

НЕОАНТИГЕНЫ В ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

М.А. Барышникова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_ba@mail.ru

Раковые клетки в процессе развития опухоли накапливают много мутаций соматических генов. В результате таких генетических мутаций в опухолевых клетках образуются антигены, специфичные только для клеток опухоли и отсутствующие в нормальных тканях. Они получили название «неоантигены». Такие неоантигены могут быть высоко иммуногенными и рассматриваются в качестве молекул-мишеней, воздействие на которые может привести к отторжению опухоли. Хотя о существовании неоантигенов известно уже долгое время, их изучение и использование в терапии опухолей стало возможным только с повышением доступности массового кластерного секвенирования для детекции всех мутаций в опухолях и биоинформационных алгоритмов, предсказывающих, какие мутированные пептиды будут высокоаффинно связываться с аутологичными молекулами человеческих лейкоцитарных антигенов с последующей активацией иммунного ответа.

Ключевые слова: неоантигены, пептиды, противоопухолевые вакцины, блокаторы иммунных чек-пойнтов

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14

NEOANTIGENS IN TUMOR IMMUNOTHERAPY

M.A. Baryshnikova, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Malignant tumors are known to have complex mutational profiles and harbor concurrent alterations in many somatic genes. The inherent genetic heterogeneity is a critical determinant of cancer cells. The term of neoantigens was introduced to emphasize that these antigens are specific for cancer cells and are absent in normal tissue. Neoantigens are highly immunogenic and at present are considered to be the target molecules in cancer therapy. Although the neoantigens have been known for a long time, their study and use became possible with the increase in the availability of mass cluster sequencing to detect all mutations in tumors and bioinformatic algorithms predicting what mutated peptides will be highly affine to human leukocyte antigen autologous molecules with subsequent activation of the immune response.

Key words: neoantigens, peptides, anticancer vaccines, immune check point inhibitors

Введение

Иммунотерапия опухолей начала новый виток своего развития после успешного применения в клинике препаратов, направленных на контрольные точки иммунной системы. Многочисленные исследования демонстрируют, что в опухолях накапливается множество соматических мутаций, результатом которых является экспрессия антигенов, специфичных для опухоли и отсутствующих в нормальных тканях, которые получили в литературе название «неоантигены». В некоторых случаях неоантигены могут вызывать иммунный ответ против опухоли из-за отсутствия толерантности к ним, в результате чего они могут распознаваться клетками иммунной системы как чужеродные белки [1].

В 1990-е годы было обнаружено, что у ряда онкологических больных с опухолями, отличающимися высокой генетической нестабильностью, при лече-

нии с помощью адоптивной иммунотерапии развивался сильный Т-клеточный иммунный ответ против неоантигенов [2–4]. Эти мутации были в большинстве случаев уникальны для каждого конкретного пациента и, к сожалению, не могли быть универсальными мишенями для вакцинотерапии рака, поэтому исследования неоантигенов не выходили за рамки фундаментальных и долгое время не попадали из лабораторий в клинику.

Неоантигены и ответ на терапию блокаторами иммунных чек-пойнтов

Успехи в терапии опухолей, достигнутые при использовании блокаторов контрольных точек иммунной системы, возродили интерес к неоантигенам. Иммунологические контрольные точки, или иммунные чек-пойнты, — это система ингибиторных механизмов, которые участвуют в регуляции иммунного ответа.

В норме они защищают организм от аутоиммунных реакций, ограничивают повреждения органов и тканей, вызванные иммунными клетками. Эти механизмы ингибирования появляются и в опухолевой ткани, защищая клетки опухоли от распознавания иммунной системой.

Было замечено, что меланома и рак легкого хорошо отвечают на анти-PD-1-терапию, и некоторыми исследователями было сделано предположение, что мутантные пептиды частично вовлечены в развитие Т-клеточного ответа на лечение [5]. Было обнаружено, что опухоли, поддающиеся лечению блокаторами иммунных чек-пойнтов, обладают генетической нестабильностью и имеют большое число мутаций [6, 7].

В исследовании G.P. Pfeifer было показано, что УФ-индуцированная меланома и рак легких курильщиков несут множество генных мутаций [8]. В работе В. Heemskerk и соавт. было сделано предположение, что большое количество мутаций в таких опухолях, как меланома кожи, индуцированный курением рак легкого, колоректальный рак, связано с подверженностью клеток мутагенным или воспалительным стимулам: УФ-излучению, сигаретному дыму, еде, содержащей мутагенные и способствующие воспалению компоненты [9].

N. McGranahan и соавт. показали взаимосвязь между наличием неоантигенов и общей выживаемостью при первичных аденокарциномах легких [10]. На ранних стадиях немелкоклеточного рака легкого идентифицировали инфильтрирующие опухоль CD8⁺ лимфоциты, которые экспрессировали высокие уровни PD-1. У больных прогрессирующим немелкоклеточным раком легкого и меланомой чувствительность к блокаторам PD-1 и CTLA-4 была повышена в случае неоантиген-положительных опухолей, у пациентов с устойчивым клиническим ответом определяли Т-клетки, распознающие неоантигены. Также в результате этой работы обнаружено значительное повышение выживаемости у больных колоректальным раком с высоко нестабильным геномом при лечении блокаторами PD-1.

