

## ВЛИЯНИЕ АНТИТЕЛ К СТЛА-4 И PD-1 НА СОДЕРЖАНИЕ ИХ РЕЦЕПТОРОВ МИШЕНЕЙ

Чикилева И.О.<sup>1</sup>, Шубина И.Ж.<sup>1</sup>, Самойленко И.В.<sup>1</sup>, Караулов А.В.<sup>2</sup>,  
Киселевский М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»

Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Резюме.** Ингибиторные рецепторы СТЛА-4 и PD-1 (модуляторы иммунного синапса) играют ключевую роль в регуляции иммунных реакций. Они подавляют чрезмерное развитие иммунного ответа в ответ на патогенные микроорганизмы и предотвращают аутоиммунные реакции. Модуляторы иммунного синапса представляют собой мишени современной эффективной противоопухолевой терапии на основе человеческих и гуманизированных моноклональных антител (ипилидумаб и ниволумаб, тремелидумаб, пембролизумаб и другие). При всей своей эффективности по сравнению с методами обычной химиотерапии терапия на основе блокаторов иммунных чек-пойнтов имеет существенные недостатки, а именно высокую стоимость и существенные побочные эффекты аутоиммунной природы, притом, что терапия помогает, к сожалению, не всем пациентам. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования с целью увеличения эффективности и безопасности данного метода и выработки критериев отбора пациентов для терапии. Один из возможных подходов к снижению побочных эффектов терапии блокаторами модуляторов иммунного синапса – это использование их не системно, а *ex vivo* при получении препаратов активированных иммунных клеток пациентов для противоопухолевой терапии. Целью нашей работы было проследить, каким образом воздействуют блокирующие антитела на экспрессию рецепторов СТЛА-4 и PD-1 в подобной системе *in vitro*. Во-первых, было исследовано содержание данных ингибиторных рецепторов в клетках популяции лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев и пациентов с распространенной меланомой. Далее было определено воздействие добавления антител к модуляторам иммунного синапса на содержание клеток, несущих СТЛА-4 и PD-1, в популяции лимфоцитов при их активации в присутствии фитогемагглютинаина. Наша работа показала, что присутствие терапевтических антител к любому из двух данных иммунных чек-пойнтов при активации клеток *in vitro* не только блокирует собственный рецептор-мишень, но и перекрестно снижает долю клеток, экспрессирующих другой ингибиторный рецептор. Таким образом, по всей видимости, введение антител либо к PD-1, либо к СТЛА-4 в данных экспериментальных условиях может подавлять оба негативных сигнальных каскада одновременно. Причем ответ на антитела, блокирующие разные иммунные чек-пойнты, варьировал у разных доноров. Наши данные могут служить теоретической основой для отработки эффективных комбинаций активаторов лимфоцитов и ингибиторов иммунных чек-пойнтов *in vitro*

### Адрес для переписки:

Чикилева Ирина Олеговна  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ  
115211, Россия, Москва, Каширское ш., 24.  
Тел./факс: 8 (499) 324-27-94.  
E-mail: irinatchikileva@mail.ru

### Address for correspondence:

Chikileva Irina O.  
N. Blokhin Medical Research Center of Oncology  
115211, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe highway, 24.  
Phone/Fax: 7 (499) 324-27-94.  
E-mail: irinatchikileva@mail.ru

### Образец цитирования:

И.О. Чикилева, И.Ж. Шубина, И.В. Самойленко, А.В. Караулов, М.В. Киселевский «Влияние антител к СТЛА-4 и PD-1 на содержание их рецепторов мишеней» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 59-68. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-59-68

### For citation:

I.O. Chikileva, I.Zh. Shubina, I.V. Samoylenko, A.V. Karaulov, M.V. Kiselevsky "Influence of antibodies against CTLA-4 and PD-1 upon quantities of their target receptors", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 59-68. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-59-68

для адоптивной терапии опухолей, а также служить для прогноза возможного ответа на антитела к CTLA-4 и к PD-1 для подбора персонализированного метода иммунотерапии.

*Ключевые слова:* иммунные чек-пойнты, ингибиторные иммунные рецепторы, CTLA-4, PD-1, ипилимумаб, ниволумаб, иммунотерапия опухолей

## INFLUENCE OF ANTIBODIES AGAINST CTLA-4 AND PD-1 UPON QUANTITIES OF THEIR TARGET RECEPTORS

Chikileva I.O.<sup>a</sup>, Shubina I.Zh.<sup>a</sup>, Samoylenko I.V.<sup>a</sup>, Karaulov A.V.<sup>b</sup>, Kiselevsky M.V.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Inhibitory receptors CTLA-4 and PD-1 (immune checkpoints) play a key role in regulation of immune reactions. They suppress excessive immune response against pathogenic microbes and prevent autoimmune reactions. The immune checkpoints are targets of the modern effective therapy based on human and humanized monoclonal antibodies (ipilimumab and nivolumab, tremelimumab, pembrolizumab, etc). However, despite its high efficiency compared to standard chemotherapy, the therapy based on blocking immune check points is facing several problems, i.e., high therapy cost and severe negative autoimmune-related side effects. Unfortunately, this therapy helps to minority of the patients. Hence, further studies are required to improve its efficiency and safety, as well as to search for selection criteria of the patients who would benefit from the therapy. An appealing approach to reduce negative side effects from immune checkpoint inhibition is application of the blocking antibodies, aiming for ex vivo generation of patients' activated immune cells for cancer therapy, thus avoiding systemic drug administration. Our aim was to elucidate influence of immune checkpoint blocking antibodies on the expression of CTLA-4 and PD-1 in such an *in vitro* model. First of all, we have determined quantities of lymphocyte receptors in peripheral blood of healthy volunteers, or cancer patients with disseminated melanoma. Moreover, we defined effect from the addition of antibodies against immune checkpoints on proportions of cells expressing CTLA-4 and PD-1 in the population of phytohemagglutinin-activated lymphocytes. Our study demonstrated that, in presence of antibodies to either of the two checkpoints during *in vitro* cell activation, the blockade of specific target receptor is accompanied by reduced number of cells positive for another checkpoint. Hence, the antibodies directed against PD-1 or CTLA-4 seem to suppress both negative signal cascades at once, if tested under such experimental conditions. Noteworthy, the response to blocking antibodies for different immune checkpoints varied for different donors. Our data may be used for development of effective combinations of lymphocyte activators and immune check-point inhibitors, for *in vitro* generation of activated lymphocytes applied for adoptive cancer therapy, as well as for prediction of possible responses to antibodies against CTLA-4 or PD-1, aiming to select the best personalized cancer immunotherapy.

