

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-79-91>

# Противоопухолевые эффекты сочетанного действия рекомбинантного циклофилина А человека и ингибиторов контрольных точек иммунитета в экспериментальной модели меланомы B16 *in vivo*

А.А. Калинина, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Анастасия Андреевна Калинина [aakalinina89@gmail.com](mailto:aakalinina89@gmail.com)

**Введение.** Ингибиторы контрольных точек иммунитета занимают особое место среди стратегий иммунотерапии онкологических заболеваний. На сегодняшний день наиболее широкое клиническое применение получили анти-CTLA-4 (CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических лимфоцитов 4) и анти-PD-1/PD-L1-терапия (PD-1 – рецептор программируемой клеточной гибели 1, PD-L1 – лиганд 1 PD-1). Между тем терапия ингибиторами контрольных точек иммунитета не всегда оказывается успешной, и многочисленные исследования указывают на необходимость комбинирования ее с другими подходами иммунотерапии, в том числе с цитокинами. Особый интерес в этом отношении представляет секреторный циклофилин А (ЦФА). Плейотропное иммуностимулирующее действие и противоопухолевый эффект рекомбинантного ЦФА человека (рЦФА) показаны нами ранее. Наши исследования рЦФА как противоопухолевого фактора указывают на перспективность его использования в химио-иммунотерапии и комбинированной иммунотерапии онкологических заболеваний.

**Цель исследования** – оценить противоопухолевые эффекты комбинированной иммунотерапии с использованием рЦФА и ингибиторов контрольных точек иммунитета в модели меланомы B16 *in vivo*.

**Материалы и методы.** Мышам C57BL/6 подкожно прививали клетки меланомы B16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли вводили внутривенно блокирующие моноклональные антитела к PD-1, PD-L1 и лиганду 2 PD-1 (PD-L2), рецептору CTLA-4, белку гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) или молекуле CD276 в дозе 100 мкг/мышь. Рекомбинантный ЦФА человека вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. Терапевтический эффект сочетанной иммунотерапии оценивали по динамике роста меланомы B16 и выживаемости животных-опухоленосителей.

**Результаты.** В комбинации с антителами к CTLA-4 рЦФА проявлял выраженное и продолжительное синергическое противоопухолевое действие до 19-го дня по окончании комбинированной иммунотерапии с увеличением продолжительности жизни экспериментальных животных на 70 %. Рекомбинантный ЦФА человека в сочетании с антителами к LAG-3 оказывал синергический терапевтический эффект до 12-го дня после иммунотерапии. Сочетание рЦФА с антителами к PD-L1 и CD276 имело кратковременный эффект до 5-го дня после терапии. Комбинирование рЦФА с блокаторами PD-1 и LAG-3 отменяло противоопухолевое действие двойной терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о способности рЦФА значительно усиливать терапевтический эффект отдельных ингибиторов контрольных точек иммунитета. Таким образом, рЦФА может быть предложен в качестве потенциального компонента комбинированной противоопухолевой иммунотерапии.

**Ключевые слова:** циклофилин А, ингибитор контрольных точек иммунитета, комбинированная иммунотерапия, меланома B16

**Для цитирования:** Калинина А.А., Казанский Д.Б., Хромых Л.М. Противоопухолевые эффекты сочетанного действия рекомбинантного циклофилина А человека и ингибиторов контрольных точек иммунитета в экспериментальной модели меланомы B16 *in vivo*. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):79–91.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-79-91>

## Anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A combined with immune checkpoint inhibitors in the experimental model of melanoma B16 *in vivo*

A.A. Kalinina, D.B. Kazansky, L.M. Khromykh

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

**Contacts:** Anastasiia Andreevna Kalinina [aakalinina89@gmail.com](mailto:aakalinina89@gmail.com)

**Introduction.** Immune checkpoint inhibitors have an exceptional position in cancer immunotherapy. Currently, anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) and anti-PD-1/PD-L1 (PD-1 – programmed cell death 1, PD-L1 – programmed death 1 ligand 1) therapies are most widely applied in clinical practice. Still, immune checkpoint inhibitors therapy is not always successful, and multiple studies have indicated that it should be combined with other immunotherapeutic strategies, including cytokines. Secreted cyclophilin A (CypA) could be of particular interest in this respect. Previously, we showed that recombinant human CypA (rhCypA) had pleiotropic immunostimulatory activity and anti-tumor effects. Studies of rhCypA as an anti-cancer factor pointed to its potential use in cancer chemoimmunotherapy and combination immunotherapy.

