

# 免疫检查点抑制剂治疗黑色素瘤患者的疗效

马玉婷

青海大学研究生院, 青海 西宁

收稿日期: 2023年6月21日; 录用日期: 2023年7月16日; 发布日期: 2023年7月24日

## 摘要

黑色素瘤是一种起源于黑色素细胞的恶性肿瘤, 它是仅次于基底细胞癌和鳞状细胞癌的第三大常见皮肤恶性肿瘤, 也是最具侵袭性的皮肤癌, 易发生转移而具有较高的致死率。晚期黑色素瘤在历史上一直是一种难以治疗的疾病, 因为系统性的治疗方案很少。然而, 在过去的几年里, 科学的进步导致了新型治疗方法的批准, 改变了晚期黑色素瘤的一线管理, 其中免疫检查点抑制可以说在黑色素瘤肿瘤学领域和其他领域产生了最大的兴奋。细胞毒性t淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4)和程序性死亡受体(PD-1)是一种免疫检查点分子, 是公认的抗体的靶点, 是治疗恶性黑色素瘤的免疫疗法, 其功能是控制免疫反应的起始、持续时间和幅度。靶向CTLA-4和PD-1的ICIs已经彻底改变了晚期黑色素瘤和许多其他恶性肿瘤的管理。本文对免疫检查点抑制剂(ICIs)治疗恶性黑色素瘤的疗效进行综述。

## 关键词

黑色素瘤, 免疫检查点抑制剂, 细胞毒性t淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA-4), 程序性死亡受体(PD-1), 免疫治疗, 疗效

# Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Treating Patients with Melanoma

Yuting Ma

Graduate School of Qinghai University, Xining Qinghai

Received: Jun. 21<sup>st</sup>, 2023; accepted: Jul. 16<sup>th</sup>, 2023; published: Jul. 24<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

Melanoma is a malignant tumor that originates from melanocytes. It is the third most common skin malignancy after basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma, and is also the most aggressive skin cancer with a high lethality rate due to its tendency to metastasize. Advanced mela-

noma has historically been a difficult disease to treat because there are few systemic treatment options. However, in the past few years, scientific advances have led to the approval of novel therapeutic approaches that have transformed the first-line management of advanced melanoma, with immune checkpoint inhibition arguably generating the most excitement in the field of melanoma oncology and beyond. Cytotoxic t lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and programmed death receptor (PD-1) are immune checkpoint molecules that are recognized targets of antibodies and immunotherapies for the treatment of malignant melanoma, which function to control the initiation, duration and magnitude of the immune response. ICIs targeting CTLA-4 and PD-1 have revolutionized the management of advanced melanoma and many other malignancies. This article reviews the efficacy of immune checkpoint inhibitors (ICIs) for the treatment of malignant melanoma.

## Keywords

Melanoma, Immune Checkpoint Inhibitors, Cytotoxic t Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4), Programmed Death Receptor (PD-1), Immunotherapy, Efficacy

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

恶性黑色素瘤(malignant melanoma)是一种高度侵袭性肿瘤,对人类健康和生命构成较大威胁。据统计,每年全世界估计有超过 28 万新发患者,死亡病例 6 万多[1]。全球范围内,发病率和死亡率差异显著,据调查,恶性黑色素瘤发病率仅占皮肤恶性肿瘤的 5%左右,但却构成其死亡率的 75%,主要与发现和处理的时机有关。早期病变,完全可以通过手术方式处理;晚期病变,治疗手段有限,且疗效常常差强人意。回顾黑色素瘤的发生历程,其常与 MAPK 通路和 PI3K-AKT-mTOR 通路异常有关,若从肿瘤免疫的角度看,则常与机体免疫系统失衡有关[2]。传统治疗转移性黑色素瘤的主要方法有达卡巴嗪,替莫唑胺,福莫司汀或紫杉烷类药物进行化疗。但是,这些化疗的方法并不能显著增加患者生存率。随着免疫检查点抑制剂的出现,利用免疫系统的力量和有效治疗转移性黑色素瘤患者的潜力终于被实现了。在过去的十年中以免疫检查点抑制剂为首的免疫治疗可显著延长患者 OS,降低死亡及复发风险,改善无进展生存期[3]。人们早就知道,免疫系统在黑色素瘤的自然史中发挥着作用,其通过抑制 t 细胞表面的负性免疫调节分子的功能,增强 t 细胞的抗肿瘤免疫应答,进而产生抗肿瘤的免疫效应。原发性黑色素瘤的自发性部分或完全消退是有充分记录的,并被认为是相当常见的发生。晚期转移性疾病的完全消退并不常见,但已经被描述了很多次,文献报道的病例早在 19 世纪晚期的[4]。