*Keywords:* immune checkpoints, inhibitory immune receptors, CTLA-4, PD-1, ipilimumab, nivolumab, cancer immunotherapy

### Введение

Ингибиторные рецепторы CTLA-4 и PD-1 представляют собой ключевые молекулы в регуляции иммунного ответа, так как их активация отключает либо уменьшает иммунные реакции в зависимости от потребностей организма, что дало им название иммунных чек-пойнтов, то есть контрольных точек иммунитета. Блокирование иммунных чек-пойнтов при помощи специфических антител [25] либо удаление их генов путем генно-инженерных манипуляций (нокаутирование) [27] у лабораторных животных ведет к иммунным нарушениям, которые классифицируют

как аутоиммунные реакции. Потеря гена CTLA-4 приводит к ранней гибели мышей (2-3 недели после рождения), сопровождающейся массивной инфильтрацией тканей активированными лимфоцитами, которая влечет фатальное разрушение тканей ряда органов [12, 27]. Потеря функционального гена PD-1 не вызывает гибели лабораторных мышей [19]. Кроме того, необходимы дополнительные провоцирующие генетические факторы, чтобы нарушение данного гена привело к развитию аутоиммунных заболеваний, что указывает на различную специализацию данных ингибиторных рецепторов в регуляции развития и протекания иммунных реакций [19].

Существенным прорывом в лечении онкологических заболеваний, в особенности метастатической меланомы, оказалась разработка метода лечения на основе моноклональных антител, блокирующих иммунные чек-пойнты [17, 18]. Основная гипотеза о механизме действия данного подхода лечения заключается в том, что, ослабляя негативную регуляцию иммунного ответа, можно сделать эффективными противоопухолевые иммунные реакции, которые якобы «выключены» данными иммунными чек-пойнтами. К сожалению, при высокой стоимости и зачастую выраженных и даже фатальных побочных эффектах аутоиммунной природы данный метод лечения помогает далеко не всем пациентам. Так, при использовании препарата ипилимумаб для лечения злокачественной меланомы объективный ответ наблюдается приблизительно у 10% пациентов [18]. Эффективность терапевтических антител ниволумаб оказалась выше при менее выраженных аутоиммунных эффектах. Объективный ответ наблюдался у 30-35% пациентов со злокачественной меланомой [13]. Причем в течение 12 месяцев не наблюдалось рецидивов также у большего числа пациентов, которых лечили препаратом ниволумаб, а не ипилимумаб (70,5 и 60,8% соответственно) [31]. Последние данные показывают, что ниволумаб оказался не эффективен для лечения множественной миеломы в монорежиме, но, предположительно, способствовал успешности последовавшей терапии на основе иммуномодулирующих препаратов (талидомид, леналидомид) [21]. Недавно проведенное сравнительное исследование также показало сравнительно низкую эффективность ипилимумаба по сравнению с ниволумабом и пембролизумабом (блокаторами PD-1) [15]. Ряд научных коллективов во всем мире, в том числе и наш, ведет разработки с целью увеличить эффективность и безопасность метода лечения онкологических пациентов при помощи блокаторов иммунных чек-пойнтов и выработать критерии отбора пациентов для терапии. Для этого важно понять, какие процессы идут в организме пациентов в ходе терапии: какие гены включаются, а какие, наоборот, какие сигнальные пути задействованы. Разумеется, в первую очередь следует обратить внимание на сами мишени терапии, ингибиторные корецепторы.

Оба рецептора принадлежат к семейству CD28 и функционируют как гомодимеры [24]. Они имеют единственный внеклеточный домен, схожий с переменным доменом иммуноглобулинов. Однако, в отличие от CD28, необходимого для индукции эффективного иммунного ответа через T-клеточный рецептор (ТКР), иммунные чек-пойнты ему препятствуют, хотя и разными

способами, и в разных пространственных и временных точках его развития [24].

