

Иммунологические маркеры прогноза ответа на иммунотерапию при немелкоклеточном раке легкого

А.А. Мусаелян^{1,2}, С.В. Лапин¹, М.А. Уртеннова¹, С.В. Одинцова¹, И.В. Чистяков¹, А.М. Улитин¹, Н.Т. Исманбаев¹, А.Л. Акопов¹, С.В. Орлов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»; Россия, 354376 Краснодарский край, Сочи, Адлерский р-н, с. Веселое, ул. Мира, 177

Контакты: Арам Ашотович Мусаелян a.musaelyan8@gmail.com

Введение. Терапия ингибиторами контрольных точек иммунного ответа стала стандартом лечения пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого. Однако, несмотря на выявление в клинической практике экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1, определяющей эффективность терапии, до 80 % пациентов с данной патологией не отвечают на лечение.

Цель исследования – оценить прогностическую роль клинических и иммунологических маркеров при использовании ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в монорежиме в ≥ 2 линиях распространенного немелкоклеточного рака легкого.

Материалы и методы. В исследование включены 45 пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого, получавшие ингибиторы контрольных точек иммунного ответа (1-я группа), а также 30 пациентов с данной патологией, которым проводили в 1-й линии химиотерапию (2-я группа). У всех больных до начала лечения не было аутоиммунных заболеваний. Определение аутоантител, β -2-микроглобулина, неоптерина, интерлейкина 6, интерлейкина 18 и HLA-DRB1 в 1-й группе проводилось через 2 мес после начала терапии, а во 2-й – перед началом очередного цикла химиотерапии.

Результаты. В 1-й группе наличие мутаций *EGFR/ALK* является независимым предиктором низких показателей выживаемости без прогрессирования ($p = 0,018$). В ходе однофакторного анализа было выявлено, что нейтрофильно-лимфоцитарное отношение до начала применения ингибиторов контрольных точек иммунного ответа < 5 ($p = 0,009$) и появление иммуноопосредованных нежелательных явлений ($p = 0,038$) связаны с высокими показателями выживаемости без прогрессирования. В 1-й группе уровень β -2-микроглобулина был ниже при длительности ответа ≥ 6 мес, чем при прогрессировании < 6 мес: 1,7 и 2,9 мг/л соответственно ($p < 0,0001$). У пациентов, получавших ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, с уровнем β -2-микроглобулина $\geq 2,5$ мг/л наблюдаются более низкие показатели выживаемости без прогрессирования, чем у пациентов со значением этого маркера $< 2,5$ мг/л: 168 дней и значение не достигнуто соответственно ($p = 0,017$). При длительности ответа ≥ 6 мес значение неоптерина оказалось ниже, чем при прогрессировании заболевания: 8,6 и 13,4 нмоль/л соответственно ($p < 0,0001$). Показатели выживаемости без прогрессирования были хуже у больных с уровнем неоптерина ≥ 12 нмоль/л, чем у больных с уровнем этого маркера < 12 нмоль/л (медиана 164 дня и значение не достигнуто соответственно; $p = 0,0007$). По результатам многофакторного анализа β -2-микроглобулин $\geq 2,5$ мг/л ($p = 0,006$) и неоптерин ≥ 12 нмоль/л ($p = 0,027$) оказались независимыми предикторами более короткой выживаемости без прогрессирования. Низкие уровни интерлейкина 6 и интерлейкина 18, а также антитела к тиреоидной пероксидазе связаны с ответом ≥ 6 мес. Ген *HLA-DRB1*03* ассоциирован с ответом ≥ 6 мес, а также с более высокими показателями выживаемости без прогрессирования по сравнению с другими аллельными вариантами. Уровни β -2-микроглобулина, неоптерина, интерлейкина 6 и интерлейкина 18 в 1-й группе по сравнению со 2-й группой оказались выше ($p < 0,0001$).

Заключение. Иммунологические маркеры могут служить перспективными прогностическими факторами у пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого при применении ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

Ключевые слова: предиктивные маркеры, иммуноопосредованные нежелательные явления, немелкоклеточный рак легкого, иммунотерапия

Для цитирования: Мусаелян А.А., Лапин С.В., Уртеннова М.А. и др. Иммунологические маркеры прогноза ответа на иммунотерапию при немелкоклеточном раке легкого. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):79–88. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-79-88.

Immunological markers for predicting the response to immunotherapy in non-small cell lung cancer

A.A. Musaelyan^{1,2}, S.V. Lapin¹, M.A. Urtenova¹, S.V. Odintsova¹, I.V. Chistyakov¹, A.M. Ulitin¹, N.T. Ismanbaev¹, A.L. Akopov¹, S.V. Orlov^{1,2}

¹I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University; L'va Tolstogo St., 6–8, Saint Petersburg 197022, Russia;

²Research Institute of Medical Primatology; 177 Mira St., Veseloe village, Sochi, Adler District, Krasnodar Territory 354376, Russia

Contacts: Aram Ashotovich Musaelyan a. musaelyan8@gmail.com

Introduction. Immune checkpoint inhibitors have become the standard of care for patients with advanced non-small cell lung cancer. However, despite the determination of programmed death-ligand 1 expression in clinical practice, which determines the effectiveness of therapy, up to 80 % of patients with non-small cell lung cancer do not respond to treatment.

The study objective – investigation of the prognostic role of clinical and immunological markers during immune checkpoint inhibitor monotherapy in ≥ 2 lines in patients with advanced non-small cell lung cancer.

Materials and methods. The study included 45 patients with advanced non-small cell lung cancer receiving programmed cell death 1 / programmed death-ligand 1 inhibitors in monotherapy in 2 and subsequent lines (Group 1), as well as 30 patients with advanced non-small cell lung cancer receiving first-line chemotherapy (Group 2). All patients from 2 groups did not have autoimmune diseases before starting treatment. The determination of autoantibodies, β -2-microglobulin, neopterin, interleukin 6, interleukin 18 and the allelic variant of HLA-DRB1 in patients in the Group 1 was carried out 2 months after the start of therapy, and in the Group 2 – before the start of the next chemotherapy cycle.