目前在黑色素瘤治疗中研究最广泛的免疫检查点有细胞毒性 t 淋巴细胞相关蛋白(Cytotoxic t lymphocyte-associated protein, CTLA-4)和程序性细胞死亡蛋白 1 (Programmed cell death protein, PD-1)等[5]。

## 2. ICIs 生物学

免疫检查点的一个重要方面是它们在维持自我耐受性方面的作用——即避免自身免疫,而这对于防止在对感染的免疫反应过程中对正常组织的损害是必要的。有多个免疫检查点可以导致激活和抑制信号,因此它们形成一个复杂的调节网络。虽然免疫检查点在一些免疫细胞上表达,但在过去的三十年里,研究的一个主要焦点是它们在 t 淋巴细胞功能中的作用。逃避免疫系统是癌症生长所需的许多特征之一;

颠覆免疫检查点是这种情况发生的一种方式,从而为治疗操作提供了机会。两个最与临床相关的检查点, CTLA-4 和 PD-1 作为抗癌免疫反应的刹车。在动物模型中,这些受体的抑制剂可以消除肿瘤[6]。此外,由于它们在 t 细胞激活中不同但互补的作用点,联合阻断增加了肿瘤效应 t 细胞浸润和效应 t 细胞与髓系来源的抑制细胞比例的增加,以及同时产生干扰素(IFN)- $\gamma$  和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  的 CD8 阳性 t 细胞的数量。这些观察结果表明,肿瘤特异性 t 细胞可以通过抑制 PD-1 或 CTLA-4 检查点,或两者都被扩展和刺激来执行抗肿瘤功能。为了防止自身免疫,许多免疫检查点通路在免疫反应过程中的多个步骤中调节 t 细胞的激活[7] [8]。其中一些检查点与 t 细胞的激活有关。其中一种蛋白 B7 在 apc 表面表达,它与 t 细胞上表达的 CD28 相互作用导致 t 细胞活化。其他的蛋白质也参与了免疫反应的下调。细胞毒性 t 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4)在活化的 t 细胞上表达,并与 APCs 上的 B7 相互作用,导致 t 细胞抑制[9] [10]。有证据表明 CTLA-4 信号也参与了 t 细胞发育的早期[11]。体内研究表明,阻断 CTLA-4 的抗体导致 t 细胞活化增加,对肿瘤的免疫反应增加,这在体外得到了证实[12] [13]。另一个抑制性检查点涉及到程序性死亡蛋白 1 (PD-1)及其配体 PD-L1 和 PD-L2 的相互作用。PD-1 是 CD28 家族的成员,参与免疫抑制并与 t 细胞衰竭相关[14] [15] [16]。PD-1 与 PD-L1 和 PD-L2 结合,导致效应 t 细胞反应的抑制[17]。虽然 CTLA-4 和 PD-1 是目前免疫检查点相互作用,但免疫系统中存在许多刺激和抑制性相互作用。人们不断努力针对这些新的检查点,并继续更好地理解在免疫系统内发生的信号。研究表明,CTLA-4 和 PD-1 导致 t 细胞激活变化的机制存在差异[18]。这些检查点通路的差异为联合治疗提供了机会。

