

Потенциальные биомаркеры эффективности терапии ниволумабом при метастатическом почечно-клеточном раке

М.С. Саяпина¹, Н.А. Савелов², Н.В. Любимова¹, Ю.С. Тимофеев¹, Д.А. Носов³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23;

²ГБУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 143423 Московская обл., Красногорский район, пос. Истра, 27;

³ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента России; Россия, 121359 Москва, ул. Маршала Тимошенко, 15

Контакты: Мария Сергеевна Саяпина ms-sayapina@mail.ru

Введение. Терапия ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (антителами к PD-1) стала стандартом лечения больных метастатическим почечно-клеточным раком (мПКР), резистентных к тирозинкиназным ингибиторам.

Цель исследования – идентификация надежных иммунологических маркеров, предсказывающих чувствительность мПКР к иммунотерапии ниволумабом, что способствовало бы повышению ее эффективности и более рациональному использованию.

Материалы и методы. В статье представлен анализ результатов лечения 23 пациентов с мПКР, получавших ниволумаб в рамках программы расширенного доступа к препарату. Частота объективного ответа в данной группе составила 21,7 %. Медиана выживаемости без прогрессирования составила 4 мес (95 % доверительный интервал 1,37–10,04). Медиана общей выживаемости не достигнута при медиане времени наблюдения 10 мес (3–14 мес), осложнения III–IV степени были отмечены в 13 % случаев.

Результаты. При проведении иммунотерапии ниволумабом факторами, благоприятно влияющими на выживаемость без прогрессирования заболевания, стали наличие клинического эффекта, благоприятный прогноз согласно критериям Memorial Sloan Kettering Cancer Center, развитие гипотиреоза, исходные уровни интерлейкина-17A и sPD-1 в сыворотке крови, превышающие пороговые значения. Отрицательным прогностическим фактором при проведении иммунотерапии ниволумабом стала исходно повышенная концентрация в сыворотке крови TGF- β 1 по сравнению с пороговым уровнем (20 нг/мл). Число преобладающих линий терапии, экспрессия PD-L1 и FOXP3 на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах не оказали достоверного влияния на выживаемость без прогрессирования. Эффективность и токсический профиль ниволумаба в данной серии наблюдений соответствовали результатам III фазы клинического исследования. Препарат отличался хорошей переносимостью.

Заключение. Результаты исследования показали более низкую токсичность и хорошую переносимость ниволумаба по сравнению с таргетными препаратами, зарегистрированными ранее. Невысокая частота побочных эффектов позволяет изучать ниволумаб в комбинированных или последовательных/альтернирующих режимах с другими ингибиторами иммунных контрольных точек и таргетными препаратами.

Ключевые слова: ниволумаб, метастатический почечно-клеточный рак, TGF- β 1, IL-17A, sPD-1, PD-L1, FOXP3

Для цитирования: Саяпина М.С., Савелов Н.А., Любимова Н.В. и др. Потенциальные биомаркеры эффективности терапии ниволумабом при метастатическом почечно-клеточном раке. Онкоурология 2018;14(1):16–27.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-1-16-27

Potential biomarkers for nivolumab therapy of metastatic renal cell carcinoma

M.S. Sayapina¹, N.A. Savyolov², N.V. Lyubimova¹, Yu.S. Timofeev¹, D.A. Nosov³

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Moscow City Oncological Hospital No. 62 of the Moscow Healthcare Department; 27 Istra Settlement, Krasnogorsk District, Moscow Region 143423, Russia;

³Central Clinical Hospital of the Administration of the President of the Russian Federation; 15 Marshala Timoshenko St., Moscow 121359, Russia

Background. Therapy with immune checkpoint inhibitors (antibodies against PD-1) has become a standard of treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) resistant to tyrosine kinase inhibitors.

Objective: to identify reliable immunological markers predicting mRCC sensitivity to nivolumab therapy to increase its effectiveness and facilitate its more rational application.

Materials and methods. The article presents an analysis of treatment of 23 patients with mRCC who received nivolumab under the expanded access program. Objective response rate in this group was 21.7%. Median progression-free survival was 4 months (95% confidence interval was 1.37–10.04). Median overall survival wasn't reached for median follow-up duration of 10 months (3–14 months); grade III–IV complications were observed in 13% of cases.

Results. During nivolumab therapy, factors positively affecting progression-free survival were presence of clinical effect, favorable prognosis per the Memorial Sloan Kettering Cancer Center criteria, development of hypothyroidism, baseline serum levels of interleukin-17A and sPD-1 above the threshold values. Baseline increased serum concentration of TGF- β 1 compared to the threshold level (20 ng/ml) was a negative prognostic factor for nivolumab immunotherapy. The number of previous therapy lines, PD-L1 and FOXP3 expression on tumor-infiltrating lymphocytes didn't significantly affect progression-free survival. Effectiveness and toxicity profile of nivolumab in this series of observations conformed to the results of the phase III clinical trial. The drug was characterized by high tolerability.

Conclusion. The study results demonstrated lower toxicity and high tolerability of nivolumab compared to previously registered targeted drugs. Low rate of adverse events allows to study nivolumab in combined or subsequent/alternating modes of treatment with other immune checkpoint inhibitors and targeted drugs.

Key words: nivolumab, metastatic renal cell carcinoma, TGF- β 1, IL-17A, sPD-1, PD-L1, FOXP3

For citation: Sayapina M.S., Savyolov N.A., Lyubimova N.V. et al. Potential biomarkers for nivolumab therapy of metastatic renal cell carcinoma. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(1):16–27.

Введение

В рандомизированном исследовании III фазы CheckMate-025 было продемонстрировано значительное преимущество препарата из группы моноклональных антител к PD-1 (programmed death protein 1, белок программируемой гибели клеток) ниволумаба над эвरोлимусом относительно медианы общей выживаемости (ОВ) (25 мес против 19,6 мес соответственно) и объективного ответа (25% против 5% соответственно) во 2-й линии при метастатическом почечно-клеточном раке (мПКР), а также его благоприятный токсический профиль [1]. Ранее было показано, что гиперэкспрессия в опухолевой ткани больных мПКР лиганда PD-1 белка PD-L1 ассоциируется с плохим прогнозом [2]. В то же время отсутствие экспрессии не может полностью исключить положительного эффекта от проводимой анти-PD-1-терапии [3]. Недостаточная валидация данного биомаркера может быть обусловлена гетерогенной экспрессией PD-L1 в первичной опухоли и отдаленных метастазах, влиянием предшествующей анти-VEGFR-терапии на экспрессию PD-L1, одиночной экспрессией PD-L2, большей экспрессией PD-L1 в опухолевом микроокружении, чем на опухолевых клетках, отсутствием стандартов пороговых значений экспрессии при проведении иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Гетерогенность молекулярных нарушений в первичной опухоли и отдаленных метастазах также влияет на дискордантность данного биомаркера и ограничивает его использование в клинической практике [4], однако данный маркер может являться прогностическим в оценке ОВ при мПКР. У больных мПКР, получающих в 1-й линии сунитиниб/пазопаниб, гиперэкспрессия PD-L1 достоверно ассоциировалась со снижением показателей ОВ [5]. Таким образом, идентификация надежных иммунологических марке-

ров, предсказывающих чувствительность опухоли к данному методу лечения, способствовала бы повышению его эффективности и более рациональному использованию.

