

# МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ К АНТИ-PD-1 ТЕРАПИИ

Я. А. Жуликов<sup>1</sup>, И. В. Самойленко<sup>2</sup>, Л. В. Демидов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);  
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Игорь Вячеславович Самойленко i.samoylenko@ronc.ru

Появление в клинической практике ингибиторов иммунных контрольных точек стало революцией в лечении метастатической меланомы кожи. Однако блокада PD-1 позволяет добиться объективного ответа лишь у 30–40 % пациентов. К настоящему времени известно множество механизмов первичной резистентности меланомы к иммунотерапии, связанных с особенностями как опухоли, так и опухолевого микроокружения. Как правило, ответ на анти-PD-1 терапию является длительным, но вторичная резистентность формируется у 25 % пациентов, имевших объективный ответ на данный вид лечения. В этом обзоре описаны основные механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии, а также возможные пути их преодоления.

**Ключевые слова:** меланома, иммунотерапия, анти-PD-1/PD-L1 терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-34-46

## MECHANISMS OF RESISTANCE TO ANTI-PD-1 THERAPY IN METASTATIC CUTANEOUS MELANOMA

Ya. A. Zhulikov<sup>1</sup>, I. V. Samoylenko<sup>2</sup>, L. V. Demidov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sechenov University, Bldg. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

<sup>2</sup>N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

The appearance of modulators immune synapse in clinical practice has become a revolution in metastatic skin melanoma treatment. However, blockade PD-1 allows to achieve objective response in only 30–40 % of patients. Recently, many mechanisms of primary resistance of melanoma to immunotherapy studied, they related both to the characteristics of the tumor and the tumor microenvironment. The response to anti-PD-1 therapy usually is durable, but acquired resistance emerges in 25 % of patients, who had an objective response to this treatment. This review will describe the main mechanisms of resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic skin melanoma and possible ways of their overcoming.

**Key words:** melanoma, cancer immunotherapy, anti-PD-1/PD-L1 treatment

### Введение

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек — блокаторов CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD-1 (programmed death 1) и его лиганда (PD-L1) — произвело революцию в лечении метастатической меланомы кожи и других злокачественных новообразований [1, 2]. Несмотря на высокую клиническую эффективность, у 50–60 % пациентов имеется первичная резистентность к анти-PD-1 терапии [3, 4]. Следует отметить, что при оценке ответа на терапию по критериям RECIST у 5 % пациентов с ранним прогрессированием наблюдается псевдопрогрессирование, обычно связанное с инфильтрацией опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), впоследствии переходящее в объ-

ективный ответ [5]. На данный момент выделены предиктивные маркеры эффективности анти-PD-1 терапии: относительное количество лимфоцитов  $\geq 17,5$  %, наличие CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухолевом инфильтрате, а также прогностические маркеры: уровень лактатдегидрогеназы  $\leq 2,5$  нормы, отсутствие висцеральных метастазов или висцеральные метастазы только в легких [6]. Интересно, что имеется много данных о молекулярно-генетических маркерах опухоли, а также опухолевого микроокружения, связанных с первичной резистентностью меланомы к анти-PD-1 терапии. Однако нет ни одного рекомендованного маркера для отбора пациентов, нуждающихся в анти-PD-1 терапии. Наиболее обсуждаемым является вопрос о необходимости определения

экспрессии PD-L1 на поверхности опухолевых клеток. Результаты клинических исследований доказали, что экспрессия PD-L1 более чем 5 % опухолевых клеток связана с более высокой эффективностью анти-PD-1 терапии метастатической меланомы кожи [3, 7, 8]. Изучение маркеров первичной резистентности и разработка новых диагностических панелей открывают перспективы создания рациональных комбинаций анти-PD-1 с другими препаратами, а также выделения категории пациентов, у которых данный вид терапии потенциально неэффективен [9].

Как правило, ответ на анти-PD-1 терапию является длительным и стойким. Тем не менее при медиане наблюдения 21 мес вторичная резистентность формируется у 25 % пациентов, и вероятность ее развития не зависит от наличия предшествующей терапии [10]. На данный момент имеются скудные данные по механизмам развития вторичной резистентности к анти-PD-1 терапии, а также по эффективности различных методов лечения таких пациентов. Однако эти знания могут помочь в поиске наиболее эффективных методов лечения данной категории больных и разработке мер, препятствующих развитию вторичной резистентности.

#### Формирование клеточного иммунного ответа

Для уничтожения опухолевой клетки CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцит последовательно должен пройти следующие этапы: активация, пролиферация, дифференцировка и цитотоксичность.

Первый этап проходит в лимфоузлах и характеризуется образованием активационного синапса между антигенпрезентирующей клеткой (АПК), как правило, дендритной (ДК), и наивным Т-лимфоцитом. Накопление знаний об ингибиторах иммунных контрольных точек привело к переосмыслению теории активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В настоящее время принято считать, что оптимальными условиями для их активации является наличие 2 активационных сигналов [11].

В образовании первого активационного сигнала участвуют комплекс МНС-I-антиген (major histocompatibility complex I type) на поверхности АПК и TCR (T-cell receptor), CD3, CD8 на поверхности Т-лимфоцита. Результатом этого взаимодействия является активация MAPK/ERK, p38 MAPK и PI3K/AKT/mTOR сигнальных путей, регулирующих пролиферацию и дифференцировку CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита. Вторым активационным сигналом является взаимодействие CD28 на поверхности Т-клетки и CD80/86 на поверхности АПК, приводящее к активации PI3K/AKT/mTOR сигнального пути. Таким образом, происходит амплификация активационных эффектов, что облегчает активацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита (рис. 1). Изменение работы любого из вышеописанных

взаимодействий приводит к нарушению активации Т-лимфоцита.

Завершается стадия активации после появления на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита ингибирующих молекул (CTLA-4, LAG3, Tim3) [12]. После этого происходит IL-2-зависимая ауто- и паракринная, стимулируемая Т-хелперами 1-го типа, пролиферация и дифференцировка CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в CTL. Этот этап длится несколько дней [13].

Заключительным этапом формирования клеточного иммунного ответа являются взаимодействие CTL с опухолевой клеткой и цитотоксичность. В формировании данного синапса участвуют TCR, CD3, CD8 на поверхности Т-лимфоцита и комплекс МНС-I-антиген на поверхности опухолевой клетки. После их взаимодействия происходят активация ZAP-70, фосфорилирование LAT, активация PKC (протеинкиназа C), RAC1, PLCγ1 и DYN (dynein), что обеспечивает поляризацию и перемещение centrosомы к области синапса. Завершается этот этап выбросом цитолитических гранул в область синаптической щели и уничтожением клетки-мишени (рис. 2) [14].