CTLA-4 имеет общие лиганды с CD28, молекулы костимуляции В7-1 и В7-2. Причем взаимодействует с ними с более высокой аффинностью. Этот рецептор преимущественно локализован внутри клеток, как в покоящихся, так и в активированных T-лимфоцитах, хотя при активации клеток увеличивается его содержание в клетках, а также интенсифицируется обмен его молекул между плазматической мембраной и эндосомально-лизосомальным внутриклеточным компартментом [16, 29]. Исключительно во время активации клеток рецептор выходит на ограниченный период времени в область иммунного синапса с антигенпрезентирующей клеткой (АПК), где, вероятно, оказывает свое ингибирующее действие на функционирование T-клетки, взаимодействуя со своими лигандами, молекулами В-7, конкурируя с CD28 и, предположительно, индуцируя некоторые негативные сигнальные события, подавляющие развитие эффективного иммунного ответа. Далее иммунный синапс нарушается и клетки расходятся. Однако именно в этот момент происходит событие, которое многими авторами считается сейчас ключевым в функционировании рецептора CTLA-4. Белок осуществляет процесс транс-эндоцитоза, связывая молекулы В-7 на поверхности АПК и направляя их в комплексе с собой внутрь T-клетки, в лизосомально-эндосомальный компартмент, где они подвергаются протеолизу [23]. Таким образом, способность индуцировать иммунный ответ к презентуемому антигену у АПК после взаимодействия с данным иммунным чек-пойнтом в значительной степени снижается. Этот уникальный процесс обуславливает возможность негативного воздействия CTLA-4 не только напрямую на клетки, которые его несут, но и на другие лимфоциты со схожей антигенной специфичностью, но нокаутированные по данному гену [6, 30]. Таким образом, первоначальная гипотеза о прямой конкуренции между CD28 и CTLA-4 за общие лиганды в данный момент была в значительной степени пересмотрена. Механизм его действия оказался более сложным.

PD-1 присутствует на клеточной поверхности, а также в сети Гольджи [20]. В отличие от CTLA-4, PD-1 имеет свои собственные лиганды PD-L1 и PD-L2, которые могут находиться на поверхности как АПК, так и других клеток организма. Таким образом, если ингибиторное воздействие CTLA-4 ограничено лимфоидными тканями, где инициируется иммунный ответ, то PD-1 может действовать дополнительно в тканях, осуществляя контроль над его осуществлением [9]. Взаимодействие рецептора PD-1 с его лигандами

ведет к ингибированию активационных процессов, осуществляемых через ТКР и CD28. Так же как и в случае CTLA-4, экспрессия PD-1 стимулируется при активации Т-клеток [11]. Действие обоих чек-пойнтов сокращает пролиферацию Т-клеток, метаболизм глюкозы, продукцию цитокинов, выживание клеток [8, 11]. Существенно, что как CTLA-4, так и PD-1 экспрессируются как Т-клетками, так и натуральными киллерами (НК) [2, 26].

Блокирование столь важных иммунных регуляторов, как CTLA-4 и PD-1, приводит не только к изменению в клеточных сигнальных каскадах, но и в профиле экспрессии генов. Причем, судя по имеющимся данным, мы имеем дело с крайне сложной регуляторной системой. Это ярко демонстрируется значительным отличием воздействия на экспрессию генов комбинированного или последовательного введения ингибиторов иммунных чек-пойнтов [7]. Основным результатом блокирования рецептора CTLA-4 в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) оказывается увеличение у них уровня экспрессии генов, ответственных за клеточный цикл и пролиферацию [6, 7]. Причем это было показано, как в экспериментальной системе на Т-клетках мышей, дефективных по экспрессии гена CTLA-4 [6], так и у людей, проходящих терапию антителами к CTLA-4 [7]. Интересно отметить, что экспрессия гена CTLA-4 увеличивалась под воздействием блокаторов данного рецептора [7]. Это позволяет предположить присутствие компенсаторных механизмов, восстанавливающих негативную регуляцию через CTLA-4 в случае его блокирования. Авторы другой работы отметили, что терапия блокаторами CTLA-4 (ипилимумаб) ведет также к некоторому увеличению фракции CD4<sup>+</sup>Т-хелперных клеток, экспрессирующих PD-1, что предполагает также параллельную активацию негативной регуляции через другой сигнальный каскад [4].

Блокирование PD-1 у МНК ведет, в отличие от CTLA-4, к активации генов, ответственных за функционирование натуральных киллеров (НК), важнейших эффекторов врожденного иммунитета, способных лизировать некоторые опухоли [7]. В то же время комбинация антител к CTLA-4 и PD-1, хотя и ведет к изменению экспрессии значительно более широкого спектра генов, но слабо пересекается с профилями воздействия индивидуальных блокаторов, что говорит о сложной системе регуляции, в которой участвуют иммунные чек-пойнты, и о возможном синергизме в их действии [7].

Был идентифицирован широкий спектр транскрипционных и эпигенетических факторов, регулирующих экспрессию PD-1 в ходе нор-

мального иммунного ответа и при хронической инфекции [1]. Как в регуляции экспрессии PD1, так и CTLA-4 участвуют транскрипционные факторы семейства NFAT (nuclear factor of activated T cells – ядерный фактор активированных Т-клеток) [1, 5, 10]. Однако следует отметить, что знания о деталях регуляции экспрессии CTLA-4 и PD-1, в особенности в присутствии их блокаторов, достаточно ограничены.

Следует подчеркнуть, что наше знание о природе данных ингибиторных рецепторов еще далеко не полное, и многие данные мы получаем лишь только сейчас, когда терапия блокаторами CTLA-4 и PD-1 уже была одобрена для широкой клинической практики. Особо ярко это было продемонстрировано в прекрасном обзоре Lucy S.K. Walker and David M. Sansom, показавшем противоречивость и недостаточность практически всех данных о функционировании корцептора CTLA-4 [28]. Согласно анализу работ, проведенному авторами, на данный момент практически нет достоверных, непротиворечивых сведений ни о механизмах ингибиторного воздействия CTLA-4 на клетки, ни о сигнальных каскадах, запускаемых данным иммунным чек-пойнтом, ни о его воздействии на «стоп-сигнал» во время взаимодействия Т-клеток с антигенпрезентирующими клетками (АПК), необходимым для эффективной активации иммунного ответа. Поэтому изучение механизмов воздействия специфических блокирующих антител на данные иммунные чек-пойнты представляет огромный интерес для медицины и для фундаментальной биологии.

