



© М.В. Мнихович¹, Д.А. Борисов², Р.Г. Тимофеев², Ю.С. Агафонова²,
 Л.М. Ерофеева¹, Т.В. Безуглова¹, И.А. Ширипенко^{1,2}

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты как мишень иммунотерапии при раке молочной железы

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Российская Федерация

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

© Maxim V. Mnikhovich¹, Denis A. Borisov², Roman G. Timofeev², Yulia S. Agafonova²,
 Lyudmila M. Erofeeva¹, Tatyana V. Bezuglova¹, Ivan A. Shiripenko^{1,2}

Tumor-Infiltrating Lymphocytes as a Target for Immunotherapy in Breast Cancer

¹Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, the Russian Federation

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, the Russian Federation

В статье рассмотрены вопросы использования опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) в клинической практике, освещены новейшие исследования, посвященные поиску перспективных методов лечения онкологических больных на примере рака молочной железы (РМЖ) с разным уровнем лимфоцитарной инфильтрации. Одним из перспективных методов терапии опухолей в настоящее время является метод иммунотерапии, в основе которого лежит воздействие на иммунные контрольные «точки», или чекпойнты, представляющие собой систему ингибиторных механизмов, регулирующих активацию иммунного ответа. Клетки опухоли, воздействуя на чекпойнты, предотвращают активацию опухолю-специфических лимфоцитов и, таким образом, приобретают устойчивость к действию иммунной системы. Целью иммунотерапии является блокирование взаимодействия иммунных чекпойнтов и их лигандов, экспрессируемых клетками опухоли и её микроокружением, приводящее к реактивации противоопухолевого иммунного ответа. В связи с этим актуальными являются исследования, направленные на поиск молекулярных мишеней. Наиболее важным объектом этих исследований являются опухолю-инфильтрирующие лимфоциты. Для подготовки обзора проведен поиск литературы по базам данных Scopus, Web of Science, Medline, PubMed, CyberLeninka, РИНЦ и CNKI. При анализе использованы источники, индексируемые в базах данных Scopus, Web of Science, PubMed; 70 % работ опубликовано за последние 5 лет. Использовано 40 источников для написания данного литературного обзора.

Ключевые слова: обзор исследований опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов; рак молочной железы; иммунотерапия; иммунные контрольные «точки»; иммунные чекпойнты

Для цитирования: Мнихович М.В., Борисов Д.А., Тимофеев Р.Г., Агафонова Ю.С., Ерофеева Л.М., Безуглова Т.В., Ширипенко И.А. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты как мишень иммунотерапии при раке молочной железы. *Вопросы онкологии*. 2024; 70(3): 424-432. DOI 10.37469/0507-3758-2024-70-3-424-432

✉ Контакты: Мнихович Максим Валерьевич, mnychmaxim@yandex.ru

The article discussed the use of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in clinical practice and highlighted the latest research in the search for promising ways to treat cancer patients, using breast cancer with different levels of lymphocyte infiltration as an example. One of the promising methods of tumour therapy today is immunotherapy, which is based on targeting immune control “points” or checkpoints, a system of inhibitory mechanisms that regulate the activation of the immune response. By acting on checkpoints, tumour cells prevent the activation of tumour-specific lymphocytes and thus become resistant to the action of the immune system. The goal of immunotherapy is to block the interaction of immune checkpoints and their ligands expressed by tumor cells and their microenvironment, leading to reactivation of the anti-tumor immune response. In this context, studies aimed at identifying molecular targets are currently underway. The main target of these studies are tumor-infiltrating lymphocytes. A literature search of Scopus, Web of Science, Medline, PubMed, CyberLeninka, RSCI and CNKI databases was conducted to prepare the review. The analysis used sources indexed in the Scopus, Web of Science and PubMed databases; 70 % of papers published in the last 5 years. 40 sources were used to write this review.

Keywords: review of studies on tumor-infiltrating lymphocytes; breast cancer; immunotherapy; immune control points; immune checkpoints

For Citation: Maxim V. Mnikhovich, Denis A. Borisov, Roman G. Timofeev, Yulia S. Agafonova, Lyudmila M. Erofeeva, Tatyana V. Bezuglova, Ivan A. Shiripenko. Tumor-infiltrating lymphocytes as a target for immunotherapy in breast cancer. *Voprosy Onkologii = Problems in Oncology*. 2024; 70(3): 424-432. (In Rus).-DOI: 10.37469/0507-3758-2024-70-3-424-432

