

Vliv cílené léčby BRAF a MEK inhibitory na imunitní systém u metastazujícího melanomu

Linda Řandová¹, Ondřej Kodet^{1, 2, 3}

¹Dermatovenerologická klinika, 1. LF UK a VFN, Praha

²Anatomický ústav, 1. LF UK v Praze

³BIOCEV – Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci u Prahy

Cílená léčba BRAF a MEK inhibitory patří mezi základní pilíře celkové léčby pacientů s BRAF mutovaným melanomem. Navzdory dobré terapeutické odpovědi je tato léčba zatížena brzkým vznikem rezistence. Určitou možností, jak tuto rezistenci překonat, je kombinace cílené terapie a imunoterapie. Samotné BRAF mutované melanomy mají imunosupresivní vlastnosti, které stimuluje nádorové mikroprostředí. Cílená léčba BRAF a MEK inhibitory významně ovlivňuje imunitní nádorové mikroprostředí, které by mohlo podporovat použití kombinované terapie s *checkpoint* inhibitory. Tyto poznatky však zatím nebyly podpořeny v klinických studiích. Práce přináší pohled na současné znalosti ovlivnění imunitního systému cílenou terapií.

Klíčová slova: cílená terapie, BRAF inhibitory, MEK inhibitory, *checkpoint* inhibitory, melanom, imunitní mikroprostředí.

Effect of target therapy with BRAF and MEK inhibitors on the immune system in metastatic melanoma

Target therapy with BRAF and MEK inhibitors is one of the main pillars of treating patients with BRAF-mutated melanoma. Despite a good therapeutic response, this treatment is burdened by early development resistance. A particular possibility to overcome this resistance is the combination of target therapy and immunotherapy. BRAF-mutated melanomas themselves have immunosuppressive properties that stimulate the tumour microenvironment. Target therapy with BRAF and MEK inhibitors significantly affects the immune tumour microenvironment, which could support the use of combination therapy with *checkpoint* inhibitors. However, these findings have not yet been supported in clinical studies. The work provides insight into the current knowledge of the influence of the immune system by target therapy.

Key words: targeted therapy, BRAF inhibitors, MEK inhibitors, *checkpoint* inhibitors, melanoma, immune microenvironment.

Úvod

BRAF inhibitory představují možnost cílené terapie nádorů s přítomnou somatickou mutací genu BRAF V600 (V600E, vzácněji i V600K a V600R). Zavedení této terapie v léčbě metastazujícího melanomu přineslo zlomový okamžik s velkou mírou terapeutických odpovědí. Prvotní nadějně výsledky byly zatíženy brzkým vznikem nádorové rezistence a selháním terapie. Vemurafenib, první BRAF inhibitor, který byl zaveden do klinického testování ve studii BRIM-3 byl

hodnocen oproti monoterapii dakarbazinem. Terapeutická odpověď byla až 53 %, což byla hodnota do té doby nezaznamenaná v léčbě metastazujícího melanomu. Celkové přežití (OS) u pacientů léčených vemurafenibem bylo 13,6 měsíce proti 9,7 měsícům u pacientů léčených pouze dakarbazinem (míra rizika (HR): 0,70, 95%; interval spolehlivosti (CI): 0,57–0,87, $p = 0,0008$) (1). Vznik nádorové rezistence a selhání této terapie demonstrují data u dlouhodobého sledování, kdy poměr počtu OS v prvním roce léčby byl 56 % paci-

entů na léčbě vemurafenibem oproti 46 % na terapii dakarbazinem. Ve 4. roce sledování byl tento poměr OS již pouze 17 % pacientů ku 16 % pacientům na terapii dakarbazinem (2). Poměrně záhy byla zveřejněna data klinické studie BREAK-3, ve které byl testován druhý BRAF inhibitor dabrafenib, který zaznamenal podobnou terapeutickou účinnost jako vemurafenib (3). Vzhledem k rychlému nástupu rezistence při terapii BRAF inhibitory (6–9 měsíců) byla hledána cesta k potencování efektu a překonání alespoň některých mechanismů



doc. MUDr. Ondřej Kodet, Ph.D.

Dermatovenerologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

ondrej.kodet@vfn.cz

Cit. zkr: Onkologie. 2023;17(2):108-112

Článek přijat redakcí: 23. 3. 2023

Článek přijat k publikaci: 6. 4. 2023

INZERCE

rezistence (4, 5). Proto byla zavedena kombinovaná terapie BRAF a MEK (MEK1/2, trametinib, cobimetinib) inhibitory s cílenou inhibicí v dalším stupni MAP kinázové signalizace (5). Trametinib a cobimetinib patří mezi selektivní reverzibilní inhibitory MEK 1/2 kináz, které jsou součástí MAP kinázové intracelulární signalizace. Jedná se o kinázový protein, který je uložen mezi proteinem BRAF a ERK kinázou. První inhibitor trametinib ukázal významnou účinnost v kombinaci s dabrafenibem ve studii COMBI-D. Cobimetinib byl zkoušen v kombinaci s vemurafenibem ve studii COMBI-V. Obě kombinace ve studiích prokázaly statisticky významné zlepšení celkového přežití a přežití bez progresu oproti monoterapii jen BRAF inhibitory. V dlouhodobém přežití byly výsledky obou studií spojeny (211 ve studii COMBI-D a 352 ve studii COMBI-V). Celková míra přežití do progresu (PFS) byla 21 % (95 % CI, 17–24) po 4 letech a 19 % (95 % CI, 15–22) po 5 letech. Celková míra OS byla 37 % (95 % CI, 33–42) po 4 letech a 34 % (95 % CI, 30–38) po 5 letech. Kompletní terapeutická odpověď byla u 109 pacientů (19 %) a byla spojena s dlouhodobým efektem a trváním remise (6). Třetí dvojice BRAF a MEK inhibitorů, resp. encorafenibu a binimetinibu byla testována ve studii Columbus sledující efekt zmíněných inhibitorů oproti monoterapii vemurafenibem či encorafenibem. Medián sledování pro OS byl 36,8 měsíce (95 % CI, 0,47–0,79), medián OS pro kombinaci encorafenibu s binimetinibem byl 33,6 měsíce (95 % CI, 24,4–39,2) ve srovnání s 16,9 měsíci (95 % CI, 14,0–24,5) při terapii vemurafenibem (HR 0,61; 95 %, CI 0,47–0,79; $p < 0,0001$) (7). Tato studie prokázala na zatím nejlepší dlouhodobé výsledky OS pacientů na kombinované terapii BRAF a MEK inhibitory.

Výše popsané studie a znalosti o efektu imunoterapie melanomu *checkpoint* inhibitory nabídl možnost kombinované terapie, která by mohla navodit vyšší míru terapeutických odpovědí a současně prodloužit terapeutickou odpověď u pacientů s BRAF mutovaným melanomem (8). Jednou z těchto kombinací byla studie COMBI-i, která navíc zavedla třetí anti-PD-1 protilátku spartalizumab. Dostupná data z klinické fáze 1 a 2, při sledování 1 rok, byl OS 85,9 % (95% CI, 69–94) a kompletní remise byla pozorována dokonce u 1/3 všech pacientů (9). Tyto výsledky ukázaly

na poměrně zajímavé možnosti léčby, ale z posledních uveřejněných dat bohužel vyplývá, že kombinovaná terapie anti-PD-1 s cílenou terapií signifikantně neprodloužila PFS oproti kombinaci placeba a cílené terapie. Medián sledování byl 27,2 měsíce a medián PFS byl v kombinaci 16,2 měsíce oproti 12,0 měsícům v kombinaci jen s placebem (HR, 0,82; 95 % CI, 0,655–1,027; $p = 0,042$). Očekávané PFS po 12 měsících léčby bylo 58 % oproti 50 % pacientů a po 24 měsících terapie 44 % oproti 36 % pacientů. Tyto statistické údaje nepotvrdily původním očekávání a údaje z předchozích fází klinického testování (10). Výsledky této studie ukázaly na nutnost důslednějšího prozkoumání případného vlivu BRAF a MEK inhibitorů na imunitní systém, protože nadále je případná kombinace těchto léčiv jednou z možností k dosažení efektivnější a dlouhodobější terapie u pacientů s přítomnou BRAF mutací.