Results. In Group 1, the presence of EGFR/ALK mutations is an independent predictor of shorter progression-free survival ($p = 0.018$). Also, in the univariate analysis, neutrophil-lymphocyte ratio < 5 before immune checkpoint inhibitors ($p = 0.009$) and the appearance of immune-related adverse events ($p = 0.038$) are associated with long-term progression-free survival. In Group 1, β -2-microglobulin was lower in patients with a response duration of ≥ 6 months than with a progression < 6 months: 1.7 mg/L and 2.9 mg/L, respectively ($p < 0.0001$). Patients receiving immune checkpoint inhibitors with a β -2-microglobulin level ≥ 2.5 mg/L have a shorter progression-free survival than patients with a marker value < 2.5 mg/L: 168 days and the value is not reached, respectively ($p = 0.017$). In response duration ≥ 6 months neopterin value was lower than in disease progression: 8.6 nmol/L and 13.4 nmol/L, respectively ($p < 0.0001$). Progression-free survival was lower in patients with neopterin ≥ 12 nmol/L than patients with neopterin < 12 nmol/L: median was 164 days and the value was not reached, respectively ($p = 0.0007$). Based on the results of multivariate analysis, β -2-microglobulin ≥ 2.5 mg/L ($p = 0.006$) and neopterin ≥ 12 nmol/L ($p = 0.027$) were independent predictors of shorter progression-free survival. Low levels of interleukin 6 and interleukin 18, as well as antibodies to thyroperoxidase, are associated with a response of ≥ 6 months. HLA-DRB1*03 was associated with a duration of response of ≥ 6 months, as well as a longer progression-free survival compared with other allelic variants. The levels of β -2-microglobulin, neopterin, interleukin 6, interleukin 18 were higher in patients in Group 1 than in patients in Group 2 ($p < 0.0001$).

Conclusion. Immunological markers can serve as promising prognosis markers in patients with advanced non-small cell lung cancer during immunotherapy.

Key words: predictive markers, immune-related adverse events, non-small cell lung cancer, immunotherapy

For citation: Musaelyan A.A., Lapin S.V., Urtenova M.A. et al. Immunological markers for predicting the response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2022; 9(2):79–88. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-79-88.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунотерапия (ИТ) считается стандартом лечения пациентов с распространенным немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Использование анти-PD-1/PD-L1-антител (PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели; PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели) демонстрирует лучшие противоопухолевый ответ и показатели общей выживаемости (ОВ) по сравнению с классическими стратегиями системной терапии [1]. Однако лишь у 20–30 % пациентов с местно-распространенным и метастатическим НМРЛ наблюдается длительный клинический ответ на это лечение [2]. Таким образом, важной проблемой является отбор пациентов, у которых применение анти-PD-1/PD-L1 антител будет наиболее эффективным, что позволит избежать воз-

никновения нежелательных явлений (НЯ), а также лишних экономических затрат [3]. Однако в связи со сложным характером взаимодействия опухоли и иммунной системы при ИТ отсутствуют специфические предиктивные маркеры.

В настоящее время единственным одобренным маркером ответа на ИТ при распространенном НМРЛ является экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках [4]. Согласно результатам исследования KEYNOTE-024, у пациентов с метастатическим НМРЛ и высоким уровнем экспрессии PD-L1 (≥ 50 %) отмечается увеличение показателей выживаемости без прогрессирования (ВБП) и ОВ при использовании анти-PD-1-антител по сравнению со стандартной химиотерапией [5]. Однако применение PD-L1 в качестве предиктивного маркера остается противоречивым в связи с тем,

что больные с низкой и отрицательной его экспрессией также имеют продолжительный ответ на терапию [6]. Это обусловлено техническими особенностями теста (наличием различных детектируемых платформ и отсутствием стандарта при оценке экспрессии PD-L1), пространственной гетерогенностью опухоли и ее изменчивостью при проведении терапии [7]. Таким образом, необходим поиск новых потенциальных маркеров ответа при НМРЛ. Одним из путей решения этой проблемы является исследование суррогатных маркеров иммунного ответа как одного из ключевых биологических звеньев, определяющих эффективность ИТ.

Было показано, что воспалительные маркеры, такие как нейтрофильно-лимфоцитарное (НЛО) и тромбоцитарно-лимфоцитарное отношение (ТЛО), а также цитокины, в частности интерлейкин 6 (ИЛ-6), являются предикторами эффективности терапии ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ИКТИО) [5]. Мы предположили, что маркеры активации Т-клеточного иммунного ответа, например β -2-микроглобулин (β -2-МГ) и интерлейкин 18 (ИЛ-18), и макрофагов (неоптерин) могут быть использованы в качестве мониторинга ответа на применение ИКТИО. Поскольку в ряде исследований показано, что иммуноопосредованные НЯ служат предикторами ответа на терапию ИКТИО, мы определяли наличие аутоантител, которые являются ранним отражением аутоиммунных реакций, а также изучали наиболее известный ген в мозаике аутоиммунитета — *HLA-DRB1*.

Цель исследования — определение прогностического значения клинико-морфологических и иммунологических параметров при ИТ во 2-й и последующих линиях у пациентов с распространенным НМРЛ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование были включены 45 пациентов с местно-распространенным и метастатическим НМРЛ, получавших во 2-й и последующих линиях анти-PD-1 (пембролизумаб, ниволумаб) или анти-PD-L1-антитела (атезолизумаб), а ранее — платиносодержащую химиотерапию ($n = 40$) или таргетную терапию ингибиторами киназы анапластической лимфомы (anaplastic lymphoma kinase, ALK)/рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) ($n = 5$) (1-я группа). Эти больные были разделены на 2 подгруппы в зависимости от продолжительности ответа на терапию: ответ ≥ 6 мес (случаи с частотой объективных ответов и стабилизацией) ($n = 26$) и прогрессирование заболевания < 6 мес ($n = 19$).

В связи с тем, что до начала ИТ у многих пациентов не определяли большинство иммунологических маркеров, была выделена 2-я группа, в которой оценивали иммунологические параметры при проведении химиотерапии в качестве суррогатной нулевой точки для больных, получающих анти-PD-1/PD-L1-антитела

во 2-й и последующих линиях. Во 2-ю группу вошли 30 больных НМРЛ, получавших платиносодержащий дуплет. Клинико-эпидемиологическая характеристика этих пациентов представлена в табл. 1.

У всех пациентов, включенных в исследование, до начала системного лечения в анамнезе не было аутоиммунных заболеваний. Также до анти-PD-1/PD-L1-терапии у больных исследуемой группы уровень тиреотропного гормона соответствовал референтному значению. У всех пациентов 1-й группы были взяты образцы сыворотки крови для определения иммунологических маркеров через 2 мес от начала анти-PD-1/PD-L1 терапии. Забор крови осуществлялся до начала цикла, а также сразу после окончания введения препарата для изучения уровня цитокинов (рис. 1). С целью определения динамики изменения иммунологических параметров у 16 пациентов 1-й группы дополнительно были взяты образцы периферической крови до ИТ и через 6 мес от начала лечения. У больных 2-й группы забор биоматериала проводили перед очередным циклом химиотерапии.