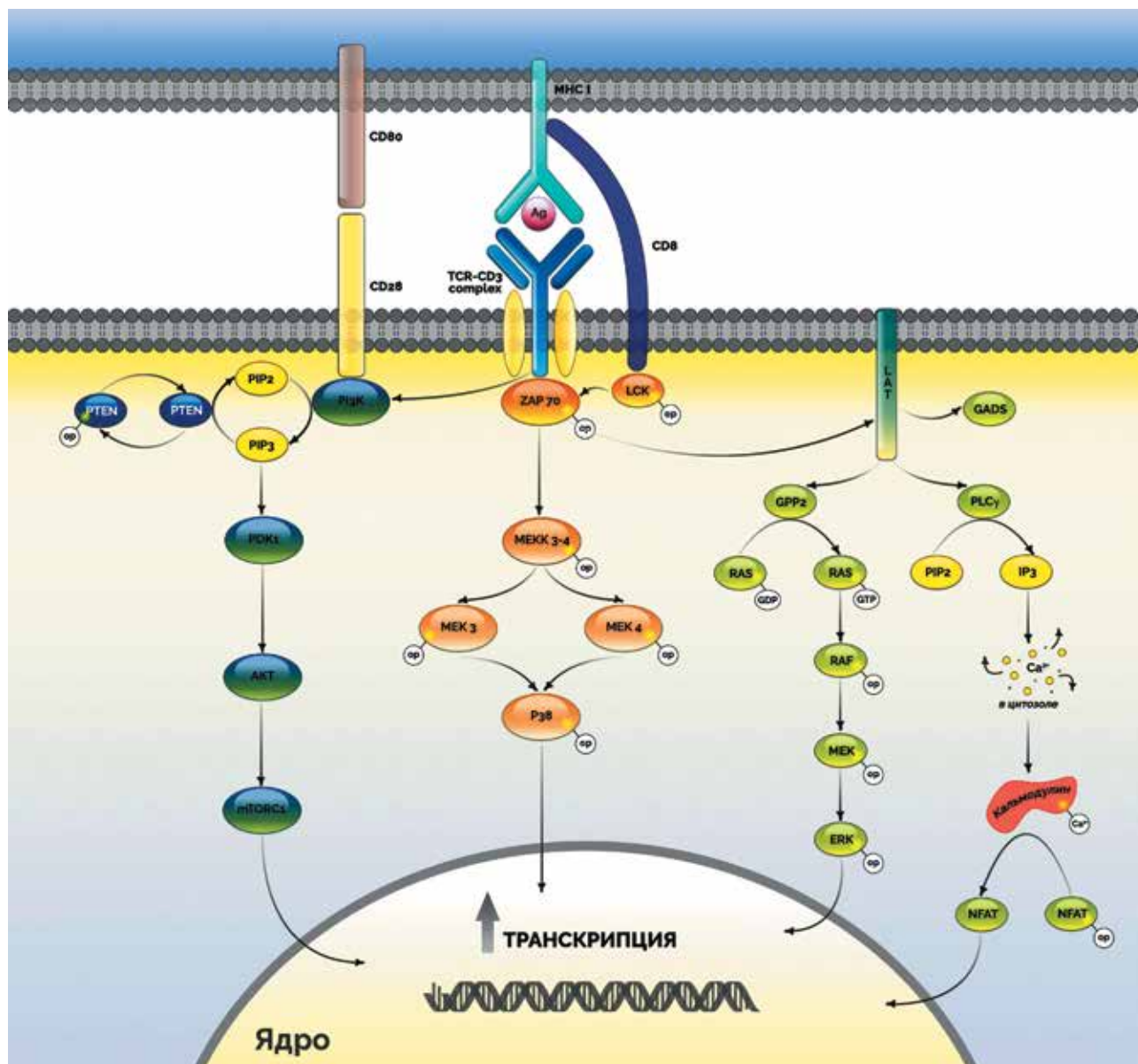
Знание молекулярных основ формирования клеточного иммунного ответа необходимо для понимания механизмов действия анти-PD-1 препаратов и развития резистентности к ним.

#### Функции PD-1/PD-L1

PD-1 является членом семейства CD28. Конститутивная экспрессия PD-1 наблюдается на поверхности CD8 и CD4 Т-лимфоцитов, NK-клеток, В-клеток, моноцитов [15]. Ключевую роль в индуцированной экспрессии PD-1 играет транслокация в ядро NFAT, происходящая после активации Т-лимфоцита [16, 17]. Другими индукторами экспрессии PD-1 являются интерфероны (ИФН) I типа [17, 18].

PD-L1 (programmed death ligand 1) и PD-L2 относятся к семейству белков B7. PD-L1 конститутивно экспрессируется на низком уровне ДК и другими профессиональными и непрофессиональными АПК — эндотелием, клетками иммунопrivилегированных органов, а также опухолевыми клетками. Экспрессия PD-L1 индуцируется провоспалительными цитокинами, в том числе ИФН I и II типов, TNFα (tumor necrosis factor α), VEGF (vascular endothelial growth factor) [19]. В опухолевых клетках экспрессия PD-L1 может повышаться за счет различных механизмов: активация PI3K/AKT/mTOR в глиобластомах, амплификация 9p24.1 в лимфомах, активирующие мутации в генах *BRAF* и *NRAS* в меланомах кожи [20–22].

При взаимодействии PD-1 на поверхности Т-клетки и PD-L1 на АПК происходит ингибирование активирующих сигналов, поступающих от комплекса TCR, CD3, CD8 и CD28 (рис. 3). Таким образом завершается фаза активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов,



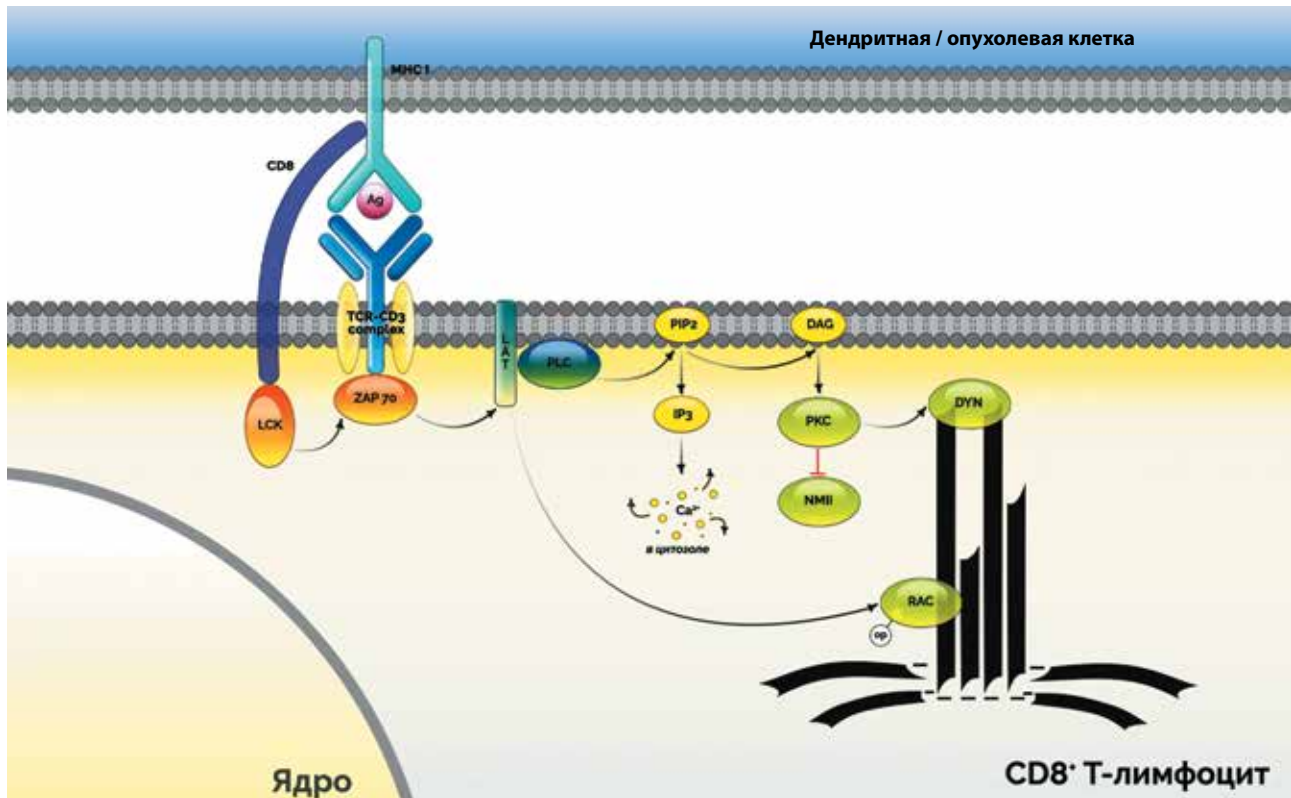
**Рис. 1.** Активационный иммунный синапс. Первый активационный сигнал — взаимодействие комплекса TCR, CD3, CD8 на поверхности T-лимфоцита с MHC-I-Ag на поверхности АПК. Результатом этого взаимодействия является активация внутриклеточной киназы ZAP-70. Взаимодействие CD8 с MHC-I приводит к активации Lck-киназы, также фосфорилирующей ZAP-70. Впоследствии ZAP-70 фосфорилирует LAT, который становится центром для активации нижележащих белков, таких как PLC (фосфолипаза C), комплекс GRB2, GADS и др. Активированная PLC гидролизует PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат) до IP3 (инозитол-1,4,5-трифосфат) и DAG (диацилглицерол). IP3 взаимодействует с  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами эндоплазматической сети, что приводит к повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле.  $\text{Ca}^{2+}$  связывается с кальмодулином, комплекс  $\text{Ca}^{2+}$  — кальмодулин активирует Ca-нейрин, впоследствии дефосфорилирующий и активирующий NFAT (nuclear factor of activated T cells). NFAT транслируется в ядро и повышает экспрессию IL-2 и PD-1. LAT также фосфорилирует и активирует белки сигнальных путей MAPK/ERK, p38 MAPK и PI3K/AKT/mTOR, стимулирующих пролиферацию, выживаемость и дифференцировку CD8<sup>+</sup> T-лимфоцита. Второй активационный сигнал — взаимодействие CD28 на поверхности T-лимфоцита и CD80/86 на поверхности АПК, которое приводит к активации сигнального пути PI3K/AKT/mTOR в T-клетке

что обеспечивает иммунную толерантность на периферическом уровне [17, 19].