В ряде исследований показано преимущество оценки экспрессии PD-L1 совместно с FOXP3, поскольку PD-L1 способствует дифференцировке нативных CD4⁺T-лимфоцитов в регуляторные CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T-лимфоциты [6–8]. Также в одном из поданализов продемонстрирована динамическая нестабильность экспрессии PD-L1 на фоне лечения. У 26 пациентов, включая 4 больных мПКР, проводили забор материала до лечения и в процессе, и было показано что дисрегуляция (увеличение экспрессии) PD-L1 ассоциировалась с частотой объективного ответа. Это может указывать на адаптивные изменения экспрессии PD-L1 в ответ на лечение и возможность рассмотрения данного маркера в качестве динамического предиктора [9].

В настоящее время проводится изучение растворимых форм PD-L1/(s)PD-1. Продемонстрирована отрицательная прогностическая значимость наличия высокого уровня растворимой формы PD-L1 (sPD-L1) в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Более того, резкое снижение уровня sPD-L1 на фоне лечения ассоциировалось с полным ответом. В отдельных работах приводятся данные о том, что отсутствует прямая связь между sPD-L1 и экспрессией PD-L1 в опухолевой ткани. Данный факт еще раз указывает на то, что помимо опухолевых клеток существуют дополнительные источники синтеза PD-L1 (с помощью матриксных металлопротеиназ) в присутствии провоспалительных факторов [10].

При этом функциональное значение растворимой формы PD-1 (soluble programmed death protein 1, sPD-1) остается не совсем понятным. Описан факт двойного

антагонизма: с одной стороны, sPD-1 функционально блокирует и ингибирует иммунорегуляторный эффект связывания PD-1 на активированных Т-клетках с лигандами, активируя антигенспецифический иммунный ответ [11], с другой — функционирует подобно мембранной форме, демонстрируя иммунную регуляцию за счет обратного сигналинга через PD-L1 и PD-L2 к дендритным клеткам, приобретающим супрессивный фенотип [12].

Возможно, изучение растворимых форм sPD-L1/PD-1 позволит преодолеть опухолевую гетерогенность и идентифицировать наиболее значимые предикторные и прогностические биомаркеры. Интерес представляет изучение концентрации интерлейкина-17А (interleukin-17A, IL-17A) в сыворотке крови, повышение которой отмечено у больных с аутоиммунными заболеваниями, в том числе и нефритами [13, 14], а также трансформирующего фактора роста бета 1 (transforming growth factor beta 1, TGF-β1), являющегося основным иммуносупрессором.

Материалы и методы

Всего в данное исследование за период с 2015 по 2017 г. были включены 23 пациента с мПКР. Дизайн исследования предусматривал, что каждый пациент будет получать ниволумаб в дозе 3 мг/кг внутривенно каждые 2 нед до прогрессирования заболевания или неприемлемой (III–IV степени) токсичности. У всех пациентов до начала лечения и через 2 мес производили забор крови для последующего определения сывороточных маркеров (TGF-β1, IL-17A, sPD-1), а также подбор послеоперационных блоков для ИГХ-определения уровня экспрессии FOXP3 и PD-L1 в опухолевой ткани и на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (tumor infiltrating lymphocytes, TILs). Средний возраст больных составил 62 года (52–69 лет). Среди пациентов преобладали мужчины (78,2 %). У всех пациентов к моменту начала терапии было удовлетворительное соматическое состояние (оценка по шкале ECOG 0–2 балла), а диагноз подтверждался данными гистологического исследования (табл. 1).

Оценку частоты объективных ответов проводили каждые 8 нед в соответствии с критериями irRECIST (Immune-related Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) на основании результатов компьютерной томографии органов грудной клетки и брюшной полости. Токсичность лечения оценивали по международным общепринятым критериям определения вида и степени токсичности в соответствии с руководством NCI CTCAE (National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events) версии 4.03.

Иммуноферментное исследование. Содержание исследуемых белков определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике до лечения и через 2 мес путем центрифугирования крови со скоростью

3000 об/мин при температуре +4 °С в течение 10 мин на центрифуге РС-6 (Дастан, Россия). Сыворотку разливали по 300–400 мкл в 2 пластиковые пробирки и хранили при температуре –80 °С до проведения анализа. Иммуноферментные исследования выполняли с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями производителей. Калибровочные кривые, построенные по результатам анализа коммерческих стандартов в диапазоне сывороточных концентраций 31,25–2000,0 пг/мл для TGF-β1 (Bioscience, США), 0,5–100,0 пг/мл для IL-17A (Bioscience, США), 0,6–750,0 мЕд/мл для эритропоэтина (Beckman, США) и 0,895–1,457 нг/мл для PD-1 (USCN, Китай), имели вид линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации антигенов в пробе.

ИГХ-исследование на PD-L1 и FOXP3. ИГХ-исследование выполнено на срезах опухолевой ткани, приготовленных по стандартной методике. Иммуноокрашивание проведено в полностью автоматическом иммуноштейнере Leica BOND III с использованием предустановленных настроек иммуноштейнера и стандартных реагентов производства Leica Biosystems (Германия). Первичные антитела к PD-L1 (клон SP142 1:100; Spring Bioscience, США) и FOXP3 (клон EP340 1:100; Cell Marque, США) инкубировали в течение 20 мин. Использовали систему детекции Bond Polymer Refine Detection (Leica Microsystems, Германия). Для усиления сигнала использовали DAB Enhancer BOND (Leica Biosystems, Германия). Для PD-L1 оценивали экспрессию в лимфоцитах, инфильтрирующих строму опухоли, а именно процент площади, занимаемой окрашенными лимфоцитами, относительно всей площади инвазивной опухоли. Для FOXP3 оценивали экспрессию в лимфоцитах, инфильтрирующих строму опухоли, путем подсчета среднего числа FOXP3-положительных лимфоцитов в зонах их наибольшего скопления. Оценку проводили в 5 полях зрения при увеличении 40.

Результаты

Эффективность ниволумаба. Эффективность иммунотерапии ниволумабом оценена у 23 пациентов. Полный ответ достигнут у 1 (4,34 %) пациента, частичный — у 4 (17,40 %). Длительная (≥6 мес) стабилизация болезни отмечена в 5 (21,70 %) случаях. Общая частота контроля над заболеванием (полный и частичный ответ + длительная стабилизация) составила 43,40 %. Для всей группы из 23 пациентов медиана выживаемости без прогрессирования (ВБП) от начала иммунотерапии ниволумабом составила 4 мес (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,37–10,04) (рис. 1).