Во всех группах были определены аутоантитела, ассоциированные с наличием иммуноопосредованных НЯ, развивающихся на фоне приема ИКТИО: антинуклеарный фактор (АНФ), антитела к цитоплазме нейтрофилов класса IgG (АНЦА), экстрагируемым ядерным антигенам, тиреопероксидазе (анти-ТПО), β -2-гликопротеину (анти- β -2-ГП), микросомам печени и почек, митохондриям (АМА), гладким мышцам (АГМА), модифицированному цитруллинированному виментину (анти-MCV), антикардиолипиновые антитела класса IgG и IgM (АКА). Также были исследованы такие воспалительные маркеры, как β -2-МГ, неоптерин, ИЛ-6 и ИЛ-18.

Определение иммунологических маркеров. Исследование иммунологических параметров осуществлялось с помощью иммуноферментного анализа с применением наборов реагентов фирм ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия) (для определения антител к экстрагируемым ядерным антигенам, АКА и анти-MCV); EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Германия) (для определения анти-ТПО, анти- β -2-ГП); IBL International GmbH (Германия) (для определения неоптерина); «Вектор-Бест» (Россия) (для определения ИЛ-6 и ИЛ-18). Антинуклеарный фактор, АНЦА, АМА и АГМА выявляли путем непрямой иммунофлюоресценции с использованием коммерческих тест-систем компании EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Германия). Концентрацию β -2-МГ измеряли с помощью иммунотурбидиметрического исследования с использованием набора Biosystems S.A. (Испания). С учетом того, что на значение этого маркера в крови влияет функция почек, у всех пациентов был определен уровень креатинина до ИТ и через 2 мес после нее.

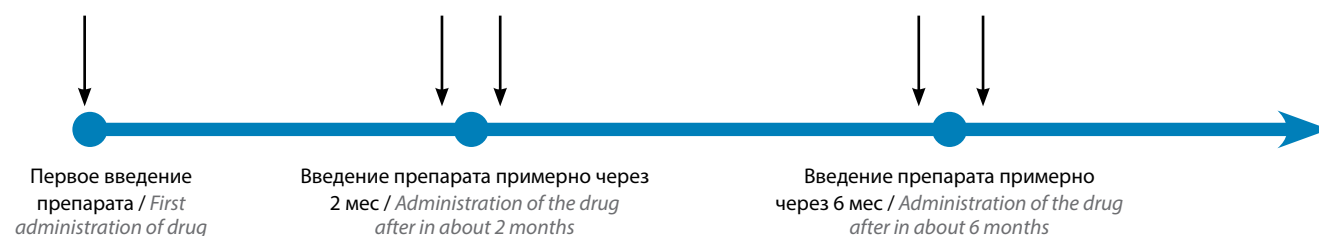
С целью выявления групп аллелей гена *HLA-DRB1* у всех пациентов из лейкоцитов периферической

Таблица 1. Клинико-эпидемиологическая характеристика пациентов, включенных в исследование**Table 1.** Clinico-epidemiological data of patients included in the study

Показатель Parameter	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	<i>p</i>
Пол, абс. (%): Gender, abs. (%): мужской male женский female	30 (66,7) 15 (33,3)	21 (70,0) 9 (30,0)	0,806
Возраст: Age: медиана (интерквартильный размах), лет median (interquartile range), years <60, абс. (%) <60, abs. (%) >60, абс. (%) >60, abs. (%)	62 (59–69) 25 (55,6,0) 30 (44,4,0)	64 (59–70) 12 (40,0) 18 (60,0)	0,655
Гистологический тип, абс. (%): Histological type, abs. (%): плоскоклеточная карцинома squamous cell carcinoma аденокарцинома adenocarcinoma	27 (60,0) 18 (40,0)	18 (60,0) 12 (40,0)	1,0
Стадия заболевания, абс. (%): Stage of disease, abs. (%): местно-распространенный locally advanced метастатический metastatic	9 (20,0) 36 (80,0)	6 (20,0) 24 (80,0)	1,0
Прогрессирование заболевания <6 мес, абс. (%): Disease progression within 6 months, abs. (%): да yes нет no	19 (42,2) 26 (57,8)	17 (56,7) 13 (43,3)	0,220

Иммунотерапия, абс. (%): Immunotherapy, abs. (%): ниволумаб nivolumab пембролизумаб embrolizumab атезолизумаб atezolizumab	12 (26,7) 29 (64,4) 4 (8,9)	—	—
Линия системной терапии, абс. (%): Line of systemic therapy, abs. (%): 2-я 2 nd 3-я 3 rd	36 (80,0) 9 (20,0)	—	—
Терапия в 1-й линии, абс. (%): First-line therapy, abs. (%): химиотерапия chemotherapy ингибиторы ALK ALK inhibitors ингибиторы EGFR EGFR inhibitors	40 (88,9) 3 (6,7) 2 (4,4)	—	—
Мутационный статус, абс. (%): Mutational status, abs. (%): EGFR+ ALK+ EGFR/ALK— нет данных no data	2 (4,4) 3 (6,7) 21 (46,7) 19 (42,2)	—	—
Статус PD-L1 на опухолевых клетках, абс. (%): PD-L1 expression on tumor cells, abs. (%): <1 % 1–49 % >50 %	16 (35,6) 20 (44,4) 9 (20,0)	—	—

Примечание. ALK — киназа анапластической лимфомы; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1.
Note. ALK — anaplastic lymphoma kinase; EGFR — epidermal growth factor receptor; PD-L1 — programmed death ligand-1.

**Рис. 1.** Дизайн взятия образцов периферической крови у пациентов, получающих иммунотерапию. Стрелки указывают на временные точки взятия образцов для исследования**Fig. 1.** Design of peripheral blood sampling from patients receiving immunotherapy. The arrows indicate the time points of sampling for research

крови с помощью набора реагентов ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА («ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией производителя была выделена геномная ДНК. Типирование 13 групп аллелей гена *HLA-DRB1* проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с применением набора *HLA-ДНК-ТЕХ* («ДНК-Технология», Россия). Также были получены данные о НЛО и ТЛО пациентов 1-й и 2-й групп до терапии и через 2 мес от ее начала, которые могут служить потенциальными предиктивными маркерами ответа на анти-PD-1/PD-L1-анти-тела.

Радиологическая оценка ответа на проводимую терапию (с использованием компьютерной томографии) осуществлялась согласно критериям Response evaluation criteria in solid tumors 1.1 (RECIST 1.1). В 1-й и 2-й группах первичными конечными точками при оценке ответа на терапию стали степень ответа и продолжительность лечения >6 мес. Вторичной конечной точкой было определение ВПБ. Медиана наблюдения составила 6,5 мес (интерквартильный размах — 4,8–9,5 мес).