Взаимодействие PD-1 на поверхности T-клеток и PD-L1 на опухолевых клетках ингибирует Lck и PLC, играющие ключевую роль в реализации цитолитического потенциала CTL. Кроме того, PD-L1 может взаимодействовать с CD80, экспрессируемым

на поверхности CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов и ДК, что позволяет ингибировать цитолитическую функцию CTL даже при проведении анти-PD-1 терапии [23].

Блокада PD-1 доказала свою эффективность в лечении метастатической меланомы в нескольких клинических исследованиях [3, 4, 6]. Однако у 45 % предлеченных и 25 % пациентов, не получавших ранее



**Рис. 2.** Цитолитический иммунологический синапс. В формировании данного синапса участвуют TCR, CD3, CD8 на поверхности T-лимфоцита и комплекс MHC-I-антиген на поверхности опухолевой клетки. Последовательно происходят активация ZAP-70, фосфорилирование LAT, активация PLC $\gamma$ 1. PLC $\gamma$ 1 расщепляет PIP2 на DAG и IP3, что играет ключевую роль в полимеризации центросомы. DAG активирует изоформы PKC (PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\zeta$  и PKC $\eta$ ). PKC $\eta$  ингибирует NM II (nonmuscle myosin II), способствуя его накоплению на заднем (+) конце центросомы, что создает толкающую силу. Также активация PKC $\eta$  приводит к накоплению в области синапса DYN (динеина), тянущего центросому за передний (–) конец к области синапса. После того как центросома оказывается в области синапса, происходит выброс цитолитических гранул в синаптическую щель и уничтожение клетки-мишени

терапию по поводу метастатической меланомы кожи, наблюдается прогрессирование заболевания до первого контрольного обследования [6]. Механизмы первичной резистентности можно условно разделить на 2 группы: события, происходящие в клетках опухоли и микроокружения, хотя они тесно связаны друг с другом. К первой группе можно отнести: активирующие мутации в гене *BRAF*, потерю *PTEN*, активацию WNT-каскада, секрецию VEGF и противовоспалительных цитокинов, гиперэкспрессию CD155. Исследование W. Hugo и соавт. показало, что в меланоме с первичной резистентностью к анти-PD-1 терапии гиперэкспрессированы гены: иммуносупрессорных цитокинов (*IL10*, *VEGFA*, *VEGFC*), хемоаттрактантов моноцитов и макрофагов (*CCL2*, *CCL7*, *CCL8* и *CCL13*), мезенхимальные (*AXL*, *ROR2*, *WNT5A*, *LOXL2*, *TWIST2*, *TAGLN*, *FAP*) [24]. Ко второй группе событий можно отнести экспрессию CTLA-4, Tim3, LAG3, TIGIT, IDO1 клетками микроокружения [25].

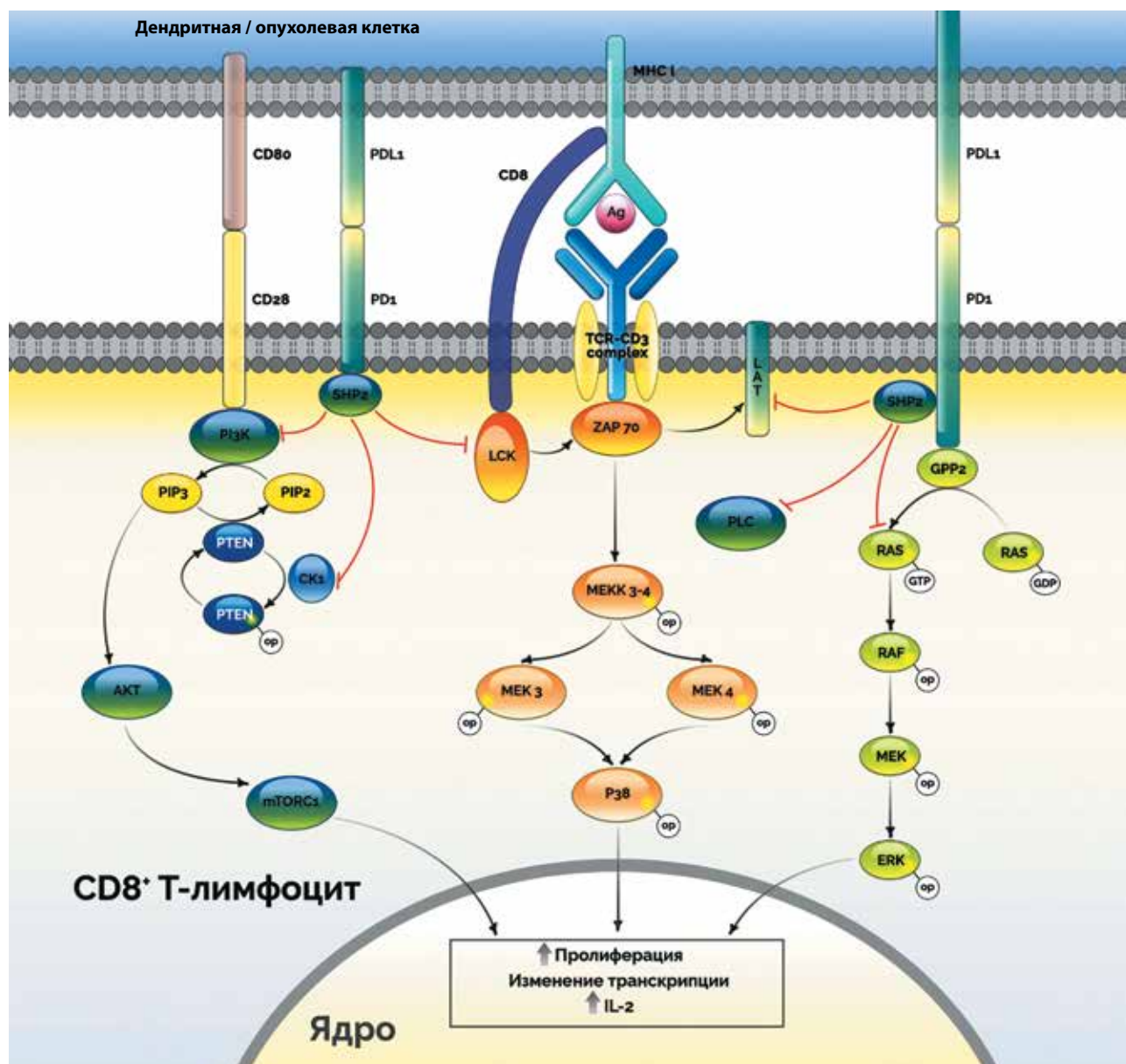
#### Наличие активирующих мутаций *BRAF V600*

Согласно данным Cancer Genome Atlas, активирующие мутации в гене *BRAF* имеются в 52 % всех

меланоме кожи [26]. Большинство мутаций расположены в киназном домене и повышают активность *BRAF*. Наиболее часто встречается замена валина на глутамин в кодоне 600 (*BRAF V600E*). М. Mandalà и соавт. выделили несколько основных механизмов подавления клеточного иммунного ответа опухолевыми клетками с мутацией *BRAF V600E*: секреция иммуносупрессивных цитокинов (IL1 $\beta$ , IL6, IL10, VEGFA); изменение опухолевого микроокружения с иммунокомпетентного на иммуносупрессивный тип; снижение экспрессии MHC-I и меланоцитарных дифференцировочных генов (MDAs) клетками меланомы [27].

