

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

МЕХАНИЗМЫ СОПРОТИВЛЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ БЛОКАДЕ ИММУННЫХ СВЕРОЧНЫХ ТОЧЕК

*Вдовиченко Константин Константинович,
к.б.н., доцент**

*Гарбуз Людмила Ильинична,
к.б.н., доцент**

*Власов Вадим Вячеславович,
к.б.н., доцент**

*Насушная Инна Викторовна,
преподаватель**

*Васильчук Анастасия Валерьевна,
старший преподаватель**

** ПГУ им Т. Г. Шевченко, медицинский факультет,
каф Биологии и физиологии человека,
Приднестровье, г. Тирасполь*

MECHANISMS OF TUMORS RESISTANCE TO IMMUNE CHECKPOINT BLOCKADE

*Vdovichenko Konstantin Konstantinovich,
c.b.s., assistant professor**

*Garbuz Lyudmila Ilyinichna,
c.b.s., assistant professor**

*Vlasov Vadim Vyacheslavovich,
c.b.s., assistant professor**

*Nasushnaya Inna Victorovna,
lecturer**

*Vasilchuyk Anastasiya Valeriyevna,
senior lecturer**

** Tiraspol State University of Pridnestrovie named after T. G. Shevchenko,
Faculty of Medicine, Biology & Physiology Chair,
Tiraspol, Pridnestrovie*

Аннотация

«Блокада иммунных сверочных точек» (БИСТ) в лечении опухолей – это использование терапевтических антител, разрушающих отрицательные регуляторные иммунные каскады, и запускающих противоопухолевый иммунный ответ. Такие антитела были успешно апробированы в клинике, однако во многих случаях опухоли оказывались резистентными к блокаде. У клиницистов до сих пор мало инструментов, чтобы перед началом лечения определить: ответит или не ответит пациент на такую терапию. Новейшие научные исследования в онкологии могут дать ответ на этот вопрос. В обзоре описаны молекулярные механизмы резистентности и рассматриваются подходы по преодолению резистентности к блокаде в иммунных сверочных точках.

Abstract

«Immune checkpoint blockade» in tumors treatment implies therapeutic antibodies, destroying negative regulatory pathways and starting up the anti-tumor immune response. Such antibodies have been successfully tested in the clinic, but in many cases, tumors were resistant to the blockade. Clinicians still have a few tools before starting treatment to determine whether the patient will respond or not to such therapy. The latest scientific research in oncology can give the answer to this question. The review describes molecular mechanisms of resistance and approaches to overcome the latter to the blockade in the immune checkpoints.

Ключевые слова: БИСТ (блокада иммунных сверочных точек), сигнальные каскады в опухолях, иммунотерапия, регуляторные каскады, адаптивный перенос

Key words: ICB (immune checkpoint blockade), oncological signaling pathways, regulatory pathways, adoptive transfer

Опухолевая иммунотерапия – это стратегия лечения новообразований путём повышения цитотоксического потенциала иммунной системы человека, а в особенности опухоль-специфичных цитотоксических Т-клеток. Среди различных типов опухолевой иммунотерапии блокада иммунных

сверочных точек получила наибольшее распространение для лечения ряда опухолей. Разработаны несколько антител, атакующих CTLA4 (антиген цитотоксических Т-лимфоцитов), PD1 и PD-L1. Активация CTLA4, PD1 и PD-L1 блокирует развитие иммунного ответа, поэтому

антитела, которые препятствуют активации данных молекул (т.е. осуществляют блокаду иммунных сверочных точек), не дают возможности опухоли заблокировать цитотоксический иммунный ответ.

Большое количество антител и малых молекул, нацеленных на другие возможные иммунные сверочные точки (такие как LAG3, TIGIT, TIM3, V7H3, CD39, CD73 и рецептор к аденозину A2A) и разрушающих отрицательное регулирование между опухолевыми и Т-клетками, или миелоидными и Т-клетками, находится в стадии клинических и преклинических испытаний.

Пациент и его возраст, пол, HLA-генотип и генетический полиморфизм, а также строма опухоли (иммунная система хозяина и ассоциированная с опухолью строма), и средовые факторы (микробиота кишечника) влияют на результат БИСТ (блокады иммунных сверочных точек) [1, с. 582; 2, с. 109]. Однако характеристики опухолевой клетки (факторы, характеризующие свойства опухоли) – её генетический, транскрипционный или функциональный профиль – являются основными определяющими факторами ответа опухоли или её резистентности. Значимость характеристик опухоли отражается в широкой вариации ответа на БИСТ у разных гистологических типов и в ответе опухолей с одинаковыми молекулярными и генетическими показателями (например, микросателлитной нестабильностью). От таких внутренних характеристик опухоли зависит, как факторы, внешние по отношению к опухоли (иммунная система хозяина и опухоль-ассоциированная строма) будут влиять на резистентность к терапии.

Внутренние механизмы опухолевой резистентности

Факторы, определяющие индукцию и поддержание естественного противоопухолевого Т-клеточного ответа, довольно сложны. Характеристики, присущие самим опухолевым клеткам, такие как спектр мутаций, функционирование интерферонового сигнального каскада, экспрессия антиген-презентирующих молекул и сигнальные пути обхода иммунитета – влияют на подготовку (прайминг), активацию и привлечение Т-клеток к опухоли, а эти Т-клетки необходимы для иммунного ответа в контексте БИСТ. Резистентность к БИСТ может быть следствием нарушения в любой из перечисленных ключевых характеристик опухоли, либо возникать из-за отсутствия противоопухолевого иммунного ответа или ослаблением уже запустившегося противоопухолевого ответа.

Недостаточность «антигенности» опухоли

Опухолевые неоантигены могут служить эффективными мишенями для противоопухолевого иммунитета. Была найдена корреляция между грузом мутаций и ответом на БИСТ во множестве злокачественных новообразований [3, с. 124; 4, с. 2189]. У пациента, давшего ответ на анти-CTLA4

БИСТ, Т-клетки, специфичные к определенным опухолевым неоантигенам, находились в опухолевом микроокружении, и размножились в ответ на анти-CTLA4 терапию [5, с. e440]. Рабочие неоантиген-специфичные Т-клетки обнаруживаются в опухолевом микроокружении даже в отсутствие БИСТ. У пациента с метастазирующей холангиокарциномой, среди инфильтрировавших опухоль лимфоцитов была выявлена популяция CD4⁺ Т-клеток, специфичных к опухолевому неоантигену. С помощью полногеномного секвенирования было доказано, что инфильтрировавшие опухоль лимфоциты (ИОЛ) содержали CD4⁺ Т-хелперные 1 (Т(Н)1) клетки, распознавшие мутацию в белке, взаимодействующем с *erbb2* (ERBB2IP), экспрессируемом опухолью. Адоптивный перенос (собственные Т-клетки пациента, модифицированные и размноженные *ex vivo* и затем введенные назад пациенту) опухолевых инфильтрировавших лимфоцитов (ОИЛ), содержащих порядка 25% специфических к данной мутации полифункциональных Т(Н)1 клеток, замедлил у пациента прогрессию опухоли и дал длительную стабилизацию болезни. При прогрессировании болезни пациенту обратно ввели его же клетки, при этом популяция клеток содержала уже более 95% реактивных на мутацию Т(Н)1 клеток. У пациента наблюдали регрессию опухоли. Данные результаты доказывают, что CD4⁺ Т-клетки, отвечающие на мутированный антиген, можно использовать для лечения метастатического эпителиального рака [6, с. 641]. Неоантигены являются ключевыми опухолевыми иммуногенами. Получены убедительные результаты исследований вакцин, основанных на опухолевых неоантигенах [7, с. 548]. У пациентов с микросателлитной нестабильностью, вызванной дефектами в репарации неспаренных оснований, наблюдается повышенный ответ на БИСТ, что ещё раз подтверждает роль неоантигенов в противоопухолевом иммунном ответе. И, наоборот, опухоли со слабой антигенностью менее чувствительны к БИСТ (*пояснение: даже при полной свободе Т-клеток против опухоли они мало что могут сделать, если опухоль имеет мало отличительных меток*).

Опухолевый интерферон-γ сигнальный каскадный путь

Продуктивный Т-клеточный ответ против опухолевого антигена приводит к экспрессии интерферона-γ (IFNγ) опухолевым микроокружением, а это ведёт к активации JAK–STAT сигнального пути, который индуцирует экспрессию лиганда к PD1 (PD-L1). Нарушение интерферон-γ сигнального каскада в опухолевой клетке предотвращает индукцию экспрессии PD-L1 и таким образом делает блокаду PD1–PD-L1 неэффективной (рис. 1).

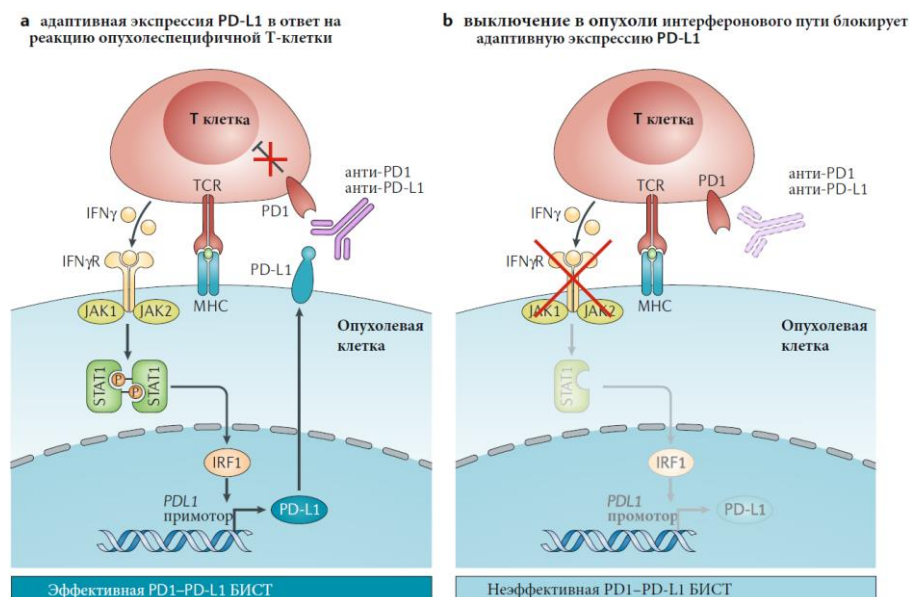


Рис. 1. Интерфероновый сигнальный каскад в экспрессии PD-L1.

а – нормальный противоопухолевый иммунный ответ важен для эффективной блокады иммунных сверочных точек. Опухоль-реактивные Т-клетки, распознающие опухолевые антигены, в контексте МНС I или II, высвобождают интерферон- γ ($IFN\gamma$), что приводит к активации JAK – STAT сигнального каскада. При этом активируется транскрипционный фактор IRF1 (interferon regulatory factor 1), который, в свою очередь, активирует транскрипцию гена PDL1, кодирующего лиганд к PD-1, чем вызывается адаптивная экспрессия данного лиганда (PD- L1) на поверхности опухолевой клетки, а это, в свою очередь, ослабляет противоопухолевый Т-клеточный ответ. Антитела против PD1 или PD- L1 разрушают петлю такой отрицательной обратной связи и восстанавливают противоопухолевый иммунитет.