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism (версия 9.3.0; GraphPad Software Inc., США). Точный тест Фишера использовали для сравнения качественных признаков, критерий Шапиро–Уилка — для оценки нормальности распределения количественных показателей для каждой исследуемой группы. Различия количественных признаков между 2 группами определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. Для определения возможности прогнозирования раннего прогрессирования заболевания с помощью исследуемых маркеров, а также оптимальных пороговых значений иммунологических маркеров с целью последующего анализа ВБП применяли ROC-анализ. В 2 подгруппах пациентов с разными показателями иммунологических маркеров для выявления различий в показателях ВБП использовали логарифмический ранговый критерий. Влияние на ВБП клинико-морфологических данных и иммунологических маркеров оценивали с помощью одно- и многофакторного регрессионного анализа Кокса. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-морфологические параметры и ответ на иммунотерапию

В 1-й группе пациенты с длительностью ответа ≥ 6 мес и ранним прогрессированием заболевания (<6 мес) не различались по возрасту, полу, статусу по шкале Восточной кооперативной онкологической группы (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG), статусу курения, индексу массы тела, гистологическому типу опухоли, мутационному статусу и уровню экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках ($p > 0,05$). Взаимосвязи

ответа на проводимую ИТ со значениями НЛО и ТЛО до лечения и через 2 мес от его начала выявлено не было ($p > 0,05$).

Однофакторный регрессионный анализ показал, что отсутствие мутаций в гене *EGFR* или транслокаций *ALK* (отношение рисков (ОР) 5,18; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,75–22,68; $p = 0,045$) и НЛО <5 (ОР 8,02; 95 % ДИ 1,21–32,24; $p = 0,009$) ассоциировано с высокими показателями ВБП (табл. 2). Согласно результатам многофакторного анализа, только наличие мутаций *EGFR/ALK* (ОР 8,13; 95 % ДИ 1,13–64,97; $p = 0,018$) было независимым предиктором более короткой ВБП.

В 1-й группе при применении ИКТИО в 37,8 % случаев развились иммуноопосредованные НЯ. При этом отмены терапии не потребовалось. Во всех случаях отмечалась токсичность I–II степени. У пациентов с НЯ наблюдались такие заболевания, как аутоиммунный тиреоидит ($n = 7$), экзантема ($n = 4$), гепатит ($n = 3$), пульмонит ($n = 2$), колит ($n = 1$). Появление иммуноопосредованных НЯ было взаимосвязано с продолжительностью ответа ≥ 6 мес: НЯ наблюдались в 53,9 % (14/26) случаев ответа ≥ 6 мес и в 15,8 % (3/19) случаев прогрессирования заболевания <6 мес ($p = 0,013$). Однофакторный регрессионный анализ показал, что появление иммуноопосредованных НЯ ассоциировано с более продолжительной ВБП (ОР 2,88; 95 % ДИ 1,10–8,45; $p = 0,038$). Однако в ходе многофакторного анализа этой взаимосвязи обнаружено не было ($p = 0,064$).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ОТВЕТ НА ИММУНОТЕРАПИЮ

Бета-2-микроглобулин. Было показано, что уровни креатинина у пациентов до ИТ и через 2 мес после нее соответствовали референтным значениям. Это свидетельствует об отсутствии влияния снижения почечного клиренса на данный показатель. У пациентов с длительностью ответа на терапию ≥ 6 мес уровень β -2-МГ через 2 мес после лечения оказался значительно ниже, чем у пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес: медиана этого показателя составила 1,7 мг/л (95 % ДИ 1,6–2,3 мг/л) и 2,9 мг/л (95 % ДИ 2,5–3,3 мг/л) соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 2). У 16 пациентов 1-й группы в 2 контрольных точках — через 2 и 6 мес от начала терапии — не наблюдалось различий в уровне β -2-МГ.

Площадь под ROC-кривой (area under curve, AUC) для данного маркера при прогнозировании раннего прогрессирования заболевания составила 0,842 (95 % ДИ 0,722–0,962; $p < 0,0001$). Его оптимальное пороговое значение — 2,5 мг/мл. У пациентов с уровнем β -2-МГ $\geq 2,5$ мг/мл показатели ВБП оказались статистически значимо ниже, чем у пациентов с уровнем этого маркера $<2,5$ мг/мл: медиана составила 168 дней и значение не достигнуто соответственно (ОР 2,8; 95 % ДИ 1,2–6,9; $p = 0,017$) (рис. 3). Также в ходе

Таблица 2. Результаты однофакторного и многофакторного регрессионного анализа клинико-морфологических и иммунологических параметров, связанных с выживаемостью без прогрессирования

Table 2. Results of univariate and multivariate regression analysis of clinical, morphological and immunological parameters associated with progression-free survival

Показатель Parameter	Однофакторный анализ Univariate analysis		Многофакторный анализ Multivariate analysis	
	ОР (95 % ДИ) HR (95 % CI)	<i>p</i>	ОР (95 % ДИ) HR (95 % CI)	<i>p</i>
Возраст (≥ 75 vs < 75 лет) Age (≥ 75 vs < 75 years)	1,41 (0,49–3,20)	0,332	—	—
Пол (мужской vs женский) Gender (male vs female)	1,03 (0,36–2,65)	0,914	—	—
Статус по шкале ECOG (0/1 vs 2/3) ECOG status (0/1 vs 2/3)	1,11 (0,56–2,49)	0,834	—	—
Статус курения (курившие/курящие vs. некурящие) Smoking status (former/current vs never)	1,53 (0,43–4,25)	0,452	—	—
Индекс массы тела (≥ 25 vs < 25 kg/m ²) Body mass index (≥ 25 vs < 25 kg/m ²)	0,85 (0,60–1,45)	0,623	—	—
Гистологический тип (неплоскоклеточный рак vs плоскоклеточный рак) Histological type (non-squamous cell carcinoma vs. squamous cell carcinoma)	0,45 (0,16–1,17)	0,110	—	—
Отсутствие мутаций <i>EGFR/ALK</i> vs наличие мутаций <i>EGFR/ALK</i> None <i>EGFR/ALK</i> mutation vs presence <i>EGFR/ALK</i> mutation	5,18 (0,75–22,68)	0,045	8,13 (1,13–64,97)	0,018
Уровень экспрессии PD-L1 (< 50 vs ≥ 50) PD-L1 expression level (< 50 vs ≥ 50)	0,28 (0,04–0,99)	0,091	—	—
Иммуноопосредованные нежелательные явления (наличие vs отсутствие) Immune-related adverse events (presence vs none)	2,88 (1,10–8,45)	0,038	3,46 (1,01–14,78)	0,064
Нейтрофильно-лимфоцитарное отношение до начала терапии (< 5 vs ≥ 5) Neutrophil-lymphocytic ratio before initiation of therapy (< 5 vs ≥ 5)	8,02 (1,21–32,24)	0,009	8,36 (0,78–91,11)	0,068
Уровень β -2-микроглобулина ($\geq 2,5$ vs $< 2,5$) β -2-microglobulin level ($\geq 2,5$ vs $< 2,5$)	0,27 (0,09–0,69)	0,009	0,13 (0,03–0,40)	0,006
Уровень неоптерина (≥ 12 vs < 12) Neopterin level (≥ 12 vs < 12)	0,23 (0,07–0,64)	0,007	0,35 (0,13–0,87)	0,027
Уровень интерлейкина 6 (≥ 6 vs < 6) Interleukin 6 level (≥ 6 vs < 6)	0,46 (0,18–1,16)	0,091	—	—
Уровень интерлейкина 18 (≥ 273 vs < 273) Interleukin 18 level (≥ 273 vs < 273)	0,23 (0,05–1,06)	0,056	—	—
Антитела к тиреопероксидазе (отсутствие vs наличие) Antibodies to thyroperoxidase (none vs presence)	0,31 (0,05–1,09)	0,118	—	—