### 3. CTLA-4 抗体

CTLA-4 是一种免疫球蛋白细胞表面受体,是 t 细胞活化[19] [20]的抑制剂。在被幼稚 t 细胞[21]和 FoxP3 激活后,它主要在幼稚的 t 细胞上表达 + 调节性 t 细胞(Tregs) [22]。t 细胞的激活不仅依赖于 TCR 与通过 APC 呈递的抗原结合,还依赖于共刺激第二信号的存在,通常是通过将 t 细胞上表达的 CD28 与 APC 上发现的 CD80/86 结合。这种次级信号的缺失可能导致 t 细胞识别所呈现的肽为“自身抗原”或对该抗原产生耐受性。CTLA-4 是 CD28 的竞争性同源物,与 CD28 [23]相比,对 CD80 (B7-1)的亲合力更高,CD86 (B72)的程度较低,导致 t 细胞共刺激的抑制 TCR 信号通路可立即上调细胞的表达表面 CTLA-4 表达,在[21] [22] [24]激活后 2~3 天达到峰值,在 t 细胞激活时提供一个负反馈回路。在 t 细胞激活[25]后,细胞内囊泡内的 CTLA-4 也被快速运输到免疫突触。在免疫突触上,CTLA-4 通过 CD80/CD86 的结合来稳定,使其能够收集和抑制 CD28 的结合。CTLA-4 限制 CD28 下游信号通路,抑制 PI3K 和 AKT 通路[26] CTLA-4 与 CD80/86 的结合,介导了一个细胞内的负反馈通路,通过酪氨酸磷酸酶 SHP-2 和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 PP2A 来实现,去磷酸化信号激酶进一步下游。此外,CTLA-4 作用于细胞外,从附近的细胞中去除 CD28 配体 CD80/86。通过体内的反内吞作用,包括 APCs,进一步抑制 t 细胞活化[27]。

伊匹单抗治疗不可切除的 III 期或 IV 期黑色素瘤的有效性最初在两项随机 III 期临床试验中得到证实。在一项对既往接受过转移性疾病治疗的研究中,676 名受试者按 3:1:1 的比例随机接受伊匹单抗加糖蛋白 100 疫苗(gp100)、单独使用伊匹单抗或单独使用 gp100 [28]。伊匹单抗每 3 周给予一次,连续 4 个周期,剂量为 3 mg/kg 体重。伊匹单抗 + gp100 组的中位总生存期为 10.0 个月,单独伊匹单抗组为 10.1 个月,单独 gp100 组为 6.4 个月。伊匹单抗单独组的最佳总缓解效率为 10.9%,而 gp100 单独组为 1.5%。在接受伊匹单抗治疗的患者中,高达 15%的患者发生了 3 级或 4 级免疫相关不良事件,3%的患者单独使用 gp100 治疗时发生了 3 级免疫相关不良事件。(3 级或 4 级不良事件严重危及生命或致残,经常需要干预)。有 14 例与研究药物相关的死亡(2.1%),其中 7 例是由于免疫相关的不良事件。该试验的结果导致伊匹单抗于 2011 年在美国获得批准,随后也在包括欧洲和澳大利亚在内的其他司法管辖区获得批准[28]。与伊匹单抗相关的毒性也非常不同,并遵循与传统化疗非常不同的模式。自身免疫性毒性包括结肠炎、

垂体炎、肝炎、胰腺炎和许多其他毒性被记录。这些毒性的治疗包括使用类固醇的免疫抑制或其他免疫抑制。这些毒性的模式也很新颖,在患者开始治疗后几周至几个月就会出现严重的副作用[29]。伊匹单抗是第一个在晚期黑色素瘤治疗中显示出生存获益的治疗方法,并成为后续治疗方法开发的标准疗法。

一项包括 10 项前瞻性和 2 项回顾性研究中 1861 例接受伊匹单抗治疗的黑色素瘤的汇总分析显示,3 年后的生存平台期为 21% [30]。随后,在了一项随机 III 期研究中,伊匹单抗采用两种不同的治疗方案(10 mg/kg 和 3 mg/kg)进行测试[31]。接受 10 mg/kg 治疗的患者获得了更长的 OS (15.7 个月对 11.5 个月),但经历了更高的毒性率,主要表现为腹泻、结肠炎、肝炎和垂体炎[31]。此外,伊匹单抗在脑受累患者中的疗效得到了证实:无症状和有症状的类固醇治疗患者的疾病控制率分别为 18% 和 5% [32]。在无症状的中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)转移的患者中,伊匹单抗联合福莫司汀联合治疗为 3 年。操作系统率为 27.8% [33]。

