci PD-1 (CD279) odgrywa kluczową rolę w prawidłowej aktywacji limfocytów T w odpowiedzi komórkowej. Cząsteczki tej rodziny dostarczają krytycznego sygnału zarówno w aktywacji jak i hamowaniu limfocytów T. Poprzez aktywację limfocytów przyczyniają się do wzrostu ich populacji, różnicowania i zwiększenia produkcji cytokin; poprzez negatywny sygnał „usypiają” funkcję limfocytów[14,16].

Receptor PD-1 został po raz pierwszy opisany w latach 90. XX wieku przez Ishida i współpracowników [17]. Od tamtej pory trwają intensywne badania molekularne

The PD-1 receptor is a glycoprotein with structure typical for type I trans-membrane proteins. The most essential, when it comes to function, element of the receptor structure is the cyto-plasmatic tail, containing two tyrosine motives (ITSM) to which the phosphatases, responsible for transmitting the immune-suppressing signal, connect [10,25].

The expression of PD-1 receptor takes place in cells presenting the antigen; mainly the B and T-lymphocytes (through the TCR and BCR signal path) and also dendritic cells and monocytes [8,25]. The PD-1 activation occurs the moment one of its ligands, PD-1L (B7-H1) and PD-2L (B7-DC) is bound. The majority of human cells show the expression of PD-1L and the PD-2L is found mainly in dendritic cells and monocytes [24]. After activation of PD-1 receptor it transmits a negative signal halting the TCR/BCR receptor paths, resulting in drop of cytokines and anti apoptotic proteins (e.g. Bcl-2) production and increase of IL-10 synthesis that halts the inflammatory reaction [12,26]. The PD-1 expression is sustained as long as the antigen stimulation is kept. In case of prolonged stimulation with antigen (chronic infections, inflammation) high expression of PD-1 on lymphocytes occurs, and their functions are gradually impaired and exhausted (the phenotype of "exhausted" lymphocytes, described e.g. in chronic lymphocytic leukemia) [27]. In the result the cellular mechanisms for body protection are disturbed and the homeostasis of the body impaired which may result in weaker immune "readiness" [4]. A form of de-organization of information within cells is observed: from one side the high PD-1 expression indicates the increased need for anti alien antigen activity, and on the other side the extinguishing cytokine inflammatory reaction halts the migration of phagocytes and the cytotoxic activity. The cascade of reactions that inactivate the antigen may end in total elimination, and the inflammatory reaction in total extinguishing of foci of inflammation.

CHARACTERISTIC OF PD-1 RECEPTOR AND ITS LIGANDS

The expression of ligands of the PD-1 programmed death receptor is differentiated. The majority of cells of body show PD-L1 expression, and PD-L2 is limited to the dendritic cells and monocytes [13].

Both ligands compete in bonding with the receptor, but the PD-L2 shows, on average, three times stronger PD-1 kinship than PD-L1 [28].

PD-L1 expression was found in cancers of: lungs, colon, stomach, kidney, breast, urinary bladder, cancers of head and neck and in melanoma [13,29,25,23]. Higher PD-L1 expression in research of patients with cancers of kidney, esophagus, pancreas and ovary was connected with shorter total survival time. The expression of PD-1 and PD-L1 was described in lymphomas and non-Hodgkin lymphomas.

larne nad ekspresją PD-1 w różnorodnych nowotworach. Aktualnie pojawiają się obiecujące doniesienia o efektach prób przedklinicznych, z przeciwciałami monoklonalnymi hamującymi ekspresję PD-1/PD-1L [10,18,19,20,21,22,23]. Receptor PD-1 jest glikoproteiną o budowie charakterystycznej dla typu I transbłonowych protein. Najistotniejszym funkcjonalnie elementem struktury receptora jest ogon cytoplazmatyczny, który zawiera dwa motywy tyrozynowe (ITSM), do których przyłączane są fosfatazy odpowiedzialne za przekazywanie sygnału immunosupresyjnego [10,25].