В исследовании D.T. Le и соавт. оценивали клиническую эффективность пембролизумаба (анти-PD-1) у пациентов с прогрессирующей метастатической карциномой с наличием или отсутствием дефектов репарации однонуклеотидных замен [11]. Было показано, что высокая нагрузка соматическими мутациями связана с увеличением времени выживаемости без прогрессирования после лечения пембролизумабом. У пациентов с большим количеством мутаций объективный ответ на лечение и время выживаемости без прогрессирования составили 40 и 70 % соответственно, в отличие от 0 и 11 % у пациентов с низким числом мутаций. Таким образом, это исследование

показало, что статус репарации однонуклеотидных замен является прогностически значимым для предсказания клинической эффективности блокады иммунных чек-пойнтов пембролизумабом [11].

В опухолях разных типов, отвечающих на терапию блокаторами контрольных точек иммунной системы, обнаружены CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфичные к неоантигенам [1]. Эти данные подтверждают, что распознавание неоантигенов – важный фактор, обеспечивающий эффективность иммунотерапии в клинике.

Неоантигены как мишени для терапии опухолей

Недавние достижения в секвенировании следующего поколения и компьютерном анализе привели к быстрой и доступной идентификации индивидуальных неоантигенов у пациентов.

В 2007 г. M. Nielsen и соавт. был предложен алгоритм для количественного прогнозирования связывания мутантных пептидов, определенных при полноэкзомном секвенировании, с любыми локусами HLA-A и -B (HLA – human leukocyte antigens, человеческие лейкоцитарные антигены) [12]. В результате было выполнено значительное число работ, посвященных возможности создания противоопухолевых вакцин на основе неоантигенов.

Новые методы для легкого и доступного определения иммуногенных неоантигенов вызвали повышенный интерес научного сообщества, так как значительно расширили спектр потенциальных мишеней для персонализированной иммунотерапии [5]. В ноябре 2013 г. на воркшопе Общества иммунотерапии рака (Society for Immunotherapy of Cancer, SITC), посвященном персонализированной терапии опухолей, были подняты следующие вопросы: являются ли клинические ответы на терапию цитокинами, адоптивным Т-клеточным переносом или блокаторами иммунных чек-пойнтов опосредованными специфической реактивностью на неоантигены? Какие неоантигены наиболее хорошо распознаются клетками иммунной системы и могут ли неоантигены быть эффективно использованы в качестве вакцин? [5].

Систематические исследования мутаномы опухоли начались около 5 лет назад. В 2012 г. J. Castle и соавт. предположили, что использование секвенирования для систематического анализа иммуногенных мутаций может проложить путь для персонализированной терапии онкологических пациентов [13]. В своей работе J. Castle и соавт. секвенировали геном клеток мышины меланомы B16F10 и обнаружили, что он несет 962 точечные соматические мутации, причем 563 из них были в экспрессирующихся генах. Потенциальные драйверные мутации встречались в классических опухолевых супрессорных генах и генах, вовлеченных в проонкогенные сигнальные пути,

которые контролируют клеточную пролиферацию, адгезию, миграцию и апоптоз. Среди найденных мутаций были Aim1 и Tggr, известные и для человеческой меланомы. Иммуногенность и специфичность 50 валидированных неоантигенов определяли иммунизацией мышей длинными пептидами, способствовавшими представлению на МНС I и II классов мутированных эпитопов. Треть этих пептидов оказалась иммуногенной, в 60 % выявили иммунные ответы, направленные избирательно против мутированных последовательностей в сравнении с последовательностями дикого типа. На мышинных моделях с перевитыми опухолями иммунизация пептидами вызывала подавление роста опухоли *in vivo* в профилактических и терапевтических режимах, демонстрируя, таким образом, что мутированные эпитопы, содержащие 1 аминокислотную замену, могут быть использованы в качестве эффективных вакцин [13].

Исследование мутаномы также использовали Н. Matsushita и соавт. [14]. В процессе изучения механизмов иммуноредактирования опухолей они охарактеризовали мутации в высокоиммуногенных метилхолантрен-индуцированных саркомах иммунодефицитных Rag^{-/-} мышей, которые фенотипически похожи на зарождающиеся клетки первичной опухоли. Иммуноредактирование рака — процесс селекции иммунной системой низкоиммуногенных опухолевых клеток — включает 3 фазы: удаление, балансирование и ускользание. Несмотря на то что известны многие компоненты иммунной системы, участвующие в этом процессе, его основные механизмы пока остаются плохо изученными. Центральным принципом иммуноредактирования рака заключается в том, что процесс распознавания Т-клетками опухолевых антигенов управляет иммунологической деструкцией опухоли или, наоборот, ее ростом. Имеющиеся знания об опухолевых антигенах получены в основном в результате анализа опухолей, которые развились в иммунокомпетентных организмах и поэтому уже являются «отредактированными». Мало известно об антигенах, экспрессированных в зарождающихся опухолях: достаточно ли их, чтобы индуцировать защитные противоопухолевые иммунные ответы, или их экспрессия регулируется иммунной системой? Ответ на этот вопрос искали в своей работе Н. Matsushita и соавт. Используя экзомное секвенирование и компьютерный анализ связывания мутантных пептидов с молекулами главного комплекса гистосовместимости, авторы идентифицировали точечную мутацию в гене *спектрин-β2*, которая приводит к тому, что сильно возрастает связывание пептида с МНС I класса. Авторы доказали, что этот пептид является доминантным опухолевым антигеном, который вызывает полную спонтанную CD8⁺ Т-клеточно-опосредованную регрессию метилхолантрен-

индуцированной саркомы у иммунокомпетентных мышей. Таким образом, высокая иммуногенность «неотредактированных» опухолей может быть обусловлена экспрессией высоко антигенных мутантных пептидов. Н. Matsushita и соавт. предположили, что одним из механизмов иммуноредактирования опухоли является Т-клеточно-зависимый процесс иммуноселекции опухолевых клеток, у которых отсутствуют неоантигены, вызывающие иммунный ответ [14].