В своей работе мы изучали содержание ингибиторных рецепторов PD-1 и CTLA-4 (долю позитивных клеток и относительную экспрессию) у пациентов, проходящих терапию антителами к PD-1 и в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) человека. Кроме теоретического аспекта, касающегося механизмов регуляции иммунных чек-пойнтов, данное исследование актуально, в первую очередь, в рамках оценки систем генерации *ex vivo* лимфоцитов, активированных в присутствии ингибиторов иммунных чек-пойнтов для последующей адоптивной терапии пациентов со злокачественными опухолями.

## Материалы и методы

В ходе исследования были протестированы образцы периферической венозной крови здоровых добровольцев и пациентов со злокачественной метастатической меланомой, проходящих терапию антителами к PD-1 на базе РОНЦ им. Н.Н. Блохина (приводятся данные для 10 пациентов и 4-х добровольцев). Образцы крови па-

циентов анализировали до начала терапии и спустя 2-3 месяца перед началом следующего курса терапии.

Из стабилизированной гепарином периферической крови выделяли мононуклеарные клетки (МНК) на одноступенчатом градиенте фикола-урографина плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> (ПанЭко, Россия). МНК пациентов и доноров немедленно обрабатывали конъюгатами антител к CTLA-4 и PD-1 с фикоэритрином (PE) (eBioscience, США) в концентрациях, рекомендованных производителем. Окрашивание антителами к PD-1 проводили в фосфатно-солевом буфере с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина. Для оценки внутриклеточного содержания CTLA-4 клетки предварительно пермеабелизировали при помощи набора FoxP3-staining buffer set (eBioscience, США) и далее проводили окрашивание, как рекомендовано производителем. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACS Cantoo II (Becton Dickinson, США). Анализ осуществляли среди лимфоцитов, определяя их популяцию на основании параметров прямого и поперечного светорассеяния.

Часть МНК здоровых доноров предварительно активировали 3 суток в полной среде с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки в присутствии 1 мкг/мл фитогеммагглютинаина (ФГА) (ПанЭко, Россия) отдельно или в комбинации с блокирующими антителами к PD-1 (ни-

волумаб, Bristol-Myers Squibb, США) и CTLA-4 (50 мкг/мл) (ипилимуаб, Bristol-Myers Squibb, США). Далее образцы культивированных МНК обрабатывали для проточной цитометрии так же, как и для исходных клеток.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакетов FACSDiva v. 6.1.3 и Microsoft Excel 2010, Statistica v. 10. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

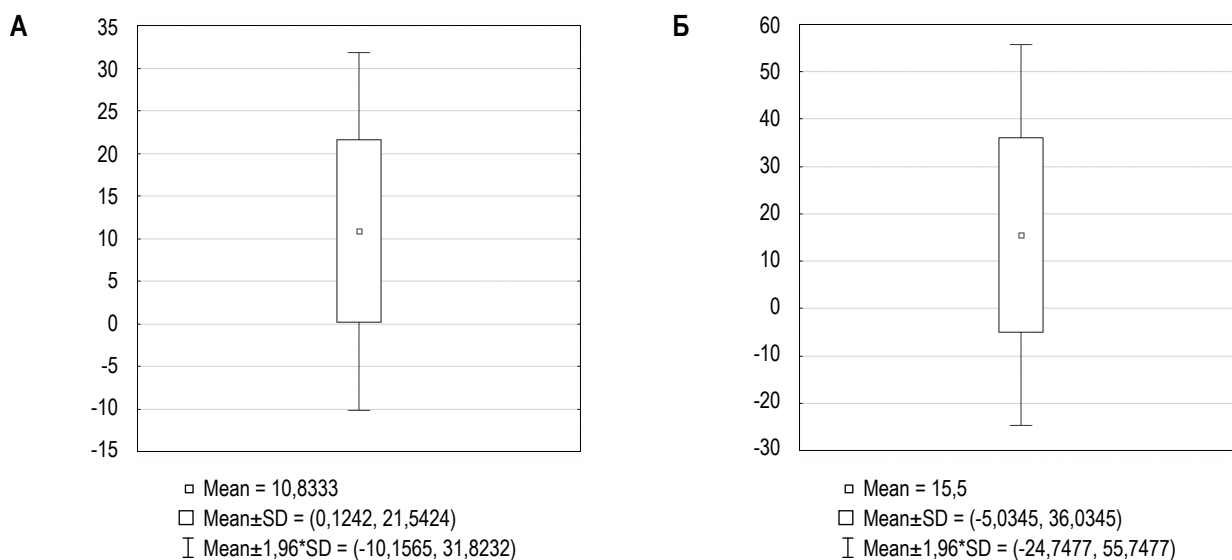
## Результаты

### Характер экспрессии рецепторов PD-1 и CTLA-4 у здоровых доноров и пациентов с распространенной меланомой

Рецептор CTLA-4 присутствует внутри клеток подавляющего большинства лимфоцитов как больных распространенной меланомой (84-91%), так и здоровых доноров (81-99%). На поверхности клеток данный модулятор иммунного синапса не был детектирован ни в одном из обследованных образцов.

Рецептор PD-1 был детектирован на значительно варьирующей у разных индивидуумов части лимфоцитов больных (от 2 до 36%, рис. 1А). У здоровых доноров также отмечался разброс показателя в значительных пределах (от 2 до 46%, рис. 1Б).

Таким образом, не было выявлено существенных различий в экспрессии иммунных чек-



**Рисунок 1.** Характер экспрессии PD-1 лимфоцитами периферической крови здоровых доноров и пациентов с распространенной меланомой до начала лечения

**Примечание.** Диаграмма «ящик с усами», характеризующая долю PD-1<sup>+</sup> клеток среди лимфоцитов пациентов с распространенной меланомой до начала лечения (А) или здоровых доноров (Б).