Несмотря на то что 48 % пациентов получали иммунотерапию в 3 и более линиях, в большинстве случаев после прогрессирования удавалось добиться эффекта

Таблица 1. Характеристики больных метастатическим почечно-клеточным раком, получавших терапию ниволумабом в период с 2015 по 2017 г. (n = 23)

Table 1. Characteristics of patients with metastatic renal cell carcinoma who received nivolumab therapy in the period between 2015 and 2017 (n = 23)

| Показатель Characteristic | n | % |
|---|----|------|
| Пол: Sex: | | |
| мужской male | 18 | 78,2 |
| женский female | 5 | 21,8 |
| Морфологический тип рака: Morphological type of cancer: | | |
| светлоклеточный clear cell | 21 | 91,3 |
| несветлоклеточный (папиллярный, неклассифицируемый) non-clear cell (papillary, non-classifiable) | 2 | 8,7 |
| Локализация метастазов: Metastasis location: | | |
| легкие lungs | 21 | 91,3 |
| лимфатические узлы lymph nodes | 15 | 65,2 |
| кости bones | 9 | 39,1 |
| печень liver | 4 | 17,4 |
| надпочечник adrenal gland | 4 | 17,4 |
| центральная нервная система central nervous system | 2 | 8,7 |
| мягкие ткани, поджелудочная железа, яичники soft tissue, pancreas, ovaries | 3 | 13,0 |
| Предшествующая нефрэктомия: Previous nephrectomy: | | |
| радикальная radical | 15 | 65,2 |
| паллиативная palliative | 8 | 34,8 |
| Прогноз по классификации Memorial Sloan Kettering Cancer Center: Prognosis per the Memorial Sloan Kettering Cancer Center classification: | | |
| благоприятный favorable | 7 | 30,4 |
| промежуточный intermediate | 15 | 65,2 |
| неблагоприятный poor | 1 | 4,3 |
| Прогноз по классификации D.Y. Heng: Prognosis per the D.Y. Heng Score: | | |
| благоприятный favorable | 5 | 21,7 |
| промежуточный intermediate | 10 | 43,4 |
| неблагоприятный poor | 8 | 34,7 |
| Число предшествующих линий системной терапии: Number of previous lines of systemic therapy: | | |
| 1 | 12 | 52,2 |
| 2 и более 2 or more | 11 | 47,8 |

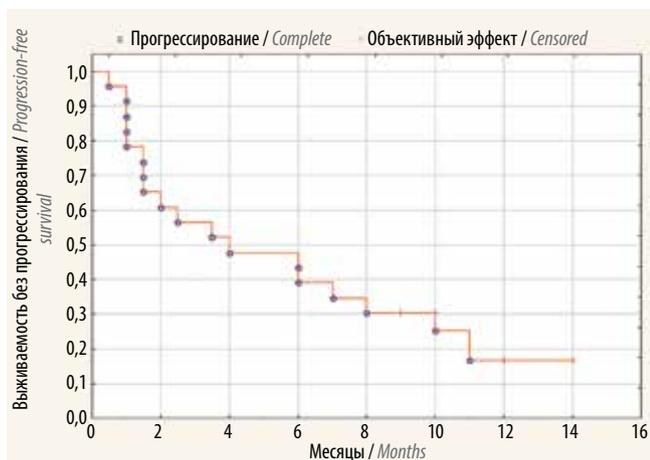


Рис. 1. Выживаемость без прогрессирования заболевания после иммунотерапии ниволумабом
Fig. 1. Progression-free survival after nivolumab immunotherapy

от последующих линий терапии, что отразилось на показателях ОВ (рис. 2). Только у 1 пациента решено было продолжить лечение ниволумабом после зафиксированного прогрессирования согласно критериям irRECIST, при последующем контроле было отмечено дальнейшее увеличение очагов более чем на 10 %, в результате чего пациент был выведен из программы. У 18 из 23 пациентов зафиксировано прогрессирование, из них 55 % больных в последующем получали различные варианты терапии (акситиниб, сунитиниб, пазопаниб, сорафениб, бевацизумаб, эверолимус + ленватиниб).

Медиана ОВ не достигнута. Медиана времени наблюдения составила 10 мес (3–14 мес).

Токсичность терапии ниволумабом. Все пациенты ($n = 23$) были включены в анализ токсичности и переносимости ниволумаба. Наиболее частыми видами негематологической токсичности всех степеней были слабость (21,7 %), бессонница (17,0 %), зуд (13,0 %) и гипотиреоз (13,0 %). Оценку степени гипотиреоза проводили на основании уровней тиреотропного гормона, свободных Т3 (трийодтиронин), Т4 (тетрайодтироксин). Среди других видов негематологической токсичности всех степеней, связанных с приемом ниволумаба, наблюдались сыпь (8,7 %), пневмонит (4,3 %), диарея (4,3 %), аутоиммунный нефрит (4,3 %), аутоиммунный гепатит (4,3 %) и обострение хронической почечной недостаточности (4,3 %). Выраженной гематологической токсичности не отмечено. Осложнения III–IV степени зарегистрированы в 13 % случаев. Все токсические осложнения хорошо контролировались глюкокортикоидными препаратами. Общая частота побочных явлений, связанных с приемом препарата, приведена в табл. 2.

Прогностическое значение клинико-морфологических и иммунологических факторов у больных мПКР при проведении иммунотерапии ниволумабом. При оценке значимости различных клинико-морфологических и иммуноло-

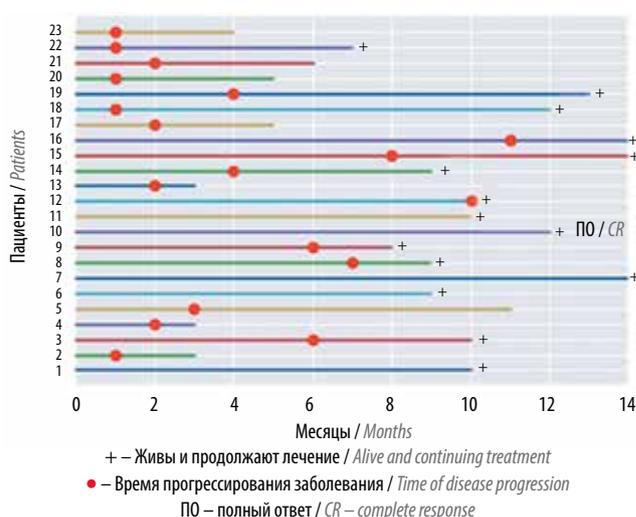


Рис. 2. Выживаемость без прогрессирования заболевания и общая выживаемость больных метастатическим почечно-клеточным раком на фоне иммунотерапии ниволумабом
Fig. 2. Progression-free survival and overall survival of patients with metastatic renal cell carcinoma receiving nivolumab immunotherapy

Таблица 2. Осложнения и токсические реакции на фоне приема ниволумаба ($n = 23$), n (%)