В 2013 г. P.F. Robbins и соавт. также использовали полноэкзомное секвенирование для идентификации мутантных неоантигенов [15]. При проведении II фазы клинических испытаний адоптивной иммунотерапии аутологичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TILs) обнаружили, что существенная регрессия метастатического поражения наблюдалась более чем у 70 % больных меланомой, получавших данное лечение. У 40 % пациентов после лечения наблюдалась полная регрессия, длящаяся как минимум 5 лет. Для того чтобы оценить связь между способностью TILs вызывать стойкую регрессию и распознавать неоантигены, авторы разработали скрининговый подход, включающий использование данных полноэкзомного секвенирования для идентификации мутантных белков в опухоли пациента. Затем авторы синтезировали и оценили кандидатные мутантные Т-клеточные эпитопы, которые были идентифицированы при помощи алгоритма связывания с главным комплексом гистосовместимости как распознающиеся Т-лимфоцитами. Используя такой подход, авторы идентифицировали мутантные антигены, экспрессированные на аутологичных опухолевых клетках, которые распознавались 3 линиями TILs, полученными от 3 пациентов с меланомой, и были ассоциированы с объективной регрессией опухоли, вызванной адоптивной иммунотерапией. Этот простой подход к идентификации мутантных антигенов, распознаваемых Т-клетками, позволил избежать необходимости создания библиотек кДНК из опухолей и их кропотливого скрининга [15].

Еще одна группа исследователей, F. Duan и соавт., доложила о возможности использования компьютерного анализа для точной идентификации иммуногенных неоантигенов с помощью нейронной сети NetMHC и анализа конформационной стабильности взаимодействия пептид — МНС I класса [16]. С помощью данного подхода авторам удалось идентифицировать мутантные неоэпитопы для создания новых якорных остатков, способных к связыванию с молекулой главного комплекса гистосовместимости. Неоэпитопы, идентифицированные авторами, вызывали CD8-зависимый иммунный ответ.

В ряде работ было подтверждено, что образующиеся в результате соматических мутаций пептиды, представленные молекулами главного комплекса

гистосовместимости I или II класса, могут вызывать активацию цитотоксических Т-лимфоцитов, что в итоге может приводить к контролю над заболеванием и регрессии опухоли, а в некоторых случаях и к излечению заболевания [1].

Полногеномный анализ опухолевых тканей показал гораздо больше мутаций, чем ожидалось, которые накапливаются в разных типах опухолей. Продукты мутировавших генов сами по себе служат потенциальными терапевтическими мишенями, особенно если такие генные продукты содержат драйверные мутации, которые влияют на канцерогенез так, как это происходит с HER2, p53 и Ras. Многие из них являются объектами таргетной терапии моноклональными антителами, ингибиторами ферментов и рецепторов, но в результате исследований, проведенных в последние годы, появились доказательства, что и «пассажирские» мутации, которые на первый взгляд кажутся не влияющими на канцерогенез, могут обладать иммуногенностью и служить мишенями для иммунотерапии. В данном случае основным мотивом терапии является стимуляция иммунной системы к узнаванию новых антигенов и развитию иммунологической реакции против опухоли. Таким образом, высокая мутационная нагрузка опухоли, с одной стороны, ускоряет процесс эволюции опухоли, с другой стороны — обеспечивает наличие новых антигенов, позволяющих атаковать опухоль активным Т-клеткам.

М. М. Gubin и соавт. использовали геномный и биоинформационный подходы, чтобы идентифицировать опухолеспецифичные мутантные белки как основной класс антигенов, с которыми реагируют Т-клетки, в результате анти-PD-1 или CTLA-4-терапии мышей с саркомой, и показали, что терапевтические вакцины из синтетических длинных пептидов, связывающихся с этими мутантными эпитопами, индуцируют отторжение опухоли, сравнимое с терапией блокаторами контрольных точек [7]. Авторы подтвердили, что Т-клетки, специфичные к мутантным антигенам, присутствуют в быстро растущих опухолях, они активируются в результате блокады иммунных чек-пойнтов (PD-1 и CTLA-4) и показывают перекрывающиеся, но в основном специфичные для лечения транскрипционные профили, делающие их способными к опосредованному удалению опухоли. Эти результаты еще раз подтверждают, что наличие опухолеспецифических мутантных антигенов — не только важное основание для терапии блокаторами иммунных контрольных точек. Они также могут быть использованы для создания персонализированных опухолеспецифических вакцин и для фундаментальных исследований различных препаратов — блокаторов иммунных чек-пойнтов.