**Aim.** To evaluate anti-tumor effects of combined immunotherapy using rhCypA and immune checkpoint inhibitors in the mouse model of melanoma B16 *in vivo*.

**Materials and methods.** C57BL/6 mice were subcutaneously transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, monoclonal antibodies to PD-1, PD-L1 and programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2), CTLA-4, lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), or CD276 were intravenously injected into mice at a dose of 100 µg/mouse. RhCypA was injected s/c on days 6–10 post-tumor transplantation at a dose of 100 µg/mouse. The therapeutic effects of combined immunotherapy were evaluated by melanoma B16 growth dynamics and the survival of tumor-bearing mice.

**Results.** In combination with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies, rhCypA had the most distinct and prolonged synergic anti-tumor effects until day 19 post-immunotherapy, with an increase in animal lifespan of 70 %. When used with anti-LAG-3 monoclonal antibodies, rhCypA exhibited a synergic therapeutic effect by day 12 post-therapy. Combination of rhCypA with anti-PD-L1 or anti-CD276 monoclonal antibodies had short-term synergic effects until day 5 after therapy. Recombinant human CypA impeded the anti-tumor effects of dual anti-PD-1 + anti-LAG-3 therapy.

**Conclusion.** Our findings pointed out that rhCypA could significantly improve therapeutic effects of individual immune checkpoint inhibitors. Therefore, rhCypA could be potentially proposed as a component of combined anti-tumor immunotherapy.

**Keywords:** cyclophilin A, immune checkpoint inhibitor, combined immunotherapy, melanoma B16

**For citation:** Kalinina A.A., Kazansky D.B., Khromykh L.M. Anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A combined with immune checkpoint inhibitors in the experimental model of melanoma B16 *in vivo*. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(3):79–91. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-79-91>

### ВВЕДЕНИЕ

Развитие иммунотерапии, направленной на коррекцию иммунного статуса пациента и рестимуляцию противоопухолевых иммунных ответов, произвело революцию в лечении онкологических заболеваний [1–3]. Среди различных подходов к иммунотерапии ингибиторы контрольных точек иммунитета (immune checkpoint inhibitors, ICIs) занимают особое место [2].

Рецептор программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), гликопротеин цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4), белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3), Т-клеточный иммуноглобулин и муциновый домен 3 (TIM3) и другие молекулы являются ключевыми контрольными точками иммунитета и играют большую роль в развитии иммунного ответа, регулируя активацию, пролиферацию и функциональную активность Т-лимфоцитов и естественных киллеров (NK-клеток) [1, 2, 4–6]. В микроокружении опухоли Т- и NK-клетки зачастую имеют фенотип функционального истощения [1, 4–6], который характеризуется высоким уровнем экспрессии

этих и некоторых других ингибиторных молекул [2, 6]. Вследствие этого Т-лимфоциты и NK-клетки не могут реализовывать свои эффекторные функции и вовлекаться в цитотоксический противоопухолевый ответ. Кроме того, компоненты опухолевого микроокружения экспрессируют ряд ингибиторных молекул (например, лиганды 1 и 2 PD-1 (PD-L1/PD-L2)), которые участвуют в негативной регуляции иммунного ответа [1, 4, 6]. Ингибиторы контрольных точек иммунитета отменяют механизмы индукции анергии Т-лимфоцитов и NK-клеток, восстанавливая и поддерживая их функциональную активность в супрессорном опухолевом микроокружении и стимулируя развитие противоопухолевых ответов [2, 6].

В настоящее время ICI-терапия, в частности с использованием анти-PD-1/PD-L1- и анти-CTLA-4-моноклональных антител (Mat), широко внедрена в клиническую практику, и ее эффективность подтверждена при многих типах опухолей, в том числе меланоме [1, 2, 7]. Однако анти-CTLA-4-терапия дает хорошие результаты

всего у 15–20 % больных меланомой [8], а у 60–70 % пациентов с различными типами рака не наблюдается ответ на блокирование PD-1/PD-L1 [9, 10]. Между тем экспериментальные данные свидетельствуют о синергическом эффекте комбинации нескольких ICIs в силу одновременного блокирования различных супрессорных путей в Т-клетках [11–13]. Так, сочетание блокирующих анти-PD-1- и анти-LAG-3-Мат недавно было клинически одобрено для терапии меланомы IV стадии [14].