Введение

Одним из перспективных методов терапии опухолей в настоящее время является метод иммунотерапии, приводящий к реактивации противоопухолевого иммунного ответа, который основан на блокировке ингибирующего сигнала, передающегося через иммунные контрольные «точки», или чекпоинты (от англ. Immunological checkpoints). Иммунные контрольные точки (чекпоинты) — молекулярные регуляторы иммунной системы, предотвращающие развитие аутоиммунных процессов. В основе функционирования чекпоинтов лежит механизм взаимодействия лиганд-рецептор. Клетки опухоли и ее микроокружения, воздействуя на контрольные точки, препятствуют активации специфических лимфоцитов и, таким образом, приобретают устойчивость к действию иммунной системы. В связи с этим на сегодняшний день открываются новые направления для исследований и поиска лекарственных молекулярных мишеней, которые бы способствовали ослаблению устойчивости раковых клеток к противоопухолевой активности клеток микроокружения, приводили к повышению эффективности иммунотерапии и других видов лечения. Наиболее важным объектом этих исследований являются опухоль-инфильтрирующие лимфоциты. Цель обзора — рассмотреть TILs с точки зрения практического применения как биомаркера прогноза клинических исходов и определения наиболее эффективного метода иммунотерапии при различных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы.

Характеристика клеточных популяций опухолевого микроокружения и точки воздействия иммунотерапии

Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ, Tumor-infiltrating lymphocytes — TILs) представлены различными клеточными популяциями: В-клетки, CD8⁺, CD4⁺ Т-лимфоциты, NK-cell и их субпопуляциями [1]. Основой иммунного ответа на опухоль является активация CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов. В этих группах традиционно выделяют наивные лимфоциты, клетки-эффекторы, клетки-памяти, CD4⁺ регуляторные клетки [1].

При исследовании патогенеза нарушений клеточных функций были выявлены фенотипы дисфункциональных Т-лимфоцитов и введены представления о субпопуляциях истощённых (exhausted) и стареющих (senescent) клеток [2, 3]. Стареющие Т-лимфоциты — это группа клеток, характеризующихся сниженными пролиферативными показателями, однако сохранившими способность к эффекторной функции. Вопрос

об экспрессии данными клетками иммунных чекпоинтов является спорным [2]. Истощённые Т-клетки представляют собой субпопуляцию лимфоцитов, активно экспрессирующих различные молекулы иммунных контрольных точек, при стимуляции которых резко снижаются эффекторные и пролиферативные возможности данных клеток [3, 4].

В настоящее время наряду с широко распространёнными методами терапии РМЖ такими, как хирургическое удаление опухоли, неoadъювантная и адъювантная химиотерапия, лучевая терапия, в клиническую практику активно внедряется иммунотерапия онкологических заболеваний. Применение лечения на основе ингибиторов иммунных контрольных точек (ICI — immune checkpoint inhibitors или ICB — immune checkpoint blockade) является оправданным при высокой концентрации TILs в опухоли (так называемые «горячие» опухоли), что выражается в значимых показателях клинической эффективности и выживаемости. Это объясняется большей насыщенностью «горячих» опухолей молекулами CTLA-4, PD-1 и PD-L1, LAG-3 — мишенями для ICI-терапии [5].

«Холодные» опухоли, имеющие низкую степень лимфоцитарной инфильтрации, обладают противоположными свойствами [5].

Таким образом, высокий уровень лиганда способствует развитию дисфункции Т-лимфоцитов, следовательно, ингибирование их взаимодействия с рецепторами лимфоцитов будет вести к восстановлению иммунного ответа. Благодаря данному механизму, эффективность ответа на иммунотерапию может оцениваться не только по концентрации TILs, но и по уровню экспрессии молекул иммунных чекпоинтов клетками опухоли и ее микроокружения (tumor microenvironment — TME), опухоль-инфильтрирующими Т-лимфоцитами [6]. Опухолевое микроокружение (tumor microenvironment — TME) включает кроме TILs ассоциированные с опухолью макрофаги, нейтрофилы, фибробласты и другие клетки, а также цитокины, являющиеся продуктами деятельности всех клеток микроокружения и опухолевых клеток.

Подходы к определению TILs в опухоли и методы диагностики

В настоящий момент можно выделить несколько способов оценки содержания TILs в опухолевых образованиях.

При количественной оценке TILs основным учитываемым параметром является степень лимфоцитарной инфильтрации опухоли [7].

Определение фенотипов и функционального состояния TILs лежит в основе описания каче-

ственных показателей. Наиболее комплексный способ, используемый для этого — Single-cell RNA-sequencing, однако он применяется лишь в передовых фундаментальных работах [8]. В современных клинических исследованиях изучаются качественные параметры TILs по косвенному признаку — уровню экспрессии опухолью лигандов к основным иммунным чекпойнтам. Важно учитывать, что данные молекулы экспрессируются, в т. ч. клетками опухолевого микроокружения [6]. Кроме того, ряд исследований показывает корреляции между клиническими исходами и определенным составом ТМЕ [6, 8, 9]. Вероятно, это достигается за счёт формирования различных цитокиновых и иных взаимодействий в ткани, поражённой опухолью. Таким образом, TILs важно рассматривать в комплексе с другими клеточными элементами ТМЕ и клетками опухоли.