Table 2. Complications and toxic reactions in patients receiving nivolumab ($n = 23$), n (%)

| Осложнение Complication | Любая степень тяжести Any severity grade | III–IV степени тяжести Grade III–IV |
|--|---|--|
| Слабость Fatigue | 5 (21,7) | 0 |
| Бессонница Insomnia | 4 (17,0) | 0 |
| Зуд Pruritus | 3 (13,0) | 0 |
| Гипотиреоз Hypothyroidism | 3 (13,0) | 0 |
| Сыпь Rash | 2 (8,7) | 1 (4,3) |
| Пневмонит Pneumonitis | 1 (4,3) | 0 |
| Диарея Diarrhea | 1 (4,3) | 0 |
| Аутоиммунный нефрит Autoimmune nephritis | 1 (4,3) | 0 |
| Аутоиммунный гепатит Autoimmune hepatitis | 1 (4,3) | 1 (4,3) |
| Острая почечная недостаточность Acute renal failure | 1 (4,3) | 1 (4,3) |

Таблица 3. Эффективность терапии ниволумабом в зависимости от принадлежности больных к прогностической группе (n = 23), n (%)

Table 3. Effectiveness of nivolumab therapy depending on patients' prognostic group (n = 23), n (%)

| Прогноз Prognosis | Определение по критериям Memorial Sloan Kettering Cancer Center Definition per the Memorial Sloan Kettering Cancer Center criteria | | | | Определение по критериям D.Y. Heng Definition per the D.Y. Heng criteria | | | |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| | Полный ответ Complete response | Частичный ответ Partial response | Стабилизация болезни Disease stabilization | Прогрессирование Progression | Полный ответ Complete response | Частичный ответ Partial response | Стабилизация болезни Disease stabilization | Прогрессирование Progression |
| Благоприятный Favorable | 1 (4,3) | 2 (8,7) | 3 (13,0) | 1 (4,3) | — | 2 (8,7) | 2 (8,7) | 1 (4,3) |
| Промежуточный Intermediate | — | 2 (8,7) | 2 (8,7) | 11 (47,8) | — | 2 (8,7) | 3 (13,0) | 5 (21,7) |
| Плохой Poor | — | — | — | 1 (4,3) | — | — | — | 7 (30,4) |
| Всего Total | 1 (4,3) | 4 (17,4) | 5 (21,7) | 13 (56,5) | 1 (4,3) | 4 (17,4) | 5 (21,7) | 13 (56,5) |

гических показателей в прогнозировании эффективности иммунотерапии ниволумабом мы проанализировали их влияние на непосредственную эффективность и ВБП 23 больных, включенных в данное исследование.

Анализ клинических факторов. При анализе эффективности иммунотерапии ниволумабом в зависимости от принадлежности больных к прогностической группе (согласно критериям Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) и D.Y. Heng) контроль над заболеванием был отмечен только в группах благоприятного и промежуточного прогноза (табл. 3).

По результатам однофакторного анализа прогноз больных, оцениваемый по критериям MSKCC, оказы-

вал достоверное влияние на ВБП больных мПКР при проведении иммунотерапии ниволумабом. Медиана ВБП больных с промежуточным и плохим прогнозом составила 2 и 8 мес соответственно ($p = 0,028$) (рис. 3а).

Число предшествующих линий терапии не оказало достоверного влияния на ВБП: в группах пациентов, ранее получивших 1 линию терапии и 2 линии и более, медиана ВБП составила 6 и 3,4 мес соответственно ($p = 0,2$) (рис. 3б).

В дальнейшем был проведен регрессионный анализ, в котором выявлена ассоциация между развитием гипотиреоза и достижением объективного ответа (рис. 4).

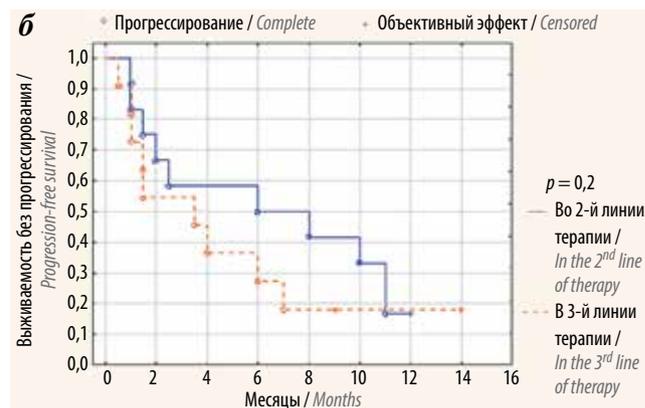


Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования заболевания в зависимости от исходного прогноза по критериям Memorial Sloan Kettering Cancer Center (а) и числа предшествующих линий терапии (б)

Fig. 3. Progression-free survival depending on the baseline prognosis per the Memorial Sloan Kettering Cancer Center criteria (a) and number of previous therapy lines (b)

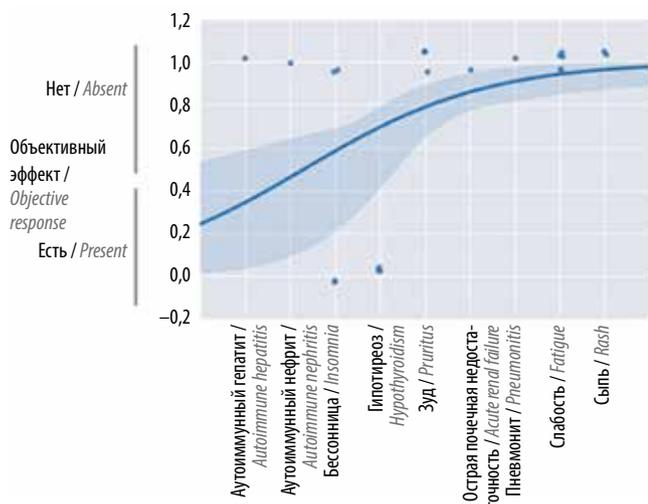


Рис. 4. Взаимосвязь между токсичностью и эффективностью иммунотерапии ниволумабом
Fig. 4. Association between toxicity and effectiveness of nivolumab therapy

Анализ сывороточных факторов. Анализ сывороточных факторов TGF-β1, IL-17A и sPD-1 выполняли у 21, 22 и 23 пациентов с мПКР соответственно до начала иммунотерапии ниволумабом и через 2 мес лечения (рис. 5). На фоне лечения для всей группы больных были отмечены достоверный ($p = 0,03$) прирост медианы уровня IL-17A с $0 \pm 1,37$ до $0,23 \pm 1,90$ пг/мл и тенденция ($p = 0,1$) к увеличению медианы уровня TGF-β1 с $11,8 \pm 10,6$ до $15,35 \pm 10,28$ нг/мл. В то же время для sPD-1 достоверных различий ($p = 0,15$) не выявлено.

В дальнейшем было проведено сравнение исходных значений TGF-β1, IL-17A и sPD-1 в зависимости от эффективности лечения: прогрессирование, включая стабилизацию, и объективный ответ.