Стоит особо отметить, что ICI-терапия может быть успешной только в отношении так называемых иммунологически «горячих» опухолей, в определенной степени инфильтрированных НК-клетками и Т-лимфоцитами [2, 15]. Между тем ICI-терапия «холодных» опухолей оказывается неэффективной в связи с практически полным отсутствием данных эффекторов иммунитета и низким уровнем экспрессии, в частности PD-1/PD-L1 в микроокружении опухоли [2, 15].

Результаты актуальных исследований указывают на необходимость сочетания использования ICIs с другими терапевтическими подходами [1, 2, 7, 15, 16]. Широкий спектр иммунорегуляторных цитокинов (интерлейкины (ИЛ) 2, 12, 15, интерфероны (ИФН)  $\alpha$  и  $\gamma$ ), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) потенциально можно использовать в комбинированной противоопухолевой иммунотерапии для повышения эффективности ICIs [17]. Данные провоспалительные цитокины стимулируют антигенное примирование Т-клеток, усиливают инфильтрацию опухоли эффекторными иммунными клетками и повышают их цитотоксические функции. Однако их применение в клинической практике весьма ограничено и сопряжено с развитием тяжелых побочных эффектов. В настоящее время только ИФН- $\alpha$  и ИЛ-2 одобрены для клинического использования и включены в протоколы лечения опухолей ряда нозологий [17]. Таким образом, остро стоит проблема поиска новых эффективных и более безопасных подходов цитокиновой иммунотерапии для возможности их комбинирования с ICIs.

Особый интерес в этом отношении может представлять секреторный провоспалительный циклофилин А (ЦФА), который обладает плейотропным иммунорегуляторным действием. Он стимулирует созревание и функционирование дендритных клеток [18], опосредуя таким образом развитие адаптивного иммунного ответа. Секреторный ЦФА также участвует в формировании очага воспаления [19] и регулирует продукцию и функции других хемокинов и провоспалительных факторов [20]. Ранее мы показали, что рекомбинантный ЦФА человека (рЦФА) обладает противоопухолевой активностью и способен подавлять рост и метастазирование опухолей различного гистогенеза [21] посредством активации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета [22], а также усиления эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток [23].

Результаты наших исследований рЦФА как противоопухолевого фактора и иммуностимулятора указывают на потенциальную перспективность его использования в комбинированной химио-иммунотерапии и в качестве компонента иммунотерапии для усиления эффективности адаптивной Т-клеточной терапии [23].

**Цель исследования** – оценить противоопухолевые эффекты комбинированной иммунотерапии с использованием рЦФА и ингибиторов PD-1, CTLA-4, LAG-3, PD-L1, PD-L2 и CD276 в модели меланомы B16 *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Самок мышей линии C57BL/6 (18–20 г, 6–8-недельного возраста) получали из экспериментально-биологической лаборатории научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Экспериментальные группы состояли из 4–16 животных.

**Клеточные линии, прививка опухоли.** Клетки переливаемой меланомы B16 мыши получены из коллекции Национального медицинского исследовательского центра онкологии. Меланому B16 выращивали *in vitro* в среде DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), обогащенной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США); 0,01 мг/мл ципрофлоксацина (KRKA, Словения) и 20 мМ NEPES (ООО «ПанЭко»), при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> до 70–80 % монослоя. Жизнеспособные клетки B16 подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева и вводили подкожно мышам C57BL/6 в дозе  $3 \times 10^5$  клеток/мышь в область правой лопатки в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS).

**Схема введения рекомбинантного циклофилина А человека.** Рекомбинантный ЦФА человека получали, как описано ранее [24]. Для его изучения как самостоятельного противоопухолевого фактора исследуемый белок вводили подкожно в дозе 100 мкг/мышь на 3–7-й дни после прививки меланомы B16. Контрольным животным без терапии аналогично вводили PBS.

**Выделение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.** На 10-й день по окончании рЦФА-монотерапии (17-й день после прививки опухоли) мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации и извлекали подкожные опухолевые узлы меланомы B16. Опухолевую ткань механически гомогенизировали до одноклеточной суспензии в 10 мл среды RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия). Полученную суспензию клеток наслаивали на раствор фикола (плотностью 1,09 г/см<sup>3</sup>) (ООО «ПанЭко») (1:1 по объему) и центрифугировали при 200g 20 мин при 22 °С. Затем отбирали клетки в интерфазе и дважды промывали бессывороточной средой RPMI-1640 при 200g 5 мин при 4 °С. Выделенные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ) ресуспендировали в PBS и использовали для цитофлуориметрического анализа.