В настоящее время основными методами оценки TILs и ТМЕ являются микроскопический метод и иммуногистохимический анализ. Микроскопическое исследование характеризуется простотой исполнения и широкой доступностью [7]. При анализе приготовленных препаратов выделяют стромальные (sTILs) и внутриопухолевые (iTILs) инфильтрирующие лимфоциты. sTILs определяются как лимфоциты, которые расположены в строме без прямого контакта с опухолевыми клетками и присутствуют в пределах границы опухоли. iTILs — лимфоциты, имеющие непосредственное взаимодействие с раковыми клетками. Изучение количества sTILs лежит в основе стандартизированной оценки TILs при раке молочной железы, однако ряд исследований ставит под сомнение данный метод, указывая на прогностическую роль iTILs [10, 11].

Имуногистохимия (ИГХ) является более информативным и точным методом, в настоящее время активно внедряемым в клиническую и исследовательскую практику [7].

ИГХ позволяет определить с помощью маркеров к поверхностным рецепторам клеток большинство субпопуляций иммунных клеток; обнаружить различные молекулярные структуры, экспрессируемые в исследуемом образце опухоли: Ki67, PD-L1, HER2, гормональных рецепторов и т. д. [7].

Результаты применения иммунотерапии при раке молочной железы различных молекулярно-биологических подтипов

Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ). ТНРМЖ распространён среди молодых женщин. На его долю приходится 10–15 % всех случаев РМЖ. ТНРМЖ отличается быстрым ростом и высокой агрессивностью [12].

В ряде исследований были определены факторы, коррелирующие с общей выживаемостью пациентов с ТНРМЖ: семейный анамнез РМЖ, расположение опухоли, гистологическая степень и статус Ki67 [13].

Иммунологически данный тип опухоли характеризуется высоким уровнем лимфоцитарной инфильтрации и значительной мутационной нагрузкой (Tumour mutation burden — TMB) [14].

Как было отмечено ранее, высокий уровень TILs ассоциируется с лучшей эффективностью иммунотерапии. Это подтверждается результатами исследований KEYNOTE-086 (I и II фазы), KEYNOTE-173, Impassion130 и выражается в увеличении значений общей выживаемости, безрецидивной выживаемости, полного патологического ответа при ТНРМЖ [15–17].

На сегодняшний день основной мишенью IC1-терапии ТНРМЖ является взаимодействие молекул PD-1 и PD-L1. Сформировавшаяся в последние годы научная концепция говорит о предиктивной значимости экспрессии PD-L1 клетками опухоли и ТМЕ для определения эффективности терапии РМЖ. Основными исследованиями в этой области являются работы Impassion130 и Impassion031, KEYNOTE-119 и KEYNOTE-355 [18, 19, 20, 21].

Для оценки значения экспрессии PD-L1 существует несколько методов. В случае Impassion 130 и 031 используется методика на основании покрытия области опухоли иммунными клетками, экспрессирующими PD-L1 [20, 21]. В KEYNOTE-119 и KEYNOTE-355 применяется метод комбинированной оценки (Combined Positive Score — CPS), который представляет собой процентное отношение PD-L1 позитивных клеток (как опухолевых, так и иммунных) к общему количеству опухолевых клеток [18, 19].

По результатам исследования Impassion 130 (пациенты с местно-распространённым или метастатическим ТНРМЖ) в группе PD-L1 положительных пациентов с экспрессией лиганда на 1 % и более опухолевых клеток, наблюдалось значимое повышение показателей общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования заболевания (progression-free survival — PFS), по сравнению с PD-L1 отрицательной группой больных [20].

В KEYNOTE-355 и KEYNOTE-119 исследовались пациенты с метастатическим ТНРМЖ. Результаты показали, что у больных с уровнем CPS ≥ 10 и CPS ≥ 20 соответственно отмечалось статистически значимое улучшение клинической картины заболевания [18, 19].

Однако в более новых исследованиях (KEYNOTE-522, Impassion-031) было продемонстрировано, что уровень PD-L1 экспрессии не являлся значимым фактором для прогнозирова-

ния эффективности ИСІ-терапии на ранних стадиях ТНРМЖ. Установлено, что при применении ингибитора контрольных точек улучшение отмечалось в группах как PD-L1-положительных, так и у PD-L1-отрицательных пациентов. Авторы отмечают, что показатель TILs, как предиктивный маркер, обладает большей точностью, по сравнению с уровнем экспрессии PD-L1 [21, 22].

Peter Schmid и соавт. (2020) предположили, что причиной противоречивости последних двух исследований является то, что в них рассматриваются более ранние, неметастатические стадии онкологического процесса [22].

На сегодняшний день ряд клинических исследований показывают прогностически значимое влияние уровня TILs на эффективность лечения при применении не только ингибиторов контрольных точек, но и химиопрепаратов.