Еще одно подтверждение того, что представленные главным комплексом гистосовместимости I класса

мутантные пептиды могут быть иммуногенными, поскольку распознаются адаптивной иммунной системой как «чужие» неоантигены, приведено в работе М. Yadav и соавт. [17]. Исследователи разработали подход, который комбинирует анализ полноэкзомного и транскриптомного секвенирования с масс-спектрометрией для идентификации неоэпитопов на 2 широко используемых мышинных моделях. Идентифицировали более 1300 аминокислотных изменений, из которых для 13 % с помощью компьютерного анализа было предсказано связывание с МНС I класса, подтвержденное масс-спектрометрией. В результате структурного моделирования связывания с МНС I класса мутации, доступные Т-клеточным рецепторам, были выбраны как иммуногенные. Вакцинация мышей отдельно каждым иммуногенным пептидом вызвала Т-клеточный терапевтический ответ. Эта группа исследователей также показала, что с помощью компьютерного анализа можно генерировать декстримеры пептид — МНС I, которые могут быть использованы для мониторинга кинетики и распределения противоопухолевого Т-клеточного ответа до и после вакцинации. Работа показывает, что доступный алгоритм компьютерного анализа может обеспечить подход к фармакодинамическому мониторингу Т-клеточного ответа на персонализированные противоопухолевые вакцины у больных раком.

S. Kreiter и соавт. предложили персонализированный подход к иммунотерапии, нацеленный на полный спектр всех индивидуальных для опухоли пациента мутаций [18]. На 3 независимых мышинных опухолевых моделях они продемонстрировали, что значительная фракция неоантигенов, являющихся результатом несинонимичных опухолевых мутаций, иммуногенна и большинство иммуногенных неоантигенов распознается CD4⁺ Т-клетками. В работе S. Kreiter и соавт. мутации, являющиеся потенциальными мишенями для вакцинотерапии, идентифицировали при секвенировании экзома и выбирали с помощью биоинформационного анализа, оценивая уровни их экспрессии и связывание с молекулой главного комплекса гистосовместимости II класса. Оказалось, вакцинация синтетическими полиэпитопными мРНК-вакцинами индуцирует мощный контроль над опухолью и полное рассасывание ранее перевитых агрессивно растущих опухолей у мышей, меняет опухолевое микроокружение и индуцирует цитотоксический Т-лимфоцитарный ответ. Авторы предлагают рассматривать специализированный иммунотерапевтический подход как универсальную модель для разностороннего использования обширного репертуара неоэпитопных мишеней, дающую возможность эффективного поражения каждой опухоли пациента с помощью персонализированных вакцин, произведенных в нужное время [18].

В 2015 г. С. J. Cohen и соавт. впервые продемонстрировали успешное выделение Т-клеток, реактивных к неоантигенам, из периферической крови пациента перед иммунотерапией [19]. Для этого провели полноэкзомное секвенирование опухоли и нормальной дезоксирибонуклеиновой кислоты, выделенной у 8 пациентов с метастатической меланомой. С помощью алгоритма связывания пептида с молекулой главного комплекса гистосовместимости идентифицировали кандидатные мутантные эпитопы, которые затем синтезировали и использовали, чтобы генерировать панели тетрамеров МНС, которые были оценены по связыванию с опухолью, после чего культивированные Т-лимфоциты использовали для лечения пациентов. Эта стратегия привела к идентификации 9 мутантных эпитопов у 5 пациентов из 8. Клетки, реагирующие с 8 из 9 эпитопов, могли быть выделены из аутологичной периферической крови, где они определялись с частотой приблизительно между 0,4 и 0,002 % [19].

В исследовании A. L. Pritchard и соавт. использовали высокопроизводительный скрининговый подход, комбинирующий данные полноэкзомного секвенирования, исследования мРНК и общедоступный алгоритм прогнозирования неоэпитопов для идентификации мутантных белков в опухоли пациента, распознаваемых циркулирующими клетками иммунной системы [20]. В исследование были включены 5 пациентов, у 3 из которых был полный ответ в течение 15 лет на лечение аутологичными дендритноклеточными вакцинами. Аутологичные клеточные линии меланомы, ранее полученные из опухолевого материала больных, и мононуклеары их периферической крови использовали для создания смешанной культуры лимфоцитов с опухолевыми клетками, что приводило к экспансии неоантиген-реактивных Т-клеток, которые использовали в скрининге мутантных пептидов. Идентифицировали 7 мутантных антигенов, которые стимулировали Т-эффекторные клетки памяти у 2 из 5 пациентов [20].

Таким образом, использование данных секвенирования опухоли пациента и HLA-типирования циркулирующих клеток периферической крови в качестве основы для прогнозирования иммуногенных неоантигенов имеет большие возможности для применения в персонализированной терапии больных раком. Интеграция этих технологий в клиническую практику — многообещающая инновация в лечении онкологических больных.

Персонализированные неоантигенные вакцины. Клинические испытания

На основании результатов вышеизложенных исследований начаты клинические испытания ряда персонализированных противоопухолевых вакцин в Европе, Северной Америке и Китае.

В настоящее время активно развиваются 2 подхода к иммунотерапии опухолей с помощью неоантигенов: пептидные вакцины и РНК-вакцины. Пептидные вакцины могут содержать смеси синтетических пептидов с адъювантами или дендритные клетки, нагруженные пептидами.