**Цитофлуориметрический анализ.** В работе использовали флуоресцентно меченные моноклональные антитела: анти-CD3/FITC (клон 145-2C11), анти-CD8/Pacific blue (клон 53-6.7), анти-CD4/APC (клон RM4-5), анти-CTLA-4/PE (клон UC10-4F10-11) и анти-LAG-3/PE (клон C9B7W) фирмы BD Pharmingen (США), а также анти-PD-1/PE-Cy7 (клон J43) фирмы eBioscience (США). Пробы клеток ОИЛ ( $5 \times 10^5$ ) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) (10 мин при 4 °С) и окрашивали флуоресцентно мечеными антителами (40 мин при 4 °С). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience, США) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience, США). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A. Для окрашивания мертвых клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain (Invitrogen, США). Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain и по показателям светорассеяния. Экспрессию поверхностных маркеров оценивали в популяции живых одиночных лейкоцитов. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., США).

**Блокирующие моноклональные антитела.** В работе использовали блокирующие Mat фирмы Bioxcell (США): анти-PD-L1 (клон 10F.9G2), анти-PD-L2 (клон TY25), анти-CD276 (клон MJ18), анти-PD-1 (клон J43), анти-CTLA-4 (клон 9D9) и анти-LAG-3 (клон C9B7W).

**Схемы комбинированной иммунотерапии.** Для проведения комбинированной иммунотерапии меланомы B16 с использованием рЧЦФА и ICIs были сформированы следующие экспериментальные группы: 1) анти-CTLA-4; 2) анти-CTLA-4 + рЧЦФА; 3) анти-LAG-3; 4) анти-LAG-3 + рЧЦФА; 5) анти-PD-1 + анти-LAG-3; 6) анти-PD-1 + анти-LAG-3 + рЧЦФА; 7) анти-PD-L1; 8) анти-PD-L1 + рЧЦФА; 9) анти-CD276; 10) анти-CD276 + рЧЦФА; 11) анти-CD276 + анти-PD-L2; 12) анти-CD276 + анти-PD-L2 + рЧЦФА. Моноклональные антитела вводили внутривенно в дозе 100 мкг/мышь на 6-й и 9-й дни после прививки опухоли, рекомбинантный ЦФА человека – подкожно в дозе 100 мкг/мышь на 6–10-й дни после прививки меланомы B16. В качестве контроля животным аналогично вводили только соответствующие Mat или рЧЦФА. Контрольным мышам без терапии подкожно вводили 200 мкл PBS по схеме, аналогичной введению рЧЦФА.

**Оценка противоопухолевого эффекта терапии *in vivo*.** Для оценки противоопухолевого эффекта терапии использовали показатели торможения роста опухоли (ТРО, %) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %) животных-опухоленосителей. Торможение роста опухоли рассчитывали по формуле:

$$\text{ТРО} = \left( \frac{V_{\text{PBS}} - V_{\text{терапия}}}{V_{\text{PBS}}} \right) \times 100 / V_{\text{PBS}},$$

где  $V_{\text{PBS}}$  – средний объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) в контрольной группе (без терапии);  $V_{\text{терапия}}$  – средний объем опухоли в группе терапии.

Объем опухоли рассчитывали как произведение трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла, измеренных с помощью штангенциркуля.

Увеличение продолжительности жизни рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ} = \left( \frac{\text{СПЖ}_{\text{терапия}} - \text{СПЖ}_{\text{PBS}}}{\text{СПЖ}_{\text{PBS}}} \right) \times 100 / \text{СПЖ}_{\text{PBS}},$$

где  $\text{СПЖ}_{\text{PBS}}$  – средняя продолжительность жизни (дни) мышей-опухоленосителей в контрольной группе (без терапии);  $\text{СПЖ}_{\text{терапия}}$  – средняя продолжительность жизни мышей-опухоленосителей в группе терапии.