#### 4. PD-1 和 PDL-1 的抗体

PD-1 是由活化的 T 细胞和 B 细胞表达的 CD28 家族的免疫抑制受体。它有两个配体,PD-L1 和 PD-L2,它们是 B7 家族的成员。这些配体在免疫细胞如巨噬细胞和单核细胞等免疫细胞上表达。非免疫细胞也可以表达 PD-1 的配体,主要是 PD-L1,肿瘤细胞可以利用这种机制来避免免疫攻击[34]。针对 PD-1 和 PD-L1 的单克隆抗体已经被开发出来来中断这一免疫抑制途径,并激活 T 细胞对肿瘤细胞的反应。与在引流淋巴结的 T 细胞启动期起作用的 CTLA-4 抑制剂相比,PD-1/PD-L1 抑制剂通过在肿瘤水平上阻断 T 细胞-肿瘤抑制相互作用而在效应期发挥作用。这些抗体对多种肿瘤类型表现出显著的临床活性。黑色素瘤是这些药物的突出的测试案例,因为它通常表达 PD-L1,而且除了针对 50% BRAF 突变的肿瘤外,很少有其他有效的全身药物治疗。

阻断 PD-1 以克服免疫抵抗成为黑色素瘤研究的一个活跃领域,几乎同时产生了两种抗体。尼鲁单抗和派姆单抗是对 PD-1 有直接活性的抗体。Nivolumab 最初在了一项 I 期研究中进行了测试,该研究招募了黑色素瘤、非小细胞肺癌、去势耐药前列腺癌、肾细胞癌或结肠直肠癌患者。共纳入 296 例患者,94 例晚期黑色素瘤患者的缓解率为 28%。此外,毒性发生率较低,只有 14% 的 3 级或 4 级药物相关不良事件 [35]。派姆单抗最初在 135 例晚期黑色素瘤患者中进行了测试,应答率为 38%。此外,观察到大多数患者的反应是持久的。不良事件总体上主要为 1 级或 2 [36]。这两种药物在晚期黑色素瘤中的 III 期试验进展。在了一项对 405 名对伊匹单抗难治性的晚期黑色素瘤患者的研究中,将尼鲁单抗与化疗进行了比较。本研究的患者随机以 2:1 选择尼鲁单抗,尼鲁单抗组的应答率为 31.7%,而化疗组为 10.6% [37]。另一项研究观察了未经治疗的无 BRAF 突变的晚期黑色素瘤患者。本研究随机将 418 名患者分为尼鲁单抗或达卡巴嗪。尼鲁单抗组的应答率为 40%,而达卡巴嗪组为 13.9%。此外,该试验还显示了总体生存率的获益尼鲁单抗组的 1 年总生存率为 72.9%,而达卡巴嗪组为 42.1% [38]。这些研究的毒性率同样有利于早期试验。

派姆单抗在了一项 3 期研究中进行了评估,该研究比较了派姆单抗与伊匹单抗的两种给药方案。共纳入 834 例晚期黑色素瘤患者,并按 1:1:1 的比例随机分组。2 个派姆单抗给药组的总缓解率分别为 33.7% 和 32.9%,而伊匹单抗组的总缓解率分别为 11.9%。派姆单抗组的 12 个月生存率分别为 74.1% 和 68.4%,而伊匹单抗组分别为 58.2%。毒性较低,在派姆单抗组中,分别有 13.3% 和 10.1% 的患者出现 3~5 级毒性。这些研究将尼鲁单抗和派姆单抗作为转移性黑色素瘤在一线或其他癌症指导治疗后的标准治疗选择[39]。此外,他们显示了良好的毒性和罕见但显著的自身免疫副作用。Weber 在 CheckMate037 随机 III 期研究中比较了尼鲁单抗(3 mg/kg q2 w)和研究选择的化疗(达卡巴嗪或卡铂加紫杉醇)。该研究纳入了 405 名既往在 BRAF 突变时接受伊匹单抗和抗 BRAF 药物治疗的患者[40]。抗 PD-1 治疗的 OS 为 16 个月,