Figure 1. PD-1 expression by peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers and patients with disseminated melanoma before treatment

Note. Box & whisker plot presents proportions of PD-1<sup>+</sup> cells within lymphocytes (A) of patients with disseminated melanoma before treatment and (B) of healthy volunteers.

пойнтов между здоровыми донорами и пациентами с распространенной меланомой.

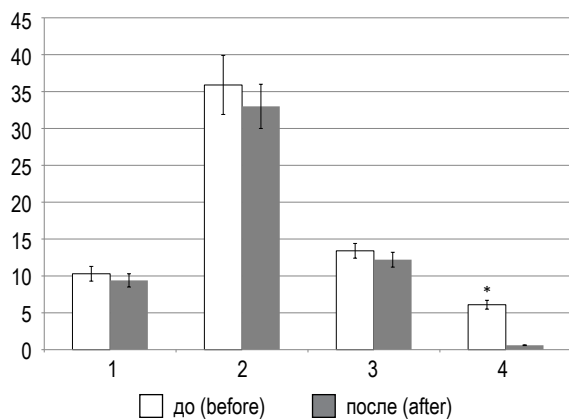
#### Поведение модуляторов иммунного синапса в ходе терапии антителами к PD-1

Данные предварительных исследований показали незначительную конкуренцию между используемыми терапевтическими антителами и антителами детекции к PD-1. Поэтому даже при отсутствии колебаний содержания рецептора его оккупация детектировалась бы нами как некоторое его снижение. У 3 из 4-х пациентов, обследованных как до, так и после курса терапии, не было отмечено статистически достоверных изменений в доле клеток, детектируемых как позитивные по данному иммунному чек-пойнту, но лишь тенденция к подобному снижению. У одного из пациентов было отмечено статистически достоверное снижение доли клеток, детектируемых как позитивные по PD-1 (рис. 2).

Данные по изменению содержания CTLA-4 доступны только для двух пациентов. Достоверных изменений содержания клеток, несущих CTLA-4, не было выявлено у обследованных пациентов (рис. 3).

#### Влияние терапевтических антител к CTLA-4 и PD-1 на содержание иммунных чек-пойнтов при активации лимфоцитов *in vitro*

Грубым приближением к модели стимуляции иммунного ответа можно считать активацию лимфоцитов *in vitro* в присутствии ФГА. Сочетание ФГА с ингибиторами иммунных чек-пойнтов



**Рисунок 2.** Воздействие терапии моноклональными антителами к PD-1 на содержание в периферической крови пациентов лимфоцитов, выявляемых как позитивные по PD-1

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал. \* – статистически достоверное отличие по сравнению с уровнем до терапии при  $p < 0,05$ .

Figure 2. Effect of anti-PD-1 monoclonal antibody therapy on contents of peripheral blood lymphocytes, which are determined as PD-1-positive

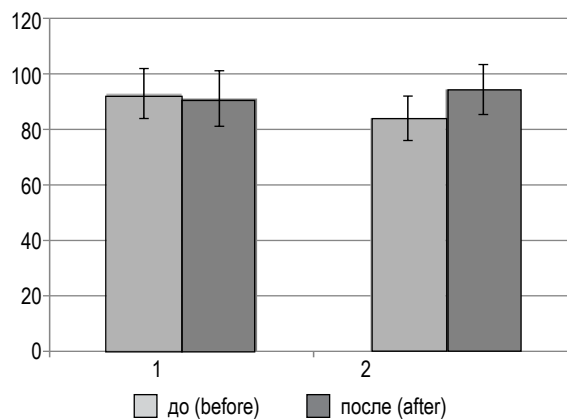
Note. Confidence interval is taken for error bars. \*, significant difference from the level before the therapy at  $p < 0.05$ .

может дать некоторое, очень приближенное представление о возможном их воздействии не на тотальную популяцию лимфоцитов, а конкретно на Т-клетки, отвечающие на антигенную стимуляцию.

Эксперименты показали значительное увеличение содержания рецепторов PD-1 и CTLA-4 в присутствии ФГА в культуре клеток здоровых доноров (рис. 4). Добавление терапевтических антител к PD-1 вело к тому, что доля клеток, выявляемых как позитивные по PD-1, значительно понижалась. Конкуренция между антителами детекции и терапевтическими значительно затрудняет интерпретацию данных. Можно предполагать как оккупацию рецептора терапевтическими антителами и их конкуренцию с антителами детекции, так и реальное снижение доли клеток, несущих PD-1 на поверхности.

Более примечателен следующий факт: присутствие антител к PD-1 во время активации лимфоцитов также существенно препятствовало нарастанию экспрессии рецептора CTLA-4 (рис. 5). Как было отмечено ранее, даже неактивированные лимфоциты в значительной степени содержат внутри клеток рецептор CTLA-4, поэтому мы исследовали именно относительный уровень экспрессии белка по средней интенсивности флуоресценции клеток.