Анализ результатов определения TGF-β1 в сыворотке крови пациентов, получающих ниволумаб, по-

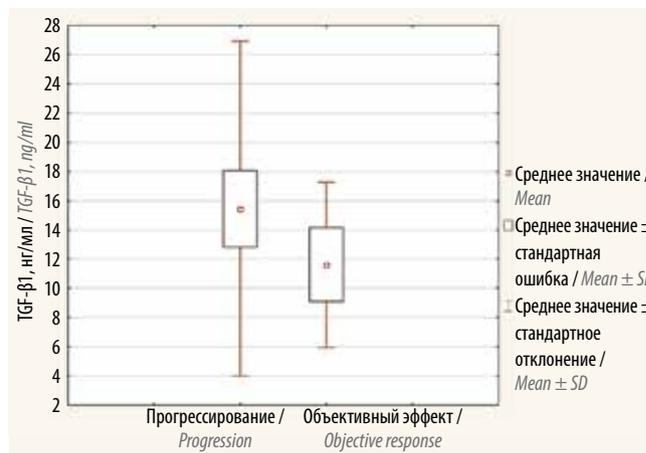
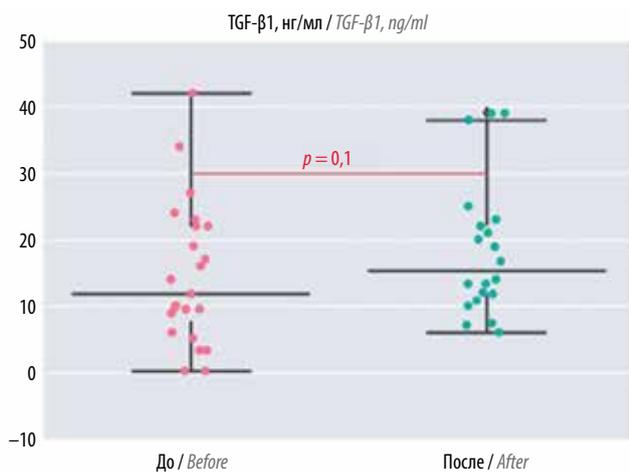


Рис. 6. Уровень TGF-β1 в периферической крови больных метастатическим почечно-клеточным раком с наличием объективного эффекта ($n = 5$) и с прогрессированием (включая стабилизацию) заболевания ($n = 16$) до начала иммунотерапии ниволумабом
Fig. 6. TGF-β1 peripheral blood levels in patients with metastatic renal cell carcinoma and objective response ($n = 5$) or disease progression (including stabilization) ($n = 16$) prior to nivolumab therapy

казал, что исходно повышенное содержание данного фактора до начала иммунотерапии ниволумабом ассоциировалось ($p = 0,34$) с прогрессированием и стабилизацией заболевания на фоне лечения и низкими показателями выживаемости (рис. 6).

Нами также был проведен анализ исходных уровней TGF-β1 в зависимости от зарегистрированного эффекта лечения ниволумабом (табл. 4).

Пороговое значение было рассчитано на основе среднего уровня и 2 стандартных отклонений в подгруппе с благоприятным исходом, что соответствовало 95 % ДИ. Следует отметить, что полученный пороговый уровень (20 нг/мл) превышал рекомендованное к практическому использованию референсное

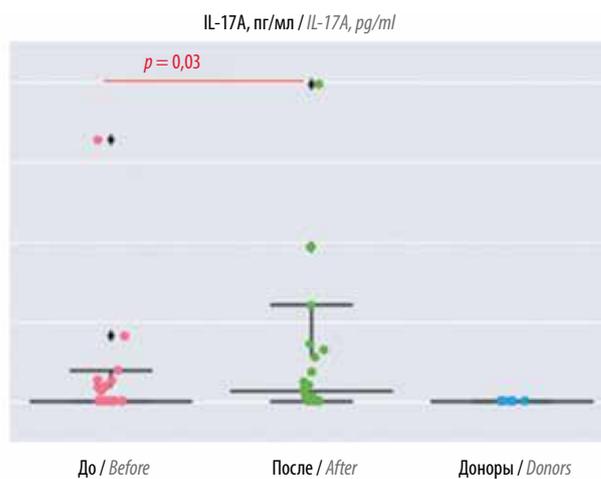


Рис. 5. Уровни TGF-β1 и IL-17A в сыворотке крови 22 больных метастатическим почечно-клеточным раком до начала терапии ниволумабом и через 2 мес лечения
Fig. 5. TGF-β1 and IL-17A serum levels in 22 patients with metastatic renal cell carcinoma prior to nivolumab therapy and after 2 months of treatment

Таблица 4. Уровни TGF-β1 в сыворотке крови пациентов, получавших ниволумаб

Table 4. TGF-β1 serum levels in patients receiving nivolumab

| Эффект Effect | Число пациентов Number of patients | Среднее значение ± стандартное отклонение, нг/мл Mean ± standard deviation, ng/ml | Интервал, нг/мл Range, ng/ml | Медиана (интерквартильный интервал), нг/мл Median (interquartile range), ng/ml |
|--|---------------------------------------|--|---------------------------------|---|
| Прогрессирование (включая стабилизацию) Progression (including stabilization) | 16 | 15,40 ± 11,05 | 3,3–42,0 | 11,8 (9,5–23,5) |
| Объективный ответ Objective response | 5 | 11,60 ± 5,65 | 5,1–17,0 | 14,0 (6,0–16,0) |

значение TGF-β1 (13,75 нг/мл), что позволило использовать рассчитанное нами значение для прогноза эффекта терапии ниволумабом. Уровни TGF-β1 >20 нг/мл были выявлены у пациентов с прогрессированием (включая стабилизацию) на фоне терапии ниволумабом (43,75 %), в то время как в группе с эффектом у всех пациентов уровни TGF-β1 были ниже порогового. Кроме того, исходно повышенный уровень TGF-β1 >20 нг/мл достоверно ($p = 0,03$) ассоциировался с худшими показателями ВБП больных мПКР на фоне терапии ниволумабом (рис. 7). У больных с исходным уровнем TGF-β1 >20 нг/мл медиана ВБП была значительно ниже, чем у больных с исходным уровнем TGF-β1 <20 нг/мл (1,5 мес против 6 мес).

При анализе результатов определения уровня IL-17A в сыворотке крови было показано, что исходные уровни IL-17A в подгруппе с объективным ответом ($0,55 \pm 0,67$ пг/мл) были достоверно выше ($p = 0,0174$), чем в подгруппе с прогрессированием и стабилизацией ($0,09 \pm 0,18$ пг/мл) (рис. 8).