Do ekspresji receptora PD-1 dochodzi na komórkach prezentujących antygen; głównie limfocytach B i T (poprzez szlak sygnałowy TCR i BCR), a także komórkach dendrytycznych i monocytach [8,25]. Aktywacja PD-1 zachodzi w momencie związania jednego z jego ligandów: PD-1L (B7-H1) i PD-2L (B7-DC). Na większości komórek ludzkiego organizmu stwierdza się ekspresję PD-1L, zaś PD-2L- głównie na komórkach dendrytycznych i monocytach [24]. Po aktywacji receptora PD-1 zostaje do niego przekazany negatywny sygnał, który hamuje szlaki receptorów TCR/BCR, czego efektem jest spadek produkcji cytokin, białek antyapoptotycznych (np. Bcl-2) oraz wzrost syntezy IL-10, która hamuje odpowiedź zapalną [12,26]. Ekspresja PD-1 jest podtrzymywana tak długo, jak długo utrzymuje się stymulacja antygenem. W sytuacji przedłużającego się stanu stymulacji antygenem (przewlekłe infekcje, zapalenia) mamy do czynienia z wysoką ekspresją PD-1 na limfocytach, których funkcje ulegają stopniowemu upośledzeniu i wyczerpaniu (fenotyp limfocytów „wyczerpanych”, opisywany min. w przewlekłej białaczce limfocytowej) [27]. W efekcie dochodzi do upośledzenia komórkowych mechanizmów obrony organizmu i zaburzenia homeostazy ustroju, które mogą skutkować osłabieniem „czujności” immunologicznej [4]. Obserwuje się swego rodzaju dezorganizację informacyjną w obrębie komórek: z jednej strony wysoka ekspresja PD-1 wskazuje na konieczność wzmożonej aktywności przeciwko obcym antygenom, z drugiej zaś strony wygasanie cytokinowej reakcji zapalnej hamuje migrację komórek żernych i aktywność cytotoksyczną. Kaskada reakcji unieczynnających antygen nie może zostać zakończona pełną eliminacją, a reakcja zapalna całkowitym wygaszeniem ognisk zapalenia.

CHARAKTERYSTYKA EKSPRESJI RECEPTORA PD-1 I JEGO LIGANDÓW

Ekspresja ligandów receptora programowanej śmierci PD-1 jest zróżnicowana. Na większości komórek organizmu obserwuje się ekspresję PD-L1, zaś PD-L2 ogranicza się do komórek dendrytycznych i monocytów [13]. Oba ligandy współzawodniczą o wiązanie się do receptora, z tym że PD-L2 wykazuje średnio trzykrotnie większe powinowactwo do PD-1 niż PD-L1 [28]. Ekspresję PD-L1 stwierdzono w rakach: płuc, okrężnicy, żołądka, nerki, piersi, pęcherza moczowego, nowotworach głowy i szyi oraz czerniaku [13,29,25,23]. Podwyższenie eks-

Up till now the mechanism that makes the cancerous cells induce the PD-L1 expression on own cells, or the PD-1 expression on lymphocytes infiltrating the change, remains unknown. It seems that a major role in the level of PD-1/PD-L path expression is played by conditions of the micro-environment of the cancer cells, which confirms the fact that the PD-L1 expression of the freshly isolated cancer cells is higher than in analogous cells from cell cultures.

THE ROLE OF PD-1 PATH IN THE ANTI-CANCEROUS RESPONSE

The analysis of literature says that the PD-1/PD-1L signal path is one of the more essential ones in the anti-cancerous response of body. The cancer cells use the PD-1 path in the following mechanisms:

- a) inhibiting the anti-cancerous response due high expression of ligand and/or activation of PD-1 receptor,
- b) inhibiting the inflammatory reaction through intensification of negative co-stimulating signal,
- c) acquisition, by cancer cells, of anti apoptotic properties,
- d) increase apoptosis of lymphocytes attacking cancerous cells that show increased PD-L1 expression,
- e) modification of micro-environmental conditions in the place of cancer development: ability to induce the PD-L1 expression in cancerous cells and the lymphocytes infiltrating the change (mechanisms unknown).

THE CLINICAL POTENTIAL OF ANTI-PD-1 AND ANTI-PD-1L ANTIBODIES.

Pre-clinical trials blocking of PD-1 receptor and its ligands.