Примечание. ОР — отношение рисков; ДИ — доверительный интервал; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; ECOG — Восточная кооперативная онкологическая группа (Eastern Cooperative Oncology Group). Жирным начертанием выделены статистически значимые различия.

Note. HR — hazard ratio; CI — confidence interval; PD-L1 — programmed death ligand-1; ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group. Statistically significant differences are highlighted in bold.

многофакторного регрессионного анализа была выявлена взаимосвязь уровня β -2-МГ $\geq 2,5$ мг/мл и низких показателей ВБП (ОР 0,13; 95 % ДИ 0,03–0,40; $p = 0,006$) (табл. 2).

Неоптерин. У пациентов, у которых длительность ответа составила ≥ 6 мес, медиана уровня неоптерина оказалась статистически значимо ниже, чем у пациентов с прогрессированием заболевания < 6 мес:

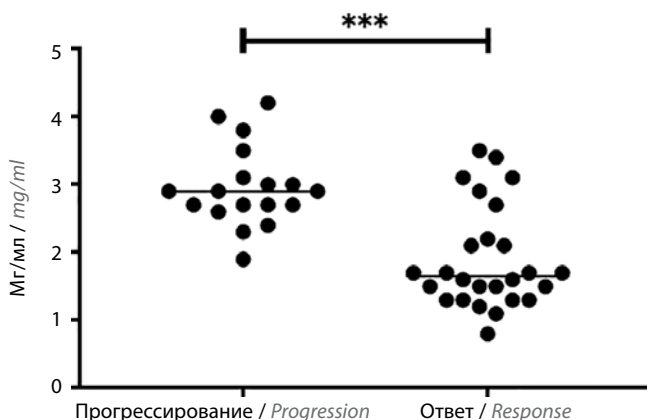
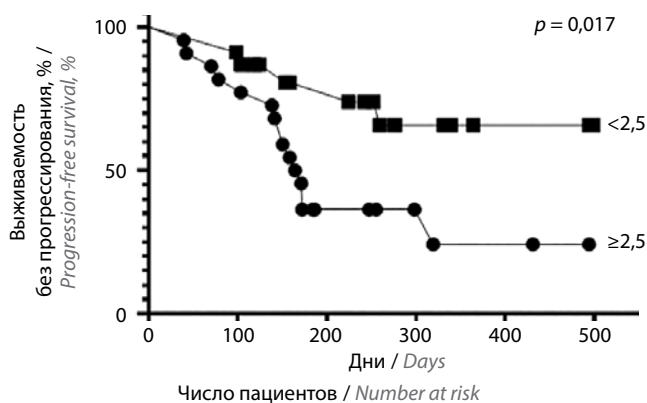


Рис. 2. Сопоставление медианы уровня β-2-микроглобулина у пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес и ответом на иммунотерапию ≥ 6 мес

Fig. 2. Comparison of the median level of β-2-microglobulin in patients with disease progression within 6 months and with a response to immunotherapy ≥ 6 months



Дни/Days

≥ 2,5	17	15	7	4	3	1
< 2,5	28	24	14	7	4	3

Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с уровнем β-2-микроглобулина ≥ 2,5 мг/мл и < 2,5 мг/мл

Fig. 3. Progression-free survival in patients with a level of β-2-microglobulin ≥ 2.5 mg/ml and a level < 2.5 mg/ml. PFS – progression-free survival

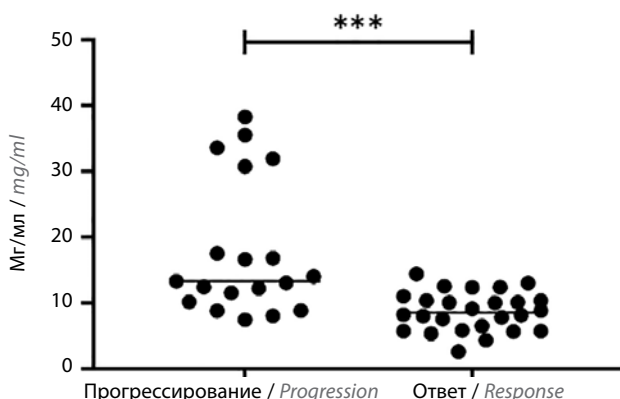


Рис. 4. Сопоставление медианы неоптерина у пациентов с прогрессированием заболевания в течение 6 мес и ответом на иммунотерапию в течение 6 мес

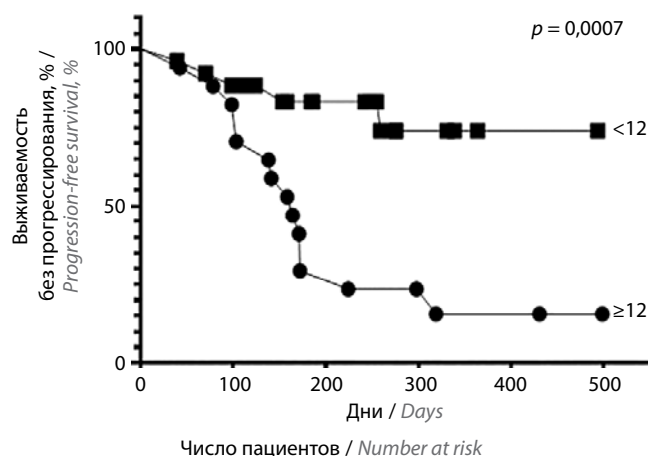
Fig. 4. Comparison of the median of neopterin in patients with disease progression and with a response to immunotherapy within 6 months

8,6 нмоль/л (95 % ДИ 7,6–10,0 нмоль/л) и 13,4 нмоль/л (95 % ДИ 13,0–23,0 нмоль/л) соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 4). У 16 больных не было различий в уровне неоптерина через 2 и 6 мес от начала терапии.