化疗为 14 个月, ORR 为 27%和 10%, 中位反应持续时间(DOR)为 32 个月和 13 个月[41]。有 9%的患者报告了 G3/G4 AEs。

## 5. 联合使用抗 PD-1 和抗 CTLA-4

早期观察显示, CTLA-4 抑制和 PD-1 抑制之间存在差异。这两种受体调节 t 细胞激活的机制是不同的[42]。此外, 这些不同受体的活性位置表明, 它们在淋巴结中发挥了更多的 CTLA-4 信号, 在组织或肿瘤中有更多的 PD-1 信号。CTLA-4 和 PD-1 是共抑制分子, 然而, 有证据表明, 它们通过不同的非冗余机制抑制 t 细胞的激活, 可能在 t 细胞进化的不同位置和时间点发挥作用。与单药治疗相比, 抗 CTLA-4 和抗 PD-1 联合治疗可能会提高临床结果。在 0673 期研究中, 945 例 IV 期或不可切除的 III 期患者被随机分配到尼鲁单抗 + 伊匹单抗联合或尼鲁单抗单药治疗或伊匹单抗单药治疗。在 31.1%的患者中检测到 BRAF 突变。该研究旨在评估尼鲁单抗 + 伊匹单抗与伊匹单抗和尼鲁单抗与伊匹单抗之间的优越性, 但没有预先确定尼鲁单抗 + 伊匹单抗和单独使用尼鲁单抗之间的直接比较。经过 36 个月的随访, 与伊匹单抗相比, 尼鲁单抗 + 治疗 PFS、OS 和 RR (57.6% vs 19%)。5 该研究报道了尼鲁单抗 + 伊匹单抗的中位 PFS 为 11 个月, 单独抗 PD-1 为 6.9 个月, 单独抗 CTLA-4 为 2.9 个月。对于 PD-L1 阳性患者, 联合组和单药尼鲁单抗组的 mPFS 均为 14.0 个月, 但在 PD-L1 阴性患者中, mPFS 为 11。尼鲁单抗 + 伊匹单抗 2 个月, 尼鲁单抗 5.3 个月。联合组 G3/G4 AEs 发生率为 55%, 单独尼鲁单抗为 16.3%, 单药伊匹单抗为 27.3%; 联合组为 36.4%患者, 尼鲁单抗组为 7.7%, 伊匹单抗组为 14.8%患者因毒性中断治疗[43]。3 年后, 联合治疗组 58%的患者存活, 尼鲁单抗组 52%的患者存活, 伊匹单抗组 34%的患者存活[44]。5 年后, 尼鲁单抗 + 伊匹单抗保持其疗效, 与单独使用尼鲁单抗 36.9 个月和单独使用伊匹单抗 19.9 个月相比, mOS 未达到[45]。抗 CTLA-4 和抗 PD-1 联合治疗提供了潜在的优越疗效, 这可能归因于每种药物以互补甚至协同的方式发挥作用。

## 6. ICI 毒性

然而, 改变免疫系统可能随后导致特定临床谱的各种自身免疫表现的发展, 称为免疫相关不良事件(irAEs)。因为这些作用被认为是来自于整体免疫增强, 所以它们可能潜在地影响身体的任何系统, 但主要涉及皮肤、结肠、肺、内分泌腺和肝脏[46]。器官特异性、irAEs 的发生率和严重程度因每种特定药物及其剂量而异, 但它们也因肿瘤类型而异[47]。对于联合 ICI 治疗, 3~4 级 irAEs 的发生率明显更高: Check Mate-067 试验报告了 59%的 3~4 级不良事件, 这些不良事件发生于 ipilimumab 3 mg/kg 加 nivolumab 1 mg/kg (每 3 周给药 4 次), 随后是 nivolumab 3 mg/kg (每 2 周给药 1 次) (用于未治疗的黑色素瘤) [48]。在相同的情况下, 对于进行性小细胞肺癌患者, CheckMate-032 在 ipilimumab 1 mg/kg 加 nivolumab 3 mg/kg (每 3 周一) 的四个剂量队列中占 19%的严重 irAEs, 在 ipilimumab 3 mg/kg 加 nivolumab 1 mg/kg (每 3 周一) 的四个剂量队列中占 30%的严重 irAEs (两个队列均每 2 周服用 nivolumab 3 mg/kg) [49]。