Blocking both the PD-1 receptor and its ligands has shown homogenous immunostimulating effect in pre-clinical trials stage. The anti-PD-1 and -PD-L1 antibodies can increase or rebuild the effective functions of T-lymphocytes, including the cytolytic activity directed against cancerous cells. Additionally, blocking PD-L1 promotes the infiltration of tumor with CD8+ lymphocytes with anti-cancerous properties, which was proven on a mice model of pancreatic cancer. The anti-PD-1 antibodies inhibit the production of metastases in melanoma and colorectal cancer in mouse model [16,19]. The experiment on mice lymphocytes deprived of PD-1 has shown the halting of spreading the cancer with the blood pathway, through mechanisms boosting proliferation and cytotoxicity of T-lymphocytes. The research has also proven the synergy of effects of chemotherapy and the anti-PD-L1 antibodies action.

presji PD-L1 w badaniach nad chorymi na raka nerki, przełyku, trzustki oraz jajnika została powiązana z krótszym czasem przeżycia. Opisano ekspresję PD-1 i PD-L1 w chłoniakach ziarniczych jak i niezziarniczych.

Do tej pory nie poznano mechanizmu, na drodze którego komórki nowotworowe wzbudzają ekspresję PD-L1 na własnych komórkach, bądź PD-1 na limfocytach naciekających zmianę. Wydaje się, że znaczący wpływ na poziom ekspresji szlaku PD-1/PD-L mają warunki mikrośrodowiska komórek nowotworu, co potwierdza fakt iż ekspresja PD-L1 na świeżo izolowanych komórkach nowotworowych jest wyższa niż w analogicznych komórkach pochodzących z hodowli komórkowej.

ROLA SZLAKU PD-1 W ODPOWIEDZI PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Z analizy piśmiennictwa wynika, że szlak sygnałowy PD-1/PD-1L jest jednym z istotniejszych w odpowiedzi przeciwnowotworowej organizmu. Komórki nowotworowe wykorzystują szlak PD-1 w następujących mechanizmach:

- a) hamowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej poprzez wysoką ekspresję liganda lub/i pobudzenie receptora PD-1,
- b) hamowanie odpowiedzi zapalnej poprzez nasilenie negatywnego sygnału kostymulującego,
- c) nabywanie przez komórki nowotworowe właściwości antyapoptotycznych,
- d) nasilenie apoptozy limfocytów atakujących komórki nowotworowe wykazujące podwyższoną ekspresję PD-L1,
- e) modyfikacja warunków mikrośrodowiska, w którym rozwija się nowotwór: umiejętność wzbudzania ekspresji PD-L1 na komórkach nowotworowych oraz limfocytach naciekających zmianę (mechanizmy niewyjaśnione).

POTENCJAŁ KLINICZNY PRZECIWCIAŁ ANTY-PD-1 I ANTY-PD-1L

Badania przedkliniczne – blokada receptora PD-1 i jego ligandów

Blokada zarówno receptora PD-1, jak i jego ligandów wykazała jednolity efekt immunostymulujący w fazie badań przedklinicznych. Przeciwciała przeciwko PD-1 i PD-L1 mogą zwiększać lub odbudowywać efektorowe funkcje limfocytów T, włączając w to cytolytyczną aktywność skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym. Dodatkowo, blokada PD-L1 promuje nacieki guza limfocytami CD8+ o właściwościach antynowotworowych, co udowodniono na mysim modelu raka trzustki. Przeciwciała anty-PD-1 hamują przerzutowanie w czerniaku oraz raku jelita grubego na modelu mysim [16,19]. Eksperyment na mysich limfocytami pozbawionych PD-1 wykazał zahamowanie rozsiewu guza drogą krwipochodną poprzez mechanizmy potęgujące proliferację i cytotoxiczność limfocytów T. Badania dowiodły również synergizm efektów chemioterapii i działania przeciwciał anty-PD-L1. Te obserwacje mają istotne implikacje dla roz-

These observations have essential implications for development of treatment strategies for cancer patients.

Clinical trials with use of anti-PD-1/ anti-PD-1L antibodies

Anti-PD-1 antibodies

NIVOLUMAB (BMS-936558)

Nivolumab, human IgG4 anti-PD-1 antibody has proven, *ex vivo*, the increase of proliferation and T-lymphocyte cytokine production that were additionally characterized by increased kinship and lytic properties in relation to cells of cultured melanoma. Also mice with melanoma and esophagus cancer survived longer after nivolumab and GM-CSF treatment.

The first stage of clinical trials, with use of different doses (0.3-10 mg/kg) of nivolumab in patients with advanced stages of melanoma, kidney cancer, non-small cell lung cancer, and colorectal cancer started in 2010. These trials have shown the total remission of rectal cancer and 2 partial responses to treatment in case of melanoma and kidney cancer.