Предварительные эксперименты не показали конкуренции между терапевтическими антителами к CTLA-4, присутствующими во время

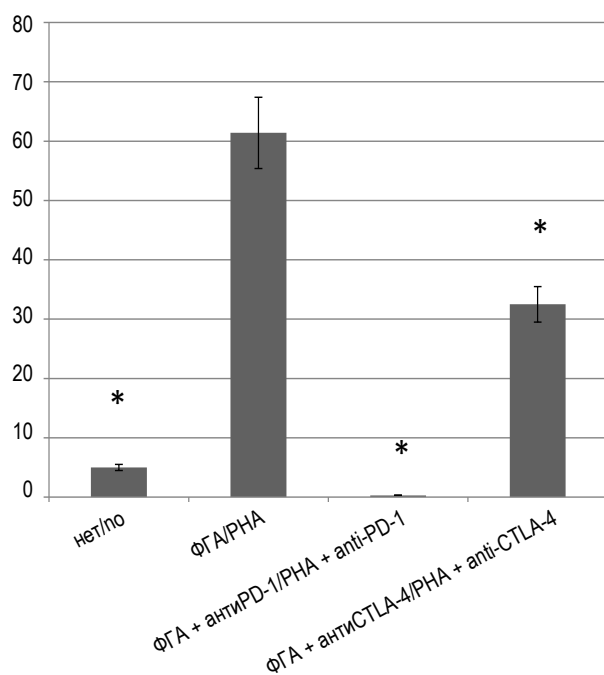


**Рисунок 3.** Воздействие терапии моноклональными антителами к PD-1 на содержание лимфоцитов, несущих внутри клеток CTLA-4

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал.

Figure 3. Effect of anti-PD-1 monoclonal antibody therapy on contents of peripheral blood lymphocytes, which express CTLA-4 intracellularly

Note. Confidence interval is taken for error bars.



**Рисунок 4.** Как антитела к PD-1, так и к CTLA-4 препятствуют увеличению содержания Т-клеток, несущих функциональный ингибиторный рецептор PD-1, в популяции МНК здоровых доноров при их активации ФГА *in vitro*

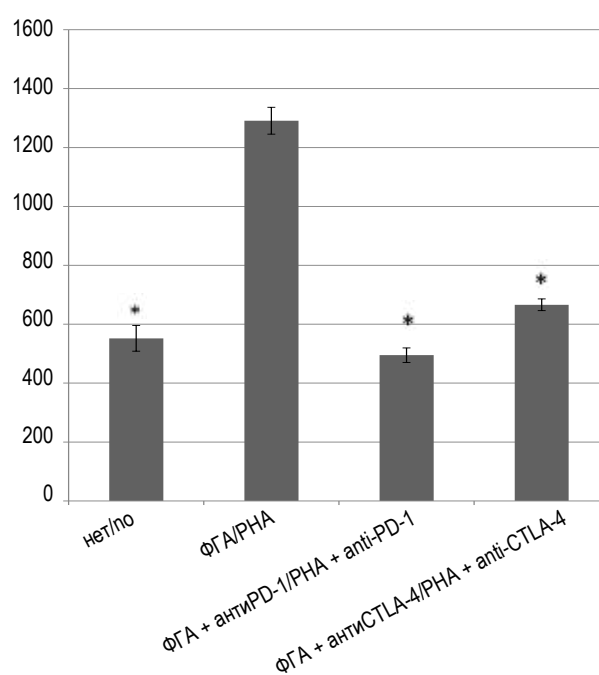
Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал. \* – статистически достоверное отличие по сравнению с долей клеток в присутствии только ФГА при  $p < 0,05$ .

Figure 4. Both anti-PD-1 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies prevent increase of percentages of healthy volunteer peripheral blood T cells, which possess functional PD-1 inhibitory receptor, after activation *in vitro* with PHA

Note. Confidence interval is taken for error bars. \*, significant difference from the proportion of cells activated solely with PHA at  $p < 0.05$ .

активации клеток, с антителами детекции при последующем окрашивании пермебиализированных МНК. Терапевтические антитела к CTLA-4 также препятствовали увеличению содержания лимфоцитов, несущих как собственный рецептор-мишень, так и PD-1, в присутствии ФГА (рис. 4, рис. 5). То есть, отключая негативную регуляцию иммунного ответа через CTLA-4, мы одновременно препятствовали регуловке через другой ингибиторный рецептор, а именно PD-1. Интересно отметить, что из рисунка 5 следует, что антитела к PD-1 имели более выраженный эффект на экспрессию CTLA-4, чем, собственно, антитела к CTLA-4.

Следует отметить, что общая тенденция к снижению содержания обоих функциональных рецепторов чек-пойнтов под воздействием антител лишь к одному из них наблюдалась у всех обследованных доноров. Однако характер воздействия был различным. То есть на кого-то сильнее



**Рисунок 5.** Как антитела к CTLA-4, так и к PD-1 препятствуют увеличению уровня экспрессии рецептора CTLA-4 внутри Т-клеток в популяции МНК здоровых доноров при их активации ФГА *in vitro*

Примечание. В качестве планок погрешности использован доверительный интервал. \* – статистически достоверное отличие по сравнению с долей клеток в присутствии только ФГА при  $p < 0,05$ .

Figure 5. Both anti-PD-1 and anti-CTLA-4 monoclonal antibodies prevent increase of CTLA-4-expression level in healthy volunteer peripheral blood T cells after *in vitro* activation with PHA

Note. Confidence interval is taken for error bars. \*, significant difference from the proportion of cells activated solely with PHA at  $p < 0.05$ .

воздействовали антитела к PD-1, на кого-то – к CTLA-4. Наблюдались индивидуальные особенности реакции на терапевтические антитела к иммунным чек-пойнтам.

Аналогичные результаты были получены также для пациента с метастатической меланомой.

## Обсуждение

По нашим сведениям мы представляем здесь первые результаты, показавшие перекрестное воздействие терапевтических антител к PD-1 и CTLA-4 на содержание их рецепторов мишеней в клеточной популяции при активации. Отключая одно из негативных звеньев регуляции иммунного ответа при помощи моноклональных антител, мы парадоксальным образом подавляли также и второе. Наблюдение было проведено исключительно в момент активации ФГА в системе *in vitro*. Таким образом, остается открытым вопрос о возможности варьирования ответа при ис-

пользовании других активаторов и его действительности *in vivo*.