В метаанализе Denkert и соавт. (2018) была произведена оценка sTILs до проведения неоадьювантной химиотерапии всех типов РМЖ и проанализированы показатели безрецидивной и общей выживаемости. Значения sTILs в пределах 0–10 % были приняты как низкие, 11–59 % как средние, 60–100 % как высокие. В результате было выявлено, что высокие значения sTILs являются предиктором полного патологического ответа (ППО) во всех типах рака. Однако наиболее часто высокие показатели sTILs наблюдались именно при ТНРМЖ (30 % случаев). Кроме того, установлена корреляция между ППО и лучшими показателями общей выживаемости [23].

HER-2/neu-положительный РМЖ. В настоящее время для лечения HER-2/neu-положительного РМЖ одобрены и активно используются хирургический метод, химиотерапия, моноклональные антитела к HER-2/neu. Работы по применению иммунотерапии немногочисленны и указывают на менее благоприятный прогноз для пациентов, по сравнению с ТНРМЖ [24].

Одним из основных исследований HER-2/neu+ РМЖ является CLEOPATRA, изучавшее лечение на основе трастузумаба и доцетаксела с добавлением пертузумаба или плацебо. Трастузумаб и пертузумаб представляют собой рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела, избирательно взаимодействующие с различными частями внеклеточного домена HER-2/neu. Ученые выяснили, что общая выживаемость была выше у больных с более высоким уровнем TILs (медиана общей выживаемости была короче у пациентов со значениями TILs ≤ 20 %, чем у пациентов со значениями TILs > 20 %, $p = 0,021$). При этом добавление пертузумаба увеличивало выживаемость пациентов, независимо от содержания TILs [25].

В исследовании PANACEA пациентам, резистентным к трастузумабу, был назначен пембролизумаб, блокатор PD-1. Во второй фазе клинических испытаний, в PD-L1-положительной группе у четверти больных был достигнут положительный клинический эффект. В группе PD-L1-отрицательных пациентов позитивного влияния пембролизумаба не отмечалось [26].

Гормон-положительный РМЖ. По сравнению с другими типами РМЖ, гормон-положительный (hormone-positive, HR+) РМЖ характеризуется относительно малой мутационной нагрузкой опухоли, следовательно, низкой иммуногенностью. Это проявляется в сниженном количестве TILs и/или низкой экспрессии PD-L1 [27]. Из этого факта можно сделать вывод о неэффективности применения ингибиторов иммунных контрольных точек при HR+ РМЖ, что было подтверждено в ряде исследований [28, 29].

Тем не менее, в настоящее время появляются данные, которые открывают перспективы для использования иммунотерапии гормон-положительных опухолей в комбинации с химиотерапией на ранних стадиях. В исследовании I-SPY2 часть пациентов с HR+/HER-2/neu- РМЖ получали неоадьювантное лечение в виде стандартной химиотерапии (паклитаксел, затем доксорубин и циклофосфамид) с добавлением пембролизумаба, и это приводило к более высокой частоте полного патологического ответа, по сравнению с группой больных, получавших только химиотерапию [30].

Перспективные исследования

Дисфункция TILs — новые представления. На сегодняшний день проводится ряд фундаментальных исследований в области дисфункции Т-лимфоцитов. С помощью разработки современных методов изучения клеточного состава опухолей, в частности Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), открываются новые представители TILs, описываются их молекулярные особенности и функциональное состояние. Благодаря этому улучшается понимание клеточных и тканевых взаимодействий, блокируя которые можно достичь наилучших результатов при иммунотерапии.

Представления о дисфункции Т-лимфоцитов как основы нарушения иммунного ответа на опухоль начали формироваться с конца XX-го в. Однако это явление воспринималось до последнего времени как бинарный процесс с наличием двух состояний Т-клеток: истощенного и функционального.

В 2020 г. вышла статья нидерландских ученых, в которой описывалась иная концепция формирования дисфункционального пула

инфильтрирующих опухоль CD8⁺ Т-лимфоцитов. Как было представлено авторами данного исследования, дисфункция Т-клеток — это постепенно возникающее снижение противоопухолевой эффекторной функции Т-лимфоцитов, вследствие приобретения ими способности к экспрессии ингибирующих молекул: PD-1, CTLA4, LAG3 (Lymphocyte-activation gene 3), TIM3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3, HAVCR2), GZMK (Granzyme K), CD39 и CD103. Ключевой характеристикой этого процесса является его стадийность, что предполагает существование переходных форм Т-клеточного звена с выделением состояний ранней и поздней дисфункции [31].

По мнению ученых, обнаруженные на основании scRNA-seq «наивноподобные» и «цитотоксические» Т-лимфоциты могут переходить в истощенные формы. Эти клетки обозначаются как преддисфункциональные, в случае появления на их поверхности ингибирующих молекул, но в меньшей концентрации, чем на истощенных (дисфункциональных) Т-лимфоцитах [31].