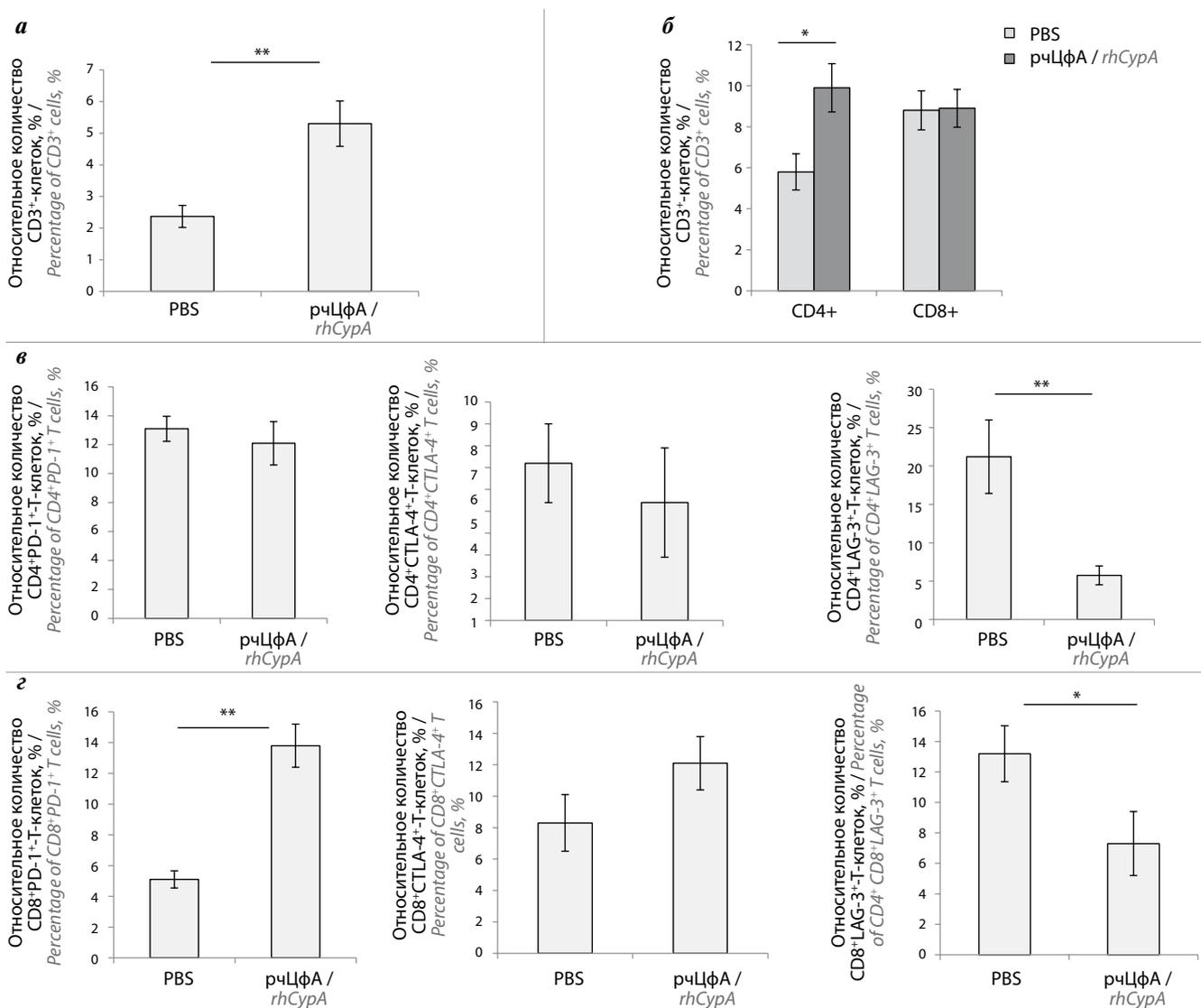
При оценке СПЖ проводили ежедневный мониторинг состояния экспериментальных животных, отмечая заметное сокращение потребления корма, низкую подвижность, вялость, некротические язвы в опухолевых узлах, для исключения мышей с поведенческими или клиническими изменениями. Летаргических мышей-опухоленосителей выводили из эксперимента, и день эвтаназии считали днем гибели животного. Противоопухолевое действие комбинированной иммунотерапии признавали значимым при ТРО  $\geq 50\%$  в течение не менее 7 дней по окончании терапии или УПЖ  $\geq 25\%$  [25].

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Предварительно осуществляли проверку нормальности распределения выборок с использованием теста Колмогорова–Смирнова для подтверждения корректности использования *t*-критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Анализ экспрессии маркеров PD-1, CTLA-4 и LAG-3 на Т-лимфоцитах, инфильтрирующих меланому B16 под действием рекомбинантного циклофилина А человека.** Ранее мы показали, что рЧЦФА значительно подавляет рост меланомы B16 *in vivo* при воздействии на ранних этапах ее формирования [21]. Для выяснения механизмов реализации противоопухолевого эффекта рЧЦФА и оценки перспективности его использования в комбинации с ICIs для иммунотерапии меланомы B16 был проведен анализ Т-клеток в микроокружении данной опухоли по окончании рЧЦФА-монотерапии (рис. 1).