BRAF mutované nádory indukují imunitní „únikové“ mechanismy

Řada studií naznačuje, že BRAF mutované nádory, včetně melanomu, vytvářejí únikové mechanismy vedoucí k tzv. „cold“ (chudému) imunitnímu nádorovému mikroprostředí, které není schopno vytvořit adekvátní protinádorovou odpověď. BRAF mutované melanomy mohou vytvořit imunosupresivní mikroprostředí, které brání prezentaci nádorových antigenů antigen prezentujícím buňkám, jako jsou dendritické buňky (DC) a makrofágy, a tak i následně stimulaci T-lymfocytů. Ho a jeho spolupracovníci zjistili, že v počátečních fázích BRAF mutovaných nádorů je snížena exprese IFN gama, TNF alfa, IL-2 a např. exprese CD40L na CD4⁺ nádor infiltrujících lymfocytech (TILs) (11). Signalizace CD40/CD40L a IFN gama jsou zásadní imunologické faktory, které mohou zlepšit diferenciaci DC a pomáhají posílit aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů (12). Navíc, nádor infiltrující dendritické buňky (TIDCs) izolované z BRAFV600E/PTEN melanomů nejsou schopny stimulovat proliferaci gp100-specifických (Pmel) CD8⁺ T-lymfocytů (11). V další řadě je snížena polarizace makrofágů M1 fenotypu, které produkují např. cytokiny IL-1 β , IL-12 a pomáhají vytvářet protinádorové mikroprostředí (11–13). Posílené makrofágy s M2 polarizací produkují IL-10 a VEGF a tlumí tak imunitní protinádoro-

vou odpověď (13). Další cestou ovlivnění imunitního systému je adekvátní exprese HLA molekul. MAP kinázová signalizace se ukázala jako dominantní regulátor exprese molekul HLA I. třídy. Bradley a jeho spolupracovníci prokázali, že BRAF mutované melanomy snižují expresi molekuly HLA I. třídy na svém buněčném povrchu prostřednictvím intracelulární posílené signalizace BRAF mutovanou kinázou (14). Celkově tyto výsledky ukazují, že konstitutivní upregulace signální dráhy MAP kinázy mutací genu BRAF může vést k pro-tumorigennímu mikroprostředí s potlačením protinádorové imunitní odpovědi.

Aktivace imunitního systému cílenou léčbou BRAF a MEK inhibitory

Vzhledem ke klinickým možnostem použití kombinované terapie BRAF a MEK inhibitory a po jejich selhání použití imunoterapie *checkpoint* inhibitory je důležité porozumět působení cílené terapie na nádorové imunitní mikroprostředí. BRAF a MEK inhibitory významně indukují protinádorovou imunitní reakci. BRAF inhibitory zvyšují expresi MHC molekul a indukují protinádorovou imunitní odpověď pomocí stimulace CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů (15). Situace u MEK inhibitorů je komplikovanější, jelikož jejich samotné podání posiluje spíše imunosupresivní účinky protinádorové imunitní reakce T-lymfocyty aktivací TCR receptoru a následně dochází k indukci apoptózy nádorově specifických T-lymfocytů. Tento imunosupresivní efekt lze blokovat např. použitím agonistů IL-15, který stimuluje T-lymfocyty pomocí aktivace PI3K kinázy (16). V *in vitro* modelování bylo navíc prokázáno, že MEK inhibitor trametinib může inhibovat funkci CD4⁺ T-lymfocytů, který lze blokovat použitím CD3/CD28 protilátek. Některé tyto poznatky nebyly ale potvrzeny v *in vivo* experimentech (17, 18). Obecně platí, že terapie BRAF a MEK inhibitory koreluje s infiltrací T-lymfocytů do nádorů a napomáhá vzniku nádor infiltrujících lymfocytů (TILs). Dostatečná infiltrace nádoru TILs je spojena s lepší terapeutickou odpovědí melanomu na *checkpoint* inhibitory. Zásadní musí být i dostatečná stimulace TILs nádorovými neoantigeny, která by v ideálním případě během cílené terapie BRAF a MEK inhibitory měla být dostatečná (díky rozpadu nádorových buněk). Na druhé straně může