Две независимые группы исследователей через 2 нед с начала приема *BRAF*-ингибиторов (*BRAF*i) наблюдали повышение экспрессии опухолевыми клетками MDAs (MART-1, gp100, TRP-1 и TRP-2), MHC-I, PD-L1, а также увеличение содержания в опухолевом инфильтрате CD8<sup>+</sup> Т-клеток и снижение миелоидных супрессорных клеток (MDSC) и Treg [28, 29]. Интересно, что MEK-ингибиторы (MEKi) подавляют пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток *in vivo*, но на мышиных моделях применение MEKi увеличивает количество активированных CD8<sup>+</sup> TILs (tumor-infiltrating





**Рис. 3.** Влияние взаимодействия PD-1 и PD-L1 на активацию CD8 T-лимфоцита. Взаимодействие PD-1 со своим лигандом приводит к активации SHP2-фосфатазы, дефосфорилирующей и инактивирующей Lck, а также стабилизирующей дефосфорилированную форму PTEN. В результате ингибируются сигнальные каскады PI3K/AKT/mTOR и MAPK в CD8<sup>+</sup> T-лимфоците. Также PD-1 подавляет активность PLC $\beta$ 1 и Ras, но не влияет на активность p38, поэтому не вызывает глобальное торможение сигналов, исходящих от TCR [19]

lymphocytes). Кроме того, при совместном применении анти-PD-1 и MEKi наблюдались более длительные ответы, чем при приеме MEKi в монотерапии [30]. Изменения опухолевого микроокружения, вызываемые применением BRAFi и комбинации BRAFi с MEKi, вызывают интерес к их совместному использованию с ингибиторами иммунных контрольных точек. Первой попыткой стало исследование эффективности комбинации ипилимумаба (анти-CTLA-4) и вемурафениба (BRAFi) для лечения метастатической меланомы кожи. Однако применение этой схемы терапии было ассоциировано с высокой

частотой аутоиммунных гепатитов и перфораций кишечника, поэтому исследование было завершено на I фазе [31]. Анти-PD-1/PD-L1 реже вызывают иммуноопосредованные нежелательные явления, чем анти-CTLA-4. Поэтому применение комбинации анти-PD-1/PD-L1 с BRAFi  $\pm$  MEKi кажется перспективным направлением в терапии метастатической меланомы кожи. На данный момент идет несколько исследований, изучающих эффективность применения этих комбинаций для лечения метастатической меланомы кожи с активирующими мутациями в гене *BRAF* (NCT02910700, NCT02357732, NCT02967692).

### Роль сигнального пути WNT в резистентности меланомы к анти-PD-1 терапии

Сигнальный путь WNT (Wingless and INT) играет важную роль в прогрессии злокачественных новообразований различных локализаций, регулируя пролиферацию, дифференцировку, адгезию, эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию, а также экспрессию многочисленных цитокинов опухолевыми клетками [32]. Активация данного сигнального пути наблюдается примерно в 30 % меланом кожи [33]. Имеется 2 независимых механизма активации сигнального пути WNT: канонический ( $\beta$ -катенин-зависимый) и неканонический (связанный с PKC, RAC1, RhoA) [32].

К настоящему времени доказана взаимосвязь между наличием  $\beta$ -катениновой подлинки опухоли и первичной резистентностью меланомы к анти-PD-1 терапии. В исследовании S. Spranger и соавт. у 48 % пациентов с метастатической меланомой кожи, у которых отсутствовали TILs, был активирован сигнальный путь WNT [34]. В последующих экспериментах на мышиных моделях было обнаружено, что в группе *BRAF V600E/PTEN*  $-/-$  с недеградируемым  $\beta$ -катенином в инфильтрате отсутствовали  $CD8^+$  Т-лимфоциты, в отличие от группы мышей *BRAF V600E/PTEN*  $-/-$  [34]. Наиболее вероятным механизмом этого является активация свободным  $\beta$ -катенином ATF3 (activation transcription factor 3) – ингибитора транскрипции

CCL4 (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ ) [35]. Результат – нарушение антигенпрезентации от BATF3-ДК к  $CD8^+$  Т-лимфоцитам. Интересно, что внутри-опухолевая инъекция активированных ДК приводила к появлению  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в опухолевом инфильтрате [34].

Гиперэкспрессия *WNT5A* и включение неканонического сигнального пути WNT в опухолевых клетках повышает их метастатическую способность и способствует прогрессии заболевания, а также положительно коррелирует с первичной резистентностью меланомы к анти-PD-1 терапии [24, 36]. Доказано, что *WNT5A*, связываясь со своим рецептором на поверхности ДК, повышает экспрессию IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygenase-1) [37].

Таким образом, блокада канонического пути WNT или ATF3 в клетках меланомы кожи может повысить эффективность анти-PD-1 терапии.

### Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR регулирует пролиферацию, метаболизм, рост, выживаемость клеток, аутофагию. Также один из эффектов активации PI3K/AKT/mTOR – повышение экспрессии противовоспалительных цитокинов и различных хемоаттрактантов, в том числе CCL2 и фактора роста эндотелия А (VEGFA). Наиболее часто активация PI3K/AKT/mTOR в клетках меланомы связана со снижением

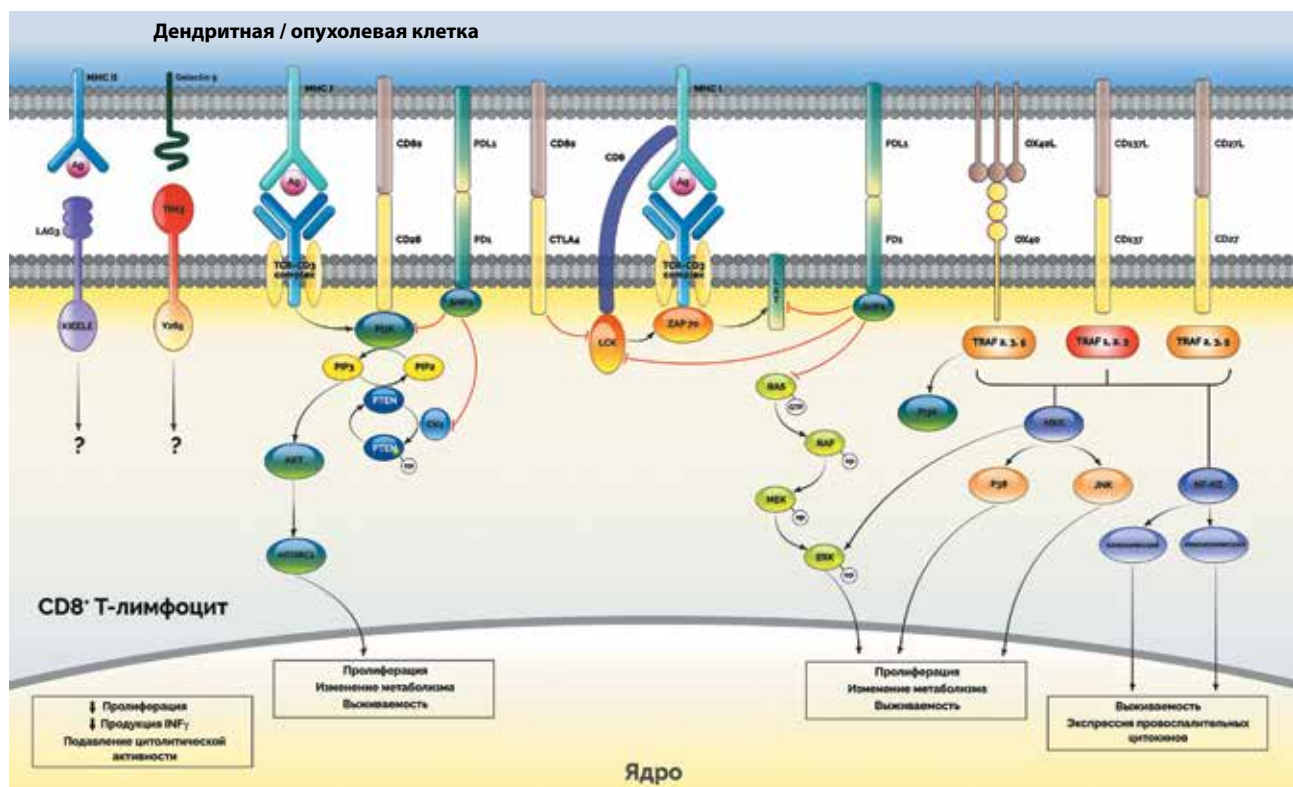


Рис. 4. Различные костимулирующие и коингибирующие взаимодействия, регулирующие Т-клеточный иммунный ответ (объяснение в тексте)

экспрессии *PTEN*. Потеря *PTEN* наблюдается в 30 % меланом кожи, наиболее часто совпадает с *BRAF*-мутацией [38]. Анализ подгруппы из 39 пациентов, получавших ниволумаб или пембролизумаб по поводу метастатической меланомы кожи, показал, что пациенты с экспрессией *PTEN* в  $\geq 10$  % опухолевых клеток получают большее преимущество от терапии анти-PD-1 препаратами, чем пациенты с отсутствием *PTEN* в опухолевых клетках ( $p = 0,029$ ), независимо от пола, расы, уровня лактатдегидрогеназы, стадии заболевания [39].