Результаты исследования показали, что под действием рЧЦФА в инфильтрате меланомы B16 наблюдалось усиленное накопление Т-клеток, доля которых в составе ОИЛ была в 2,2 раза выше по сравнению с контрольной группой (PBS) (рис. 1, а). При этом в образцах ОИЛ в группе рЧЦФА-монотерапии в 1,7 раза возросло относительное количество CD4<sup>+</sup>-Т-клеток по сравнению с контролем (рис. 1, б) без значимых изменений в относительном количестве CD8<sup>+</sup>-Т-клеток



**Рис. 1.** Влияние рекомбинантного циклофилина А человека (рЦЦФА) на экспрессию рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), гликопротеина цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) и белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) в Т-клетках, инфильтрирующих меланому В16: относительное количество (%) CD3<sup>+</sup>-Т-клеток (а), CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (б); PD-1<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup> и LAG-3<sup>+</sup>-клеток в популяции CD4<sup>+</sup>- (в) и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (г). Мышам C57BL/6 прививали подкожно меланому В16. На 3–7-й дни после прививки подкожно вводили рЦЦФА в дозе 100 мкг/мышь. На 17-й день после прививки меланомы (10-й день по окончании рЦЦФА-монотерапии) выделяли опухоль-инфильтрирующие лимфоциты и анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 6–16). \*p ≤ 0,05. \*\*p ≤ 0,01 (непарный t-критерий Стьюдента). PBS – фосфатно-солевой буфер

**Fig. 1.** Effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) on the expression of programmed cell death 1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) in T cells in the melanoma B16 tumor infiltrate: the relative count (%) of CD3<sup>+</sup> T cells (a), CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (б), PD-1<sup>+</sup>, CTLA-4<sup>+</sup>, and LAG-3<sup>+</sup> cells in the population of CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes (в) and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes (г). C57BL/6 mice were transplanted subcutaneously with melanoma B16. On days 3–7 post-tumor transplantation, rhCypA was injected subcutaneously at the dose of 100 μg/mouse. On day 17 post-tumor transplantation (day 10 after rhCypA-monotheapy), tumor-infiltrating lymphocytes were recovered and analyzed by flow cytometry. Data were obtained in three independent experiments and shown as mean ± standard error of the mean (n = 6–16). \*p ≤ 0,05. \*\*p ≤ 0,01 (unpaired Student's t-test). PBS – phosphate-buffered saline

(рис. 1, в), что указывает на снижение доли двойных негативных CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-клеток в опухолевом инфильтрате меланомы В16 под действием рЦЦФА.

Анализ экспрессии PD-1 показал, что под действием рЦЦФА доля CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>-Т-клеток в составе ОИЛ не изменилась по сравнению с контролем (PBS) (рис. 1, г). При этом в группе рЦЦФА-монотерапии относительное количество CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов среди ОИЛ было больше в 2,7 раза по сравнению с контрольной группой

(PBS) (рис. 1, д). Стоит особо отметить, что уровень экспрессии PD-1 в CD8<sup>+</sup>-Т-клетках был сопоставим в группах контроля и рЦЦФА-монотерапии и в 4,1 раза превышал уровень экспрессии в CD4<sup>+</sup>-Т-клетках (табл. 1). Это может указывать на большую чувствительность CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов к супрессорному микроокружению опухоли и анти-PD-1-PD-L1/PD-L2-терапии.