Как уже упоминалось ранее, непосредственно дисфункциональные CD8⁺ Т-клетки разделяются на ранние и поздние: первые характеризуются выраженной способностью к пролиферации, вторые — ее отсутствием. При переходе в состояние поздней дисфункции снижается проявление классических эффекторных функций Т-лимфоцитов (продукции IL-2, TNF и IFN γ). Однако Т-клетки приобретают новые возможности, например, к секреции CXCL13, выступающего в качестве хемоаттрактанта В-клеток, что лежит в основе образования лимфоидных узлов (TLS) в структуре опухоли [31].

При рассмотрении вопроса ИСІ-терапии исследователи отметили, что именно наличие ранних дисфункциональных CD8⁺ Т-лимфоцитов может иметь решающее значение для генерации стойкого противоопухолевого ответа на лечение ингибиторами иммунных чекпойнтов и, соответственно, может выполнять роль прогностического биомаркера [31].

Исследование Massimo Andreatta и соавт. (2021) представляет более глубокое изучение состава TILs и его функционирования [32].

Установлено, что опухоль-специфические TILs, с точки зрения дисфункции, представлены тремя подтипами клеток: Tex (CD8⁺ terminally-exhausted effector) и их менее активными предшественниками — Трех (CD8⁺ precursor-exhausted), EM (effector memory). При этом в ткани опухоли наиболее распространена истощенная популяция Т-клеток [32].

Главной целью иммунотерапии, по мнению Andreatta и соавт. (2021), является «оживление» именно CD8⁺ терминально истощенных

Т-лимфоцитов, поскольку данные клетки способны к противоопухолевой цитотоксической функции. В настоящее время процесс восстановления киллерной активности Т-клеток происходит, благодаря воздействию на PD1, CTLA4. Поскольку TOX и Ptpn2 считаются основными факторами, устанавливающими программу постепенного истощения CD8⁺ Т-клеток, то их блокада, а также блокада LAG3 и Klr1, может стать перспективным направлением иммунотерапии онкологических заболеваний [32].

В представленных двух исследованиях существуют взаимные противоречия. В работе Anne M. van der Leun и соавт. [31] приводятся результаты об эффективности иммунотерапии на этапах перехода Т-лимфоцитов в дисфункциональное состояние, тогда как Massimo Andreatta и соавт. [146] описывают более эффективное применение иммунотерапии на стадии терминально истощенных CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, необходимо продолжить изучение дисфункционального процесса Т-клеточного звена.

Перспективные исследования иммунофенотипов опухолевого микроокружения

В 2021 г. была опубликована статья Вагаев и соавт., в которой предложена новая классификация иммунофенотипов опухолей на основании транскриптомного анализа опухолей и TME [9].

В исследовании учёные данной группы выделяют четыре подтипа микроокружения:

1. immune-enriched (IE, иммуннообогащённый);
2. immune-enriched/fibrotic (IE/F, иммуннообогащённый/фибротический);
3. fibrotic (F, фибротический);
4. depleted (D, истощённый).

Наилучшим для применения терапии ингибиторами иммунных чекпойнтов являлись IE фенотип, наименее перспективными — F и D подтипы [9].

В данной работе показана низкая эффективность применения ИСІ-терапии при иммунофенотипах опухолей, характеризующихся малым уровнем TMB, низкой инфильтрацией TILs. Следовательно, можно утверждать, что для данных видов опухолей необходима иная терапия, направленная на формирование полноценного провоспалительного TME [9].

Новые концепции лечения полирезистентных подтипов опухолей и TILs

Как было описано ранее благоприятное прогностическое значение имеет высокий уровень инфильтрации TILs, низкие показатели данного

параметра ассоциируются с негативными клиническими исходами. Следовательно, для достижения лучших результатов лечения необходимо «перевести» малоинфильтрированные опухоли в иммуннообогащённые.

Одним из решений является применение адоптивной клеточной терапии (АКТ, Adoptive cell therapy — АСТ). На сегодняшний день АКТ используется как терапия «последнего шанса» у пациентов, опухоли которых прогрессировали, несмотря на проводимое ранее лечение. Данное направление имеет три модальности, основанные на введении разных типов клеток: TILs из биоптата опухоли, лимфоциты с генетически модифицированными Т-клеточными рецепторами и Т- или NK-клетки с химерными антигенными рецепторами (Chimeric antigen receptor, CAR) [33].

Известно, что основной причиной несостоятельности иммунного ответа эндогенных лимфоцитов является опухолевое микроокружение, способствующее переходу эффекторных лимфоцитов в истощенные формы. Модификация клеток при АКТ и параллельное введение ингибиторов контрольных точек направлены на преодоление развития дисфункции имеющихся и введённых в организм пациента активированных лимфоцитов [9, 34].

Также для перехода противовоспалительного ТМЕ в провоспалительный иммунофенотип проводится химиотерапия для достижения лимфодеплеции с последующей АКТ и введением IL-2 [35].

Для применения адоптивной клеточной терапии в настоящее время необходимо исследование двух групп показателей TILs: качественных параметров и влияния ТМЕ на лимфоциты [34].