Рис. 7. Влияние исходного уровня TGF-β1 на выживаемость без прогрессирования у больных метастатическим почечно-клеточным раком на фоне терапии ниволумабом
Fig. 7. Effect of baseline TGF-β1 level on progression-free survival in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving nivolumab therapy

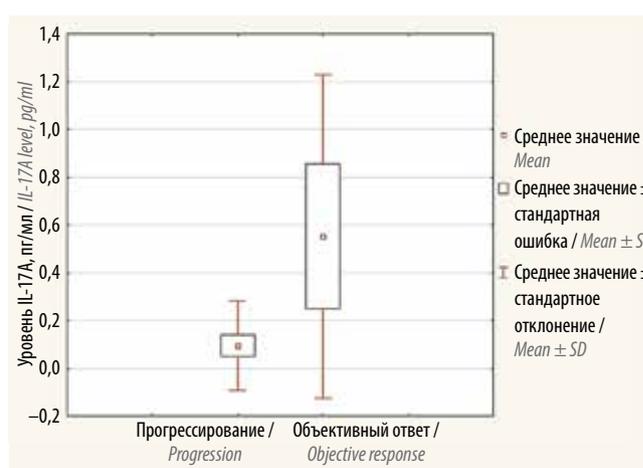


Рис. 8. Уровень IL-17A в периферической крови больных метастатическим почечно-клеточным раком с наличием объективного эффекта и с прогрессированием (включая стабилизацию) заболевания до начала иммунотерапии ниволумабом

Fig. 8. IL-17A level in peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma and objective response or disease progression (including stabilization) prior to nivolumab therapy

Нами был проведен дополнительный анализ исходных уровней IL-17A в зависимости от зарегистрированного эффекта на фоне лечения ниволумабом (табл. 5).

Пороговое значение (0,5 пг/мл) было рассчитано на основе среднего уровня и 2 стандартных отклонений в подгруппе с объективным ответом, что соответствовало 95 % ДИ. Уровни IL-17A >0,5 пг/мл были выявлены у пациентов с ответом на фоне терапии ниволумабом в 40 % случаев, в то время как в группе прогрессирования заболевания уровни IL-17A были ниже порогового в 88,23 % случаев.

На следующем этапе была проведена оценка предикторной значимости растворимой формы рецептора PD-1 в сыворотке крови больных, получавших ниволумаб (рис. 9). Исходное значение концентрации sPD-1 в группе объективного ответа достоверно превышало данный показатель в группе прогрессирования и стабилизации заболевания ($2,38 \pm 4,47$ нг/мл против $0,22 \pm 0,11$ нг/мл; $p = 0,039$).

Таблица 5. Уровни IL-17A в сыворотке крови пациентов, получавших ниволумаб

Table 5. IL-17A serum levels in patients receiving nivolumab

| Эффект Effect | n | Среднее значение ± стандартное отклонение, пг/мл Mean ± standard deviation, pg/ml | Интервал, пг/мл Range, pg/ml | Медиана (интерквартильный интервал), пг/мл Median (interquartile range), pg/ml |
|--|----|--|---------------------------------|---|
| Прогрессирование (включая стабилизацию) Progression (including stabilization) | 17 | 0,090 ± 0,187 | 0–0,52 | 0 (0–0) |
| Объективный ответ Objective response | 5 | 0,550 ± 0,670 | 0–1,62 | 0,37 (0–0,77) |

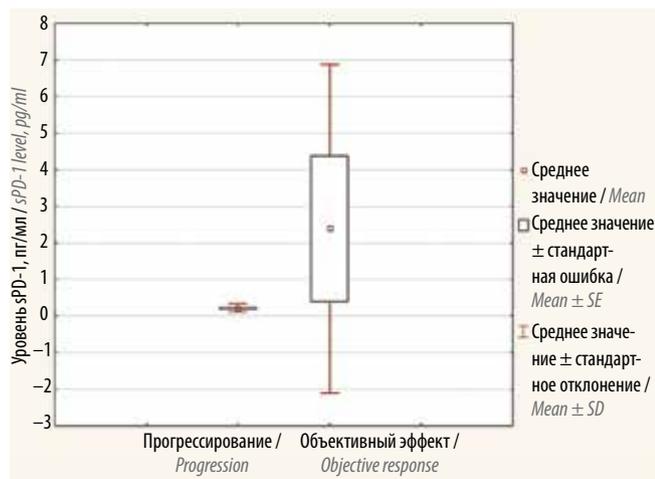
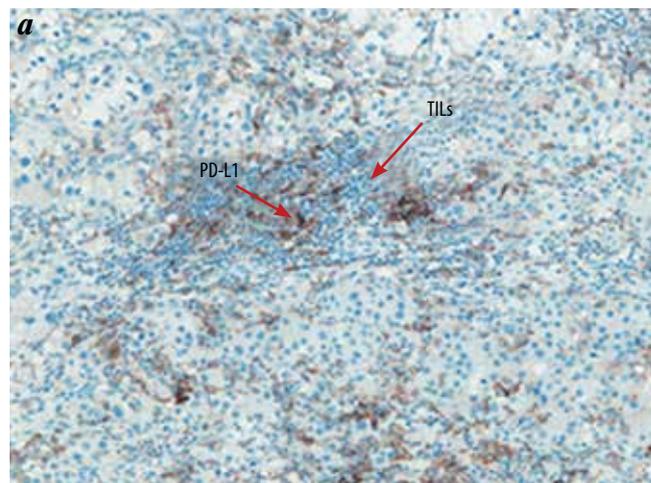


Рис. 9. Уровень sPD-1 в периферической крови больных метастатическим почечно-клеточным раком с наличием объективного эффекта и с прогрессированием (включая стабилизацию) заболевания до начала иммунотерапии ниволумабом

Fig. 9. sPD-1 level in peripheral blood of patients with metastatic renal cell carcinoma and objective response or disease progression (including stabilization) prior to nivolumab therapy



В соответствии с полученным пороговым уровнем (0,45 нг/мл) была подтверждена его предикторная значимость. Так, уровни PD-1 >0,45 нг/мл были выявлены у 40 % пациентов с зарегистрированным объективным ответом на фоне терапии ниволумабом. В подгруппе больных с прогрессированием заболевания на фоне лечения у 88,8 % пациентов уровень PD-1 был ниже порогового значения.

Анализ экспрессии PD-L1 и FOXP3 на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. У 17 (74 %) из 23 пациентов, получавших ниволумаб, была проведена оценка экспрессии PD-L1 и FOXP3 на TILs, полученных до лечения. Медиана времени, прошедшего от забора материала до начала терапии, составила 4 мес (1–15 мес).

На 1-м этапе мы оценили прогностическую значимость вышеназванных маркеров. Анализ данных продемонстрировал отсутствие достоверного влияния экспрессии PD-L1 (рис. 10) и FOXP3 (рис. 11) на ВВП ($p > 0,05$).