Доля CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>-Т-клеток в инфильтрате опухоли была сопоставима в обеих экс-

**Таблица 1.** Уровень экспрессии рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), гликопротеина цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) и белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) в Т-клетках, инфильтрирующих меланому В16, после курсового введения рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦФА)

**Table 1.** The expression level of programmed cell death 1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), and lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) in T cells in the melanoma B16 infiltrate after the course recombinant human cyclophilin A injection (rhCypA)

Маркер Marker	Контроль (PBS) Control (PBS)		РчЦФА rhCypA	
	CD4 <sup>+</sup> -Т-клетки CD4 <sup>+</sup> T cells	CD8 <sup>+</sup> -Т-клетки CD8 <sup>+</sup> T cells	CD4 <sup>+</sup> -Т-клетки CD4 <sup>+</sup> T cells	CD8 <sup>+</sup> -Т-клетки CD8 <sup>+</sup> T cells
PD-1	550,4 ± 67,5	2285 ± 118,6	486,7 ± 59,7	2295 ± 166,7
CTLA-4	198 ± 17,6	202 ± 19,2	284 ± 48,1	228 ± 21,8
LAG-3	409,4 ± 51,6	345,5 ± 56,9	179,3 ± 24,5*	244,6 ± 45,1

\* $p \leq 0,01$  при сравнении с контрольной группой (PBS) (непарный *t*-критерий Стьюдента).

**Примечание.** Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ( $n = 6-9$ ). PBS – фосфатно-солевой буфер.

\* $p \leq 0.01$  compared to the control group (PBS) (unpaired Student's *t*-test).

**Note.** Data were obtained in three independent experiments and shown as mean ± standard error of the mean ( $n = 6-9$ ). PBS – phosphate-buffered saline.

периментальных группах и составила 5–7 % (см. рис. 1, *а*) и 8–12 % (см. рис. 1, *б*) соответственно. Курсовое введение рчЦФА также не оказало влияния на уровень экспрессии данного маркера, который был одинаковым в CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетках (см. табл. 1).

Стоит особо отметить, что под действием рчЦФА в микроокружении меланомы В16 снизилось относительное количество Т-клеток, экспрессирующих маркер истощения LAG-3 (см. рис. 1, *б*). В популяции CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов доля LAG-3<sup>+</sup>-клеток в группе рчЦФА-монотерапии была в 3,6 раза ниже по сравнению с контролем (PBS) (см. рис. 1, *б*), что коррелировало также со значимо более низким уровнем экспрессии данного маркера (см. табл. 1). Относительное количество CD8<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup>-Т-клеток снизилось в 1,8 раза по сравнению с контрольной группой (PBS) (см. рис. 1, *б*), но уровень экспрессии LAG-3 не изменился (см. табл. 1).