Оба подхода имеют общие базовые этапы: в результате анализа мутантного опухоли пациента выбирают мутации для создания вакцины, которые с наибольшей вероятностью будут обеспечивать контроль над опухолью. Важно, чтобы мутации, на основе которых будут созданы противоопухолевые вакцины, подтверждались несколькими независимыми методами, были специфичными только для опухоли и содержались в транскриптах, кодирующих белки, вызывали изменения в последовательностях белков и экспрессировались в опухолевых клетках.

Преимущество РНК-вакцин заключается в том, что рибонуклеиновую кислоту можно быстро и доступно синтезировать в условиях GMP. РНК-вакцины имеют собственную адъювантную активность, могут представлять несколько эпитопов в одной молекуле, эндогенно транслируются, эффективно обеспечивают механизмы производства и презентации антигена и вызывают мощный противоопухолевый иммунитет [21]. Однако серьезным недостатком РНК-вакцин являются сложности в доставке к клеткам-мишеням *in vivo*, поскольку они не проходят через клеточную мембрану и разрушаются внеклеточными рибонуклеазами. Существуют разные подходы к адресной доставке таких вакцин. Например, это может быть использование РНК-трансфицированных дендритных клеток или прямое введение мРНК.

В работе L. M. Kranz и соавт. описана методика доставки рибонуклеиновой кислоты в дендритные клетки с помощью липидных капсул [22]. В исследовании представлены результаты эффективной доставки *in vivo* при внутривенном введении в дендритные клетки РНК-липоплексов, созданных на основе хорошо известных липидных носителей с оптимальной регулировкой заряда без необходимости функционализации частиц молекулярными лигандами. Липоплексы защищали рибонуклеиновую кислоту от экстрацеллюлярных рибонуклеаз и вызывали их эффективный захват и экспрессию кодируемого антигена популяциями дендритных клеток и макрофагов в различных лимфоидных компартментах. РНК-липоплексы активировали созревание дендритных клеток *in situ* и воспалительные иммунные механизмы, напоминающие механизмы ранней стадии вирусной инфекции. РНК-липоплексы индуцировали сильные ответы эффекторных Т-клеток и клеток памяти и вызывали INF α -зависимое отторжение прогрессирующих опухолей. В I фазе клинических испытаний по эскалации дозы РНК-липоплексов

у первых 3 пациентов с меланомой, леченных низкими дозами вакцины, наблюдали индукцию $INF\alpha$ и сильные антиген-специфические Т-клеточные ответы. Поскольку любой антиген, имеющий в основе полипептид, может быть кодирован рибонуклеиновой кислотой, РНК-липopleксы представляют собой универсальную легко применяемую вакцину для системной доставки к дендритным клеткам и синхронной индукции как мощного адаптивного иммунитета, так и врожденных иммунных механизмов, опосредованных индукцией интерферона для иммунотерапии рака.

В 2017 г. в Nature были опубликованы результаты клинических исследований вакцин для предотвращения рецидива метастатической меланомы после ее хирургического удаления. Одна из работ описывает клиническое использование вакцины на основе длинных пептидов, а другая – РНК-вакцины [23, 24]. В результате обоих исследований наблюдались активация $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток и предотвращение рецидива заболевания у большинства пациентов. В случае рецидива после использования вакцин наблюдали хороший эффект анти-PD-1-терапии.

Работа, выполненная Р.А. Ott и соавт. [23], описывает клинические испытания иммуногенной персонализированной неоантигенной вакцины на основе длинных пептидов для лечения меланомы. Авторы исследования предположили, что вакцинация неоантигенными пептидами может, с одной стороны, увеличить уже существующую популяцию неоантиген-специфических Т-клеток, а с другой – индуцировать более широкий репертуар новых специфических к опухоли Т-клеток у онкологических больных, приводя к контролю развития опухоли. Для создания вакцины, направленной на персональные неоантигены опухоли пациента, исследователи провели полноэкзомное секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты опухоли и нормальных клеток, полученных от этого пациента, идентифицировали соматические мутации, ортогонально проверили и оценили экспрессию мутированных аллелей РНК-секвенированием опухоли, предсказали, какие мутированные пептиды вероятнее всего связываются с аутологичными HLA-A или HLA-B белками пациентов и синтезировали клинически применимые длинные пептиды. Полученные пептиды смешали с иммуногенным адьювантом – поли-ICLC (Хилтонол), являющимся лигандом TLR3 и MDA5. Полученную вакцину оценили в клиническом исследовании I фазы, результаты которого показали доступность, безопасность и иммуногенность пептидной вакцины, направленной на 20 ранее предсказанных персональных опухолевых антигенов. Индуцированные вакциной полифункциональные $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки поражали 58 (60 %) и 15 (16 %) соответственно из

97 уникальных неоантигенов при вакцинации пациентов. Т-клетки отличали мутантные антигены от антигенов дикого типа и в некоторых случаях прямо распознавали аутологичные опухоли. Из 6 вакцинированных пациентов 4 не имели рецидива заболевания в течение 25 мес после вакцинации, тогда как у 2 больных с рецидивом была в дальнейшем применена анти-PD1-терапия и наблюдалась полная регрессия опухоли. Полученные в исследовании результаты обеспечивают обоснование для будущего развития данного иммунотерапевтического подхода, как отдельно, так и в комбинации с блокаторами контрольных точек или другими видами иммунотерапии [23].