Как было показано ранее, длительная терапия ипилимумабом стимулирует экспрессию гена CTLA4 [7], а также несколько стимулирует содержание лимфоцитов, несущих ингибиторный рецептор PD-1 [3, 7]. Таким образом, блокирование рецептора CTLA-4, действительно, ведет к модулированию обеих ингибиторных сигнальных цепей как через CTLA-4, так и через PD-1. Однако авторы, в отличие от нас, наблюдали типичную картину компенсаторных механизмов, часто включающихся в природе при ингибировании какого-либо процесса. Впрочем, следует учитывать, что мы отслеживали рецептор на белковом уровне, причем в момент краткосрочной активации *in vitro*, что, вероятно, объясняет кажущееся противоречие. Исследование первых моментов воздействия ингибиторов иммунных чек-пойнтов на иммунную систему пациентов не проводилось, хотя и с большой вероятностью играет ключевую роль в дальнейшем ответе на терапию.

Исследование Das R. и соавт. показало, что рецептор PD-1 на лимфоцитах периферической крови пациентов оказывался полностью заблокированным терапевтическими антителами (ниволумабом) и не взаимодействовал с антителами детекции [7]. Это тоже не соответствует нашим данным, но мы использовали другие антитела детекции, которые конкурируют с ниволумабом крайне слабо. Кроме того, не совпадают точки забора образцов крови.

С точки зрения получения максимального противоопухолевого иммунного ответа со стороны разных звеньев иммунной системы целесообразно комбинировать антитела к модуляторам иммунного синапса PD-1 и CTLA-4, так как таким образом можно достигнуть максимального эффекта как в активации T-, так и НК-клеточных звеньев противоопухолевого иммунитета [7, 13]. К сожалению, подобная терапия сопровождается и более выраженными аутоиммунными побочными эффектами по сравнению с отдельными блокаторами [14]. Поэтому нам представляется целесообразным проведение активации лимфоцитов в присутствии отдельных терапевтических антител и, в особенности, их комбинации

и активаторов лимфоцитов *in vitro* для последующего адоптивного введения пациентам. Подобный подход, по нашим предположениям, должен значительно снизить негативное побочное действие препаратов терапевтических моноклональных антител, блокирующих CTLA-4 и PD-1. Кроме того, подавление негативных регуляторов иммунного ответа, вероятно, позволит получить препараты более активных форм лимфоцитов с лучшим противоопухолевым действием. Как было показано недавно, блокирующие антитела к CTLA-4 и PD-1 могут оказывать дополнительное активирующее воздействие на противоопухолевую активность CIK (cytokine-induced killer cells – клеток-киллеров, индуцированных цитокинами), действие которых в значительной степени определяется НК [22].

Наши данные позволяют предположить синергизм действия антител к CTLA-4 и к PD-1 в отключении ингибиторных функций в регуляции иммунного ответа в лимфоцитах. Действительно, данные клинических исследований показали, что комбинация блокирующих антител к PD-1 и CTLA-4 имеет эффективность, превосходящую сумму терапевтических воздействий каждого из блокаторов по отдельности [7, 32]. Наше исследование может служить одним из объяснений подобного синергичного действия блокаторов.

Наряду с общими закономерностями в перекрестном ингибировании своих и чужих рецепторов мишеней со стороны терапевтических антител к CTLA-4 и PD-1, мы отметили индивидуальные особенности доноров в отношении чувствительности к различным ингибиторам иммунных чек-пойнтов по степени снижения содержания функциональной формы того или иного рецептора. Зачастую антитела к PD-1 в большей степени подавляли содержание CTLA-4, чем, собственно, антитела к нему. Однако встречалась и противоположная картина, когда более выраженное действие оказывали антитела к CTLA-4. По нашим предположениям, подобный тест *in vitro* может служить предиктором чувствительности иммунной системы отдельного пациента к тому или иному ингибитору иммунных чек-пойнтов и способствовать выбору персонализированного метода лечения.

## Список литературы / References

1. Bally A.P., Austin J.W., Boss J.M. Genetic and epigenetic regulation of PD-1 expression. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 6, pp. 2431-2437.
2. Beldi-Ferchiou A., Lambert M., Dogniaux S., Vély F., Vivier E., Olive D., Dupuy S., Levasseur F., Zucman D., Lebbé C., Sène D., Hivroz C., Caillat-Zucman S. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 45, pp. 72961-72977.
3. Bjoern J., Juul Nitschke N., Zeeberg Iversen T., Schmidt H., Fode K., Svane I.M. Immunological correlates of treatment and response in stage IV malignant melanoma patients treated with Ipilimumab. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 4, e1100788. doi: 10.1080/2162402X.2015.1100788.