Диагностическая ценность неоптерина при определении раннего прогрессирования заболевания была следующей: AUC составила 0,832 (95 % ДИ 0,711–0,953; $p < 0,0001$). Оптимальный уровень данного маркера равен 12 нмоль/л. У пациентов с уровнем неоптерина ≥ 12 нмоль/л показатели ВБП были статистически значимо ниже, чем у пациентов с уровнем этого маркера < 12 нмоль/л (медиана составила 164 дня и значение не достигнуто соответственно) (ОР 4,8; 95 % ДИ 1,9–12,3; $p = 0,0007$) (рис. 5). Также в ходе многофакторного регрессионного анализа Кокса было выявлено, что значение неоптерина ≥ 12 нмоль/л ассоциировано с более низкими показателями ВБП (ОР 0,35; 95 % ДИ 0,13–0,87; $p = 0,027$) (табл. 2).

Цитокины. У пациентов 1-й группы, у которых отмечалось прогрессирование заболевания < 6 мес, уровень ИЛ-6 через 2 мес после начала терапии оказался выше, чем у пациентов с ответом ≥ 6 мес: медиана составила 14 пг/мл (95 % ДИ 6,0–18,4 пг/мл) и 3,9 пг/мл (95 % ДИ 2,8–5,0 пг/мл) соответственно ($p < 0,0001$) (рис. 6). В свою очередь, у больных с прогрессированием заболевания < 6 мес по сравнению с больными с ответом ≥ 6 мес отмечалась более высокая медиана уровня ИЛ-18: 327,4 пг/мл (95 % ДИ 300,5–405,5 пг/мл) и 233,3 пг/мл (95 % ДИ 198,9–271,8 пг/мл) соответственно ($p = 0,0003$).

Для прогнозирования ранней прогрессии заболевания AUC для ИЛ-6 и ИЛ-18 составила 0,849 (95 % ДИ 0,719–0,978; $p < 0,0001$) и 0,808 (95 % ДИ 0,668–0,948; $p = 0,0005$) соответственно. Оптимальные пороговые значения этих маркеров составили 6 и 273 пг/мл



Дни/Days

≥ 12	17	15	7	4	3	1
< 12	28	24	14	7	4	3

Рис. 5. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с уровнями неоптерина ≥ 12 нмоль/л и < 12 нмоль/л

Fig. 5. Progression-free survival in patients with a level of neopterin ≥ 12 nmol/l and a level < 12 nmol/l

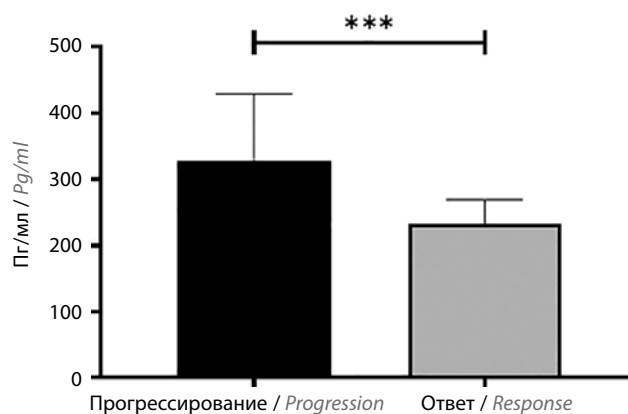
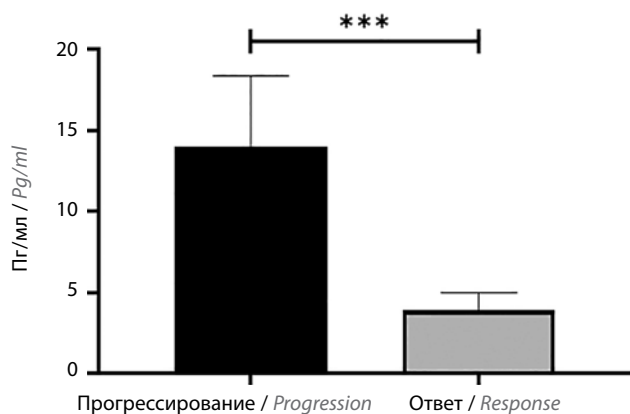


Рис. 6. Уровни интерлейкина 6 (а) и интерлейкина 18 (б) у пациентов с ответом на лечение и прогрессированием заболевания в течение 6 мес
Fig. 6. Interleukin 6 (a) and interleukin 18 (b) levels in patients with response and progression within 6 months

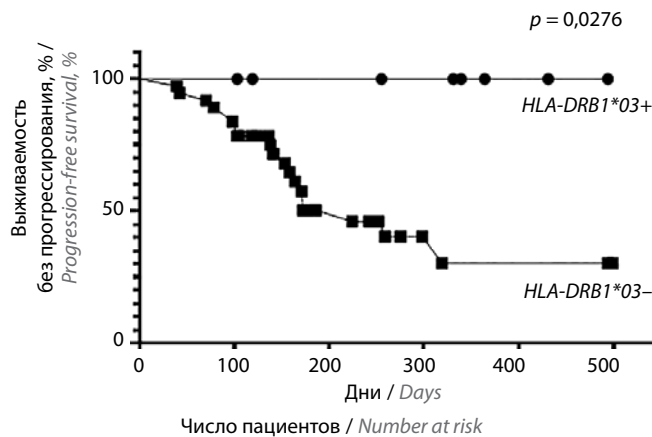
соответственно. Однофакторный регрессионный анализ Кокса не показал статистически значимой взаимосвязи уровней ИЛ-6 ($p = 0,091$), ИЛ-18 ($p = 0,056$) и ВБП.

HLA-DRB1. У пациентов 1-й группы наличие генотипа *HLA-DRB1*03* ассоциировано с длительностью ответа ≥ 6 мес: он наблюдался в 26,9 % (7/26) случаев ответа >6 мес и в 0 % (0/19) при прогрессировании заболевания ($p = 0,016$). У всех больных отмечалась частота объективного ответа: в 6 случаях достигнут частичный ответ, в 1 — полный. У пациентов с наличием аллели *HLA-DRB1*03* показатели ВБП оказались статистически значимо выше, чем у пациентов с другими аллельными вариантами: медиана — значение не достигнуто и 224 дня соответственно (ОР 3,6; 95 % ДИ 1,2–11,2; $p = 0,0276$) (рис. 7). Однако однофакторный регрессионный анализ Кокса не показал взаимосвязи *HLA-DRB1*03* и более длительной ВБП ($p > 0,05$).