Для оценки экспрессии PD-L1 использовали пороговые уровни $\geq 0,5$ и ≥ 1 %, и PD-L1-положительными были признаны соответственно 11 (64 %) и 8 (47 %)

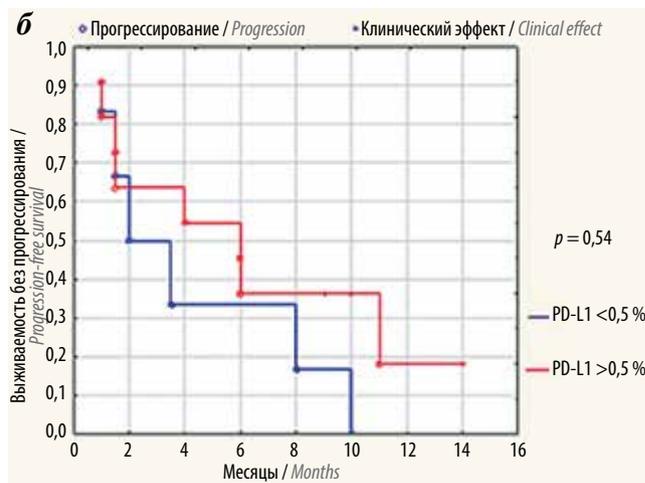


Рис. 10. Экспрессия PD-L1 на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TILs) (а) и ее влияние на выживаемость без прогрессирования заболевания (б)
Fig. 10. PD-L1 expression on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) (a) and its effect on progression-free survival (b)

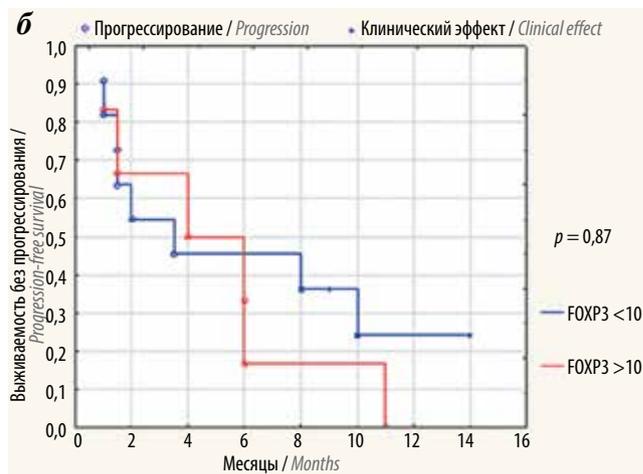
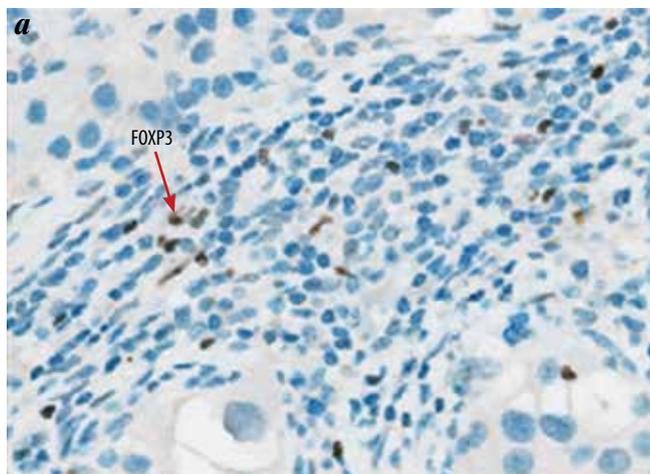


Рис. 11. Экспрессия FOXP3 на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (а) и ее влияние на выживаемость без прогрессирования заболевания (б)
 Fig. 11. FOXP3 expression on tumor-infiltrating lymphocytes (a) and its effect on progression-free survival (б)

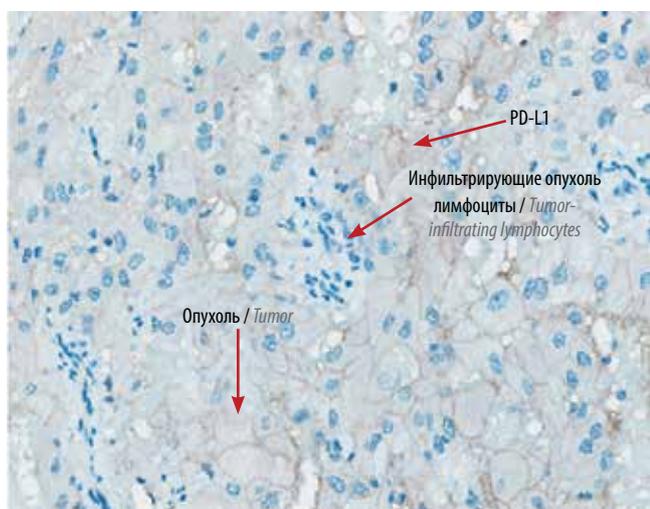


Рис. 12. Гиперэкспрессия PD-L1 (тонкие коричневые мембраны опухолевых клеток) в опухолевой ткани
 Fig. 12. PD-L1 hyperexpression (thin brown membranes of the tumor cells) in tumor tissue

из 17 пациентов. При использовании порогового уровня $\geq 0,5$ % клинический эффект (объективный ответ + длительная стабилизация) был выше в группе PD-L1-положительных пациентов (54,5 % против 33,3 %). Для оценки экспрессии FOXP3 использовали пороговое значение ≥ 10 %, и FOXP3-положительными были признаны 11 (64 %) из 17 пациентов. Клинический эффект отмечен в 45 % случаев среди FOXP3-положительных и в 50 % случаев – среди FOXP3-отрицательных пациентов. Гиперэкспрессия PD-L1 в опухолевой ткани, сопровождающаяся частичным ответом, отмечена только у 1 (5,8 %) пациента (рис. 12).

Таким образом, экспрессия PD-L1 и FOXP3 на TILs не оказывает достоверного влияния на ВВП больных мПКР на фоне иммунотерапии ниволумабом и не несет предикторной значимости.

Обсуждение

Для всей группы из 23 больных частота объективных ответов, определяемая в соответствии с критериями irRECIST, достигла 21,7 %, что соответствует результатам других исследований [1, 15]. Дополнительный анализ продемонстрировал, что такой клинический фактор, как развитие гипотиреоза, в 100 % случаев ассоциировался с наличием объективного ответа. Возможно, это объясняется сопряженностью функций щитовидной железы и тимуса (посредством гормонального воздействия), где вырабатываются нативные Т-лимфоциты. Таким образом, подавление функции щитовидной железы способствует снижению их выработки и повышению эффективности иммунотерапии.

Независимыми факторами, предсказывающими достижение объективного ответа, т. е. сокращение размеров отдаленных метастазов на 30 % и более, явились исходно повышенные уровни IL-17A и sPD-1. Отмечено также благоприятное предикторное значение повышенного уровня sPD-1 (вероятно, за счет функционального блокирования и ингибирования иммунорегуляторного эффекта связывания PD-1 на активированных Т-лимфоцитах с лигандами, активирования антигенспецифического иммунного ответа [11]), в то время как исходно повышенная концентрация иммуносупрессивного фактора TGF- β 1 > 20 нг/мл достоверно ухудшала показатели ВВП. Экспрессия PD-L1 и FOXP3 на TILs не обладает предикторной значимостью и не оказывает достоверного влияния на ВВП больных мПКР на фоне иммунотерапии ниволумабом.

Такой фактор, как принадлежность больных к группе риска (благоприятный, промежуточный или плохой прогноз) согласно критериям MSKCC, не утратил своей прогностической ценности. Значение медианы ВВП больных с благоприятным прогнозом

достоверно превышало значение медианы ВБП больных с промежуточным и плохим прогнозом (8 мес против 2 мес; $p = 0,028$). Таким образом, данная прогностическая шкала в дальнейшем может быть использована при планировании последующих клинических исследований, оценивающих эффективность ингибиторов иммунных контрольных точек или их комбинаций в сравнении с другими лекарственными подходами у больных мПКР. Очевидно также, что больные с плохим прогнозом особенно остро нуждаются в идентификации новых молекулярных мишеней для более эффективной противоопухолевой терапии.