б – сходный сценарий, в котором опухоль-специфичные Т-клетки контактируют с антигеном в контексте МНС, что приводит к высвобождению $IFN\gamma$. Однако в данном случае интерфероновый сигнал не передаётся в ядро опухолевой клетки вследствие повреждения этого каскада (например, из-за потери функции JAK1 или JAK2), и адаптивной экспрессии PD- L1 не происходит, из-за чего ИСТ будет неэффективна.

$IFN\gamma R$ - $IFN\gamma$ receptor; TCR - T cell receptor.

Давно известно, что нарушение $IFN\gamma$ -сигнального каскада – это механизм резистентности не только к ИСТ, но и более широкой резистентности к противоопухолевому иммунитету. Опухолевые клетки были взяты от мышей и модифицированы по экспрессии $IFN\gamma$ -рецептора (на его доминантно-негативную форму). Когда эти клетки привили к опухолям мышей, у которых уже развился противоопухолевый иммунитет (вследствие назначения им соответствующих доз липополисахарида), модифицированные клетки показали резистентность к ранее развившемуся иммунитету [8, с. 447]. В другой работе спонтанные опухоли, возникшие у мышей с отсутствующим $IFN\gamma$ -рецептором, были реимплантированы иммунокомпетентным и иммунодефицитным мышам, данные опухоли росли с одинаковой кинетикой. Однако, восстановление функции $IFN\gamma$ -рецепторов этих опухолей вызывало их подавление у иммунокомпетентных (но не иммунодефицитных) мышей, что подтверждает критическую роль опухолевого $IFN\gamma$ -сигнального каскада в подавлении её иммунитетом [9, с. 7556].

Белки, участвующие в передаче сигнала в интерфероновом ($IFN\gamma$) каскаде, были

идентифицированы с помощью CRISPR-скрининга, выявляющего гены, наиболее значимые для появления резистентности к иммунотерапии. В одном из исследований [10, с. 414] были сконструированы РНК (guide RNA) к 2 368 генам. Эти РНК вводили в клетки линии мышиной меланомы (B16), в которых белок Cas9 был экспрессирован, что необходимо для работы системы CRISPR/Cas9. Эти опухоли имплантировали мышам «дикого типа», которым затем давали анти-PD1 антитела и GVAX (вакцина, состоящая из облучённых модифицированных опухолевых клеток, экспрессирующих в повышенных количествах гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор (GM-CSF)). А также имплантировали мышам с отсутствующим локусом (в ДНК) α -цепи Т-клеточного рецептора. Гены, кодирующие белки, вовлечённые в сигнальный путь от $IFN\gamma$ -рецептора, включая *Jak1*, *Stat1*, *Ifngr1*, *Ifngr2* и *Jak2*, экспрессировались в повышенных количествах в опухолях мышей «дикого типа». Также был идентифицирован *Ptpn2* (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2) – ген, кодирующий белок, снижающий чувствительность $IFN\gamma$ -рецептора (запускающего каскад), то есть

являющийся посредником в резистентности к анти-PD1 антителу и GVAX. В параллельном исследовании, CRISPR-скрининг был выполнен на линии меланомы человека *in vitro*, кокультивируемой с Т-клетками, спроектированными для экспрессии специфичного к опухолевому антигену Т-клеточного рецептора (TCR) [11, с. 538]. И вновь, IFN γ -сигнальный каскад оказался очень активным в резистентных опухолевых клетках, при этом в них наблюдалась высокая транскрипционная активность генов *JAK1* и *STAT1*, а также гена *APLNR*, кодирующего недавно идентифицированный регулятор интерфероновой передачи сигнала, известный как рецептор апелина (apelin receptor). *APLNR* повышает чувствительность опухолевых клеток к IFN γ за счет взаимодействия с *JAK1*.

В третьем скрининге, проведенном с помощью системы CRISPR, клетки мышиной меланомы культивировались в течение 3 дней совместно с опухоль-специфичными Т-клетками [12, с. 770]. И вновь в резистентных опухолевых клетках уровень транскрипции генов, вовлеченных в передачу сигнала от IFN γ -рецептора, был значительно выше по сравнению с опухолевыми клетками, которые совместно культивировались с неспецифическими Т-клетками; транскрипция *Ptprn2* также была повышенной. В данном исследовании была использована клеточная линия мышиной меланомы B16, предварительно обработанная IFN γ для повышения экспрессии МНС I, что, возможно, могло исказить результаты в сторону повышения активности IFN γ -сигнального пути. Вдобавок к IFN γ -рецепторной сигнализации, обнаружено, что компоненты хроматинового регулятора PBAF (форма SWI/SNF-комплекса ремоделинга хроматина, содержащая уникальные субъединицы ARID2, PBRM1 и BRD7) подавляют экспрессию генов в ответ на IFN γ и таким образом способствуют резистентности опухолевых клеток к уничтожению Т-клетками. Генетическое удаление этих компонентов из клеток B16 приводило к повышению противоопухолевой эффективности анти-PD1 и анти-CTLA4 БИСТ *in vivo*.

Исследования подтверждают биологическую значимость мутаций, приводящих к потере функции в генах *JAK1* and *JAK2*, наблюдаемых у пациентов с меланомой, у которых после успешной анти-PD1-терапии возникли рецидивы [13, с. 819-820]. В данном случае потеря адаптивной экспрессии PD-L1 на самих опухолевых клетках (что снимает необходимость анти-PD1 терапии) не объясняет приобретенную резистентность к противоопухолевому иммунитету. Скорее, что потеря передачи сигнала от IFN γ -рецептора позволяет опухоли избежать функций противоопухолевых эффекторов иммунной системы. Сходные свойства мутаций в IFN γ -задействованных генах наблюдались у пациентов, не давших ответа на анти-CTLA4 БИСТ [14, с. 397].

В отличие от роли IFN γ -рецепторного сигнального пути в снижении иммуногенности опухолей, длительная работа этого сигнального пути в опухолевых клетках может вызывать резистентность к БИСТ. Это предположение основано на свойствах противовирусного иммунитета: длительная работа интерферонового сигнального пути типа I пагубно сказывается на контроле (сдерживании) вируса [15, с. 202]. В работе [16, с. 1541] было показано, что длительное воздействие на клетки мышиной меланомы как *in vitro*, так и *in vivo*, приводит к адаптивной резистентности к БИСТ по PD-L1-независимому механизму путем увеличения (т.е. на клеточной поверхности их становится больше) других ингибирующих Т-клетки рецепторов за счёт эпигенетических и транскриптомных изменений, относящихся к IFN γ -сигнальному пути, в частности, к *STAT1*. До сих пор не до конца ясно, какая именно из функций IFN γ -сигнального пути наиболее важна для успешной БИСТ. Одним из эффектов IFN γ -сигнального пути является антипролиферативный эффект [17, с. 563], который приводит к координированной экспрессии антиген-процессирующего комплекса и поверхностных молекул МНС I и II, а также синтезу хемоаттрактантов CXCL9 и CXCL10 (рис. 2а).

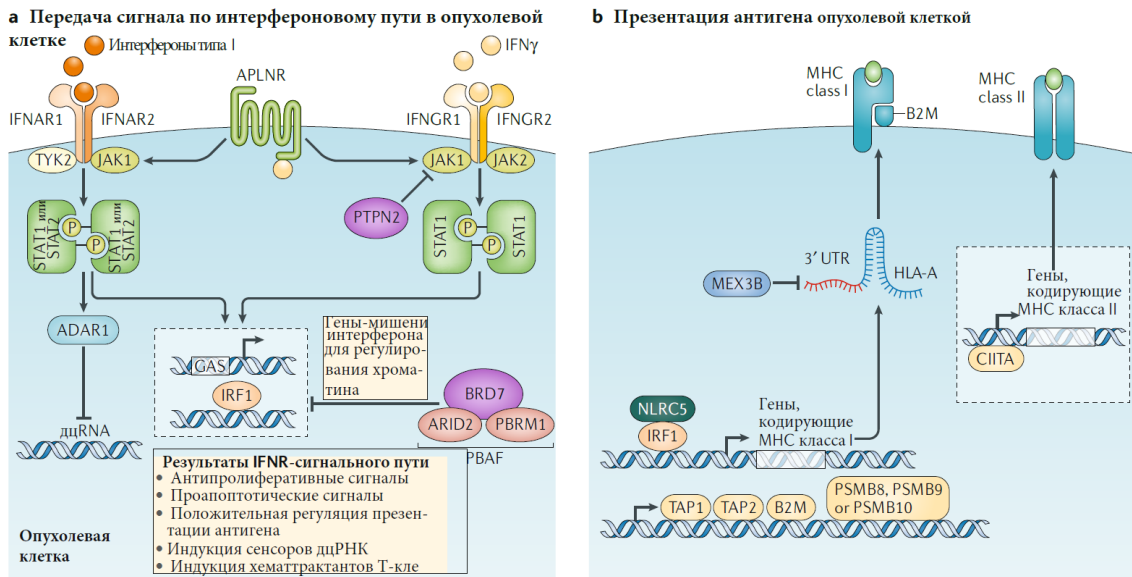


Рис. 2. Механизм возникновения резистентности к БИСТ в опухоли.

a – основанный на CRISPR скрининг выявил критическую роль интерфероновой сигнализации в опухоли в ответ на БИСТ и основанную на Т-клетках иммунотерапию. В этих исследованиях были выявлены компоненты интерферон- γ (IFN γ) и интерферон первого типа сигнальных путей, такие как JAK1, JAK2, STAT1 и IFN γ -рецептор 1 (IFNGR1) и IFNGR2. Эти компоненты играют наиважнейшую роль в том, будет ли блокада иммунных сверхочных точек успешной или нет. Также была определена роль в ответе на БИСТ менее известных регуляторов, включая апелиновый рецептор (APLNR), регулирующий чувствительность к IFN γ и интерферону первого типа; тирозин-протеинфосфатаза нерецепторного типа 2 (tyrosine- protein phosphatase non- receptor type 2, PTPN2), модулирующая чувствительность к IFN γ ; BRD7 и ДНК-связывающие субъединицы ARID2 и PBRM1, являющиеся частью комплекса ремоделинга хроматина PBAF, вовлеченного в регулирование экспрессии генов-мишеней IFN γ ; а также специфичная к дцРНК аденозиндезаминаза (ADAR1), отрицательно регулирующая уровень дцРНК в клетке. Сигнальные каскады интерферона первого типа и IFN γ сходятся на сайте активации IFN γ – GAS (регуляторный участок в ДНК) и ведут к активации транскрипционных регуляторов, таких как фактор регулирования интерферона 1 (IRF1), что и даёт основные результаты работы данных сигнальных путей.

b – во многих исследованиях было показано, что независимые от интерферона дефекты в презентации антигена также ведут к уходу от иммунного ответа и резистентности к БИСТ. Такие дефекты встречаются в локусе HLA или в $\beta 2$ -микроглобулине – компоненте комплекса МНС I. Другие дефекты затрагивают аппарат процессинга антигена, а именно его компоненты: мембранные транспортные белки TAP1 и TAP2, субъединицы иммунопротеасомы PSMB8, PSMB9, PSMB10; либо же повреждается регулировка транскрипции генов МНС I (например, из-за нарушений в цитоплазматическом белке NLRC5). Экспрессия МНС первого класса регулируется и на посттранскрипционном уровне. РНК-связывающий белок MEX3B взаимодействует с транскриптами HLA- A, что приводит к деградации этих транскриптов и, соответственно, снижению экспрессии молекул МНС I. Было найдено, что количество белка MEX3B повышено у пациентов с меланомой, не давших ответа на БИСТ. Повышенная МНС II-зависимая презентация антигена на опухолевых клетках ассоциирована с улучшенным ответом на БИСТ, но в случаях резистентности к иммунной блокаде были обнаружены генетические дефекты в генах МНС II, либо же в гене транскрипционного активатора МНС II – CIITA.