由抗 PD-1 抗体引起的 irAEs 的发生时间尚不明确, 但它显示出比抗 CTLA-4 毒性稍晚的趋势。在对接受 nivolumab 治疗的患者进行的汇总分析中, 皮肤性 irAE 的发病时间约为 5 周, 胃肠道为 7 周, 肝脏为 8 周, 肺部为 9 周, 内分泌为 10 周, 肾毒性为 15 周[50] [51]。然而, 抗 PD1 irAEs 的发生率并未在多项 ple 试验中显示出一致的时间表, 目前尚不清楚。

## 7. 结论

免疫检查点抑制剂通过靶向 t 细胞中的免疫调节途径以增强抗肿瘤免疫应答, 从而杀死肿瘤细胞。ICI 联合治疗为癌症患者提供了新的治疗方式选择并且有可能达到治愈。黑色素瘤患者通过 ICI 联合治疗有

明显的生存获益。ICI 已成为癌症治疗的核心支柱，具有持久的反应以及通常可控制的毒性，因此成为癌症患者一种极具吸引力且广泛使用的治疗选择。在临床实践和未来黑色素瘤患者的研究设计中应考虑 ICI 联合治疗的方式。免疫检查点抑制在治疗黑色素瘤的过程中已经牢固确立，并有可能继续扩大。

## 参考文献

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., *et al.* (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] Schadendorf, D., Van Akkooi, A.C.J., Berking, C., *et al.* (2018) Melanoma. *The Lancet*, **392**, 971-984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- [3] Zaremba, A., Zimmer, L., Griewank, K.G., *et al.* (2020) Immunotherapy Beim Malignant Melanoma. *Der Internist*, **61**, 669-675. <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00812-1>
- [4] Bennet, W.H. (1899) Some Peculiarities in the Behaviour of Certain Malignant and Innocent Growths. *The Lancet*, **153**, 3-7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)78943-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)78943-X)
- [5] Petrova, V., Arkhypov, I., Weber, R., *et al.* (2020) Modern Aspects of Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article 2367. <https://doi.org/10.3390/ijms21072367>
- [6] Curran, M.A., Montalvo, W., Yagita, H. and Allison, J.P. (2010) PD-1 and CTLA-4 Combination Blockade Expands Infiltrating T Cells and Reduces Regulatory T and Myeloid Cells within B16 Melanoma Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 4275-4280. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915174107>
- [7] Goldrath, A.W. and Bevan, M.J. (1999) Selecting and Maintaining a Diverse T-Cell Repertoire. *Nature*, **402**, 255-262. <https://doi.org/10.1038/46218>
- [8] Fife, B.T. and Bluestone, J.A. (2008) Control of Peripheral T-Cell Tolerance and Autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Immunological Reviews*, **224**, 166-182. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00662.x>
- [9] Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., *et al.* (1994) CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation. *Immunity*, **1**, 405-413. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X)
- [10] Krummel, M.F. and Allison, J.P. (1995) CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T Cells to Stimulation. *Journal of Experimental Medicine*, **182**, 459-465. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.459>
- [11] Brunner, M.C., Chambers, C.A., Chan, F.K., *et al.* (1999) CTLA-4-Mediated Inhibition of Early Events of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*, **162**, 5813-5820. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.10.5813>
- [12] Leach, D.R., Krummel, M.F. and Allison, J.P. (1996) Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*, **271**, 1734-1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
- [13] Van Elsas, A., Hurwitz, A.A. and Allison, J.P. (1999) Combination Immunotherapy of B16 Melanoma Using Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 (CTLA-4) and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)-Producing Vaccines Induces Rejection of Subcutaneous and Metastatic Tumors Accompanied by Autoimmune Depigmentation. *Journal of Experimental Medicine*, **190**, 355-366. <https://doi.org/10.1084/jem.190.3.355>
- [14] Koga, N., Suzuki, J., Kosuge, H., *et al.* (2004) Blockade of the Interaction between PD-1 and PD-L1 Accelerates Graft Arterial Disease in Cardiac Allografts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **24**, 2057-2062. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000145015.23656.e4>
- [15] Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., *et al.* (2005) Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Research*, **6**, 1089-1096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.1089.65.3>
- [16] Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., *et al.* (2006) PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature*, **443**, 350-354. <https://doi.org/10.1038/nature05115>
- [17] Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., *et al.* (2008) PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, **26**, 677-704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
- [18] Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., *et al.* (2005) CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, **25**, 9543-9553. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005>
- [19] Krummel, M.F. and Allison, J.P. (1996) CTLA-4 Engagement Inhibits IL-2 Accumulation and Cell Cycle Progression Upon Activation of Resting T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, **183**, 2533-2540. <https://doi.org/10.1084/jem.183.6.2533>
- [20] Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., *et al.* (1994)