Число предшествующих линий терапии не оказало достоверного влияния на ВБП ($p = 0,2$), что подтверждает возможность использования ниволумаба как в 1-й, так и в последующих линиях. На данный момент проводится целый ряд исследований по изучению неoadъювантного и адъювантного применения ингибиторов иммунных контрольных точек [16].

В то же время необходимо признать, что критерии *irRECIST* и такой показатель, как ВБП, уже не способны в полной мере отразить степень противоопухолевой активности ингибиторов иммунных контрольных точек. Об этом свидетельствуют практически одинаковые значения ВБП пациентов на фоне иммунотерапии ниволумабом и таргетной терапии [1], а также наличие объективных ответов после зарегистрирован-

ного прогрессирования опухолевого процесса. Значение ОВ является более объективным критерием в оценке противоопухолевого эффекта ингибиторов иммунных контрольных точек.

Заключение

Результаты представленного исследования эффективности терапии ниволумабом у больных мПКР показывают его низкую токсичность и хорошую переносимость по сравнению с таргетными препаратами, зарегистрированными ранее. Аутоиммунные осложнения III–IV степени отмечены лишь в 13 % случаев и хорошо контролируются глюкокортикоидными препаратами. Однако у 1 (4,3 %) пациента на фоне терапии было зарегистрировано обострение хронической почечной недостаточности, потребовавшее проведения диализа.

Невысокая частота побочных эффектов позволяет изучать ниволумаб в комбинированных или последовательных/альтернирующих режимах с другими ингибиторами иммунных контрольных точек и таргетными препаратами. Предварительные результаты исследований I–II фаз уже продемонстрировали возможность применения комбинаций ниволумаба и ипилимумаба в редуцированных дозах, атезолизумаба и бевацизумаба, авелумаба и акситиниба, пембролизумаба и акситиниба, а также пембролизумаба и ленаватиниба [16].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Motzer R.J., Escudier B., McDermott D.F. et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2015;373(19):1803–13. DOI: 10.1056/NEJMoa1510665. PMID: 26406148.
- Thompson R.H., Dong H., Kwon E.D. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(2 Pt 2):709–15. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1868. PMID: 17255298.
- Choueiri T.K., Fishman M.N., Escudier B.J. et al. Immunomodulatory activity of nivolumab in previously treated and untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC): biomarker-based results from a randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2014;32(suppl):5012. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.5012.
- Choueiri T.K., Fishman M.N., Escudier B. et al. Immunomodulatory activity of nivolumab in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): association of biomarkers with clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2015;33(suppl):4500. DOI: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.4500.
- Choueiri T.K., Figueroa D.J., Fay A.P. et al. Correlation of PD-L1 tumor expression and treatment outcomes in patients with renal cell carcinoma receiving sunitinib or pazopanib: results from COMPARZ, a randomized controlled trial. *Clin Cancer Res* 2015;21(5):1071–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1993. PMID: 25538263.
- Li Z., Dong P., Ren M. et al. PD-L1 expression is associated with tumor FOXP3⁺ regulatory T-cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. *J Cancer* 2016;7(7):784–93. DOI: 10.7150/jca.14549. PMID: 27162536.
- Hou J., Yu Z., Xiang R. et al. Correlation between infiltration of FOXP3⁺ regulatory T-cells and expression of B7-H1 in the tumor tissues of gastric cancer. *Exp Mol Pathol* 2014;96(3):284–91. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.03.005. PMID: 24657498.
- Geng Y., Wang H., Lu C. et al. Expression of costimulatory molecules B7-H1, B7-H4 and FOXP3⁺-T-regs in gastric cancer and its clinical significance. *Int J Clin Oncol* 2015;20(2):273–81. DOI: 10.1007/s10147-014-0701-7. PMID: 24804867.
- Powderly J.D., Koeppen H., Hodi F.S. et al. Biomarkers and associations with the clinical activity of PD-L1 blockade in a MPDL3280A study. *J Clin Oncol* 2013;31(suppl):3001. DOI: 10.1200/jco.2013.31.15_suppl.3001.
- Rossille D., Gressier M., Damotte D. et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia* 2014;28(12):2367–75. DOI: 10.1038/leu.2014.137. PMID: 24732592.
- Song M.Y., Park S.H., Nam H.J. et al. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8⁺ T-cell responses by soluble PD-1. *J Immunother* 2011;34(3):297–306. DOI: 10.1097/CJI.0b013e318210ed0e. PMID: 21389868.
- Kuipers H., Muskens F., Willart M. et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T-cell activation. *Eur J Immunol*

- 2006;36(9):2472–82. DOI: 10.1002/eji.200635978. PMID: 16917960.
13. Peliçari K.O., Postal M., Sinicato N.A. et al. Serum interleukin-17 levels are associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo)* 2015;70(5):313–7. DOI: 10.6061/clinics/2015(05)01. PMID: 26039945.
14. Waite J.C., Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflamm* 2012;2012:819467. DOI: 10.1155/2012/819467. PMID: 22229105.
15. Motzer R.J., Rini B.I., McDermott D.F. et al. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2015;33(13):1430–7. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.0703. PMID: 25452452.
16. Rini B.I., McDermott D.F., Hammers H. et al. Society for immunotherapy of cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of renal cell carcinoma. *J Immunother Cancer* 2016;4:81. DOI: 10.1186/s40425-016-0180-7. PMID: 27891227.

Вклад авторов

М.С. Саяпина: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Н.А. Савелов: получение данных для анализа;

Н.В. Любимова, Ю.С. Тимофеев: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Д.А. Носов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных.

Authors' contributions

M.S. Sayapina: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

N.A. Savyolov: obtaining data for analysis;

N.V. Lyubimova, Yu.S. Timofeev: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

D.A. Nosov: developing the research design, analysis of the obtained data.

ORCID авторов

М.С. Саяпина: <https://orcid.org/0000-0003-3056-5523>

Н.А. Савелов: <https://orcid.org/0000-0002-4164-2240>

Н.В. Любимова: <https://orcid.org/0000-0003-2579-3468>

Ю.С. Тимофеев: <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>

Д.А. Носов: <https://orcid.org/0000-0001-8415-5197>

ORCID of authors

M.S. Sayapina: <https://orcid.org/0000-0003-3056-5523>

N.A. Savyolov: <https://orcid.org/0000-0002-4164-2240>

N.V. Lyubimova: <https://orcid.org/0000-0003-2579-3468>

Yu.S. Timofeev: <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>

D.A. Nosov: <https://orcid.org/0000-0001-8415-5197>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 03.07.2017. **Принята к публикации:** 18.12.2017.

Article received: 03.07.2017. **Accepted for publication:** 18.12.2017.