Клетки меланомы человека, имеющие дефекты в IFN γ -сигнальном пути, не чувствительны к антипролиферативному эффекту интерферона, и не усиливают экспрессию молекул МНС I [18, с. 15440].

Потеря МНС в опухолевых клетках

Опухолевые клетки способны избежать уничтожения Т-клетками путём снижения экспрессии поверхностных комплексов МНС (главного комплекса гистосовместимости). Взаимодействие опухолевых антигенов происходит в основном по МНС I-зависимому пути, дефекты в этом пути наблюдаются чаще, чем при взаимодействии антигена с помощью МНС II.

Тем не менее, предполагают, что экспрессия МНС класса II на клетках меланомы может быть биомаркером ответа на анти-PD1 терапию. Наиболее важным следствием передачи сигнала от IFN γ в противоопухолевом иммунитете можно считать индукцию или усиление ответа на антиген с помощью МНС I. В данном процессе требуется координированная экспрессия ряда генов, включая TAP1, TAP2, B2M, а также генов иммунопротеасомы PSMB8, PSMB9 и PSMB10 (рис. 2b). На поверхности опухолевых клеток, потерявших способность передавать сигнал от интерферона, может оказаться мало или не оказаться вовсе антиген-взаимодействующих

комплексов МНС класса I (из-за снижения или прекращения синтеза самих молекул МНС), что делает возможным уход от иммунного ответа. Так, в работе [19, с. 1107] было показано, что при стабильной трансфекции опухолевых клеток, дефицитных по $IFN\gamma$, геном *TAP1* (*Antigen peptide transporter 1*), у мышей «дикого типа» наблюдалось подавление опухоли, но не у мышей, дефицитных по Т-клеткам (*Rag2^{-/-}*). Так, для некоторых дефицитных по МНС I опухолевых клеток требуется их предварительная обработка $IFN\gamma$ для координированной экспрессии аппарата процессинга антигена и комплекса «МНС class I-пептид» [20, с. 265]. Дефекты процессинга антигена нарушают экспрессию на поверхности клетки МНС I, даже если в сигнальном каскаде $IFN\gamma$ нет нарушений.

Резистентны к иммунотерапии опухоли не только с такими мутациями. Данные мутации могут являться результатом селективного давления иммунной системы. Так, например, было сообщено [21, с. 100], что у пациентов с меланомой, получавших иммунотерапию, иногда теряется экспрессия $\beta 2$ -микроглобулина (ген *B2M*; и таким образом, теряется экспрессия МНС I). В образцах продольной биопсии от другого пациента с метастазирующей меланомой был обнаружен приобретенный дефицит МНС I вследствие потери функции гена *B2M*, при этом данному пациенту иммунотерапия не проводилась [22, с. 6593]. Недавно проведенный численный подсчет количества копий HLA (лейкоцитарный антиген человека) позволил исследователям установить степень клональной и субклональной потери гетерозиготности в локусе HLA. Часто параллельная субклональная и фокальная потеря гетерозиготности HLA, особенно часто встречающаяся в метастазах, говорит о иммунологическом давлении в этих опухолях даже без применения иммунотерапии [23, с. 1259]. Сходная связь между иммунологическим давлением и генетическими изменениями антигена наблюдалась у пациентов с колоректальными опухолями, имеющими микросателлитную нестабильность. Такие опухоли высоко иммуногенны [24, с. 730].

Было сообщено о некоторых случаях приобретенной резистентности к БИСТ вследствие мутаций в генах, кодирующих этапы процессинга антигена, в частности, мутаций в гене *B2M* [13, с. 819]. Более того, при потере гетерозиготности в *B2M*-локусе наблюдалась меньшая общая выживаемость в двух независимых группах пациентов, получавших лечение БИСТ.

Были идентифицированы новые гены, регулирующие ответ на антиген. Например, при *in vitro* скрининге на усиление функции киназы (совокупности киназ) было выявлено, что ген *MEX3B*, кодирующий посттранскрипционный негативный регулятор HLA-A, позволяет клеткам меланомы избегать опухоль-специфичных Т-клеток (рис. 2b). Примечательно, что наблюдалось повышение экспрессии *MEX3B* в группе пациентов,

не давших ответа на анти-PD1 терапию [25, с. 3369].

Регуляция онкогенных сигнальных путей

Онкогенные сигнальные пути вносят важный вклад в иммунность опухолей на всех стадиях развития опухоли, включая инициацию опухоли, рост, инвазию и метастазирование. Остановимся на нескольких таких каскадах.

WNT- β -катенин сигнальный каскад – это эволюционно консервативный путь передачи сигнала, вовлеченный в широкий круг процессов, включая онкогенез и эмбриогенез. В каноническом WNT- β -катенин сигнальном каскаде передача сигнала начинается со связывания белков из семейства WNT с рецепторами на клеточной поверхности, активирующимися и передающим сигнал далее, что приводит к транслокации в ядро β -катенина и транскрипционной активации генов-мишеней. Оказалось, что данный сигнальный каскад является онкогенным, он препятствует инициации *de novo* противоопухолевого иммунного ответа. Такое заключение появилось на основании наблюдений, показавших что треть образцов меланом с активным WNT- β -катенин сигнальным каскадом имеет недостаточную инфильтрацию Т-клетками. Клеточные линии меланомы с активным WNT- β -катенин сигнальным каскадом синтезируют иммуносуппрессирующие цитокины, такие как IL-10 [26, с. 2110]. Также было показано, что работа данного сигнального каскада приводит к предотвращению первичного контакта коммитированного лимфоцита с антигеном в противоопухолевом ответе из-за того, что не происходит привлечения дендритных клеток, экспрессирующих BATF3 (basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3). В других исследованиях было показано, что растворимый WNT-агонист – WNT5A, происходящий из клеток меланомы, активирует передачу сигнала от β -катенина в дендритных клетках, что ведёт к метаболическому сдвигу: окислительному фосфорилированию и окислению жирных кислот, отмеченному активностью индоламин 2,3-диоксигеназы 1 (IDO1) и активаторного рецептора пролиферации пероксисом γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR γ), что приводит к иммуносупрессии. Так, в частности, конверсия триптофана в кинуренин катализируется IDO1, а ген этого фермента является транскрипционной мишенью в иницируемой WNT5A передаче сигнала. Такой метаболический сдвиг способствует развитию регуляторных (т.е. ослабляющих иммунный ответ) Т-клеток, и в то же время супрессии активности эффекторных Т-клеток. Ингибирование этого метаболического сдвига повышает эффективность анти-PD1 иммунотерапии *Braf^{V600E}/Pten^{-/-}*-мышью меланомы [27, с. 147].

В ряде работ по изучению нескольких разных типов рака была обнаружена связь между усилением передачи сигнала в WNT- β -катенин каскаде и отсутствием инфильтрации в опухоль иммунных клеток. В результате опухоли хуже

отвечают на БИСТ (они называются иммунологически холодными опухолями). Сюда же можно отнести исследование, интегрирующее геномные, транскриптомные и иммуногистохимические данные по образцам колоректальных опухолей в рамках проекта Опухолевый Геномный Атлас [24], а также другие исследования по иммунологически холодным опухолям яичников, опухолей головы-шеи, мочевого пузыря и аденоидной кистозной карциномы [28, с. 927; 29, с. 679; 30, с. 632; 31, с. 563]. В другой работе обнаружили, что уровень серин/треониновой протеинкиназы PAK4 – медиатора в передаче сигнала по WNT-каскаду – повышен в иммунологически холодных опухолях у пациентов с меланомой, не отвечающей на анти-PD1 БИСТ. На многих мышинных моделях было показано, что генетическое удаление или фармакологическое ингибирование PAK4 приводит к отмене резистентности к анти-PD1 терапии [32].

CDK4–CDK6 и клеточный цикл

Доказательства связи между регулировкой клеточного цикла и онкогенной трансформацией были получены из наблюдений за вирусной трансформацией, ведущей к интеграции вируса в генетический локус циклина А, связыванию аденовирусного онкогена E1A с циклином А и повышению экспрессии D-циклинов в паратиреоидных опухолях [33, с. 1071]. Циклинзависимые киназы CDK4 и CDK6 играют особую роль в онкогенезе, поскольку совместно с D-циклинами они способствуют прогрессии клеточного цикла и переходу из фазы G1 в фазу S. Через десять лет после их открытия Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) был одобрен первый ингибитор CDK4/CDK6 – *пальбоциклиб* (palbociclib). Начиная с 2017 года, по меньшей мере, четыре исследования подтвердили влияние CDK4/CDK6-ингибирования на противоопухолевый иммунитет. Например, было показано, что CDK4/CDK6-ингибитор *абемациклиб* (abemaciclib) в комбинации с анти-PD-L1 терапией показал более сильный противоопухолевый эффект на мышинной модели опухоли молочной железы, чем агенты по отдельности. Это наблюдение было связано с повышением количества двухцепочечной РНК (дцРНК) и чувствительности к ней в опухолевых клетках в результате снижения уровня ДНК-метилтрансферазы в ответ на лекарство. Опухолевые клетки распознают сигналы опасности, такие как дцРНК, благодаря экспрессии специфических рецепторов. Активация этих рецепторов усиливает экспрессию противовоспалительных генов, включая гены, кодирующие интерфероны и антигены. В другом исследовании [34, с. 216] Т-клеток человека *in vivo* культурах, а также спонтанных и ксенографтовых мышинных моделей опухолей было показано, что комбинация пальбоциклиба или трилациклиба (trilaciclib) с анти-PD1 блокадой оказала более сильный эффект, чем применение

агентов по отдельности. Эффекты ингибирования CDK4/CDK6 на противоопухолевую иммунность были связаны с их прямым влиянием на Т-клетки, что определяло более высокую выработку ими IL-2 и усиление инфильтрации в опухоль, несмотря на снижение их пролиферативной активности.