Антитела к тиреопероксидазе. Во всех случаях наличия аутоиммунного тиреоидита ($n = 7$) выявлены анти-ТПО (положительное значение в соответствии с инструкцией производителя составляло >50 МЕ/мл). В 1-й группе их наличие ассоциировано с длительностью ответа ≥ 6 мес: они обнаружены в 26,9 % (7/26) случаев при ответе на лечение и в 0 % (0/19) при прогрессировании заболевания ($p = 0,016$). Однако по результатам однофакторного регрессионного анализа взаимосвязи между анти-ТПО и ВБП не обнаружено ($p = 0,118$) (см. табл. 2).

В 1-й группе не было выявлено взаимосвязи длительности ответа на ИТ и наличием исследуемых аутоантител: АНФ, АНЦА, антител к экстрагируемым ядерным антигенам, АКА, анти- β -2-ГП, АМА, АГМА и анти-МСВ.

Определение различий в иммунологических параметрах между 1-й и 2-й группами. Во 2-й группе при проведении химиотерапии не выявлено исследуемых антител (АНФ, АНЦА, антитела к экстрагируемым ядерным антигенам, АКА, анти-ТПО, анти- β -2-ГП, АМА, АГМА, анти-МСВ). Также в данной группе не обнаружено взаимосвязи аллельных вариантов гена *HLA-DRB1* и ответа на химиотерапию.



Дни / Days						
HLA-DRB1*03+	17	15	7	4	3	1
HLA-DRB1*03-	28	24	14	7	4	3

Рис. 7. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с *HLA-DRB1*03* и другими аллельными вариантами
Fig. 7. Progression-free survival in patients with *HLA-DRB1*03* and other allelic variants

У пациентов 1-й группы, получавших ИТ в основном после химиотерапии, и у пациентов 2-й группы, которым назначали платиносодержащий дуплет, выявлено статистически значимое различие уровня β -2-МГ ($p < 0,0001$): медиана данного показателя составила 2,1 мг/л (95 % ДИ 2,0–2,5 мг/л) и 1,1 мг/л (95 % ДИ 1,0–1,2 мг/л) соответственно. У 16 больных 1-й группы медиана уровня β -2-МГ сопоставима с медианой этого маркера во 2-й группе до начала ИТ — 1,2 мг/л (95 % ДИ 1,0–1,4 мг/л).

Также выявлено статистически значимое различие уровня неоптерина в 1-й и 2-й группах: медиана этого показателя составила 9,3 нмоль/л (95 % ДИ 10,0–14,3 нмоль/л) и 6,3 нмоль/л (95 % ДИ 5,7–7,5 нмоль/л) соответственно. До иммунотерапии медиана уровня неоптерина оказалась аналогичной у 16 пациентов 1-й группы и пациентов 2-й группы — 5,9 нмоль/л (95 % ДИ 5,2–6,9 нмоль/л).

У пациентов 1-й группы уровень ИЛ-6 через 2 мес от начала лечения оказался выше, чем у пациентов

2-й группы: медиана составила 5,6 пг/мл (95 % ДИ 5,8–9,7; $n = 19$) и 2,0 пг/мл (95 % ДИ 1,8–2,7 пг/мл) соответственно ($p < 0,0001$). В 1-й группе также отмечалась более высокая медиана уровня ИЛ-18 по сравнению со 2-й группой: 268,7 пг/мл (95 % ДИ 250,9–319,2 пг/мл) и 165,0 пг/мл (95 % ДИ 151,6–181,9 пг/мл) соответственно ($p < 0,0001$). У 16 пациентов 1-й группы до ИТ уровни ИЛ-6 и ИЛ-18 были сопоставимы с этими показателями пациентов 2-й группы (в обоих случаях $p = 1,0$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время ИТ является стандартом лечения пациентов с распространенным НМРЛ. Однако ее низкая эффективность приблизительно у 60 % пациентов обуславливает необходимость поиска новых предиктивных и прогностических маркеров ответа [8]. По результатам оценки клинко-патоморфологических характеристик НМРЛ, в том числе уровня экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках, лишь наличие мутаций *EGFR/ALK* является независимым предиктором более короткой ВБП ($p = 0,018$). Исследование биомаркеров в периферической крови является одним из подходов к решению данной проблемы, преимуществом которого служит малоинвазивный характер забора материала.

Была показана предиктивная роль маркеров хронического воспаления. Однофакторный регрессионный анализ показал, что НЛО ≥ 5 до начала лечения является предиктором более низких показателей ВБП ($p = 0,009$). В нашем исследовании впервые обнаружена прогностическая роль β -2-МГ при использовании анти-PD-1/PD-L1-антител. Этот маркер представляет собой гликозилированный белок, компонент HLA I класса, участвующий в регуляции иммунного ответа [9]. У пациентов с распространенным НМРЛ, получающих ИТ в монорежиме во 2-й и последующих линиях, наличие высокого уровня β -2-МГ (медиана 2,9 мг/л) через 2 мес после начала терапии ассоциировано с ранним прогрессированием заболевания (< 6 мес) ($p < 0,0001$). Также результаты многофакторного регрессионного анализа показали, что β -2-МГ $\geq 2,5$ мг/л является независимым предиктором более короткой ВБП ($p = 0,006$).

При этом не обнаружено влияния на уровень данного маркера платиносодержащей химиотерапии в 1-й линии у пациентов с НМРЛ: его медиана во 2-й группе составила 1,1 мг/л. Схожий показатель был получен у пациентов перед началом ИТ. Для исключения влияния нарушения функции почек как ключевого регулятора катаболизма β -2-МГ у больных 1-й группы определен уровень креатина, который соответствовал референтным значениям. В ряде работ продемонстрирована негативная прогностическая роль β -2-МГ при гематологических неоплазиях [10]. Возможным объяснением данного феномена является то, что высокий уровень данного маркера *in vitro* ингибирует иммунный ответ путем замедления образования функциональных дендритных клеток [10].

Еще одним прогностическим маркером, впервые обнаруженным в ходе работы, является неоптерин. В исследованиях показано, что данный белок представляет собой биомаркер постоянной иммунной стимуляции, что обусловлено нарушением иммунного ответа [11]. Повышение уровня неоптерина связано с негативным прогнозом при различных злокачественных новообразованиях [11]. Было впервые показано статистически значимое увеличение уровня неоптерина при ИТ у пациентов с распространенным НМРЛ ($p < 0,0001$). Также высокий уровень этого белка (медиана – 15,4 нмоль/л) связан с прогрессированием заболевания в течение 6 мес. Показатели ВБП у пациентов с неоптерином ≥ 12 нмоль/л оказались значительно хуже, чем у пациентов с низким уровнем данного маркера ($p = 0,0007$). В ходе многофакторного анализа было выявлено, что уровень неоптерина ≥ 12 нмоль/л является независимым предиктором более короткой ВБП ($p = 0,027$).