docházet k navození ztrátě především nádorových CD8⁺ T-lymfocytů (snížení efektorové části TILs) a infiltraci nádoru nádorově asociovanými makrofágy (CAMs), což může vést k navození rezistence na imunoterapii u metastatického melanomu (19, 20). V klinických studiích s BRAF inhibitory nebyl prokázán vliv na ovlivnění sekrece prozánětlivých cytokinů (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10) a jejich koncentraci v séru oproti zdravým dárčům (21), ale dochází k významné aktivaci MAP kinázové signalizace pomocí zvýšené fosforylace ERK kinázy u BRAF nemutovaných buněk (BRAF^{wt}), včetně CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů. Tato patologická aktivace se může odrazit v neadekvátní (paradoxní) diferenciaci a proliferaci T-lymfocytů (22). Navzdory těmto znalostem, mechanismy, kterými cílená léčba BRAF a MEK inhibitory ovlivňují fenotyp, funkci T-lymfocytů a formování samotných TILs v nádoru, nejsou zcela ještě pochopeny.

Imunomodulační účinek cílené terapie

Poměrně zajímavý je imunomodulační efekt BRAF a MEK inhibitorů, který je popsán v některých preklinických, ale i klinických studiích. Tyto studie poukazují na nízkou infiltraci T-lymfocytů u BRAF V600E mutovaných melanomů. Navíc byla prokázána i vyšší hladina imunosupresivních faktorů, které se podílejí na ochraně nádorových melanocytů před aktivitou imunitního systému (23–25). Kombinovaná terapie BRAF a MEK inhibitory může navodit změny v imunologickém chování melanomu, které v důsledku vedou k překonání poměrně zásadní imunologické tolerance nádoru (26). Wilmott a jeho kolegové našli překvapivě vyšší zánětlivý infiltrát TILs v biopsiích z melanomů odebraných již po týdnu léčby BRAF inhibitory ve srovnání s původní biopsií ze stejných ložisek před zahájením terapie. Navíc byl prokázán

vyšší peritumorózní infiltrát CD8⁺ T-lymfocytů, který koreloval i s redukcí nádorové tkáně při terapii BRAF inhibitory (27). Redukce nádorové tkáně při cílené terapii je spojena s apoptózou a nekrózou nádorových buněk a následným uvolněním nádorových neoantigenů, které mohou účinně stimulovat funkce imunitního systému v protinádorové imunitní odpovědi. Vedle uvolnění antigenů, jako jsou Melan-A/MART-1, glykoprotein-100 (gp100), nebo protein související s tyrozinázou 1 a 2, dochází ke zvýšení sérových hladin cytokinů INF-gama, TNF-alfa a snížení hladiny imunosupresivních cytokinů a chemokinů IL-8 a IL-6 (26, 28). Tyto poznatky podporují předchozí znalosti o podpoře TILs v melanomu při cílené terapii a snahu k možné kombinaci imunoterapie a cílené terapie BRAF a MEK inhibitory u melanomu (20). Bohužel se ukazuje, že efekt stimulující imunitní systém při použití cílené terapie se s délkou léčby neprohlubuje, ale naopak snižuje. To ukazují práce srovnávající léčbu BRAF a MEK inhibitory, kde pacienti léčení kombinovanou cílenou terapií při progresi měli v biotických vzorcích nižší infiltrát CD8⁺ T-lymfocytů ve srovnání se vzorky pacientů léčených anti-PD-1 terapií (29). Jednoznačný mechanismus není přesně znám, ale zvažuje se role nedostatečné imunitní odpovědi v důsledku snížené exprese antigenů diferenciac melanocytů (tyrozináza, melan-A/MART-1 a CSPG4) (30). Je tedy zřejmé, že BRAF a MEK inhibitory významně modulují nádorové mikroprostředí melanomu, ale i samotné nádorové melanocyty. V důsledku cílené terapie tak dochází k významné změně fenotypu nádorových melanocytů a snížení exprese typických melanocytárních znaků diferenciac.