В работе по изучению транскриптома единичной клетки из образцов меланомы от пациентов, получавших лечение БИСТ [35, с. 984], была выявлена схема (*программа*, см. далее) резистентности с участием CDK4/CDK6. При сравнении результатов секвенирования тотальных препаратов РНК в рамках проекта Опухолевый геномный атлас (группа меланомы), а также профилей экспрессии опухолей, связанных с исключением Т-клеток (т.е. в которые не происходило их инфильтрации) было обнаружен набор генов, экспрессия которых повышалась при резистентности опухолей к БИСТ. Авторы данного исследования назвали этот набор генов *программой резистентности*. В результате фармакологического скрининга клеточных линий, экспрессирующих программу резистентности, было обнаружено, что такие линии чувствительны к CDK4/CDK6-ингибиторам. Более того, в ранее опубликованных данных по изучению влияния ингибирования CDK4/CDK6 на клетки опухоли молочной железы в мышинных моделях была показана репрессия программы резистентности в ответ на такое ингибирование. CDK4/CDK6 работают через фосфорилирование белка ретинобластомы 1 (RB1) (онкосупрессора), и таким образом, ингибирование этих киназ давало репрессию в двух клеточных линиях меланомы с нормальным RB1, но не в линии с дефектным RB1.

MAPK сигнальный каскад помогает опухоли избегать иммунного ответа благодаря повышению экспрессии иммунорегуляторных (т. е. ослабляющих иммунный ответ) цитокинов – интерлейкина 6 и 10 (IL-6, IL-10) [36, с. 1651]. Влияние данного сигнального пути на иммунологический статус опухоли особенно сильное для меланом, где примерно половина опухолей несёт мутации в гене BRAF (участник передачи сигнала в MAPK-каскаде). В таких опухолях БИСТ является терапией первой линии. Вемурафениб (vemurafenib) – ингибитор мутантного BRAF, повышает восприимчивость клеток меланомы к цитотоксическому эффекту Т-клеток, не задевая при этом пролиферативную активность самих Т-клеток [37, с. 5213]. Такое повышение восприимчивости можно объяснить увеличением экспрессии молекул MHC I и антигенов дифференцировки в меланоме [38, с. 1225]. Вемурафениб также останавливает прогрессию клеточного цикла путём кооперативной передачи сигнала через IFN γ -рецептор и рецептор фактора некроза опухолей в присутствии активирующей мутации *BRAF(V600E)* [39, с. 37]. Для подтверждения этого использовали CRISPR-скрининг опухолевых клеток линии B16, культивированных совместно с опухоль-специфичными Т-клетками (как описано ранее).

При этом оказалось, что в резистентных опухолевых клетках инактивировались негативные регуляторы MAPK-каскада. В отдельной работе секвенировали тотальную РНК, полученную из образцов опухолей пациентов с меланомой, которых лечили PD1-БИСТ. При этом генный набор от пациентов, которые не отвечали на данную терапию, совмещался с набором, ассоциированным с резистентностью к MAPK-ингибиторам [40, с. 35]. Однако эти данные нужно воспринимать с осторожностью, поскольку они не подтверждены исследованиями транскриптома опухолей от пациентов с меланомой, леченных БИСТ [35]. Ингибирование BRAF нарушает экспрессию иммуносупрессивных факторов в опухоли. Например, опухоли с мутацией *BRAF(V600E)* показали повышение экспрессии цитокинов IL-6 и IL-10, VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), что дало иммуносупрессивный эффект, отчасти из-за их влияния на функцию дендритных клеток (как и в случае синтеза IL-12 и фактора некроза опухолей) [36, с. 1654].

Разработка комбинированных схем терапии с использованием БИСТ и ингибиторов мутантного BRAF (вемурафениб) пока застопорилась из-за угрозы токсичности, поскольку происходит парадоксальная активация MAPK-пути в клетках с диким типом BRAF. Поэтому усилия направлены на использование ингибиторов MEK (MAPK/extracellular signal-regulated kinase), которые блокируют MAPK-каскад как в клетках с мутантным *BRAF(V600E)*, так и в клетках с BRAF дикого типа; либо на использование комбинации ингибиторов MEK и BRAF. При использовании клеточной линии CT26 (мышинная опухоль кишечника) в качестве модели, анти-PD1 терапия в комбинации с ингибиторами MEK дала долговременный эффект контроля опухоли: ингибиторы не влияли на функцию CD8-клеток, но способствовали выживанию эффекторных антиген-специфичных Т-лимфоцитов, инфильтрировавших опухоль [41, с. 609]. Сходным образом комбинация ингибиторов MEK и BRAF повышала эффективность как адоптивной Т-клеточной терапии, так и анти-PD1 блокады (БИСТ) [42, с. 279га41]. Недавно были опубликованы три исследования по одновременному применению ингибиторов MAPK-каскада и БИСТ [43, с. 936; 44, с. 941, 45, с. 929]. В двух работах использовали *дабрафениб* (dabrafenib, ингибитор BRAF), *траметиниб* (trametinib, ингибитор MEK) и анти-PD1 антитело *пембролизумаб* (pembrolizumab), в обоих случаях наблюдались (63% и 73%) сильные (третьей степени и выше) побочные эффекты: лихорадка, повышенный уровень трансаминазы и сыпь. Один пациент умер от пневмонии [44, с. 941]. Третье исследование включало группу пациентов, получавших комбинацию *кобиметиниба* (cobimetinib, ингибитор MEK), вемурафениба и анти-PD-L1 антитела *атезолизумаб* (atezolizumab), при этом 72% пациентов дали одинаковый ответ. Вводная терапия кобиметинибом и вемурафенибом

привела к относительному повышению количества пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток.

Потеря функции опухолевого супрессора PTEN

Хотя роль онкосупрессоров в онкогенезе была описана довольно давно, открытие потери функции *PTEN* как частой причины онкогенеза, было сделано лишь в конце 20-го столетия [46, с. 1943]. В одном из исследований была тщательно проанализирована роль дисфункции *PTEN* (данный ген был удалён) в меланоме человека и аналогичной мышинной меланоме в отношении эффективности иммунотерапии Т-клетками [47, с. 202]. В отсутствие *PTEN* опухолевые клетки были более устойчивы к цитотоксическим опухолю-специфичным Т-лимфоцитам как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом экспрессия *PTEN* (то есть при его нормальной функции) коррелировала с ответом на анти-PD1 терапию, с более высоким выходом культивировавшихся *ex vivo* инфильтрировавших опухоль лимфоцитов от пациента. В других исследованиях наблюдались сходные эффекты, вызванные потерей функции *PTEN*. Так, при исследовании данных, полученных в ходе секвенирования РНК из образцов саркомы мягких тканей, было выявлено снижение экспрессии генов, связанных с инфильтрацией Т-клеток и их цитолитической активностью (таких как гены, кодирующие CD8 α и гранзим В) в опухолях с делетированным *PTEN*. Более того, у пациента с недостаточной реакцией на анти-PD1 БИСТ в той части опухоли, которая не отвечала на терапию, было выявлено отсутствие *PTEN* [48, с. 197], что предполагает роль дисфункционального (делетированного) *PTEN* в развитии резистентности к данной терапии. *PTEN* усиливает передачу сигнала от интерферона типа I в ответ на вирусный стимул, облегчая перенос в ядро интерферон-регуляторного фактора 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3), а также в ответ на активацию рецепторов распознавания паттернов (РРП) ДНК-вирусами, РНК-вирусами, полиинозил:полицитидиловыми кислотами и полисахаридами [49, с. 241]. Такое свойство *PTEN* можно использовать в будущем для разработки лекарств, направленных на РРП для преодоления резистентности к БИСТ.

Ингибирование фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) было предложено в качестве терапевтического подхода для усиления противоопухолевого иммунитета, поскольку PI3K негативно регулируется *PTEN* угнетая киназу. В опухолях киназа чаще всего неправильно регулируется. Однако, в опухолях (PI3K α и PI3K β) и иммунных клетках (PI3K δ и PI3K γ) активны разные изоформы. Ингибирование изоформ PI3K, преобладающих в опухолях, сдерживает рост опухоли. Активация PI3K γ в макрофагах активизирует иммуносупрессивную транскрипционную программу, которая препятствует противоопухолевой функции Т-клеток независимо от опухоли [50, с. 437]. Влияет ли ингибирование опухолевых PI3K на

противоопухолевую активность, остаётся пока неясным.

Опухолевые дифференцированные и стволовые клетки

Опухолевые стволовые клетки резистентны к традиционным цитотоксическим агентам. Появились доказательства, что дифференцировка или «стволовость» опухоли также играют роль в возникновении резистентности к терапии, основанной на иммунитете. Транскриптомный анализ опухолей от пациентов с меланомой, резистентной к анти-PD1 БИСТ, выявил сигнатуру, свойственную «стволоподобным» мезенхимальным клеткам [40, с. 38]. У пациента, который ответил на адоптивно внесённые Т-клетки, нацеленные на антиген дифференцировки меланоцитов 1 (*melanocyte differentiation antigen 1, MART1*), рецидивировавшая опухоль потеряла экспрессию MART1 – феномен дифференцировки и резистентности к иммунотерапии, который удалось фенокопировать *in vitro* [51, с. 935]. В других исследованиях было продемонстрировано, что стволовые опухолевые клетки экспрессируют отрицательные регуляторные молекулы, такие как CD80 [52, с. 1172], PD-L1 [53, с. 4047] и NKGD2 [54, с. 254]. WNT-сигнальный каскад, ранее описываемый как путь, используемый опухолью для сопротивления иммунотерапии, играет важную роль в дифференцировке и стволовости опухолей [55, с. 1461].

БИОМАРКЕРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕЙ

***De novo* опухоль-реактивные Т-клетки**

Блокада иммунных сверхочных точек использует естественный противоопухолевый Т-клеточный ответ. Наблюдения указывают на то, что эффективность БИСТ зависит от предсуществующего иммунного ответа (т. е. уже развившегося ответа на опухоль до начала самой процедуры блокады). Так, пациенты с меланомой – опухолью, известной своей иммуногенностью, давали очень хорошую реакцию на монотерапию БИСТ [56, с. 371]. Меланома долгое время использовалась в качестве модели для изучения иммунотерапии. Клинический успех адоптивного переноса клеток (*ex vivo* размноженных лимфоцитов, инфильтрировавших опухоль у пациента) больным с метастазировавшей меланомой является доказательством того, что у этих пациентов уже (т. е. до стадии выделения инфильтрировавших лимфоцитов) присутствовали опухоль-специфичные Т-клетки [57, с. 850].

Самым простым индикатором предсуществующего противоопухолевого иммунного ответа можно считать наличие Т-клеток в опухолевом микроокружении [58, с. 13765; 59, с. 1960]. У пациентов с меланомой, получавших анти-PD1 терапию, присутствие Т-клеток в образцах биопсии, полученной до начала лечения, было ассоциировано с ответом на терапию, а плотность CD8⁺ Т-клеток на границе инвазии опухоли являлась показателем силы ответа [60, 568].