Эффективность одновременного ингибирования PI3K/АКТ и блокирования PD-1 была доказана на мышинных моделях меланомы с делецией *PTEN*. Одновременная блокада CTLA-4, PD-L1 и PI3K $\gamma$  увеличивала количество полных ответов с 0 до 30 % при использовании клеточной линии 4T1 и с 20 до 80 % при использовании линии B16-GMCSF по сравнению с группой без ингибитора PI3K $\gamma$  [40].

На сегодняшний день иницировано одно исследование Ib фазы по совместному применению ингибитора PI3K $\delta$  (INCB050465) и пембролизумаба в терапии различных злокачественных новообразований (NCT02646748).

#### Секреция VEGF

VEGF входит в семейство факторов роста эндотелия и включает 7 протеинов VEGF A–E, плацентарный фактор роста (PIGF) 1 и 2 [41]. Роль VEGFA в подавлении клеточного иммунного ответа хорошо изучена. VEGFA снижает экспрессию E-селектина, VCAM1 и ICAM1 клетками эндотелия, затрудняя миграцию Т-лимфоцитов в опухолевый очаг [42].

Результаты нескольких исследований показали, что высокая экспрессия VEGFA опухолевыми клетками способствует накоплению Treg [43] и MDSC (myeloid suppressor stem cells) [44] в микроокружении опухоли, а также нарушает созревание ДК на мышинных моделях, приводя к формированию иммуносупрессорного микроокружения.

Анализ транскриптома метастатических меланом пациентов перед анти-PD-1 терапией доказал, что высокая экспрессия VEGFA и VEGFC ассоциирована с первичной резистентностью к данному лечению [24]. Ведутся многочисленные исследования эффективности использования комбинаций анти-PD-1/PD-L1 с антиангиогенными препаратами в терапии метастатического светлоклеточного рака почки.

#### Экспрессия других ингибиторов и активаторов иммунных контрольных точек

После взаимодействия с АПК на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов повышается экспрессия многочисленных молекул, стимулирующих или ингибирующих активацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита. Следова-

тельно, блокады одного ингибирующего сигнала от взаимодействия PD-1 и PD-L1 может быть недостаточно для реализации стойкого противоопухолевого иммунного ответа из-за активации других иммунных контрольных точек (рис. 4).

#### CTLA-4

CTLA-4 входит в семейство белков B7. Впервые был обнаружен в библиотеке ДНК мышинных CTLs. Пик экспрессии CTLA-4 на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов наблюдается через 48 ч после активации. Сродство CTLA-4 к CD80 и CD86 выше, чем у CD28. Кроме того, связывание CTLA-4 с CD80/86 приводит к активации фосфатазы PP2A (protein phosphatase 2), дефосфорилирующей и инактивирующей LAT – ключевой белок в TCR-сигнальном каскаде [45]. Таким образом завершается фаза активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита.

Поскольку CTLA-4 и PD-1 регулируют формирование клеточного иммунного ответа на разных уровнях, применение комбинаций препаратов, блокирующих эти рецепторы, является рациональным. На данный момент имеются результаты исследования III фазы CHECKMATE 067 по применению комбинации ипилимумаба и ниволумаба в лечении метастатической меланомы. Подгрупповой анализ этого исследования показал отсутствие статистически значимого различия в медиане выживаемости без прогрессирования у пациентов с PD-L1-позитивными опухолями (экспрессия PD-L1 на поверхности  $\geq 5$  % опухолевых клеток) между группами комбинированной терапии и ниволумаба. В подгруппе с PD-L1-негативными опухолями было достигнуто статистически значимое преимущество комбинированной терапии по сравнению с ниволумабом: медиана выживаемости без прогрессирования 11,2 мес против 5,3 мес [3].

#### LAG3

LAG3 является гомологом CD4 и связывается с МНС-II. Экспрессия LAG3 наблюдается на поверхности NK-клеток, В-клеток, ДК, а также активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Имеются данные о связи LAG3 с истощением пула CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в очагах хронических вирусных инфекций, а также в меланомах кожи, светлоклеточных опухолях почки, опухолях яичников [46]. Блокирование LAG3 на поверхности Т-лимфоцитов приводит к повышению экспрессии ими IL-2, IL-4, ИФН $\gamma$ . Механизмы, объясняющие эти эффекты, неизвестны [47]. На данный момент запущено несколько исследований, изучающих эффективность монотерапии анти-LAG3 препаратами и их комбинации с анти-PD-1 в лечении различных злокачественных новообразований (NCT01968109) [48].



### Tim3

Tim3 экспрессируется на поверхности активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1-го типа, макрофагов [49]. Лигандом Tim3 является галектин 9. Пути внутриклеточной передачи сигналов от Tim3 на сегодняшний день не описаны. Подавление взаимодействия Tim3–галектин 9 приводит к развитию различных аутоиммунных заболеваний у мышей [50]. Повышение экспрессии Tim3 на поверхности TILs во время анти-PD-1 терапии является маркером развивающейся резистентности на моделях аденокарциномы легкого с мутациями *EGFR T790M/L858R* и *KRAS*. Совместная блокада Tim3 и PD-1 была эффективна на мышинных моделях аденокарциномы легкого с резистентностью к анти-PD-1 терапии [50]. Таким образом, одновременная блокада PD-1 и LAG3/Tim3 может повысить эффективность иммунотерапии меланомы и замедлить развитие вторичной резистентности.

### TIGIT

TIGIT (T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) был обнаружен у лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), его экспрессия на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов была взаимосвязана с маркерами прогрессирования ВИЧ. TIGIT экспрессируется на поверхности Treg, CTLs, NK-клеток, его лигандами являются CD155 и CD112. CD155 обладает самым высоким сродством к TIGIT. Гиперэкспрессия CD155, по некоторым данным, наблюдается у 90 % метастатических меланом кожи [51]. После связывания TIGIT со своим лигандом активируется внутриклеточный ITIM-домен, впоследствии активирующий фосфатазу SHIP-1, что приводит к дефосфорилированию и инактивации Lck. Таким образом, взаимодействие TIGIT с CD155 на поверхности опухолевой клетки снижает цитолитический потенциал CTL, обладая синергичным действием с PD-L1 *in vitro* [52].

TIGIT и его лиганды – CD155, CD112, а также молекулы-двойники с противоположными функциями – CD226, CD96 регулируют активность NK- и Т-клеток. Увеличение влияния CD155/CD112 и TIGIT приводит к ингибированию противоопухолевого иммунного ответа и может лежать в основе первичной резистентности к анти-PD-1 терапии. Доказано, что CD8<sup>+</sup>TIGIT<sup>+</sup> Т-лимфоциты дисфункциональны, в то время как TIGIT<sup>+</sup> Treg обладают высокой супрессорной активностью [53]. Совместное блокирование CD155/TIGIT с PD-1/PD-L1 является перспективным направлением в иммунотерапии меланомы.