Качественные показатели TILs необходимы в получении материала для проведения индивидуальной АКТ, а также для оценки факторов резистентности, с которыми придётся столкнуться CAR-T- и CAR-NK-клеткам у конкретного пациента [34].

Есть две основные концепции нацеливания АКТ — индивидуальные неоантигены и универсальные онкологические мишени [34, 36].

В первом случае происходит обнаружение опухоль-специфических TILs, чаще всего находящихся в истощённом состоянии, и в дальнейшем при помощи метода scRNA-seq выявляются мишени, на которые необходимо нацеливать аутологические или аллогенные лимфоциты. Это дорогой, технологически сложный и оттого малодоступный метод для широкой клинической практики в ближайшие годы [34].

Другой вариант — это создание клеток, ориентированных на универсальные рецепторы, которые характерны для определённой группы

опухолей и отсутствуют в нормальных тканях пациента. Проблемами данного метода являются более низкие безопасность и эффективность, относительно ранее описанного способа [36].

Изначально адоптивная иммунотерапия основывалась на использовании Т-лимфоцитов, однако в настоящее время данные идеи нашли применение в отношении NK-клеток. CAR-NK обладают рядом важных преимуществ: удобством получения, большей безопасностью и более широкой системой распознавания. Также для некоторых опухолей была показана высокая онколитическая активность конкретно этого типа клеток. Фактически система нацеливания CAR-NK повторяет таковую у CAR-T [37, 38].

Отметим возможность применения в будущем ещё одного параметра оценки TILs в контексте АКТ — количественного. Как было отмечено в работе Вагаев и соавт. (2021), пациенты с опухолями, характеризующимися низкой лимфоцитарной инфильтрацией, зачастую резистентны к ИС-терапии [9]. Соответственно, для таких больных введение экзогенных модифицированных лимфоцитов, способных к активной пролиферации, является многообещающим, а иногда и единственно действующим методом лечения.

Также весьма перспективным является использование концепции АКТ для лечения метастазов опухолей, т. к. их иммунная инфильтрация значительно ниже, чем в первичных очагах. Однако в ряде исследований была показана проблема высокой мутационной гетерогенности метастазов и первичной опухоли. Таким образом, при применении АКТ, ориентированной на неоантигены, возникает необходимость нацеливания клеток на конкретный метастаз [34, 39, 40].

Обсуждение

В данной статье были рассмотрены вопросы использования TILs в клинической практике, освещены новейшие, пока еще единичные, исследования, посвященные поиску перспективных методов лечения онкологических больных на примере РМЖ с разным уровнем лимфоцитарной инфильтрации. Результаты многочисленных исследований показывают, что с прогностической точки зрения при различных видах лечения и при оценке перспективности применения определённого типа терапии важно учитывать три фактора, характеризующие TILs: количественный, качественный состав и влияние других составляющих опухолевого микроокружения.

Более высокая обогащённость опухоли TILs, характерная для ТНРМЖ, является благоприятным показателем для проведения иммунотерапии и прогноза эффективности лечения. Таким

образом, терапия на основе ингибиторов иммунных контрольных точек позволяет сделать ТНРМЖ, отличающийся быстрым прогрессированием и высокой летальностью, более благоприятным подтипом РМЖ с точки зрения прогноза для больных.

Польза применения иммунотерапии при HER-2/neu-положительном РМЖ находится на стадии изучения. В исследовании PANACEA продемонстрирована эффективность пембролизумаба для PD-L1 положительных пациентов, резистентных к трастузумабу. Также установлен факт влияния TILs на исходы заболевания, и на примере работы CLEOPATRA отражена позитивная роль высокого уровня TILs для прогноза эффективности лечения.

В настоящее время активно изучается функционирование TME и TILs. На основе накопленных данных группой ученых во главе с А.В. Багаевым разработана классификация опухолевого микроокружения с преобладанием провоспалительного, либо противовоспалительного компонентов. Именно наличие противовоспалительного иммунофенотипа TME, ассоциированного с низким уровнем TILs, может объяснить резистентность гормон-положительного РМЖ к ИС-терапии.

Современные исследования фактически основаны на адаптированном к онкологии законе Либиха: исследователи ищут «лимитирующий фактор» иммунного ответа, который пытаются «исправить» — привести его к оптимальному показателю. На этом логическом принципе основаны идеи применения антииммуносупрессорной и адоптивной клеточной терапии, а также работы А.М. van der Leun и соавт. и М. Andreatta и соавт., в которых вводятся представления о различных типах дисфункциональных Т-лимфоцитов, что дает основание для поиска новых мишеней иммунотерапии.

Таким образом, получение новых данных о ранее мало исследованных составляющих TME и TILs, а также разработка и подтверждение теорий функционирования опухолевого микроокружения дают возможность проводить в будущем клинические исследования инновационных моделей терапии. Перспективными для осуществления таких задач в настоящее время являются новые ингибиторы контрольных точек (антитела к LAG3, KLRG1 и другие), а также различные модальности применения CAR-клеток.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing

The study was performed without external funding.