В исходных образцах от пациентов, которые ответили на PD1-блокаду, наблюдался повышенный уровень фосфорилированного STAT1 на границе инвазии. Это говорит о том, что ответ на терапию требует не просто присутствия Т-клеток, а активированных Т-клеток, производящих интерферон γ (IFN γ), который запускает сигнальный каскад, ведущий к фосфорилированию STAT1 в соседних опухолевых и стромальных клетках. Это подтверждает роль описанного выше характерного для опухоли IFN γ -сигнального каскада в ответ на PD1-блокаду. О подобных результатах было сообщено в работе по изучению анти-PD1 терапии (pembrolizumab) у пациентов с колоректальными опухолями, имевшими неисправности в системе репарации неспаренных оснований [61, с. 2509], а также у пациентов с уротелиальной карциномой, получавших анти-PD-L1 терапию [62, с. 544].

Однако наличие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в самом начале не всегда связано с ответом на анти-PD1 терапию, что наблюдали в группе пациентов, получавших, либо не получавших анти-CTLA4 терапию [63, с. 934]. Это отчасти можно объяснить гетерогенностью и неверными критериями отбора используемых для анализа биопсий до начала терапии. Также следует иметь в виду, что у пациентов, имевших опухоль-специфичные Т-клетки, какие-то локальные иммуносупрессивные факторы ограничили инфильтрацию и экспансию этих клонов. В других случаях опухоль-специфичные Т-клетки присутствовали на периферии опухоли, но не в самом микроокружении опухоли [64, с. 1251]. В этой работе было показано, что Т-клетки, начавшие бороться с опухолью после получения анти-PD1 терапии, оказались не клонами, инфильтрировавшими опухоль до начала терапии, а другими клонами, т.е. вошедшими в опухоль уже после начала терапии. Такие результаты говорят о том, что наличие инфильтрировавших опухоль лимфоцитов не является однозначным предсказателем осуществления *de novo* противоопухолевого иммунного ответа.

PD-L1 как маркер интерфероновой передачи сигнала

Было показано, что экспрессия молекул иммунных сверхочных точек, таких как PD-L1, в клетках микроокружения опухоли является предсказательным фактором в отношении ответа на БИСТ, хотя и не во всех случаях [65, с. 2443; 66, с. 2018]. Экспрессия PD-L1 не обязательно свидетельствует о наличии противоопухолевого ответа (предсуществующего). Так, некоторые пациенты с PD-L1-положительными опухолями не дали ответа на терапию, а пациенты с PD-L1-отрицательными опухолями дали ответ на терапию БИСТ [67, с. 122; 68, с. 320; 69, с. 1976].

Экспрессия PD-L1 регулируется через интерферон-сигнальный каскад, который включает киназы JAK1 и JAK2, транскрипционные факторы STAT1, STAT2 и STAT3 и транскрипционный активатор IRF1. IFN γ способен стимулировать

экспрессию PD-L1 даже на экзосомах опухолевого происхождения, что приводит к супрессии CD8⁺ Т-клеток [70, с. 382]. Поскольку в данном случае инфильтрировавшие опухоль Т-клетки сосуществуют с PD-L1-экспрессирующими опухолевыми и/или иммунными клетками, блокада PD1–PD-L1-сигнального пути может быть успешной (рис. 1а), что ещё раз подчеркивает роль присущего опухоли IFN γ сигнального пути в ответе на PD1-блокаду.

Оба интерфероновых сигнальных пути – как типа I, так и типа II (IFN γ) конвергируют на активации генов-мишеней, а именно *PDL1*. В то время как интерфероны типа I синтезируются преимущественно миелоидными клетками в ответ на активацию РПП, интерферон типа II синтезируется в основном Т-клетками при распознавании схожих антигенов. Таким образом, в контексте основанного на Т-клетках противоопухолевого иммунитета, интерферон типа II играет более важную роль. Из-за мутаций в интерферон-сигнальных путях (особенно в пути второго типа), либо вследствие эпигенетических или пост-транскрипционных механизмов, ограничивающих экспрессию PD-L1 в опухоли, PD-1–PD-L1 БИСТ может быть неэффективной (рис. 1б).

Экспрессия PD-L1 регулируется и другими механизмами. Сюда можно включить избыточную экспрессию (из-за амплификации локусов PD-L1, PD-L2 и JAK2, известную как PDJ-амплификация [71, с. 2835]), эпигенетическое подавление, транскрипционное регулирование (например, посредством MYC, PTEN и индуцируемого гипоксией фактором 1 α (HIF 1 α)), посттранскрипционное регулирование (с помощью микроРНК), посттрансляционную модификацию (гликозилирование, фосфорилирование и убиквитинилирование), а также перемещение из цитоплазмы в эндосомы.

Результаты изучения опухолевого транскриптома

Применявшиеся долгое время основанные на иммуногистохимии методы оценки иммунологического статуса опухолей ограничены по своим возможностям, что способствовало появлению мультиплексных подходов. Примерами таких новых методов можно считать секвенирование РНК и чипы для исследования определенных генов. Новые методики в использовании алгоритмов деконволюции РНК (расшифровки функций РНК), таких как оценка цитолитической активности, MCP-счётчик (подсчёт популяции клеток в микроокружении), CIBERSORT и TIMER [72, с. 453; 73, с. 218], позволяют оценить состав иммунных клеток в образце опухоли. Подсчёт цитолитической активности – это самый простой метод деконволюции РНК, он позволяет определить состав эффекторных Т-клеток в опухоли, используя геометрические данные по экспрессии граназа А и перфорина [74, с. 48]. Более высокие значения

цитолитической активности коррелируют с ответом на анти-CTLA4 БИСТ.

Однако, иммунные сигнатуры из препаратов тотальной РНК опухоли имеют и недостатки. Гетерогенность опухоли затрудняет получение воспроизводимых и согласованных результатов.

Для устранения трудностей, возникающих при исследовании тотальной РНК из опухолей, применяется секвенирование РНК одиночных клеток. Анализ 48 образцов биопсии опухоли от 32 пациентов, получивших БИСТ, показал, что инфильтрация CD8⁺ Т-клетками (это было определено на основе иммуногистохимического анализа) была невысокой в опухолях до получения терапии у пациентов, давших ответ на неё. Однако секвенирование РНК одиночных клеток показало, что CD8⁺ Т-клетки от респондеров (т. е. ответивших на терапию) до начала терапии были обогащены транскриптами, относящимися к дифференцировке (например, мРНК транскрипционного фактора *TCF7*), активации и выживанию клеток памяти по сравнению с CD8⁺ Т-клетками у нон-респондеров: эти клетки были обогащены транскриптами генов *истощения* [75, с. 998].

Опухолевые неоантигены как мишени Т-клеток

Несмотря на доказательства того, что осуществляемый Т-клетками неоантиген-специфический ответ играет центральную роль в эффективности БИСТ, набор мутаций в опухоли ограничивает ответ на БИСТ [76, с. 665]. Это частично объясняется клональностью интересующих мутаций [77, с. 1463].

Чтобы мутация стала мишенью иммунитета, она должна быть эффективно представлена иммунной системе с помощью главного комплекса гистосовместимости (МНС). И хотя сами методы оценки неоантигенов улучшились, этот способ недостаточно эффективен [78, с. 815].

Преодоление резистентности опухолей

При комбинировании анти-CTLA4 и анти-PD1 блокады наблюдается значительно более сильный противоопухолевый иммунный ответ, чем при использовании компонентов по отдельности. Транскриптомные и иммуногистохимические данные свидетельствуют о том, что у пациентов, ответивших на двойную БИСТ, до терапии уже был продуктивный противоопухолевый иммунный ответ, который сдерживался иммунными сверхочными точками (рис. 3а) и был ниже уровней, достигнутых при одновременной блокаде PD1–PD-L1 и CTLA4. На стадии преклинических или клинических испытаний находится несколько ингибиторов альтернативных иммунных сверхочных точек, включая нацеленные на LAG3, VISTA, TIM3, аденозиновый рецептор A2A, CD73, BTLA, V7-H3, V7-H4 и иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток [79, с. 1069].

У ряда пациентов необходимо инициировать противоопухолевый иммунный ответ путём увеличения (усиления) презентации антигенов и

праймирования иммунного ответа против уже существующих у них антигенов.

Опухоль и дренирующие её лимфатические узлы можно рассматривать как превалирующие места презентации опухолевых антигенов [80, с. 855], поэтому подходы, нацеленные на модулирование презентации антигена в опухоли или в лимфатических узлах представляют интерес (рис. 3b). Данные подходы основаны на 1) индукции провоспалительного состояния, которое разрушает основные механизмы иммуносупрессии в опухолевом микроокружении; 2) индукции иммуногенной клеточной смерти и 3) привлечении профессиональных антиген-презентирующих

клеток (АПК) для эффективного праймирования против опухолевых антигенов. Примером может служить интраопухолевый иммунный стимулянт - бактерия Кальметт-Герен – БЦЖ-вакцина, являющаяся стандартной терапией для поверхностного рака мочевого пузыря [81, с. 153].

Как хемо-, так и радиотерапия способны индуцировать иммуногенную клеточную смерть [82, с. 365; 83, с. 51]. На мышинных моделях было показано, что иммунный эффект как хемо-, так и радиотерапии зависит от Т-клеток, и оба эти вида терапии повышают эффективность БИСТ [84, с. 1050; 85, с. 373].