### Члены суперсемейства TNFR

Суперсемейство TNFR (tumor necrosis factor receptor) включает 27 членов. Наиболее интересными ми-

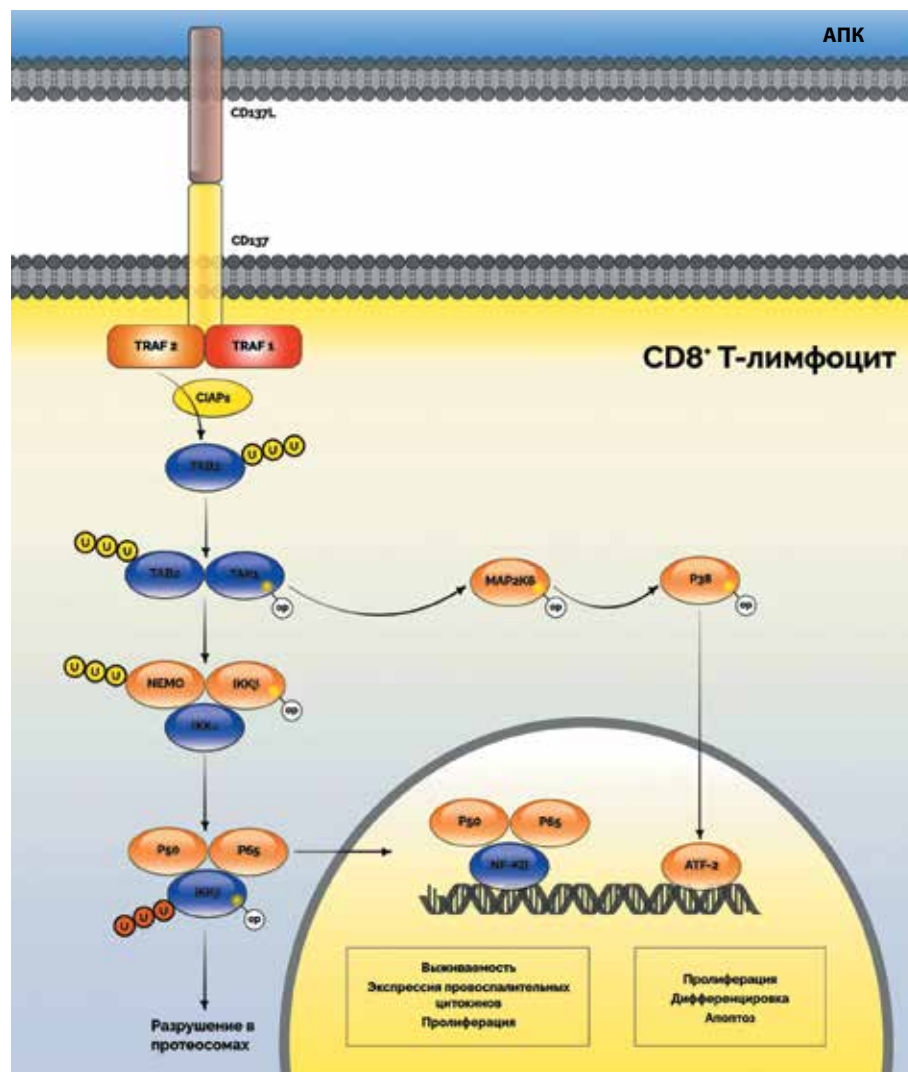
шенями для иммунотерапии являются 4-1BB, OX-40, CD27, их экспрессия наблюдается на поверхности NK- и Т-клеток. Взаимодействие данных белков с соответствующими им лигандами приводит к активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита (рис. 5) [54].

4-1BB (CD137) имеет 1 лиганд – CD137L, который экспрессируется макрофагами, активированными В-лимфоцитами и ДК. Запуск внутриклеточных каскадов, контролируемых 4-1BB, стимулирует пролиферацию и повышает выживаемость CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Интересно, что экспрессия CD137 в опухолевом микроокружении выше, чем в нормальных тканях. Одним из возможных объяснений данного факта является HIF1 $\alpha$  (hipoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) – зависимая индукция экспрессии CD137. Это позволяет рассматривать комбинирование активаторов 4-1BB с анти-PD-1/PD-L1 препаратами как перспективную область иммуноонкологии [55].

OX-40 (CD134), так же как и CD137, является активирующим рецептором, появляется на поверхности CD4 и CD8 Т-лимфоцитов через 24–48 ч после их активации. OX-40 имеет 1 лиганд – CD252 (OX-40L), экспрессирующийся на поверхности АПК, эндотелиальных и NK-клеток. Взаимодействие OX-40 и OX-40L приводит к повышению пролиферации и выживаемости CD8<sup>+</sup> Т-клеток, что необходимо для формирования клеток памяти [56]. Доклинические модели показывают, что в зависимости от цитокинового состава в микроокружении активация OX-40 может стимулировать пролиферацию и активность Treg либо снижать их супрессорную активность [57, 58]. Синергизм агонистов OX-40 и анти-PD-1 препаратов является предпосылкой для исследования эффективности комбинации этих препаратов в лечении злокачественных новообразований различных локализаций. С одной стороны, взаимодействие OX-40 со своим лигандом активирует пролиферацию и выживаемость CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в том числе экспрессирующих на поверхности PD-1. С другой стороны, OX-40 повышает экспрессию ИФН $\gamma$ , который индуцирует экспрессию PD-1 на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита [59].

CD27 является активирующей молекулой, конститутивно экспрессируется на поверхности активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и клеток памяти, NK- и NKT-клеток, а также В-лимфоцитов и Treg и имеет 1 лиганд – CD70. Взаимодействие CD27 и CD70 повышает пролиферацию и выживаемость CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [60]. На данный момент в клинических исследованиях изучается эффективность применения агонистического антитела к CD27 – варилумаба в комбинации с различными иммуноонкологическими препаратами.





**Рис. 5.** Ранний этап трансдукции активационного сигнала от CD137. Взаимодействие членов суперсемейства TNFR со своими лигандами приводит к образованию гетеродимеров и активации TRAFs-белков (tumor necrosis factor receptor-associated factors). Комплексы, содержащие TRAF2, способны взаимодействовать с убиквитинлигазой E3, запуская полиубиквитинирование белков-мишеней. Эти события приводят к активации канонического и неканонического NF-κB сигнального пути, а также MAPK. Результатом этого являются пролиферация, ингибирование апоптоза и стимулирование дифференцировки CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [54]

### IDO1

IDO1 — внутриклеточный гемсодержащий фермент, катализирующий превращение триптофана в кинуренин. В норме IDO1 экспрессируется эндотелием плаценты, зрелыми ДК, а также в лимфоидных органах и играет важную роль в предотвращении отторжения аллогенного плода во время беременности [61]. Экспрессия IDO1 также может наблюдаться в клетках некоторых злокачественных новообразований, в том числе меланомы.

Экспрессия IDO1 приводит к истощению триптофана в опухолевом микроокружении. Накопление триптофан-дефицитных транспортных РНК в цитоплазме активирует стресс-ассоциированную киназу — GCN2 (general control non-depressible 2), фосфорилирующую и инактивирующую трансляционный

фактор инициации (eIF2) [62]. Индукция экспрессии IDO1 в клетках линии HELA с помощью ИФНγ приводила к снижению содержания фосфорилированных форм 4EBP1 и S6K1, что говорит о подавлении активности сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Обработка клеток ингибитором IDO1 индоксимодом приводила к реактивации PI3K/AKT/mTOR в клетках HELA [63]. Как было написано выше, активация этого сигнального пути играет критическую роль на этапе активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Повышение соотношения кинуренин/триптофан в крови пациентов с метастатической меланомой кожи ассоциировано с низкой общей выживаемостью [64].

На сегодняшний день имеются результаты II фазы клинического испытания ингибитора IDO эпакдастата в комбинации с пембролизумабом в лечении

метастатической меланомы кожи, частота объективного ответа составила 56 %. На основании этих данных запущена III фаза клинического испытания эпакдотата.

#### Механизмы вторичной резистентности к анти-PD-1 терапии

На сегодняшний день основными предполагаемыми механизмами развития вторичной резистентности меланомы кожи к анти-PD-1 терапии являются: дисфункция интерферонового пути в клетках опухоли (мутации в JAK1-2), мутации в  $\beta$ 2-микроглобулине (B2M), экспрессия других иммунных чекпоинтов. К сожалению, для данной группы пациентов доступно мало эффективных терапевтических опций.