- CTLA-4 Can Function as a Negative Regulator of T Cell Activation. *Immunity*, **1**, 405-413. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X)
- [21] Alegre, M.L., Noel, P.J., Eisfelder, B.J., Chuang, E., Clark, M.R., Reiner, S.L. and Thompson, C.B. (1996) Regulation of Surface and Intracellular Expression of CTLA4 on Mouse T Cells. *The Journal of Immunology*, **157**, 4762-4770. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.11.4762>
- [22] Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., *et al.* (2000) Immunologic Self-Tolerance Maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, **192**, 303-310. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.303>
- [23] Sansom, D.M. (2000) CD28, CTLA-4 and Their Ligands: Who Does What and to Whom? *Immunity*, **101**, 169-177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x>
- [24] Linsley, P.S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K.L. and Mittler, R.S. (1996) Intracellular Trafficking of CTLA-4 and Focal Localization towards Sites of TCR Engagement. *Immunity*, **4**, 535-543. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80480-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80480-X)
- [25] Egen, J.G. and Allison, J.P. (2002) Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Accumulation in the Immunological Synapse Is Regulated by TCR Signal Strength. *Immunity*, **16**, 23-35. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00259-X)
- [26] Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., *et al.* (2001) Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science*, **291**, 319-322. <https://doi.org/10.1126/science.291.5502.319>
- [27] Qureshi, O.S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E.M., Baker, J., *et al.* (2011) Trans-Endocytosis of CD80 and CD86: A Molecular Basis for the Cell-Extrinsic Function of CTLA-4. *Science*, **332**, 600-603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>
- [28] Hodi, F.S., O'day, S.J., McDermott, D.F., *et al.* (2010) Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **363**, 711-723.
- [29] Cybulska-Stopa, B., *et al.* (2020) Efficacy of Ipilimumab after Anti-PD-1 Therapy in Sequential Treatment of Metastatic Melanoma Patients-Real World Evidence. *Advances in Medical Sciences*, **65**, 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.05.005>
- [30] Shrikant, P., Khoruts, A. and Mescher, M.F. (1999) CTLA-4 Blockade Reverses CD8<sup>+</sup>T Cell Tolerance to Tumor by a CD4<sup>+</sup> T Cell- and IL-2-Dependent Mechanism. *Immunity*, **11**, 483-493. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80123-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80123-5)
- [31] Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schandorf, D., Hassel, J.C., *et al.* (2010) Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **363**, 711-723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- [32] Namikawa, K., Kiyohara, Y., Takenouchi, T., Uhara, H., Uchi, H., Yoshikawa, S., Takatsuka, S., Koga, H., Wada, N., Minami, H., *et al.* (2018) Efficacy and Safety of Nivolumab in Combination with Ipilimumab in Japanese Patients with Advanced Melanoma: An Open-Label, Single-Arm, Multicentre Phase II Study. *European Journal of Cancer*, **105**, 114-126. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.09.025>
- [33] McDermott, D., Haanen, J., Chen, T.T., Lorigan, P. and O'Day, S. (2013) Efficacy and Safety of Ipilimumab in Metastatic Melanoma Patients Surviving More than 2 Years Following Treatment in a Phase III Trial (MDX010-20). *Annals of Oncology*, **24**, 2694-2698. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt291>
- [34] Zou, W. and Chen, L. (2008) Inhibitory B7-Family Molecules in the Tumour Microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 467-477. <https://doi.org/10.1038/nri2326>
- [35] Tsutsumida, A., *et al.* (2019) Japanese Real-World Study of Sequential Nivolumab and Ipilimumab Treatment in Melanoma. *The Journal of Dermatology*, **46**, 947-955. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15073>
- [36] Fujisawa, Y., *et al.* (2018) Retrospective Study of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab after Nivolumab: Analysis of 60 Japanese Patients. *Journal of Dermatological Science*, **89**, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.10.009>
- [37] Muto, Y., *et al.* (2019) Investigation of Clinical Factors Associated with Longer Overall Survival in Advanced Melanoma Patients Treated with Sequential Ipilimumab. *The Journal of Dermatology*, **46**, 498-506. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14865>
- [38] Baron, K., *et al.* (2020) Comparative Effectiveness of Second-Line Ipilimumab vs Nivolumab in Combination with Ipilimumab in Patients with Advanced Melanoma Who Received Frontline Anti-PD-1 Antibodies. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, **27**, 555-559. <https://doi.org/10.1177/1078155220924719>
- [39] Mehmi, I. and Hill, J. (2018) Ipilimumab with Anti PD-1 (Nivolumab or Pembrolizumab) after Progression on First Line Anti-PD-1 Therapy for Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **36**, e21552. [https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15\\_suppl.e21552](https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e21552)