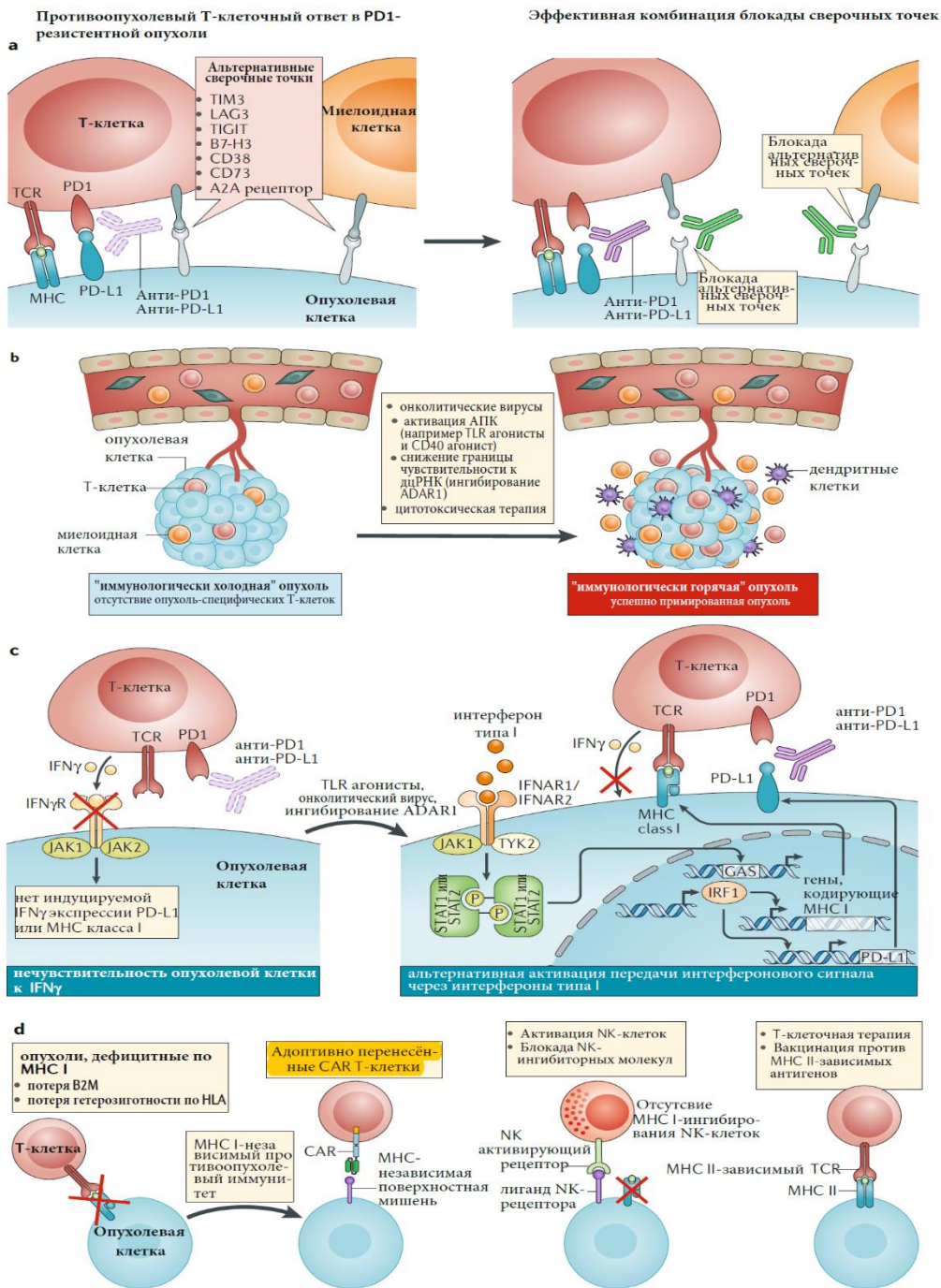


Рис. 3. Преодоление опухолевой резистентности к блокаде иммунных сверхточных точек.

a – PD- L1 может быть не единственным отрицательным регулятором противоопухолевого T-клеточного ответа. Другие молекулы в иммунных сверхточных точках, экспрессируемые на поверхности опухолевых клеток, либо же миелоидные клетки в микроокружении опухоли предотвращают эффективный противоопухолевый иммунитет. Комбинированная БИСТ разрушает механизм резистентности (панель справа).

b – в иммунологически холодных типах опухолей противоопухолевый T-клеточный ответ изначально не развивается, что делает неэффективной БИСТ. Иммунную систему можно праймировать против опухоли либо за счёт иммуногенной клеточной смерти (онколитические вирусы или цитотоксическая терапия), либо путем праймирования антиген-презентирующих клеток (использовать агонисты толл-подобных рецепторов и агонисты CD40), либо же повышая чувствительность опухолевых клеток к дцРНК (путем ингибирования дцРНК-специфичной аденозиндезаминазы (ADAR1)). Такое праймирование способно перепрограммировать иммунологически холодные опухоли и привести их к отклику на БИСТ.

c – опухоли с нарушенной IFN γ -сигнализацией не способны к экспрессии PD- L1 в ответ на IFN γ . В некоторых опухолях (в которых MHC I-зависимая презентация антигена зависит в основном от IFN γ -сигнального пути) разрушение IFN γ -сигнализации равносильно утрате презентации антигена. Активация альтернативного интерфероновому пути (интерферон первого типа) посредством агонистов TLR (толл-подобных рецепторов), с помощью онколитических вирусов или другими способами, приводит к активации передачи сигнала через STAT1 и STAT2, что запускает транскрипцию генов, кодирующих PD- L1 и MHC I за счёт активации интерферонового регулятора IRF1.

d – опухоли, резистентные к БИСТ из-за потери экспрессии экспрессии MHC I вследствие генетических изменений (потеря β 2-микроглобулина (B2M) и потеря HLA-гетерозиготности). В данной ситуации успешны три подхода: (1) T-клетки с химерными антигеновыми рецепторами (CAR) распознают свои мишени независимо от экспрессии MHC I; (2) адаптивный перенос натуральных киллеров (NK), или их стимуляция цитокинами, такими как IL-2 или IL-15, поскольку в данных клетках нет экспрессии MHC I; (3) вакцинация или адаптивная T-клеточная терапия для запуска ответа против специфичного антигена MHC II-зависимым путём.

B2M - β 2-microglobulin; DC - dendritic cell (дендритные клетки); GAS - IFN γ activation sites; IFNAR1 - interferon- α and β receptor subunit 1; IFN γ R - IFN γ receptor; JAK1 - Janus kinase 1; TCR - T cell receptor.

В то же время хемо- и радиотерапия оказывают (это задокументировано) иммуносупрессивный эффект, который приводит в работу не зависящий от самой опухоли (то есть внешний по отношению к опухоли) механизм резистентности к иммунотерапии [86, с. 1659]. Таким образом, маловероятно, что эти виды стандартной терапии станут основными в преодолении внутриопухолевого механизма сопротивления иммунной блокаде, но их роль в контроле тяжести болезни и способствовании иммуногенной смерти клеток может оказаться полезной в комбинации с иммунотерапией.

Некоторые подходы в иммунотерапии направлены на РПП. В них используются онколитические вирусы или их имитация. Вирус можно имитировать с помощью таких веществ, как полиинозиловая:полицитидиловая кислота, которая имитирует дцРНК и активирует TLR3, MDA5 и RIG-I; либо можно использовать CpG олигонуклеотиды, которые имитируют одноцепочечную ДНК и активируют TLR9. Активация РПП ведёт в свою очередь к активации провоспалительных генов, включая гены, кодирующих интерфероны первого типа, а это запускает каскад, привлекающий и активирующий антигенпрезентирующие клетки (АПК) (например, дендритные клетки). Именно они выполняют важнейшую функцию – инициацию противоопухолевого иммунного ответа [87, с. 417].

Онколитические вирусы обладают уникальной способностью: они заражают опухолевые клетки и вызывают их гибель. Их часто генетически модифицируют в терапевтических целях для

усиления противоопухолевого иммунного ответа. Основой препарата **талимоген лагерпаревек** (talimogene laherparepvec, или T-VEC, торговое название **Imlygic**) является вирус простого герпеса первого типа. Данный препарат вводится в опухоль пациентам с метастатической меланомой, вирус размножается преимущественно внутри опухолевых клеток, которые начинают экспрессировать цитокин GM-CSF, способствующий созреванию и активации АПК, находящихся поблизости [88, с. 341]. T-VEC не мешает презентации антигена в инфицированных клетках (в отличие от вирусного вектора, на основе которого создан препарат). В комбинации с анти-PD1 терапией, T-VEC дал положительный результат 62% в исследовании [89, с. 1031] (стадия Ib) с участием пациентов с метастатической меланомой – намного большее значение, чем можно было бы ожидать от просто анти-PD1 терапии. Стоит отметить, что 9 из 13 пациентов с низким количеством инфильтрировавших опухоль CD8⁺ T-клеток также дали хороший результат, а 3 из 5 пациентов с изначально низким уровнем IFN γ дали полный ответ, подтверждая роль T-VEC у пациентов без предсуществовавшего (отсутствовавшего до начала терапии) противоопухолевого иммунного ответа. Предположительный механизм: вызванная вирусом иммуногенная гибель клеток приводит к доступности пептидных антигенов. Сенсоры врожденного иммунитета к вирусным антигенам запускают интерфероновый (IFN γ) каскад; это, совместно с усиленной экспрессией GM-CSF (из-за T-VEC) привлекает и активирует АПК в

микроокружение опухоли. АПК затем либо праймируют, либо активируют опухолевые специфичные Т-клетки в опухолевом микроокружении или в дренирующих лимфатических сосудах, что приводит к отмене опухолевого иммунного исключения.

Методы повышения иммуногенности опухолей разработаны с использованием активаторов РПП, таких как SD-101 – синтетического олигонуклеотида с CpG-последовательностями. Этот олигонуклеотид активирует передачу сигнала через TLR9 (толл-подобный рецептор 9) как в опухолевых, так и в неопухолевых клетках микроокружения опухоли. В фазе Ib исследования [90, с. 1250] 78% пациентов с меланомой, не проходивших лечение анти-PD-1, дали объективный ответ. Препараты TLR9 (SD-101) для индукции системного противоопухолевого иммунитета [91, с. 3437; 92, с. 541]. К таким испытаниям можно отнести комбинацию SD-101 и агонистического антитела OX40, оказавшуюся эффективной на множестве моделей (включая модель спонтанного метастатического рака молочной железы у мышей) [93, с. eaap4488]. Агонисты сенсоров врожденного иммунитета (которые являются мощными индукторами сигнализации интерферона первого типа) стимулируют презентацию антигена в опухолях, имеющих резистентность к БИСТ из-за генетических или эпигенетических нарушений в передаче сигнала от интерферона второго типа (рис. 3с).

Восприимчивость к БИСТ опухолевых клеток тонко регулируется их чувствительностью к эндогенным сигналам врожденного иммунитета, таким как эндогенная дцРНК. Усиление чувствительности опухолевых клеток к дцРНК – направление, которое приведет к преодолению выработанной опухолью резистентности к БИСТ. Использование CRISPR скрининга по более 2300 генов в клетках мышинной меланомы показало, что в опухолях, лучше отвечавших на анти-PD1 и GVAX, потеря гена *ADAR1* (фермент редактирования РНК, который конвертирует аденозин в инозин) происходит чаще. Потеря *ADAR1* в клетках мышинной меланомы B16 приводила к отмене иммунологически холодного статуса опухолевого микроокружения и повышала чувствительность опухолевых клеток к прямому противоопухолевому эффекту интерферонов первого или второго типа [94, с. 43]. Улучшенный ответ на анти-PD1 терапию в *ADAR1*-дефицитных опухолях зависел от наличия, по крайней мере, одного из двух сенсоров дцРНК - MDA5 и PKR.