JAK/STAT сигнальный путь в настоящий момент считается одним из наиболее значимых путей, приводящих к пролиферации и дифференцировке клеток врожденного и приобретенного иммунитета [65]. ИФН I и II типов являются активаторами этого сигнального пути. Семейство JAK-киназ включает JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 [66]. После активации JAK1 и JAK2 происходят фосфорилирование и активация STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), который в последующем образует гомодимер, транслируется в ядро и связывается с промоторами IRF (interferon responsive factor). Это приводит к повышению экспрессии множества генов, в том числе MHC-I, TAP1 (transporter associated with antigen processing 1). Снижение активности JAK/STAT пути в клетках меланомы затрудняет антигенпрезентацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, тем самым подавляя клеточный иммунный ответ. Мутации в JAK1 связаны с резистентностью ко всем 3 типам ИФН, в то время как мутации в JAK2 ассоциированы с резистентностью только к ИФН $\gamma$  [67].

B2M является одним из 4 доменов MHC-I. Одной из функций B2M является транспорт MHC-I из эндоплазматической сети к клеточной мембране. Возможны 2 пути инактивации B2M: потеря части хромосомы 15 и мутации в B2M [68].

Наиболее исследуемыми путями преодоления вторичной резистентности к анти-PD-1 терапии являются применение лучевого лечения и онколитических вирусов.

Применение лучевого лечения способно вернуть чувствительность меланомы кожи к анти-PD-1 терапии [69]. Основной механизм этого эффекта — повышение секреции ИФН $\beta$  Т-лимфоцитами, что приводит к увеличению экспрессии MHC-I опухолевыми клетками [70].

В настоящее время изучается эффективность совместного применения онколитических вирусов

и анти-PD-1 препаратов, в том числе у пациентов, резистентных к иммунотерапии. В 2015 г. FDA (Food and Drug Administration) одобрила применение TVEC (talimogene laherparepvec) для лечения метастатической меланомы кожи. TVEC — герпес-вирус человека 1-го типа с встроенным в геном GM-CSF. Помимо непосредственного онколитического действия TVEC оказывает массу других местных и системных эффектов: увеличение экспрессии на поверхности опухолевых клеток DAMPs и PAMPs (damage and pathogen associated molecular patterns), что вместе с GM-CSF, интегрированным в геном вируса, привлекает клетки врожденного иммунитета и увеличивает секрецию ими ИФН I типа. Результатом этого является повышение экспрессии MHC-I на поверхности опухолевых клеток и их апоптоз, а также стимулирование созревания ДК, что может опосредовать системный эффект. На данный момент идет несколько клинических исследований по изучению эффективности совместного применения ипилимумаба с TVEC (NCT01740297) и ниволумаба с TVEC (NCT02263508) у пациентов с метастатической меланомой кожи [71].

#### Заключение

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек стало революцией в лечении метастатической меланомы. Однако частота объективного ответа на ниволумаб составляет 30–40 %. На данный момент описаны многочисленные механизмы резистентности меланомы кожи к анти-PD-1 терапии, которые могут быть использованы для создания генетической тестовой панели для отбора когорты пациентов, которым назначать анти-PD-1 терапию нецелесообразно из-за ее потенциальной неэффективности. Многие из описанных выше механизмов первичной резистентности к анти-PD-1 терапии также являются и вторичными механизмами резистентности к BRAFi. Детальное изучение их пересечения может помочь решить вопрос об оптимальной последовательности таргетной и иммунотерапии в лечении метастатической меланомы у пациентов с активирующими мутациями в гене *BRAF*, а также о возможности их сочетания.

Круг злокачественных новообразований, для лечения которых одобрены препараты, блокирующие PD-1, постоянно растет, что позволяет ожидать увеличения количества пациентов с вторичной резистентностью к данному виду терапии. Появляются данные о повышении экспрессии других ингибирующих активность CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов молекул у этих пациентов. В ближайшие годы произойдет увеличение количества новых иммуноонкологических препаратов, что повысит эффективность иммунотерапии меланомы и других злокачественных новообразований.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480(7378):480–9. DOI:10.1038/nature10673. PMID: 22193102.
- Kaufman H.L., Kirkwood J.M., Hodi F.S. et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(10):588–98. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.153. PMID: 23982524.
- Larkin J., Hodi F.S., Wolchok J.D. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015;373(13):1270–1. DOI: 10.1056/NEJMc1509660. PMID: 26398076.
- Weber J.S., D'Angelo S.P., Minor D. et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16(4):375–84. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8. PMID: 25795410.
- Khoja L., Kibiro M., Metser U. et al. Patterns of response to anti-PD-1 treatment: an exploratory comparison of four radiological response criteria and associations with overall survival in metastatic melanoma patients. *Br J Cancer* 2016;115(10):1186–92. DOI: 10.1038/bjc.2016.308. PMID: 27701388.
- Ji R.R., Chasalow S.D., Wang L. et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(7):1019–31. DOI: 10.1007/s00262-011-1172-6. PMID: 22146893.
- Topalian S.L., Taube J.M., Anders R.A., Pardoll D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16(5):275–87. DOI: 10.1038/nrc.2016.36. PMID: 27079802.
- Fusi A., Festino L., Botti G. et al. PD-L1 expression as a potential predictive biomarker. *Lancet Oncol* 2015;16(13):1285–7. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00307-1. PMID: 26433815.
- Walker L.S. EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis. *Immunol Lett* 2017;184:43–50. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.02.007. PMID: 28216262.
- Ribas A., Hamid O., Daud A. et al. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. *JAMA* 2016;315(15):1600–9. DOI: 10.1001/jama.2016.4059. PMID: 27092830.
- Stefanová I., Hemmer B., Vergelli M. et al. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 2003;4(3):248–54. DOI: 10.1038/ni895. PMID: 12577055.
- Andrews L.P., Marciscano A.E., Drake C.G., Vignali D.A. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 2017;276(1):80–96. DOI: 10.1111/imr.12519. PMID: 28258692.
- Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013;38(1):13–25. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.01.004. PMID: 23352221.
- de la Roche M., Asano Y., Griffiths G.M. Origins of the cytolytic synapse. *Nat Rev Immunol* 2016;16(7):421–32. DOI: 10.1038/nri.2016.54. PMID: 27265595.
- 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;26:677–704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. PMID: 18173375.
- Oestreich K.J., Yoon H., Ahmed R., Boss J.M. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol* 2008;181(7):4832–9. PMID: 18802087.
- Jin H.T., Ahmed R., Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;350:17–37. DOI: 10.1007/82\_2010\_116. PMID: 21061197.
- Cho H.Y., Lee S.W., Seo S.K. et al. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN- $\alpha$ -induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779(12):811–9. DOI: 10.1016/j.bbagr.2008.08.003. PMID: 18771758.
- Boussiotis V.A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *N Engl J Med* 2016;375(18):1767–78. DOI: 10.1056/NEJMr1514296. PMID: 27806234.
- Green M.R., Monti S., Rodig S.J. et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010;116(17):3268–77. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282780. PMID: 20628145.
- Parsa A.T., Waldron J.S., Panner A. et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13(1):84–8. DOI: 10.1038/nm1517. PMID: 17159987.
- Atefi M., Avramis E., Lassen A. et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3446–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2797. PMID: 24812408.
- Butte M.J., Keir M.E., Phamduy T.B. et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 co-stimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007;27(1):111–22. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.05.016. PMID: 17629517.
- Hugo W., Zaretsky J.M., Sun L. et al. Genomic and transcriptomic features of response to Anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell* 2016;165(1):35–44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065. PMID: 26997480.
- Dempke W.C.M., Fenchel K., Uciechowski P., Dale S.P. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment – the more the better? *Eur J Cancer* 2017;74:55–72. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.01.001. PMID: 28335888.
- Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015;161(7):1681–96. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.044. PMID: 26091043.
- Mandalà M., De Logu F., Merelli B. et al. Immunomodulating property of MAPK inhibitors: from translational knowledge to clinical implementation. *Lab Invest* 2017;97(2):166–75. DOI: 10.1038/labinvest.2016.132. PMID: 27991907.
- Frederick D.T., Piris A., Cogdill A.P. et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1225–31. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1630. PMID: 23307859.