The T-lymphocytes gained from the circulatory blood of the patients with use of flow cytometry analysis have shown long-term keeping of the majority of PD-1 receptors, even 3 months after a single dose of nivolumab. In later cohort examination doses of 10 mg/kg were used with good responses in case of melanoma and kidney cancer patients, without any toxic side effects. One of the participants of the trial, a patient with kidney cancer, after application of 3 doses of nivolumab has experienced a partial regression of the cancer, that lasted over 16 months [21,22].

The encouraging trial results for use of single doses of anti-PD-1 antibodies suggested the need of use of two-week schedule for administration of substance (nivolumab every 2 weeks in 8-week cycles). The ORs (objective response rates) were 20/122 of patients with NSCLC, 33/106 patients with melanoma and 10/34 patients with kidney cancer [30].

Nivolumab is currently subject to clinical trials with participation of kidney cancer, melanoma and other cancer patients.

PIDILIZUMAB (CT-011)

Humanized anti-PD-1 antibody under the name of pidilizumab, during its pre-clinical trials, proved stimulating effects on cellular response against cells of multiple myeloma. Trials were started in a group of patients of blood cancers, with a response for treatment in case of 1/3 of them. There are currently trials of the anti-cancerous action of pidilizumab in solid tissue cancers [21].

LAMBROLIZUMAB (MK-3475)

Lambrolizumab is a humanized IgG4 antibody directed against the PD-1 receptor, with effects evaluated in case of patients with different solid tissue cancers, and partial remissions observed in two cases of melanoma [21,23].

woju potencjalnych strategii leczniczych u pacjentów z nowotworami.

Badania kliniczne z zastosowaniem przeciwciał anty-PD-1/anty-PD-1L

Przeciwciała anty-PD-1

NIVOLUMAB (BMS-936558)

Nivolumab, ludzkie IgG4 przeciwciało anty-PD-1, *ex vivo* wykazywał wzrost proliferacji i produkcji cytokin limfocytów T, które dodatkowo charakteryzowały się wzmożonym powinowactwem i właściwościami litycznymi w stosunku do komórek czerniaka w hodowli. Także myszy z czerniakiem i nowotworem przełyku przeżywały dłużej po terapii nivolumabem i GM-CSF.

Pierwsza faza badań klinicznych z użyciem różnych dawek (0,3-10 mg/kg) nivolumabu u pacjentów w zaawansowanym stadium czerniaka, raka nerki, raka niedrobnokomórkowego płuc i raka odbytu rozpoczęto w 2010 roku. W badaniu tym zaobserwowano jedną całkowitą remisję dla raka odbytu i 2 częściowe odpowiedzi na leczenie dla pacjentów z czerniakiem i rakiem nerki. Na limfocytach T uzyskanych z krwi obwodowej pacjentów, w drodze analizy za pomocą cytometrii przepływowej, stwierdzono długotrwałe utrzymywanie się większości receptorów PD-1 nawet po 3 miesiącach od zastosowania pojedynczej dawki nivolumabu. W późniejszym badaniu kohortowym stosowano dawki 10 mg/kg uzyskując dobrą odpowiedź u pacjentów z czerniakiem i rakiem nerki, nie obserwując toksycznych działań niepożądanych. Jeden z uczestników badania, pacjent z nowotworem nerki, po aplikacji 3 dawek nivolumabu osiągnął częściową regresję guza, utrzymującą się przez ponad 16 miesięcy [21,22].

Zachęcające wyniki badań z zastosowaniem pojedynczych dawek przeciwciał anty-PD-1 sugerowały konieczność zastosowania dwutygodniowego harmonogramu podawania substancji (nivolumab co 2 tygodnie w 8-tygodniowych cyklach). Uzyskano ORs (ang. *objective response rate*) u 20/122 pacjentów z rakiem niedrobnokomórkowym płuc, 33/106 z czerniakiem i 10/34 z rakiem nerki [30].

Nivolumab jest aktualnie przedmiotem badań klinicznych z udziałem pacjentów z rakiem nerki, czerniakiem i innymi nowotworami.

PIDILIZUMAB (CT-011)

Humanizowane przeciwciało anty-PD-1 pod nazwą pidilizumab w badaniach przedklinicznych wykazało właściwości stymulujące odpowiedź komórkową przeciwko komórkom szpiczaka mnogiego. Rozpoczęto badania w grupie chorych na szereg nowotworów hematologicznych, uzyskując odpowiedź na leczenie u 1/3 chorych. Obecnie trwają badania nad aktywnością przeciwnowotworową pidilizumabu w guzach litych [21].