- [40] Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.T., Berman, D.M. and Wolchok, J.D. (2015) Pooled Analysis of Long-Term Survival Data from Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **33**, 1889-1894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2736>
- [41] Ascierto, P.A., Del Vecchio, M., Robert, C., Mackiewicz, A., Chiarion-Sileni, V., Arance, A., Lebbé, C., Bastholt, L., Hamid, O., Rutkowski, P., *et al.* (2017) Ipilimumab 10 mg/kg versus Ipilimumab 3 mg/kg in Patients with Unresectable or Metastatic Melanoma: A Randomised, Doubleblind, Multicentre, Phase 3 Trial. *The Lancet Oncology*, **18**, 611-622. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30231-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30231-0)
- [42] Institute, N.C. (2017) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0. [https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic\\_applications/docs/CTCAE\\_v5\\_Quick\\_Reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf)
- [43] Robert, C., Long, G.V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kallinka-Warzocha, E., *et al.* (2015) Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *The New England Journal of Medicine*, **372**, 320-330. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082>
- [44] Sullivan, R.J., Hamid, O., Gonzalez, R., Infante, J.R., Patel, M.R., Hodi, F.S., Lewis, K.D., Tawbi, H.A., Hernandez, G., Wongchenko, M.J., *et al.* (2019) Atezolizumab plus Cobimetinib and Vemurafenib in BRAF-Mutated Melanoma Patients. *Nature Medicine*, **25**, 929-935.
- [45] Ascierto, P.A., Long, G.V., Robert, C., Brady, B., Dutriaux, C., Di Giacomo, A.M., Mortier, L., Hassel, J.C., Rutkowski, P., McNeil, C., *et al.* (2019) Survival Outcomes in Patients with Previously Untreated Brafwild-Type Advanced Melanoma Treated with Nivolumab Therapy: Three-Year Follow-Up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncology*, **5**, 187-194. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4514>
- [46] Michot, J.M., Bigenwald, C., Champiat, S., *et al.* (2016) Immune-Related Adverse Events with Immune Checkpoint Blockade: A Comprehensive Review. *European Journal of Cancer*, **54**, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.016>
- [47] Marrone, K.A., Ying, W. and Naidoo, J. (2016) Immunerelated Adverse Events from Immune Checkpoint Inhibitors. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **100**, 242-251. <https://doi.org/10.1002/cpt.394>
- [48] Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., *et al.* (2017) Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, **377**, 1345-1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709684>
- [49] Antonia, S.J., Lopez-Martin, J.A., Bendell, J., *et al.* (2016) Nivolumab Alone and Nivolumab plus Ipilimumab in Recurrent Small-Cell Lung Cancer (CheckMate032): A Multicentre, Open-Label, Phase 1/2 Trial. *The Lancet Oncology*, **17**, 883-895. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30098-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30098-5)
- [50] Weber, J.S., Hodi, F.S., Wolchok, J.D., *et al.* (2017) Safety Profile of Nivolumab Monotherapy: A Pooled Analysis of Patients with Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 785-792. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.66.1389>
- [51] Larkin, J., Lao, C.D., Urba, W.J., *et al.* (2015) Efficacy and Safety of Nivolumab in Patients with BRAF V600 Mutant and BRAF Wild-Type Advanced Melanoma: A Pooled Analysis of 4 Clinical Trials. *JAMA Oncology*, **1**, 433-440. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1184>