29. Wilmott J.S., Long G.V., Howle J.R. et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(5):1386–94. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2479. PMID: 22156613.
30. Ebert P.J., Cheung J., Yang Y. et al. MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade. *Immunity* 2016;44(3):609–21. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.01.024. PMID: 26944201.
31. Ribas A., Hodi F.S., Callahan M. et al. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med* 2013;368(14):1365–6. DOI: 10.1056/NEJMc1302338. PMID: 23550685.
32. Xue G., Romano E., Massi D., Mandalà M. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in melanoma: Preclinical rationale and novel therapeutic insights. *Cancer Treat Rev* 2016;49:1–12. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.06.009. PMID: 27395773.
33. Larue L., Delmas V. The WNT/ $\beta$ -catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 2006;11:733–42. PMID: 16146765.
34. Spranger S., Bao R., Gajewski T.F. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 2015;523(7559):231–5. DOI: 10.1038/nature14404. PMID: 25970248.
35. Ramos R.N., Piaggio E., Romano E. Mechanisms of resistance to immune checkpoint antibodies. *Handb Exp Pharmacol* 2017. DOI: 10.1007/164\_2017\_11. PMID: 28315073.
36. Da Forno P.D., Pringle J.H., Hutchinson P. et al. WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14(18):5825–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5104. PMID: 18794093.
37. Holtzhausen A., Zhao F., Evans K.S. et al. Melanoma-derived Wnt5a promotes local dendritic-cell expression of IDO and immunotolerance: opportunities for pharmacologic enhancement of immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2015;3(9):1082–95. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0167. PMID: 26041736.
38. Vredeveld L.C., Possik P.A., Smit M.A. et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 2012;26(10):1055–69. DOI: 10.1101/gad.187252.112. PMID: 22549727.
39. Peng W., Chen J.Q., Liu C. et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov* 2016;6(2):202–16. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0283. PMID: 26645196.
40. De Henau O., Rausch M., Winkler D. et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K $\gamma$  in myeloid cells. *Nature* 2016;539(7629):443–7. DOI: 10.1038/nature20554. PMID: 27828943.
41. Lyons J.M. 3<sup>rd</sup>, Schwimer J.E., Anthony C.T. et al. The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis. *J Surg Res* 2010;159(1):517–27. DOI: 10.1016/j.jss.2008.12.014. PMID: 19577260.
42. Bouzin C., Brouet A., De Vriese J. et al. Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial cell anergy. *J Immunol* 2007;178(3):1505–11. PMID: 17237399.
43. Shetty S., Weston C.J., Oo Y.H. et al. Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *J Immunol* 2011;186(7):4147–55. DOI: 10.4049/jimmunol.1002961. PMID: 21368224.
44. Klose R., Krzywinska E., Castells M. et al. Targeting VEGF-A in myeloid cells enhances natural killer cell responses to chemotherapy and ameliorates cachexia. *Nat Commun* 2016;7:12528. DOI: 10.1038/ncomms12528. PMID: 27538380.
45. Parry R.V., Chemnitz J.M., Frauwirth K.A. et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005;25(21):9543–53. DOI: 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005. PMID: 16227604.
46. Takaya S., Saito H., Ikeguchi M. Upregulation of immune checkpoint molecules, PD-1 and LAG-3, on CD4+ and CD8+ T cells after gastric cancer surgery. *Yonago Acta Med* 2015;58(1):39–44. PMID: 26190896.
47. Goldberg M.V., Drake C.G. LAG-3 in cancer immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;344:269–78. DOI: 10.1007/82\_2010\_114. PMID: 21086108.
48. Kyi C., Postow M.A. Immune checkpoint inhibitor combinations in solid tumors: opportunities and challenges. *Immunotherapy* 2016;8(7):821–37. DOI: 10.2217/imt-2016-0002. PMID: 27349981.
49. Yu M., Lu B., Liu Y. et al. Tim-3 is up-regulated in human colorectal carcinoma and associated with tumor progression. *Mol Med Rep* 2017;15(2):689–95. DOI: 10.3892/mmr.2016.6065. PMID: 28035413.
50. Koyama S., Akbay E.A., Li Y.Y. et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016;7:10501. DOI: 10.1038/ncomms10501. PMID: 26883990.
51. Bevelacqua V., Bevelacqua Y., Candiello S. et al. Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. *Oncotarget* 2012;3(8):882–92. DOI: 10.18632/oncotarget.594. PMID: 22929570.
52. Inozume T., Yaguchi T., Furuta J. et al. Melanoma cells control antimelanoma CTL responses via interaction between TIGIT and CD155 in the effector phase. *J Invest Dermatol* 2016;136(1):255–63. DOI: 10.1038/JID.2015.404. PMID: 26763445.
53. Kurtulus S., Sakuishi K., Ngiow S.F. et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* 2015;125(11):4053–62. DOI: 10.1172/JCI81187. PMID: 26413872.
54. Melero I., Hirschhorn-Cymerman D., Morales-Kastresana A. et al. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1044–53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2065. PMID: 23460535.
55. Hellmann M.D., Friedman C.F., Wolchok J.D. Combinatorial cancer immunotherapies. *Adv Immunol* 2016;130:251–77. DOI: 10.1016/bs.ai.2015.12.005. PMID: 26923003.
56. Mahmood T., Yang P.C. OX40L-OX40 interactions: a possible target for gastrointestinal autoimmune diseases. *N Am J Med Sci* 2012;4(11):533–6. DOI: 10.4103/1947-2714.103311. PMID: 23181223.
57. Gough M.J., Crittenden M.R., Sarff M. et al. Adjuvant therapy with agonistic antibodies to CD134(OX40) increases local control after surgical or radiation therapy of cancer in mice. *J Immunother* 2010;33(8):798–809. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ee7095. PMID: 20842057.
58. Ruby C.E., Yates M.A., Hirschhorn-Cymerman D. et al. Cutting edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol* 2009;183(8):4853–7. DOI: 10.4049/jimmunol.0901112. PMID: 19786544.
59. Linch S.N., McNamara M.J., Redmond W.L. OX40 agonists and

- combination immunotherapy: putting the pedal to the metal. *Front Oncol* 2015;5:34. DOI: 10.3389/fonc.2015.00034. PMID: 25763356.
60. Ramakrishna V., Sundarapandian K., Zhao B. et al. Characterization of the human T cell response to *in vitro* CD27 costimulation with varlilumab. *J Immunother Cancer* 2015;3:37. DOI: 10.1186/s40425-015-0080-2. PMID: 26500773.
  61. Moon Y.W., Hajjar J., Hwu P., Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer* 2015;3:51. DOI: 10.1186/s40425-015-0094-9. PMID: 26674411.
  62. Zhai L., Spranger S., Binder D.C. et al. Molecular pathways: targeting IDO1 and other tryptophan dioxygenases for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015;21(24):5427–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0420. PMID: 26519060.
  63. Metz R., Rust S., Duhadaway J.B. et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology* 2012;1(9):1460–8. DOI: 10.4161/onci.21716. PMID: 23264892.
  64. Weinlich G., Murr C., Richardsen L. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology* 2007;214(1):8–14. DOI: 10.1159/000096906. PMID: 17191041.
  65. O'Shea J.J., Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 2012;36(4):542–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.014. PMID: 22520847.
  66. Levy D.E., Darnell J.E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):651–62. DOI: 10.1038/nrm909. PMID: 12209125.
  67. Zaretsky J.M., Garcia-Diaz A., Shin D.S. et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2016;375(9):819–29. DOI: 10.1056/NEJMoa1604958. PMID: 27433843.
  68. Sucker A., Zhao F., Real B. et al. Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2014;20(24):6593–604. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0567. PMID: 25294904.
  69. Dovedi S.J., Adlard A.L., Lipowska-Bhalla G. et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014;74(19):5458–68. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1258. PMID: 25274032.
  70. Wang X., Schoenhals J.E., Li A. et al. Suppression of type I IFN signaling in tumors mediates resistance to anti-PD-1 treatment that can be overcome by radiotherapy. *Cancer Res* 2017;77(4):839–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3142. PMID: 27821490.
  71. Marchini A., Scott E.M., Rommelaere J. Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade. *Viruses* 2016;8(1):9. DOI: 10.3390/v8010009. PMID: 26751469.