LAMBROLIZUMAB (MK-3475)

Lambrolizumab to humanizowane przeciwciało IgG4 skierowane przeciwko receptorowi PD-1, którego efekt

Without randomized trials of the aforementioned substances the evaluation of safety and activity profile, and the comparison of results of use of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies, no final conclusions can be reached. The present results show, that use of drugs in form of anti-PD-L1 antibodies may be connected with lesser organ toxicity, and the blocking with anti-PD-1 antibodies may result in better clinical effects.

Anti-PD-L1 antibodies

BMS-936559 is an antibody that in 2012 the tests on a group of 217 patients with solid tissue cancers were started (NSCLC, melanoma, colorectal, kidney, pancreatic, ovarian and breast cancers) [23,221]. The antibodies were administered every 2 weeks in 6-week cycles, with 9 responses in melanoma, 2 in kidney cancer, 5 in NSCLC and 1 in ovarian cancer [30].

SUMMARY

Although the first generation of immunotherapy drugs is characterized by their limited efficiency, the work on those substances have proven the concept, that in some of the patients the “immune equilibrium” in the cancerous tissue can be switched to the side of tumor elimination. Constant broadening and acquisition of knowledge regarding the role of the immune system in cancerogenesis shows different paths, used by the cancer to “escape” the immune mechanisms responsible for eliminating it. The role of the PD-1 programmed death receptor and other negative co-stimulating receptors engaged in immune response of the cellular type is a promising example of translation of research of immunological system into therapy. Various solid tissue cancers show PD-L1 expression, which is frequently reflected by unfavorable prognoses of outcome, as the lymphocytes infiltrating the PD-1 expressing tumors have impaired anti-cancerous functions. Results of the pre-clinical trials of anti-PD-1/PD-L1 antibodies bring initial, promising results; the scientists stress the improvement of properties and anti-cancerous functions of T-lymphocytes after use of those substances. What remains to be solved are the questions of toxicity and the occurrence of side effects. The treatment potential of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies in case of patients with advanced stages of cancers is significant and indicates the justness of further research.

działania oceniono u chorych z różnymi nowotworami litymi obserwując do tej pory dwie częściowe remisje w przypadku czerniaka [21,23].

Bez randomizowanych badań wspomnianych wyżej substancji, oceny bezpieczeństwa i profilu aktywności, a także porównania wyników z zastosowaniem przeciwciał anty-PD-1 oraz anty-PD-L1, żadne ostateczne zestawienia nie mogą być uważane za pełne. Z dotychczasowych wyników wynika, że stosowanie leków będących przeciwciałami anty-PD-L1 może wiązać się z mniejszą toksycznością narządową, podczas gdy blokowanie z użyciem przeciwciał anty-PD-1 wydaje się przekładać na lepszą skuteczność kliniczną.

Przeciwciała anty-PD-L1

BMS-936559 to przeciwciało nad którym w 2012 roku rozpoczęto badania w grupie 217 pacjentów z nowotworami litymi (rak niedrobnokomórkowy płuc, czerniak, rak odbytu, rak nerki, rak trzustki, rak jajnika i piersi) [23,221]. Przeciwciało podawano co 2 tygodnie w cyklach 6-tygodniowych uzyskując 9 odpowiedzi w czerniaku, 2 w raku nerki, 5 w niedrobnokomórkowym raku płuca i 1 w raku jajnika [30].

PODSUMOWANIE

Mimo że pierwsza generacja immunoterapeutyków cechuje się ograniczoną skutecznością, prace nad tymi substancjami dowiodły koncepcji, że u niektórych pacjentów „równowaga immunologiczna” w tkance nowotworowej może być przesunięta na korzyść eliminacji guza. Ciągłe poszerzanie i zdobywanie wiedzy na temat roli układu immunologicznego w karcinogenezie ujawnia różnorodne szlaki, poprzez które nowotwór „ucieka” mechanizmom immunologicznym odpowiedzialnym za jego niszczenie. Rola receptora programowanej śmierci PD-1 oraz innych negatywnych receptorów kostymulujących, zaangażowanych w odpowiedź immunologiczną typu komórkowego, jest obiecującym przykładem translacji badań nad układem immunologicznym do celów terapeutycznych. Różnorodne nowotwory lite wykazują ekspresję PD-L1, co często ma odzwierciedlenie w złym rokowaniu klinicznym, podczas gdy limfocyty naciekające guzy o ekspresji PD-1 posiadają upośledzone funkcje antynowotworowe. Wyniki przedklinicznych badań z zastosowaniem przeciwciał anty-PD-1/PD-L1 przynoszą wstępne, obiecujące rezultaty; naukowcy podkreślają poprawę właściwości i funkcji antynowotworowych limfocytów T organizmu po zastosowaniu tych substancji. W dalszym ciągu do rozwiązania pozostają kwestie toksyczności oraz występowania efektów ubocznych. Potencjał leczniczy przeciwciał anty-PD-1 i anty-PD-L1 u pacjentów w zaawansowanym stadium nowotworu jest znaczący i wskazuje na zasadność prowadzenia dalszych badań.