Tyto studie by mohly vést i k lepšímu načasování kombinace cílené terapie a imunoterapie s návazností na období největší imunitní aktivace. Možnost kombinace cí-

lené terapie a terapie *checkpoint* inhibitory podporuje i detekce vyšší exprese PD-L1 v melanomech po cílené terapii. Na druhé straně ale dochází k aktivaci signalizace c-Jun a STAT3, která se může podílet na imunitně zprostředkované rezistenci na terapii BRAF inhibitory (31, 32).

Závěr

I když se zdá, že imunoterapie *checkpoint* inhibitory je ideální formou léčby po selhání cílené terapie, jednoznačný efekt nemusí být vždy patrný, a především dostatečně predikovatelný. To je dáno horším celkovým stavem pacienta a často i vyšší mírou generalizace onemocnění po selhání jedné léčebné modality. Tyto poznatky a hypotézy lze opřít i o poslední výsledky studie CPDR (COMBI-I) s kombinací BRAF a MEK inhibitorů a terapie anti-PD-1 spartalizumabem, kde překvapivě nebylo potvrzeno signifikantního prodloužení PFS oproti kombinaci cílené terapie s placebem (10). Kriticky je nutné dodat, že samotný spartalizumab (na rozdíl od nivolumabu a pembrolizumabu) nebyl testován v monoterapii u metastazujícího melanomu a jeho efekt je tedy jen odhadován dle zkušeností s anti-PD-1 protilátkami v terapii melanomu. Určitou možností budoucí kombinované cílené léčby a imunoterapie nabízí provedení sekvenční terapie, která je např. využívána u antibiotické léčby k snížení vzniku antimikrobiální rezistence.

Práce je podpořena:

Centrum nádorové ekologie –

výzkum nádorového mikroprostředí v organismu podporujícího růst a šíření nádoru.

Registrační číslo:

CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000785.

LITERATURA

- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med*. [Internet]. 2011;364(26):2507-2516. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1103782>.
- Chapman PB, Robert C, Larkin J, et al. Vemurafenib in patients with BRAF V600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol*. 2017;28:2581-2587.
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9839):358-365.

- Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2020 Feb 29];71(23):7137-7140. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131348>.
- Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther*. [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 17];11:7095-7107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30410366>.
- Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, et al. Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melano-

- ma. *N Engl J Med*. 2019;381(7):626-636.
- Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, et al. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Feb 29];19(10):1315-1327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30219628>.
- Long GV, Grob JJ, Nathan P, et al. Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):1743-1754.