Согласно результатам исследования цитокины также являются прогностическими маркерами ответа на ИТ. Высокие уровни ИЛ-6 и ИЛ-18 были ассоциированы с ранним прогрессированием заболевания. При этом не показано влияния предшествующей терапии платиносодержащим дуплетом. Аналогичные данные о взаимосвязи ИЛ-6 и ответа на ИТ получены A. Keegan и соавт. [12].

Появление иммуноопосредованных НЯ I–II степени ассоциировано с длительностью ответа ≥ 6 мес ($p = 0,013$). В ходе однофакторного регрессионного анализа было выявлено, что их наличие связано с более продолжительной ВБП ($p = 0,038$). Согласно результатам метаанализа S. Hussaini и соавт. иммуноопосредованные НЯ являются независимыми предикторами увеличения показателей ВБП и ОВ независимо от типа опухоли [13]. Также наличие антител-ТПО, которое отмечалось у всех пациентов с аутоиммунным тиреоидитом, ассоциировано с длительностью ответа > 6 мес, что сопоставимо с данными, полученными в ходе исследования E. Basak и соавт. [14]. Мы не выявили других аутоантител, которые могут служить предиктивными маркерами ответа на терапию ИКТИО. Также впервые была продемонстрирована предиктивная роль генотипа *HLA-DRB1*03*, который ассоциирован с ответом на терапию ≥ 6 мес. Более того, у пациентов с распространенным НМРЛ, получавших анти-PD-1/PD-L1-терапию в монорежиме во 2-й и последующих линиях, наличие данного аллельного варианта ассоциировано с более высокими показателями ВБП. Однако регрессионный анализ Кокса данную взаимосвязь не показал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунологические маркеры могут служить перспективными прогностическими факторами у пациентов с распространенным НМРЛ при применении ингибиторов контрольных точек иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bai R., Lv Z., Xu D., Cui J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. *Biomark Res* 2020;8:34. DOI: 10.1186/s40364-020-00209-0.
2. Pourmir I., Gazeau B., de Saint Basile H., Fabre E. Biomarkers of resistance to immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: myth or reality? *Cancer Drug Resist* 2020;3:276–86. DOI: 10.20517/cdr.2020.14.
3. Möller M., Turzer S., Schütte W. et al. Blood immune cell biomarkers in patient with lung cancer undergoing treatment with checkpoint blockade. *J Immunother* 2020;43(2):57–66. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000297.
4. Salmaninejad A., Váilou S.F., Shabgah A.G. et al. PD-1/PD-L1 pathway: basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol* 2019;234(10):16824–37. DOI: 10.1002/jcp.28358.
5. Reck M., Rodríguez-Abreu D., Robinson A.G. et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1 – positive non–small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2016;375(19):1823–33. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.
6. Duchemann B., Remon J., Naigeon M. et al. Integrating circulating biomarkers in the immune checkpoint inhibitor treatment in lung cancer. *Cancers (Basel)* 2020;12(12):3625. DOI: 10.3390/cancers12123625.
7. Wang L., Hu Y., Wang S. et al. Biomarkers of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2020;20(5):139. DOI: 10.3892/ol.2020.11999.
8. Prelaj A., Tay R., Ferrara R. et al. Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2019;106:144–59. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.11.002.
9. Zhang H., Cui B., Zhou Y. et al. B2M overexpression correlates with malignancy and immune signatures in human gliomas. *Sci Rep* 2021;11:5045. DOI: 10.1038/s41598-021-84465-6.
10. Xie J., Wang Y., Freeman M.E. et al. β 2-microglobulin as a negative regulator of the immune system: high concentrations of the protein inhibit *in vitro* generation of functional dendritic cells. *Blood* 2003;101(10):4005–12. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3368.
11. Melichar B., Spisarová M., Bartoušková et al. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Ann Transl Med* 2017;5(13):280. DOI: 10.21037/atm.2017.06.29.
12. Keegan A., Ricciuti B., Garden P. et al. Plasma IL-6 changes correlate to PD-1 inhibitor responses in NSCLC. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000678. DOI: 10.1136/jitc-2020-000678.
13. Hussaini S., Chehade R., Boldt R.G. et al. Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors – A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2021;92:102134. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102134.
14. Basak E.A., van der Meer J.W.M., Hurkmans D.P. et al. Overt thyroid dysfunction and anti-thyroid antibodies predict response to anti-PD-1 immunotherapy in cancer patients. *Thyroid* 2020;30(7):966–73. DOI: 10.1089/thy.2019.0726.

Вклад авторов

А.А. Мусаелян: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, оформление иллюстративного материала, статистический анализ, написание текста статьи;
 С.В. Лапин, М.А. Уртеннова, С.В. Одинцова, И.В. Чистяков, А.М. Улитин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, научное редактирование;
 Н.Т. Исманбаев: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 А.Л. Акопов: анализ полученных данных, научное редактирование;
 С.В. Орлов: идея и разработка дизайна, научное редактирование, руководство исследованием.

Authors's contribution

A.A. Musaelyan: development of research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, design of illustrative material, statistical analysis, article writing;
 S.V. Lapin, M.A. Urtenova, S.V. Odintsova, I.V. Chistyakov, A.M. Ulitin: research design development, analysis of the data obtained, scientific editing;
 N.T. Ismanbaev: development of research design, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;
 A.L. Akopov: analysis of the data obtained, scientific editing;
 S.V. Orlov: idea and design development, scientific editing, research management.

ORCID авторов

А.А. Мусаелян / A.A. Musaelyan: <https://orcid.org/0000-0002-7570-2256>
 А.Л. Акопов / A.L. Akopov: <https://orcid.org/0000-0001-8698-7018>
 С.В. Лапин / S.V. Lapin: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>
 С.В. Орлов / S.V. Orlov: <https://orcid.org/0000-0001-6080-8042>

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.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Все пациенты подписали информированное согласие на сбор биологического материала, клинических данных и проведение иммунологических исследований. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study, to the collection of biological material, clinical data and immunological studies. The study was approved by the local Ethics Committee of I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University.

Статья поступила: 01.07.2021. Принята к публикации: 15.02.2022.

Article submitted: 01.07.2021. Accepted for publication: 15.02.2022.