References/Piśmiennictwo:

1. Okazaki T, Honjo T (2007)- *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. Int Immunol 19: 813-824
2. Van Noort JM, van Sechel A, Boon J, Boersma WJ, Polman CH, et al (1993)- *Minor myelin proteins can be major targets for peripheral blood T cells both multiple sclerosis patients and healthy subjects*. J. Neuroimmunol 46: 67-72
3. Lohmann T, Leslie RD, Londei M (1996)- *T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulindependent diabetes*. J Autoimmun 9:385-389
4. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, et al (2003): *Regulation of PD-1, PD-1L and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses*. Eur J Immunol 33: 27-6-2716
5. Lenchow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996)- *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol 14: 233-258
6. Grewal IS, Flavell RA (1998)- *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol 16: 111-135
7. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, et al (2002)- *Expression of programmed death-1 ligands by murine T cells and APC*. J Immunol 169: 5538-5545
8. Riley JL (2009)- *PD-1 signaling in primary T cells*. Immunol Rev 229: 114-125
9. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, et al. (2001)- *B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells*. J Exp Med 193: 839-846
10. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Shape AH (2008)- *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol 26: 677-704
11. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, Imamura S, et al. (1996)- *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double negative (CD4-CD8-) thymocytes*. Int Immunol 8: 773-780
12. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L (1999)- *B7-H1, a third member of the B7family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med 5: 1365-1369
13. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, et al (2002)- *Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med 8: 793-800
14. Iwai U, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, et al. (2002)- *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci USA 99: 12293-12297
15. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A (2005)- *Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother 54: 307-314
16. Zhixue Z, Zhaode B, Xijuan L, Lianhai Z, Ziyu L, et al (2013)- *Level of circulating Pd-1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications*. Chin J Cancer Res 26(1): 104-111
17. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992)- *Included expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. EMBO J 11: 3887-3895
18. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, et al (2003)- *Blokade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity*. Nat Med 9: 562-567
19. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, et al. (2005)- *Blokade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity*. Cancer Res 65: 1089-1096
20. Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, et al (2006)- *Blokade of PD-1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro*. Int J Cancer 119: 317-327
21. McDermott DF, Atkins MB (2013)-*PD-1 as a potential target in cancer therapy*. Cancer Med 2(5): 662-673
22. Takeo N, Masayuki S, Takahiro A, et al (2007)-*Clinical Significance and Therapeutic Potential of the Programmed Death-1 Ligand/Programmed Death-1 Pathway in Human Pancreatic Cancer*. Clin Cancer Res 13, 2151-2157
23. Sznol M, Lieping C (2013)- *Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced Human Cancer*. Clin Cancer Res 19: 1021-1034
24. Takanori K, Teruji T, Koji U, Shin M, Tetsuya N, et al (2014)- *Blockade of B7-H1 Suppresses of Development of Chronic Intestinal Inflammation*. J Immunol 171: 4156-4163
25. Ishida M, Iwai Y, Tanaka Y, Okazaki T, Freeman GJ, et al. (2002)- *Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues*. Immunol Lett 84: 57-62
26. Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, et al (2008)- *B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells*. Blood 111: 3635-3643
27. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, et al (2004)- *PD-1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells*. Cancer Res 64: 1140-1145
28. Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, et al. (2003)- *Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1*. Biochem Biophys Res Commun 307: 672-677
29. Zang X, Allison JP (2007)- *The B7 family and cancer therapy: costimulation and conhibition*. Clin Cancer Res 13: 5271-5279
30. Harvey R.D (2014)- *Immunologic and Clinical Effects of Targeting PD-1 in Lung Cancer*. Clinical Pharmacology & Therapeutics 96 2: 214-217