9. Long GV, Lebbe C, Atkinson V, et al. The anti-PD-1 antibody spartalizumab (S) in combination with dabrafenib (D) and trametinib (T) in previously untreated patients (pts) with advanced BRAF V600-mutant melanoma: Updated efficacy and safety from parts 1 and 2 of COMBI-i. *J Clin Oncol*. 2019;37(15_suppl):9531-9531.
10. Nathan P, Dummer R, Long GV, et al. Melanoma and other skin tumors LBA43 Spartalizumab plus dabrafenib and trametinib (Sparta-DabTram) in patients (pts) with previously untreated BRAF V600-mutant unresectable or metastatic melanoma: Results from the randomized part 3 of the phase III COMBI-i trial. 2020 [cited 2020 Nov 1]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jannonc.2020.08.2273>.
11. Ho PC, Meeth KM, Tsui YC, et al. Immune-based antitumor effects of BRAF inhibitors rely on signaling by CD40L and IFN γ . *Cancer Res*. 2014;74(12):3205-3217. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3461. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24736544; PMCID: PMC4063281.
12. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009;229(1):152-172. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x. PMID: 19426221; PMCID: PMC3826168.
13. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014;513(7519):559-563. doi: 10.1038/nature13490. Epub 2014 Jul 13. PMID: 25043024; PMCID: PMC4301845.
14. Bradley SD, Chen Z, Melendez B, et al. BRAFV600E Co-opts a Conserved MHC Class I Internalization Pathway to Diminish Antigen Presentation and CD8+ T-cell Recognition of Melanoma. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(6):602-609. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0030. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25795007; PMCID: PMC4457616.
15. Koya RC, Mok S, Otte N, et al. BRAF inhibitor vemurafenib improves the antitumor activity of adoptive cell immunotherapy. *Cancer Res [Internet]*. 2012 Aug 15 [cited 2023 Mar 19];72(16):3928-3937. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22693252/>.
16. Allegranza MJ, Rutkowski MR, Stephen TL, et al. IL15 Agonists Overcome the Immunosuppressive Effects of MEK Inhibitors. *Cancer Res [Internet]*. 2016 May 1 [cited 2023 Mar 19];76(9):2561-2572. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26980764/>.
17. Liu L, Mayes PA, Eastman S, et al. The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1639-51. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2339. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25589619.
18. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma. *Sci Transl Med*. 2015;7(279):279ra41. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4691. PMID: 25787767; PMCID: PMC4765379.
19. Hugo W, Shi H, Sun L, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell [Internet]*. 2015 Sep 10 [cited 2020 Feb 29];162(6):1271-1285. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26359985>.
20. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma. *Sci Transl Med [Internet]*. 2015 Mar 18 [cited 2023 Mar 19];7(279). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25787767/>.
21. Hong DS, Vence L, Falchook G, et al. BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency. *Clin Cancer Res*. 2012;18(8):2326-2335. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2515. Epub 2012 Feb 21. Erratum in: *Clin Cancer Res*. 2012 Jul 1;18(13):3715. PMID: 22355009.
22. Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, et al. Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(1):70-79. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0160. PMID: 24416731; PMCID: PMC3883307.
23. Ebert PJR, Cheung J, Yang Y, et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity [Internet]*. 2016 Mar 15 [cited 2020 Feb 29];44(3):609-621. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944201>.
24. Russo I, Miotto S, Saponeri A, et al. Ultra-low dose rituximab for refractory pemphigus vulgaris: a pilot study. *Expert Opin Biol Ther [Internet]*. 2020 Feb 6 [cited 2020 Feb 9];14712598.2020.1727440. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14712598.2020.1727440>.
25. Steinberg SM, Zhang P, Malik BT, et al. BRAF inhibition alleviates immune suppression in murine autochthonous melanoma. *Cancer Immunol Res [Internet]*. 2014 Nov 1 [cited 2020 Feb 29];2(11):1044-1050. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183499>.
26. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):1225-1231.
27. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2012 Mar 1 [cited 2020 Feb 29];18(5):1386-1394. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22156613>.
28. Wilmott JS, Haydu LE, Menzies AM, et al. Dynamics of chemokine, cytokine, and growth factor serum levels in BRAF-mutant melanoma patients during BRAF inhibitor treatment. *J Immunol [Internet]*. 2014 Mar 1 [cited 2020 Feb 29];192(5):2505-2513. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489105>.
29. Cooper ZA, Reuben A, Spencer CN, et al. Distinct clinical patterns and immune infiltrates are observed at time of progression on targeted therapy versus immune checkpoint blockade for melanoma. *Oncoimmunology*. 2016;5(3).
30. Pieper N, Zaremba A, Leonardelli S, et al. Evolution of melanoma cross-resistance to CD8+ T cells and MAPK inhibition in the course of BRAFi treatment. *Oncoimmunology [Internet]*. 2018 Aug 3 [cited 2020 Feb 29];7(8):e1450127. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30221038>.
31. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res*. 2013;19(3):598-609.
32. Liu L, Mayes PA, Eastman S, et al. The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2015 Apr 1 [cited 2023 Mar 19];21(7):1639-1651. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25589619/>.