Участие авторов

Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

Мнихович М.В., Безуглова Т.В. — концепция и дизайн исследования;

Мнихович М.В., Борисов Д.А., Тимофеев Р.Г., Агафонова Ю.С. — сбор и обработка материала;

Мнихович М.В., Борисов Д.А., Тимофеев Р.Г., Агафонова Ю.С., Ерофеева Л.М. — написание текста;

Мнихович М.В., Ерофеева Л.М., Безуглова Т.В., Ширипенко И.А. — редактирование.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразил(и) согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью или добросовестностью любой части работы.

Authors' contributions

The authors declare the compliance of their authorship with the international ICMJE criteria.

Mnikhovich M.V., Bezuglova T.V. — conceived the study and designed the experiment;

Mnikhovich M.V., Borisov D.A., Timofeev R.G., Agafonova Yu.S., Erofeeva L.M. — wrote the paper;

Mnikhovich M.V., Erofeeva L.M., Bezuglova T.V., Shiripenko I.A. — edited the manuscript.

All authors have approved the final version of the article before publication, agreed to assume responsibility for all aspects of the work, implying proper review and resolution of issues related to the accuracy or integrity of any part of the work.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Annaratone L., Cascardi E., Vissio E., et al. The multifaceted nature of tumor microenvironment in breast carcinomas. *Pathobiology*. 2020; 87(2): 125-142.-DOI: <https://doi.org/10.1159/000507055>.
- Zhao Y., Shao Q., Peng G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment. *Cell Mol Immunol*. 2020; 17: 27-35.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0344-8>.
- Miller B.C., Sen D.R., Al Abosy R., et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*. 2019; 20(3): 326-336.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0312-6>.
- Dolina J.S., Van Braeckel-Budimir N., Thomas G.D., Salek-Ardakani S. CD8+ T cell exhaustion in cancer. *Front Immunol*. 2021; 12:715234.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.715234>.
- De Guillebon E., Dardenne A., Saldmann A., et al. Beyond the concept of cold and hot tumors for the development of novel predictive biomarkers and the rational design of immunotherapy combination. *Int J Cancer*. 2020; 147(6): 1509-1518. -DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.32889>.
- Zhang Z., Liu S., Zhang B., et al. T cell dysfunction and ex-haustion in cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 17.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00017>.
- Hendry S., Salgado R., Gevaert T., et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: part 1: assessing the host immune response, tils in invasive

- breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol.* 2017; 24(5): 235-251.-DOI: <https://doi.org/10.1097/PAP.000000000000162>.
8. Zheng L., Qin S., Si W., et al. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science.* 2021; 374(6574): abe6474.-DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abe6474>.
 9. Bagaev A., Kotlov N., Nomie K., et al. Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy. *Cancer Cell.* 2021; 39(6): 845-865.e7.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.04.014>.
 10. Kos Z., Roblin E., Kim R.S., et al. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2020; 6: 17.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41523-020-0156-0>.
 11. Ruan M., Tian T., Rao J., et al. Predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes to pathological complete response in neoadjuvant treated triple-negative breast cancers. *Diagn Pathol.* 2018; 13: 66.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13000-018-0743-7>.
 12. Foulkes W.D., Smith I.E., Reis-Filho J.S. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363(20): 1938-48.-DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>.
 13. Lin Y., Fu F., Lin S., et al. A nomogram prediction for the survival of patients with triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2018; 9(63): 32108-32118.-DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24964>.
 14. Karn T., Jiang T., Hatzis C., et al. Association between genomic metrics and immune infiltration in triple-negative breast cancer. *JAMA Oncol.* 2017; 3(12): 1707-1711.-DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2140>.
 15. Adams S., Schmid P., Rugo H.S., et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol.* 2019; 30(3): 397-404.-DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy517>.
 16. Emens L.A., Molinero L., Loi S., et al. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer: biomarker evaluation of the IMpassion130 study. *J Natl Cancer Inst.* 2021; 113(8): 1005-1016.-DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djab004>.
 17. Loi S., Schmid P., Aktan G., et al. Relationship between tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and response to pembrolizumab (pembro)+chemotherapy (CT) as neoadjuvant treatment (NAT) for triple-negative breast cancer (TNBC): Phase 1b KEYNOTE-173 trial. *Ann Oncol.* 2019; 30 :iii2.-DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz095.003>.
 18. Cortes J., Rugo H.S., Cescon D.W., et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in advanced triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2022; 387: 217-226.-DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202809>.
 19. Winer E.P., Lipatov O., Im S.A., et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-119): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021; 22(4): 499-511.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30754-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30754-3).
 20. Schmid P., Rugo H.S., Adams S., et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020; 21(1): 44-59.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30689-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30689-8).
 21. Mittendorf E.A., Zhang H., Barrios C.H., et al. Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet.* 2020; 396: 1090-1100.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31953-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31953-X).
 22. Schmid P., Cortes J., Pusztai L., et al. Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2020; 382: 810-821.-DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>.
 23. Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S., et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol.* 2018; 19(1): 40-50.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30904-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30904-X).
 24. Kwan M.L., Kushi L.H., Weltzien E., et al. Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast Cancer Research.* 2009; 11(3).-DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr2261>.
 25. Luen S.J., Salgado R., Fox S., et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in advanced HER2-positive breast cancer treated with pertuzumab or placebo in addition to trastuzumab and docetaxel: a retrospective analysis of the CLEOPATRA study. *Lancet Oncol.* 2017; 18(1): 52-62.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30631-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30631-3).
 26. Loi S., Giobbie-Hurder A., Gombos A., et al. Pembrolizumab plus trastuzumab in trastuzumab-resistant, advanced, HER2-positive breast cancer (PANACEA): a single-arm, multicentre, phase 1b-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(3): 383-393.-DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30812-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30812-X).
 27. Goldberg J., Pastorello R.G., Vallius T., et al. The Immunology of hormone receptor positive breast cancer. *Front Immunol.* 2021; 12: 674192.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674192>.
 28. Rugo H.S., Delord J.P., Im S.A., et al. Safety and antitumor activity of pembrolizumab in patients with estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2018; 24(12): 2804-2811.-DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432>.
 29. Shah A.N., Flaum L., Helenowski I., et al. Phase II study of pembrolizumab and capecitabine for triple negative and hormone receptor-positive, HER2-negative endocrine-refractory metastatic breast cancer. *J Immunother Cancer.* 2020; 8(1): e000173.-DOI: <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000173>.
 30. Nanda R., Liu M.C., Yau C., et al. Effect of pembrolizumab plus neoadjuvant chemotherapy on pathologic complete response in women with early-stage breast cancer: an analysis of the ongoing phase 2 adaptively randomized I-SPY2 trial. *JAMA Oncol.* 2020; 6(5): 676-684.-DOI: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.6650>.
 31. van der Leun A.M., Thommen D.S., Schumacher T.N. CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer.* 2020; 20(4): 218-232.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0235-4>.
 32. Andreatta M., Corria-Osorio J., Müller S., et al. Interpretation of T cell states from single-cell transcriptomics data using reference atlases. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 2965.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23324-4>.
 33. Kirtane K., Elmariah H., Chung C.H., Abate-Daga D. Adoptive cellular therapy in solid tumor malignancies: review of the literature and challenges ahead. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 2021; 9(7).-DOI: <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002723>.
 34. Morotti M., Albukhari A., Alsaadi A., et al. Promises and challenges of adoptive T-cell therapies for solid tumours. *Br J Cancer.* 2021; 124:1759-1776.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01353-6>.

35. Owen K., Ghaly R., Shohdy K.S., et al. Lymphodepleting chemotherapy practices and effect on safety and efficacy outcomes in patients with solid tumours undergoing T cell receptor-engineered T cell (TCR-T) Therapy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Immunol Immunother.* 2023; 72: 805-814.-DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03287-1>.
36. Lin H., Cheng J., Mu W., et al. Advances in universal CAR-T cell therapy. *Front Immunol.* 2021; 12: 744823.-DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744823>.
37. Yilmaz A., Cui H., Caligiuri M.A., et al. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2020; 13(1).-DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00998-9>.
38. Zhang L., Meng Y., Feng X., et al. CAR-NK cells for cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Biomark Res.* 2020; 10.-DOI: <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00364-6>.
39. Reuben A., Spencer C.N., Prieto P.A., et al. Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *NPJ Genom Med.* 2017; 2: 10.-DOI: <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0013-8>.
40. Angelova M., Mlecnik B., Vasaturo A., et al. Evolution of metastases in space and time under immune selection. *Cell.* 2018; 175(3): 751-765.e16.-DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.018>.

Поступила в редакцию / Received / 27.09.2023

Прошла рецензирование / Reviewed / 20.12.2023

Принята к печати / Accepted for publication / 21.12.2023

Сведения об авторах / Author's information / ORCID

Максим Валерьевич Мнихович / Maxim V. Mnikhovich / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7147-7912>.
Денис Алексеевич Борисов / Denis A. Borisov / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-3625-692X>.
Роман Геннадьевич Тимофеев / Roman G. Timofeev / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0000-2468-2200>.
Юлия Сергеевна Агафонова / Yulia S. Agafonova / ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0007-4877-9569>.
Людмила Михайловна Ерофеева / Lyudmila M. Erofeeva / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2949-1432>.
Татьяна Васильевна Безуглова / Tatyana V. Bezuglova / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7792-1594>.
Иван Александрович Ширипенко / Ivan A. Shiripenko / ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5947-1523>.