В исследовании U. Sahin и соавт. представлен РНК-полинеоэпитопный подход к мобилизации иммунитета против спектра опухолевых мутаций [24]. Описаны результаты клинического применения у больных меланомой персонализированной неоантигенной РНК-вакцины, направленной на мутаном опухоли. Процесс создания вакцины включал комплексную идентификацию индивидуальных мутаций, компьютерный анализ таргетных неоэпитопов, дизайн и производство вакцины, уникальной для каждого пациента. У всех больных, принимавших участие в исследовании, развились Т-клеточные ответы против неоэпитопов вакцины. У 2 пациентов после вакцинации были удалены метастазы, в которых наблюдали индуцированную вакциной Т-клеточную инфильтрацию и неоэпитоп-специфическую гибель аутологичных опухолевых клеток. После начала вакцинации у больных стали значительно реже появляться метастазы и увеличилось время без прогрессирования. У 2 из 5 пациентов с метастазами наблюдался опосредованный вакциной объективный ответ. Один из этих пациентов имел рецидив из-за развития $\beta 2$ -микроглобулин-дефицитной меланомы, что является показателем приобретенной резистентности. У 1 пациента развился полный ответ на вакцинацию в комбинации с анти-PD1-терапией. Таким образом, исследованная неоэпитопная вакцина может предотвращать рецидив заболевания в группе пациентов с высоким риском. Кроме того, рациональная комбинация вакцины с блокаторами PD-1/PD-L1. Т-клетки, специфичные к неоэпитопам, имели PD-1-положительный фенотип клеток памяти, после вакцинации наблюдалось снижение уровня PD-L1.

Недавно опубликованы результаты еще одного клинического применения пептидной неоантигенной вакцины для лечения рака поджелудочной железы [25], которое подтверждает, что новые подходы к секвенированию помогают быстро идентифицировать мутаном опухоли и создавать персонализированные противоопухолевые вакцины в течение нескольких недель после постановки диагноза. В статье

приведен клинический случай терапии 62-летнего пациента пептидной вакциной, содержащей 4 пептида, направленных на 2 мутации в опухоли поджелудочной железы, идентифицированные с помощью экзомного секвенирования. Вакцинацию начали во время химиотерапии во время 2-й полной ремиссии и продолжили через месяц. Отслеживали INF γ -положительный клеточный ответ против пептидов вакцины в периферической крови после 12, 17 и 34 вакцинаций, анализируя разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов и эпитопсвязывающие регионы пептид-реактивных Т-клеточных линий и клонов. При анализе INF γ -продуцирующих клеток подтверждали эпитоп-специфичность, функциональность и Th1-поляризацию. Наблюдали пептид-специфический Т-клеточный ответ против 3 из 4 пептидов вакцины. Молекулярный анализ выявил широкий репертуар реагирующих на вакцину специфичных Т-клеточных рецепторов. Наблюдаемые Т-клеточные ответы вероятно привели к клиническому эффекту: пациент жив в течение 6 лет после постановки диагноза и имеет полную ремиссию 4 года.

Представленные результаты доказывают, что недорогое и доступное ДНК-секвенирование привело к началу новой эры в иммунотерапии рака, так как дает возможность развития высоко персонализированных подходов к терапии опухолей.

Адьюванты для успешной противоопухолевой вакцинотерапии

Несмотря на огромный потенциал противоопухолевых вакцин, их эффективность при применении у людей ограничена. Результаты исследования эффективности противоопухолевых вакцин на животных и в клинических испытаниях многократно подтверждают необходимость использования адьювантов при вакцинотерапии опухолей. Причем давно используемые и разрешенные к применению адьюванты, такие как алюминиевые квасцы, неполный адьювант Фрейнда, не подходят для противоопухолевой вакцинации из-за недостаточной иммуногенности или же из-за развития нежелательных побочных реакций на них. Традиционно в вакцинотерапии адьюванты использовали в качестве депо или системы доставки антигенов антигенпрезентирующим клеткам [26].

В исследованиях противоопухолевых неоантигенных вакцин, проведенных в последние 5 лет, использовали адьюванты с иммуностимулирующими свойствами, наиболее часто – лиганды TLR-3, такие как поли-И:С (polyinosinic:polycytidylic acid, poly IC). TLR-3 – эндосомальный толлподобный рецептор 3 распознает инфицирование РНК-вирусами через внутриклеточную двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту [27]. Рецепторы паттернов распознавания