4. Buchbinder E., Hodi F.S. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, pp. 3377-3383.
5. Chan D.V., Gibson H.M., Aufiero B.M., Wilson A.J., Hafner M.S., Mi Q.S., Wong H.K. Differential CTLA-4 expression in human CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4<sup>+</sup> proliferation. *Genes Immun.*, 2014, Vol. 15, no. 1, pp. 25-32.
6. Corse E., Allison J.P. Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, pp. 1123-1127.
7. Das R., Verma R., Sznol M., Boddupalli C.S., Gettinger S.N., Kluger H., Callahan M., Wolchok J.D., Halaban R., Dhodapkar M.V., Dhodapkar K.M. Combination therapy with anti-CTLA4 and anti-PD1 leads to distinct immunologic changes *in vivo*. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 3, pp. 950-959.
8. Fallarino F., Fields P.E., Gajewski T.F. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 1, pp. 205-210.
9. Fife B.T., Guleria I., Gubbels Bupp M., Eagar T.N., Tang Q., Bour-Jordan H., Yagita H., Azuma M., Sayegh M.H., Bluestone J.A. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, pp. 2737-2747.
10. Gibson H.M., Hedgcock C.J., Aufiero B.M., Wilson A.J., Hafner M.S., Tsokos G.C., Wong H.K. Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 6, pp. 3831-3840.
11. Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 677-704.
12. Khattri R., Auger J.A., Griffin M.D., Sharpe A.H., Bluestone J.A. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, pp. 5784-5791.
13. Larkin J., Lao C.D., Urba W.J., McDermott D.F., Horak C., Jiang J., Wolchok J.D. Efficacy and safety of nivolumab in patients with BRAF V600Mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: pooled analysis of 4 clinical trials. *JAMA Oncol.*, 2015, Vol. 1, no. 4, pp. 433-440.
14. Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J.J., Cowey C.L., Lao C.D., Schadendorf D., Dummer R., Smylie M., Rutkowski P., Ferrucci P.F., Hill A., Wagstaff J., Carlino M.S., Haanen J.B., Maio M., Marquez-Rodas I., McArthur G.A., Ascierto P.A., Long G.V., Callahan M.K., Postow M.A. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 373, no. 1, pp. 23-34.
15. Li X., Wang J., Yao Y., Yang L., Li Z., Yu C., Zhao P., Yu Y., Wang L. Comparative efficacy and safety of immune checkpoint inhibitor-related therapies for advanced melanoma: a Bayesian network analysis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 48, pp. 83637-83649.
16. Linsley P.S., Bradshaw J., Greene J., Peach R., Bennett K.L., Mittler R.S. Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, 1996, Vol. 4, no. 6, pp. 535-543.
17. Mahoney K.M., Freeman G.J., McDermott D.F. The next immune-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma. *Clin. Ther.*, 2015, Vol. 37, pp. 764-782.
18. Niezgodna A., Niezgodna P., Czajkowski R. Novel approaches to treatment of advanced melanoma: a review on targeted therapy and immunotherapy. *Biomed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, 851387. doi: 10.1155/2015/851387.
19. Okazaki T., Tanaka Y., Nishio R., Mitsuiye T., Mizoguchi A., Wang J., Ishida M., Hiai H., Matsumori A., Minato N., Honjo T. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, pp. 1477-1483.
20. Pentcheva-Hoang T., Chen L., Pardoll D.M., Allison J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *PNAS*, 2007, Vol. 104, no. 45, pp. 17765-17770.
21. Pianko M.J., Funt S.A., Page D.B., Cattrly D., Scott E.C., Ansel S.M.I, Borrello I.M., Gutierrez M., Lendvai N., Hassoun H., Landgren C.O., Lesokhin A.M. Efficacy and toxicity of therapy immediately after treatment with nivolumab in relapsed multiple myeloma. *Leuk. Lymphoma*, 2018, Vol. 59, no. 1, pp. 221-224.
22. Poh S.L., Linn Y.C. Immune checkpoint inhibitors enhance cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against human myeloid leukaemic blasts. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 5, pp. 525-536.
23. Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Baker J., Jeffery L.E., Kaur S., Briggs Z., Hou T.Z., Futter C.E., Anderson G., Walker L.S., Sansom D.M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 2011, Vol. 332, no. 6029, pp. 600-603.
24. Riley J.L., June C.H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 1, pp. 13-21.
25. Salama A.D., Chitnis T., Imitola J., Ansari M. J., Akiba H., Tushima F., Azuma M., Yagita H., Sayegh M.H., Khoury S.J. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, pp. 71-78.
26. Stojanovic A., Fiegler N., Brunner-Weinzierl M., Cerwenka A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN- $\gamma$  production in response to mature dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 9, pp. 4184-4191.
27. Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N., Lynch W.P., Bluestone J.A., Sharpe A.H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 1995, Vol. 3, pp. 541-547.

28. Walker L.S.K., Sansom D.M. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 63-70.
29. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1994, Vol. 1, no. 5, pp. 405-413.
30. Wang C.J., Kenefeck R., Wardzinski L., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Qureshi O.S., Sansom D.M., Walker L.S.K. Cutting edge: cell extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, pp. 1118-1120.
31. Weber J., Mandala M., del Vecchio M., Gogas H.J., Arance A.M., Cowey C.L., Dalle S., Schenker M., Chiarion-Sileni V., Marquez-Rodas I., Grob J.J., Butler M.O., Middleton M.R., Maio M., Atkinson V., Queirolo P., Gonzalez R., Kudchadkar R.R., Smylie M., Meyer N. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2017, Vol. 377, no. 19, pp. 1824-1835.
32. Wolchok J.D., Kluger H., Callahan M.K., Postow M.A., Rizvi N.A., Lesokhin A.M., Segal N.H., Ariyan C.E., Gordon R.A., Reed K., Burke M. M., Caldwell A., Kronenberg S.A., Agunwamba B.U., Zhang X., Lowy I., Inzunza H.D, Feely W., Horak C.E. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 2, pp. 122-133.

---

**Авторы:**

**Чикилева И.О.** — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Шубина И.Ж.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Самойленко И.В.** — к.м.н., отделение биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Караулов А.В.** — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Киселевский М.В.** — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

---

**Authors:**

**Chikileva I.O.**, PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Shubina I.Zh.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Samoylenko I.V.**, PhD (Medicine), Department of Tumor Biotherapy, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

**Karaulov A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunology and Allergology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Kiselevsky M.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Cell Immunity, Research Institute of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. Blokhin Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 16.04.2018

Отправлена на доработку 10.05.2018

Принята к печати 21.05.2018

---

Received 16.04.2018

Revision received 10.05.2018

Accepted 21.05.2018