Сенсоры врожденного иммунитета играют известную роль в иммунологической реактивности в сверхточных точках [95, с. 1637], но они могут не

работать при определенных условиях. В протоковой аденокарциноме поджелудочной железы наблюдается минимальная инфильтрация Т-клетками и плохой ответ на БИСТ [96, с. 418]. Комбинация химиотерапии, агониста костимуляторного белка CD40 и анти-PD1 терапия показали антиопухолевую эффективность Т-клеток на мышинной модели рака поджелудочной железы [97, с. 2719]. CD40 экспрессируется на многих клетках иммунной системы, включая дендритные клетки. При его взаимодействии с CD40-лигандом начинается презентация антигена [98, с. 265]. В комбинации с химио- и анти-PD1 терапией, активация CD40 и вызываемая химиотерапией иммуногенная смерть клеток стимулируют активацию Т-клеток (за счёт BATF3⁺ дендритных клеток), не зависящую от сигнальных каскадов врожденного иммунитета (включая передачу сигнала через MYD88, TLR4, TRIF, TLR3, STING, P2X7, каспазу 1 и каспазу 11). В настоящее время ведутся клинические испытания (фаза I/II) комбинации CD40-агониста, химиотерапии и анти-PD1 терапии (ClinicalTrials.gov, NCT03214250).

По меньшей мере, два подхода, основанные на иммунитете, изучаются сейчас для пациентов с опухолями, имеющими генетические дефекты в презентации антигена комплексами МНС I или II (рис. 3d). Основанная на методе *ex vivo* модификации Т-клеток самого пациента для экспрессии ими химерных антигеновых рецепторов (CAR-T) терапия является мощным инструментом при лечении гематологических злокачественных опухолей; в данной терапии не нужна презентация антигена посредством МНС, поскольку модифицированные Т-лимфоциты напрямую нацелены на специфические поверхностные молекулы, экспрессируемые опухолевыми клетками. При лечении солидных опухолей успех данной терапии намного скромнее. Это объясняется немногочисленностью опухолевых специфических поверхностных антигенов и иммуносупрессивным микроокружением. Новый подход по созданию CAR Т-клеток даёт надежду на положительный результат [99, с. 229]. Использование натуральных киллеров (NK), элиминирующих клетки с отсутствующими молекулами МНС I – это подход к лечению опухолей, дефицитных по МНС [100, с. 237]. B2M-дефицитные клетки линии B16 с нефункционирующим *ADAR*, сенсibilизированные к комбинации GVAX и анти-PD1 терапии, усиленно инфильтрировались NK-клетками [94, с. 44]. Адоптивная терапия NK-клетками разрабатывается в течение нескольких лет, и недавно блокада NKG2A – ингибиторного белка, экспрессирующегося как на NK-, так и на Т-клетках, показала хорошие результаты у пациентов со сквамозноклеточной карциномой головы и шеи [101, с. 1731].

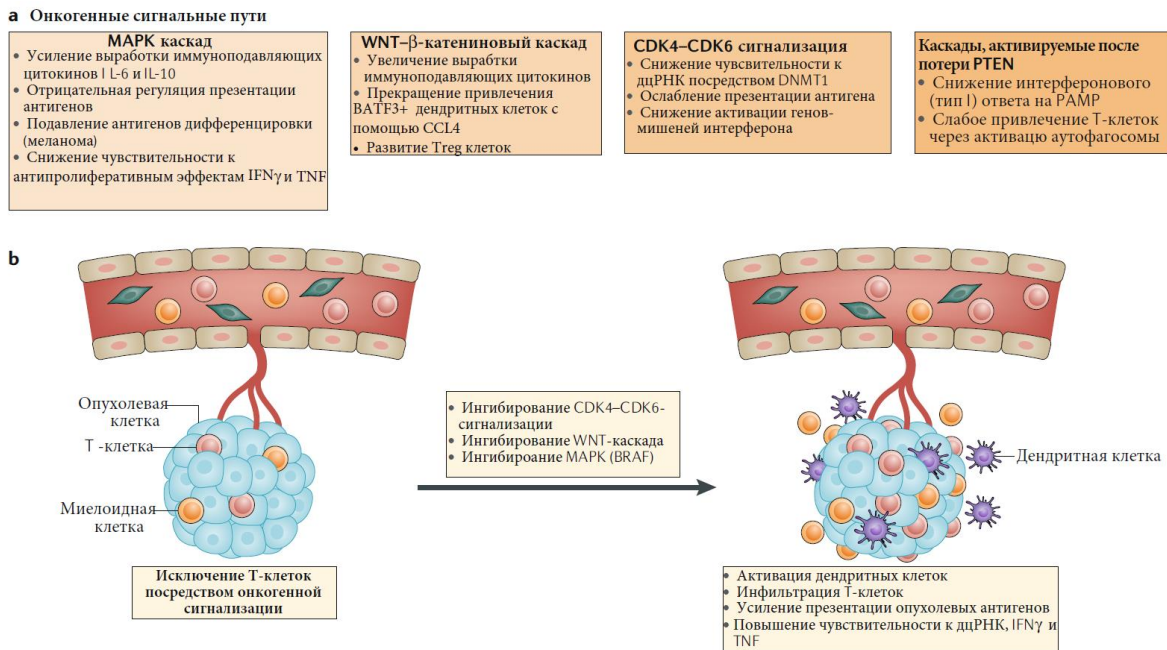


Рис. 4. Онкогенные сигнальные пути, влияющие на противоопухолевый иммунитет и резистентность к БИСТ

а – онкогенные сигнальные пути обеспечивают уникальный механизм, позволяющий опухоли избежать иммунного ответа. Здесь приведены четыре основных онкогенных сигнальных пути, вовлечённых в противоопухолевый иммунитет: МАРК-сигнальный каскад, WNT- β -катениновый каскад, CDK4-CDK6 сигнализация (циклинзависимые протеинкиназы), а также каскады, активируемые в результате утраты функции фосфоинозитид фосфатазы PTEN.

б – терапевтическое разрушение CDK4-CDK6 сигнализации (например, с помощью палбоциклиба или абемациклиба), МАРК-сигнализации (ингибиторами BRAF), либо же передачи сигнала в WNT-сигнальном каскаде отменяют исключение T-клеток опухолью и восстанавливают чувствительность к БИСТ.

BATF3 - basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like 3;

CCL4 - CC- chemokine ligand 4;

DNMT1 – DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1;

дцРНК – двухцепочечная РНК;

PAMP - pathogen-associated molecular patterns; T_{reg} клетки, регуляторные T клетки.

Для выяснения механизмов резистентности к БИСТ, вырабатываемой за счет онкогенов (рис. 4а), исследователи использовали уже существующие ингибиторы онкогенных сигнальных путей для подстёгивания противоопухолевого иммунитета (особенно в комбинации с БИСТ). К ним относятся ингибиторы WNT-каскада, ингибиторы киназ CDK4 и CDK6, а также ингибиторы киназ МАРК и PI3K (рис. 4б).

ЗаклЮчение

В процессе выявления механизмов резистентности к БИСТ были перестроены основные механизмы, регулирующие противоопухолевый иммунитет. Чувствительность опухоли к БИСТ определяется биологией опухоли: у пациентов с опухолями, имеющими сходные гистологические, молекулярные и генетические свойства, наблюдается одинаковый ответ на БИСТ. Опухоли, которые активируют противоопухолевый иммунный ответ *de novo* (из-за большого количества мутаций в них и как следствие повышенной антигенности), будут лучше реагировать на лечение с помощью БИСТ. Однако даже при достаточной антигенности,

чувствительность к БИСТ нарушается при генетических дефектах в IFN γ -каскаде и презентации антигена в опухоли.

Онкогенные сигнальные пути (за счёт привлечения клеток, критических для запуска и осуществления противоопухолевого иммунного ответа) воздействуют на IFN γ и презентацию антигена, либо же включают иммуноподавляющие факторы в микроокружении опухоли, поэтому эти сигнальные пути можно также считать медиаторами резистентности к БИСТ. Подходы в терапии, направленные на обход дефектов в IFN γ -каскаде или в презентации антигена, а также нацеленные на блокировку иммуносупрессивных онкогенных сигнальных каскадов, поддерживают надежду на распространение в клинической практике метода БИСТ.

Список литературы

1. Chowell D. et al. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy // Science -2018. -№ 359. – с. 582

2. Fessler J. et al. Exploring the emerging role of the microbiome in cancer immunotherapy // *J. Immunother. Cancer* -2019. -№ 7. – c. 108
3. Rizvi N. A. et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non- small cell lung cancer // *Science* -2015. -№ 348. – c. 124
4. Snyder A. et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma // *N. Engl. J. Med.* -2014. -№ 371. – c. 2189
5. van Rooij N. et al. // Tumor exome analysis reveals neoantigen- specific T- cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *J. Clin. Oncol.* -2013. -№ 31. – c. e439
6. Tran E. et al. Cancer immunotherapy based on mutation- specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer // *Science* -2014. -№ 344. – c. 641
7. Ott P. A. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma // *Nature* -2017. -№ 547. – c. 217
8. Dighe A. S. et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors // *Immunity* -1994. №1, – c. 447
9. Kaplan D. H. et al. Demonstration of an interferon gamma- dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* -1998. -№ 95. – c. 7556
10. Manguso R. T. et al. In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target // *Nature* -2017. -№ 547. – c. 413
11. Patel S. J. et al. Identification of essential genes for cancer immunotherapy // *Nature* -2017. -№ 548. – c. 537
12. Pan D. et al. A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell- mediated killing // *Science* -2018. -№ 359. – c. 770
13. Zaretsky J. M. et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma // *N. Engl. J. Med.* -2016. -№ 375. – c. 819
14. Gao J. et al. Loss of IFN- γ pathway genes in tumor cells as a mechanism of resistance to anti-CTLA-4 therapy // *Cell* -2016. -№ 167. – c. 397
15. Wilson E. B. et al. Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection // *Science* -2013. -№ 340. – c. 202
16. Benci J. L. et al. Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade // *Cell* -2016. -№ 167. – c. 1540
17. Bach E. A. et al. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling // *Annu. Rev. Immunol.* -1997. -№ 15. – c. 563
18. Sucker A. et al. Acquired IFN γ resistance impairs anti-tumor immunity and gives rise to T-cell-resistant melanoma lesions // *Nat. commun.* -2017. -№ 8. – c. 15440
19. Shankaran V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity // *Nature* -2001. -№ 410. – c. 1107
20. Restifo N. P. et al. Identification of human cancers deficient in antigen processing // *J. Exp. Med.* -1993. -№ 177. – c. 265
21. Restifo N. P. et al. Loss of functional beta 2- microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy // *J. Natl. Cancer Inst.* -1996. -№ 88. – c. 100
22. Sucker A. et al. Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression // *Clin. Cancer Res.* -2014. -№ 20. – c. 6593
23. McGranahan N. et al. Allele- specific HLA loss and immune escape in lung cancer evolution // *Cell* -2017. -№ 171. – c. 1259
24. Grasso C. S. et al. Genetic mechanisms of immune evasion in colorectal cancer // *Cancer Discov.* -2018. -№ 8. – c. 730
25. Huang L. et al. The RNA- binding protein MEX3B mediates resistance to cancer immunotherapy by downregulating HLA- A expression // *Clin. Cancer Res.* -2018. -№ 24. – c. 3366
26. Yaguchi T. et al. Immune suppression and resistance mediated by constitutive activation of Wnt/ β -catenin signaling in human melanoma cells // *J. Immunol.* -2012. -№ 189. – c. 2110
27. Zhao F. et al. Paracrine Wnt5a- β -catenin signaling triggers a metabolic program that drives dendritic cell tolerization // *Immunity* -2018. -№ 48. – c. 147
28. Jimenez-Sanchez A. et al. Heterogeneous tumor-immune microenvironments among differentially growing metastases in an ovarian cancer patient // *Cell* -2017. -№ 170. – c. 927
29. Sridharan V. et al. Immune profiling of adenoid cystic carcinoma: PD- L2 expression and associations with tumor- infiltrating lymphocytes // *Cancer Immunol. Res.* -2016. -№ 4. – c. 679
30. Seiwert T. Y. et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV- positive and HPV- negative head and neck squamous cell carcinomas // *Clin. Cancer Res.* -2015. -№ 21. – c. 632
31. Sweis R. F. et al. Molecular drivers of the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment in urothelial bladder cancer // *Cancer Immunol. Res.* -2016. -№ 4. – c. 563
32. Abril- Rodriguez G. T. et al. PAK4 inhibition reverses immune cell exclusion and overcomes resistance to checkpoint blockade therapy [abstract O39, электронный ресурс]. – 2018. Режим доступа: URL: <https://sitcancer.org/2018/abstracts/titles/?category=Mechanisms+of+Resistance+to+Immunotherapy>
33. Hunter T. et al. Cyclins and cancer // *Cell* -1991. -№ 66. – c. 1071
34. Deng J. et al. CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T- cell activation // *Cancer Discov.* -2018. -№ 8. – c. 216
35. Jerby-Arnon L. et al. A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade // *Cell* -2018. -№ 175. – c. 984
36. Sumimoto H. et al. The BRAF- MAPK signaling pathway is essential for cancer- immune evasion in human melanoma cells // *J. Exp. Med.* -2006. -№ 203. – c. 1651
37. Boni A. et al. Selective BRAFV600E inhibition enhances T- cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function // *Cancer Res.* -2010. -№ 70. – c. 5213