(PRRs) играют ключевую роль в системе врожденного иммунитета и обеспечивают ответ организма, направленный против микробной инфекции. Анти-микробные сигналы, индуцированные PRR, обеспечивают продукцию интерферона и цитокинов и запускают воспалительный процесс, они влияют на прогрессию опухоли и развитие аутоиммунных заболеваний. На сегодняшний день известно, что среди всех PRR только сигнальный путь эндосомального TLR-3 не индуцирует системное воспаление и вызывает активацию антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток дендритными клетками [28]. Синтетический лиганд TLR-3 поли-И:С является мощным адьювантом, способным активировать образование антиген-специфичных антител, цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы 1-го типа. Однако помимо активации иммунных ответов поли-И:С активирует внутриклеточные рецепторы вирусной инфекции – RIG-1 и MDA5, ассоциированные с токсическими эффектами, такими как индукция системного цитокинового шторма [26]. Для того чтобы преодолеть эти эффекты, была разработана модифицированная синтетическая молекула гибрид ДНК и двухцепочечная рибонуклеиновая кислота, которая связывается с TLR-3, но не с RIG-1 и MDA5. Новый лиганд TLR3 (ARNAX) совместно с опухолеспецифическими антигенами индуцировал опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты, модулировал опухолевое микроокружение по Th1-типу противоопухолевого иммунного ответа, приводил к регрессии опухоли без развития воспаления на мышинных моделях. Комбинация ARNAX и опухолеспецифических антигенов с блокаторами PD-1/PD-L1 приводила к усилению противоопухолевого ответа и помогала преодолевать резистентность к анти-PD-1/PD-L1 [29].

Еще одна модификация поли-И:С, стабилизированная поли-L-лизином (poly ICLC) (торговое название – Хилтонол (Oncovir)) взаимодействует с TLR-3 и MDA5. Исследования, проведенные на добровольцах, показали повышение активности генов, вовлеченных в сигнальные пути врожденного иммунного ответа, в том числе, отвечающих за активацию интерферона и провоспалительных сигналов [30].

Так же, как и поли-И:С, поли-ICLC активировал опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты, NK- и NKT-клетки, обеспечивая значительную регрессию опухоли и увеличение продолжительности жизни у мышей [31].

Другая модификация поли-И:С – poly (I:C₁₂C) (Амплиген) – нетоксичный и произведенный в условиях GMP аналог с заменой однонуклеотидных оснований (G и U), которые делают его более устойчивым к гидролизу и значительно снижают токсичность. Было показано, что системное внутривенное введение Амплигена не вызывало токсических эффектов,

клинические испытания у пациентов с метастатическим раком почки показали, что он может вызывать противоопухолевые иммунные ответы, обеспечивающие увеличение выживаемости больных через механизмы активации NK- и T-клеток [32].

Помимо лигандов TLR-3 совместно с неоантигенными вакцинами применяют другие адъюванты. Например, в исследовании [25] в качестве адъюванта использовали ГМ-КСФ, поскольку его эффективность была подтверждена для первой разрешенной к применению FDA вакцины против рака предстательной железы Provenge [33], а в III фазе клинических исследований ГМ-КСФ в комбинации с противоопухолевыми вакцинами показал улучшение клинического исхода у больных меланомой [34].

R. Kuai и соавт. показали, что нанодиски, митигирующие липопотеины высокой плотности, соединенные с неоантигенными пептидами и адъювантами, могут значительно улучшить доставку компонентов вакцины к лимфоидным органам и поддержать презентацию антигена дендритными клетками. Исследователи обнаружили, что вакцина с нанодисками более чем в 47 раз чаще вызывает неоантиген-специфический T-клеточный ответ по сравнению с растворимыми вакцинами, а также иммунный ответ, который более чем в 31 раз сильнее по сравнению с адъювантом CpG в Monatinide. Вакцины с нанодисками вызывали рассасывание развившихся опухолей мышей MC-38 и B16F10 в комбинации с анти-PD-1- и анти-CTLA4-терапией [35].

Использование в противоопухолевых неоантигенных вакцинах иммуностимулирующих или иммуномодулирующих адъювантов, которые преодолевают

толерантность опухолевого микроокружения и вызывают мощный противоопухолевый иммунный ответ, может обеспечить эффективность вакцинотерапии.

Заключение

Инновации в секвенировании опухолевого экзома и компьютерном анализе данных обозначили новую эру персонализированной иммунотерапии с помощью специфичных для пациента неоантигенов. Неоантигены – перспективная мишень для персонализированных противоопухолевых вакцин, позволяющая целенаправленно контролировать опухоль, не задевая нормальные ткани. Однако на сегодняшний день недостаточно клинических испытаний для того, чтобы сделать объективный вывод об их эффективности. Также требуют прояснения и оптимизации практические вопросы производства и применения персонализированных вакцин.

Проведенные разными группами исследования имеют много общих черт, подтверждая, что для эффективного контроля опухоли одного метода терапии неоантигенными пептидными или РНК-вакцинами недостаточно. Прогностическим фактором для оценки потенциальной эффективности терапии, направленной на преодоление иммунорезистентности опухолевых клеток, может служить уровень экспрессии PD/PD-L/CTLA на клетках опухоли и лимфоцитах. Не менее важным является определение уровня генетической нестабильности или количества мутаций в опухоли. Представленные исследования подтверждают мнение, что иммунотерапия опухолей наиболее эффективна после хирургического лечения, до получения пациентом химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bobisse S., Foukas P.G., Coukos G., Harari A. Neoantigen-based cancer immunotherapy. *Ann Transl Med* 2016;4(14):262. DOI: 10.21037/atm.2016.06.17. PMID: 27563649.
2. Robbins P.F., El-Gamil M., Li Y.F. et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183(3):1185–92. PMID: 8642260.
3. Mandruzzato S., Brasseur F., Andry G. et al. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 1997;186(5):785–93. PMID: 9271594.
4. Saeterdal I., Bjørheim J., Lislud K. et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(23):13255–60. DOI: 10.1073/pnas.231326898. PMID: 11687624.
5. Overwijk W.W., Wang E., Marincola F.M. et al. Mining the mutanome: developing highly personalized Immunotherapies based on mutational analysis of tumors. *J Immunother Cancer* 2013;1:11. DOI: 10.1186/2051-1426-1-11. PMID: 24829748.
6. Alexandrov L.B., Nil-Zainai S., Wedge D.C. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500(7463):415–21. DOI: 10.1038/nature12477. PMID: 23945592.
7. Gubin M.M., Zhang X., Schuster H. et al. Checkpoint Blockade Cancer Immunotherapy Targets Tumour-Specific Mutant Antigens. *Nature* 2014;515(7528):577–81. DOI: 10.1038/nature13988. PMID: 25428507.
8. Pfeifer G.P. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. *Genome Med* 2010;2(8):54. DOI: 10.1186/gm175. PMID: 20707934.
9. Heemskerk B., Kvistborg P., Schumacher T.N. The cancer antigenome. *EMBO J* 2013;32(2):194–203. DOI: 10.1038/emboj.2012.333. PMID: 23258224.
10. McGranahan N., Furness A.J., Rosenthal R. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016;351(6280):1463–9.

- DOI: 10.1126/science.aaf1490.
PMID: 26940869.
11. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596. PMID: 26028255.
 12. Nielsen M., Lundegaard C., Blicher T. et al. NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PLoS One* 2007;2(8):e796. DOI: 10.1371/journal.pone.0000796. PMID: 17726526.
 13. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. *Cancer Res* 2012;72(5):1081–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722. PMID: 22237626.
 14. Matsushita H., Vesely M.D., Koboldt D.C. et al. Cancer Exome Analysis Reveals a T Cell Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. *Nature* 2013;482(7385):400–4. DOI: 10.1038/nature10755. PMID: 22318521.
 15. Robbins P.F., Lu Y.C., El-Gamil M. et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 2013;19(6):747–52. DOI: 10.1038/nm.3161. PMID: 23644516.
 16. Duan F., Duitama J., Al Seesi S. et al. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J Exp Med* 2014;211(11):2231–48. DOI: 10.1084/jem.20141308. PMID: 25245761.
 17. Yadav M., Jhunjhunwala S., Phung Q.T. et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 2014;515(7528):572–6. DOI: 10.1038/nature14001. PMID: 25428506.
 18. Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N. et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015;520(7549):692–6. DOI: 10.1038/nature14426. PMID: 25901682.
 19. Cohen C.J., Gartner J.J., Horovitz-Fried M. et al. Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *Clin Invest* 2015;125(10):3981–91. DOI: 10.1172/JCI82416. PMID: 26389673.
 20. Pritchard A.L., Burel J.G., Neller M.A. et al. Exome Sequencing to Predict Neoantigens in Melanoma. *Cancer Immunol Res* 2015;3(9):992–8. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0088. PMID: 26048577.
 21. Boisguérin V., Castle J.C., Loewer M. et al. Translation of genomics-guided RNA-based personalised cancer vaccines: towards the bedside. *Br J Cancer* 2014;111(8):1469–75. DOI: 10.1038/bjc.2013.820. PMID: 25314223.
 22. Kranz L.M., Diken M., Haas H. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* 2016;534(7607):396–401. DOI: 10.1038/nature18300. PMID: 27281205.
 23. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991. PMID: 28678778.
 24. Sahin U., Derhovanessian E., Miller M. et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017;547(7662):222–6. DOI: 10.1038/nature23003. PMID: 28678784.
 25. Sonntag K., Hashimoto H., Eyrich M. et al. Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report. *J Transl Med* 2018;16(1):23. DOI: 10.1186/s12967-018-1382-1. PMID: 29409514.
 26. Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int Immunol* 2016;28(7):329–38. DOI: 10.1093/intimm/dxw015. PMID: 27006304.
 27. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373–84. DOI: 10.1038/ni.1863. PMID: 20404851.
 28. Matsumoto M., Takeda Y., Tatematsu M., Seya T. Toll-Like Receptor 3 Signal in Dendritic Cells Benefits Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol* 2017;8:1897. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01897. PMID: 29312355.
 29. Matsumoto M., Tatematsu M., Nishikawa F. et al. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat. Commun* 2015;6:6280. DOI: 10.1038/ncomms7280. PMID: 25692975.
 30. Caskey M., Lefebvre F., Filali-Mouhim A. et al. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 2017;208(12):2357–66. DOI: 10.1084/jem.20111171. PMID: 22065672.
 31. Damo M., Wilson D.S., Simeoni E., Hubbell J.A. TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma. *Sci Rep* 2015;5:17622. DOI: 10.1038/srep17622. PMID: 26631690.
 32. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 2009;27(25–26):3401–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.071. PMID: 19200817.
 33. Small E.J., Fratesi P., Reese D.M. et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 2000;18(23):3894–903. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.23.3894. PMID: 11099318.
 34. Kaufman H.L., Ruby C.E., Hughes T. et al. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer* 2014;2:11. DOI: 10.1186/2051-1426-2-11. PMID: 24971166.
 35. Kuai R., Ochyl L.J., Bahjat K.S. et al. Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy. *Nat Mater* 2017;16(4):489–96. DOI: 10.1038/nmat4822. PMID: 28024156.