38. Frederick D. T. 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. – c. 1225
39. Acquavella N. et al. Type I cytokines synergize with oncogene inhibition to induce tumor growth arrest // *Cancer Immunol. Res.* -2015. -№ 3. – c. 37
40. Hugo W. et al. Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma // *Cell* -2016. -№ 165. – c. 35
41. Ebert P. J. R. et al. MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade // *Immunity* -2016. -№ 44. – c. 609
42. Hu-Lieskovan S. et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma // *Sci. Transl. Med.* -2015. -№ 7. – c. 279ra41
43. Ribas A. et al. Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma // *Nat. Med.* -2019. -№ 25. – c. 936
44. Ascierto P. A. et al. Dabrafenib, trametinib and pembrolizumab or placebo in BRAF- mutant melanoma // *Nat. Med.* -2019. -№ 25. – c. 941
45. Sullivan R. J. et al. Atezolizumab plus cobimetinib and vemurafenib in BRAF- mutated melanoma patients // *Nat. Med.* -2019. -№ 25. – c. 929
46. Li J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer // *Science* -1997. -№ 275. – c. 1943
47. Peng W. et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell- mediated immunotherapy // *Cancer Discov.* -2016. -№ 6. – c. 202
48. George S. et al. Loss of PTEN is associated with resistance to anti- PD-1 checkpoint blockade therapy in metastatic uterine leiomyosarcoma // *Immunity* -2017. -№ 46. – c. 197
49. Li S. et al. The tumor suppressor PTEN has a critical role in antiviral innate immunity // *Nat. Immunol.* -2016. -№ 17. – c. 241
50. Kaneda M. M. et al. PI3Kgamma is a molecular switch that controls immune suppression // *Nature* -2016. -№ 539. – c. 437
51. Mehta A. et al. Immunotherapy resistance by inflammation- induced dedifferentiation // *Cancer Discov.* -2018. -№ 8. – c. 935
52. Miao Y. et al. Adaptive immune resistance emerges from tumor- initiating stem cells // *Cell* -2019. -№ 177. – c. 1172
53. Castagnoli L. et al. WNT signaling modulates PD- L1 expression in the stem cell compartment of triplenegative breast cancer // *Oncogene* -2019. -№ 38. – c. 4047
54. Paczulla A. M. et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion // *Nature* -2019. -№ 572. – c. 254
55. Zhan T. et al. Wnt signaling in cancer // *Oncogene* -2017. -№ 36. – c. 1461
56. Menshawy A. et al. Nivolumab monotherapy or in combination with ipilimumab for metastatic melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized- controlled trials // *Melanoma Res.* -2018. -№ 28. – c. 371
57. Dudley M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes // *Science* -2002. -№ 298. – c. 850
58. Zeng D. Q. et al. Prognostic and predictive value of tumor- infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer // *Oncotarget* -2016. -№ 7. – c. 13765
59. Galon J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome // *Science* -2006. -№ 313. – c. 1960
60. Tumeh P. C. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance // *Nature* -2014. -№ 515. – c. 568
61. Le D. T. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch repair deficiency // *N. Engl. J. Med.* -2015. -№ 372. – c. 2509
62. Mariathasan S. et al. TGFβ attenuates tumour response to PD- L1 blockade by contributing to exclusion of T cells // *Nature* -2018. -№ 554. – c. 544
63. Riaz N. et al. Tumor and microenvironment evolution during immunotherapy with nivolumab // *Cell* -2017. -№ 171. – c. 934
64. Yost K. E. et al. Clonal replacement of tumor- specific T cells following PD-1 blockade // *Nat. Med.* -2019. -№ 25. – c. 1251
65. Topalian S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti- PD-1 antibody in cancer // *N. Engl. J. Med.* -2012. -№ 366. – c. 2443
66. Garon E. B. et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer // *N. Engl. J. Med.* -2015. -№ 372. – c. 2018
67. Wolchok J. D. et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma // *N. Engl. J. Med.* -2013. -№ 369. – c. 122
68. Robert C. et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation // *N. Engl. J. Med.* -2015. -№ 372. – c. 320
69. Forde P. M. et al. Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer // *N. Engl. J. Med.* -2018. -№ 378. – c. 1976
70. Chen G. et al. Exosomal PD- L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti- PD-1 response // *Nature* -2018. -№ 560. – c. 382
71. Ribas A. et al. What does PD- L1 positive or negative mean? // *J. Exp. Med.* -2016. -№ 213. – c. 2835
72. Newman A. M. et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles // *Nat. Methods* -2015. -№ 12. – c. 453
73. Becht E. et al. Estimating the population abundance of tissue- infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression // *Genome Biol.* -2016. -№ 17. – c. 218
74. Rooney M. S. et al. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity // *Cell* -2015. -№ 160. – c. 48
75. Sade-Feldman M. et al. Defining T cell states associated with response to checkpoint immunotherapy in melanoma // *Cell* -2018. -№ 175. – c. 998

76. Nishino M. et al. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* -2017. -№ 14. – с. 655
77. McGranahan N. et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade // *Science* -2016. -№ 351. – с. 1463
78. Vitiello A. et al. Neoantigen prediction and the need for validation // *Nat. Biotechnol.* -2017. -№ 35. – с. 815
79. Wei S. C. et al. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy // *Cancer Discov.* -2018. -№ 8. – с. 1069
80. Gardner A. et al. Dendritic cells and cancer immunity // *Trends Immunol.* -2016. -№ 37. – с. 855
81. Redelman-Sidi G. et al. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer – a current perspective // *Nat. Rev. Urol.* -2014. -№ 11. – с. 153
82. Weichselbaum R. R. et al. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* -2017. -№ 14. – с. 365
83. Kroemer G. et al. Immunogenic cell death in cancer therapy // *Annu. Rev. Immunol.* -2013. -№ 31. – с. 51
84. Apetoh L. et al. Toll- like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy // *Nat. Med.* -2007. -№ 13. – с. 1050
85. Twyman-Saint Victor C. et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non- redundant immune mechanisms in cancer // *Nature* -2015. -№ 520. – с. 373
86. Seifert L. et al. Radiation therapy induces macrophages to suppress T- cell responses against pancreatic tumors in mice // *Gastroenterology* -2016. -№ 150. – с. 1659
87. Patel S. A. et al. Combination cancer therapy with immune checkpoint blockade: mechanisms and strategies // *Immunity* -2018. -№ 48. – с. 417
88. Goldsmith K. et al. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response // *J. Exp. Med.* -1998. -№ 187. – с. 341
89. Ribas A. et al. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy // *Cell* -2018. -№ 174. – с. 1031
90. Ribas A. et al. SD-101 in combination with pembrolizumab in advanced melanoma: results of a phase Ib, multicenter study // *Cancer Discov.* -2018. -№ 8. – с. 1250
91. Guiducci C. et al. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection // *Cancer Res.* -2005. -№ 65. – с. 3437
92. Vicari A. P. et al. Reversal of tumor- induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody // *J. Exp. Med.* -2002. -№ 196. – с. 541
93. Sagiv-Barfi I. et al. Eradication of spontaneous malignancy by local immunotherapy // *Sci. Transl. Med.* -2018. -№ 10. – с. eaan4488
94. Ishizuka J. J. et al. Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade // *Nature* -2018. -№ 565. – с. 43
95. Wang H. et al. cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* -2017. -№ 114. – с. 1637
96. Morrison A. H. et al. Immunotherapy and prevention of pancreatic cancer // *Trends cancer* -2018. -№ 4. – с. 418
97. Byrne K. T. et al. CD40 stimulation obviates innate sensors and drives T cell immunity in cancer // *Cell Rep.* -2016. -№ 15. – с. 2719
98. Ma D. Y. et al. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells // *Semin. Immunol.* -2009. -№ 21. – с. 265
99. Roybal K. T. et al. Synthetic immunology: hacking immune cells to expand their therapeutic capabilities // *Annu. Rev. Immunol.* -2017. -№ 35. – с. 229
100. Ljunggren H. G. et al. In search of the «missing self»: MHC molecules and NK cell recognition // *Immunol. Today* -1990. -№ 11. – с. 237
101. Andre P. et al. Anti- NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti- tumor immunity by unleashing both T and NK cells // *Cell* -2018. -№ 175. – с. 1731

БАЗОВЫЕ КРИТЕРИИ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Пищенко Елена Ефимовна,
ассистент*

Кокул Анна Сергеевна,
клинический ординатор*

Гарбуз Людмила Ильинична,
к.б.н., доцент**

Вдовиченко Константин Константинович,
к.б.н., доцент**

*кафедра анатомии и общей патологии
**кафедра биологии и физиологии человека
медицинский факультет,

ПГУ им. Т. Г. Шевченко, г. Тирасполь, ул. Мира, 33, Приднестровье