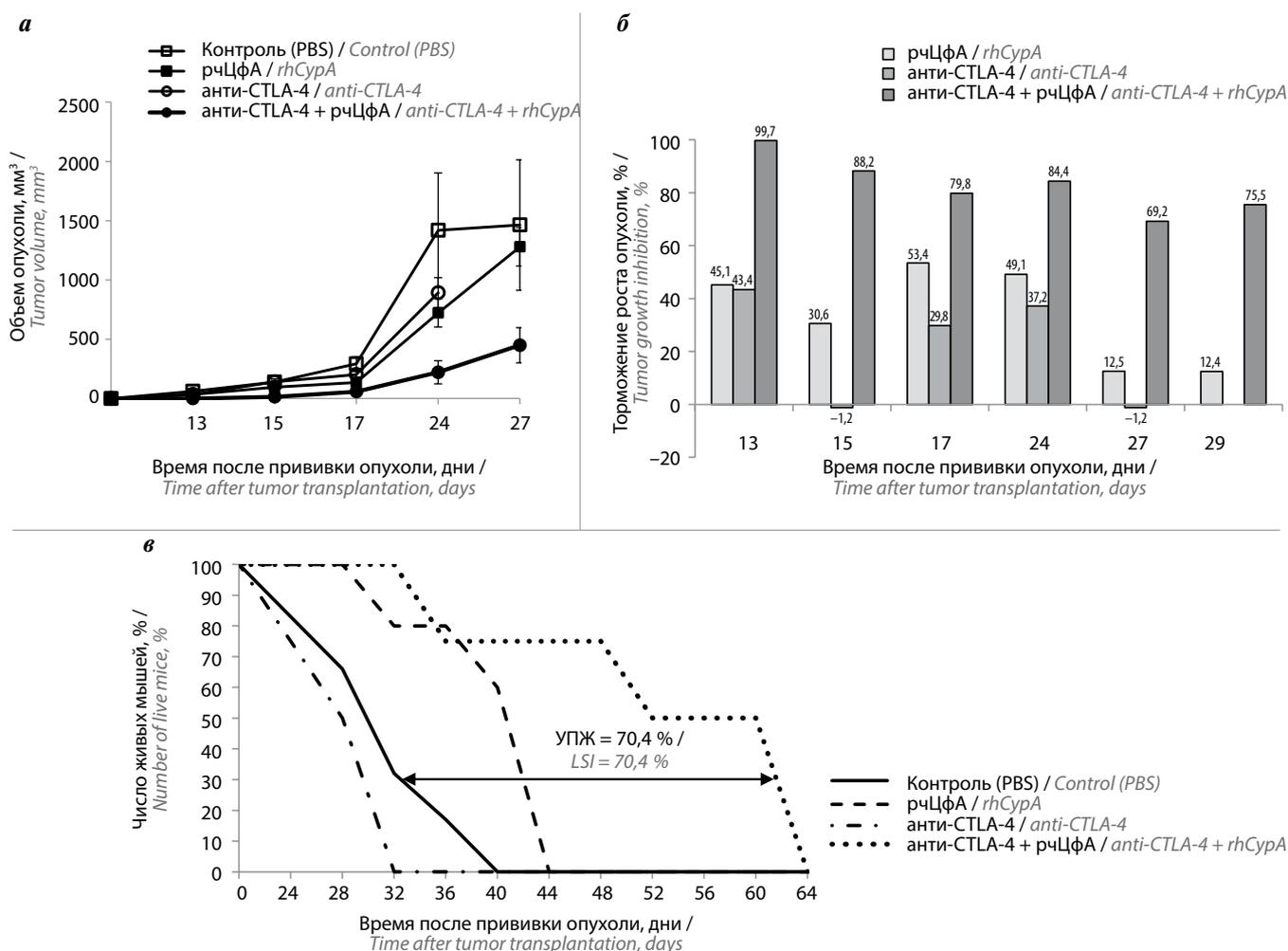
**Оценка противоопухолевых эффектов рекомбинантного циклофилина А человека в комбинациях с блокирующими антителами анти-CTLA-4, анти-LAG-3 и анти-PD-1.** Результаты нашего исследования показали, что меланома В16 в достаточной степени инфильтрирована CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клетками, экспрессирующими молекулы PD-1, CTLA-4 и LAG-3 (см. рис. 1). С учетом эффекта рчЦФА как самостоятельного противоопухолевого фактора его сочетание с ICIs может оказать синергический терапевтический эффект в этой экспериментальной модели. Для подтверждения данной гипотезы была проведена комбинированная рчЦФА + ICi-терапия меланомы В16 начиная с 6-го дня после прививки опухоли (рис. 2, 3).

При анти-CTLA-4-терапии и рчЦФА-монотерапии наблюдалось подавление роста опухоли на 43 и 53 %

до 14-го дня после терапии (24-й день после прививки опухоли) соответственно (см. рис. 2, *а*, *б*). При сочетанной иммунотерапии с использованием рчЦФА и анти-CTLA-4 блокирующих антител был отмечен сильный и продолжительный эффект подавления роста меланомы В16 до 29-го дня после прививки опухоли (19-й день по окончании терапии): ТРО составил 88–99 % на 3–5-й дни, 80–84 % на 7–14-й дни и 69–75 % на 17-й и 19-й дни по окончании терапии (см. рис. 2, *а*, *б*). Кроме того, комбинированная иммунотерапия увеличила продолжительность жизни экспериментальных животных на 70,4 % (рис. 2, *в*). Полученные данные указывают на выраженный синергический терапевтический эффект рчЦФА в комбинации с анти-CTLA-4-терапией.

Курсовое введение рчЦФА в комбинации с анти-LAG-3-терапией оказало значительный противоопухолевый эффект: показатели ТРО составили 69 % на 12-й день; 88,1 % на 14-й и 55 % на 19-й день после прививки меланомы В16 (5, 7 и 12-й дни по окончании терапии соответственно) (см. рис. 3, *а*). Поскольку терапевтический эффект анти-LAG-3-терапии не наблюдался при использованном режиме введения ICIs (см. рис. 3, *а*), полученные данные указывают на синергическое действие рчЦФА и анти-LAG-3-Мат.

В нашей работе, как и в ряде других исследований, наблюдалась низкая эффективность анти-LAG-3-терапии. Однако было показано, что блокирование одновременно PD-1 и LAG-3 позволяло достигнуть наилучших терапевтических эффектов [26–28]. В связи с этим далее мы оценили действие рчЦФА в сочетании одновременно с анти-PD-1- и анти-LAG-3-Мат (рис. 3, *б*). Двойная ICi-терапия вызвала значительное подавление роста опухоли с ТРО >90 % на 3–5-й дни и 72 %



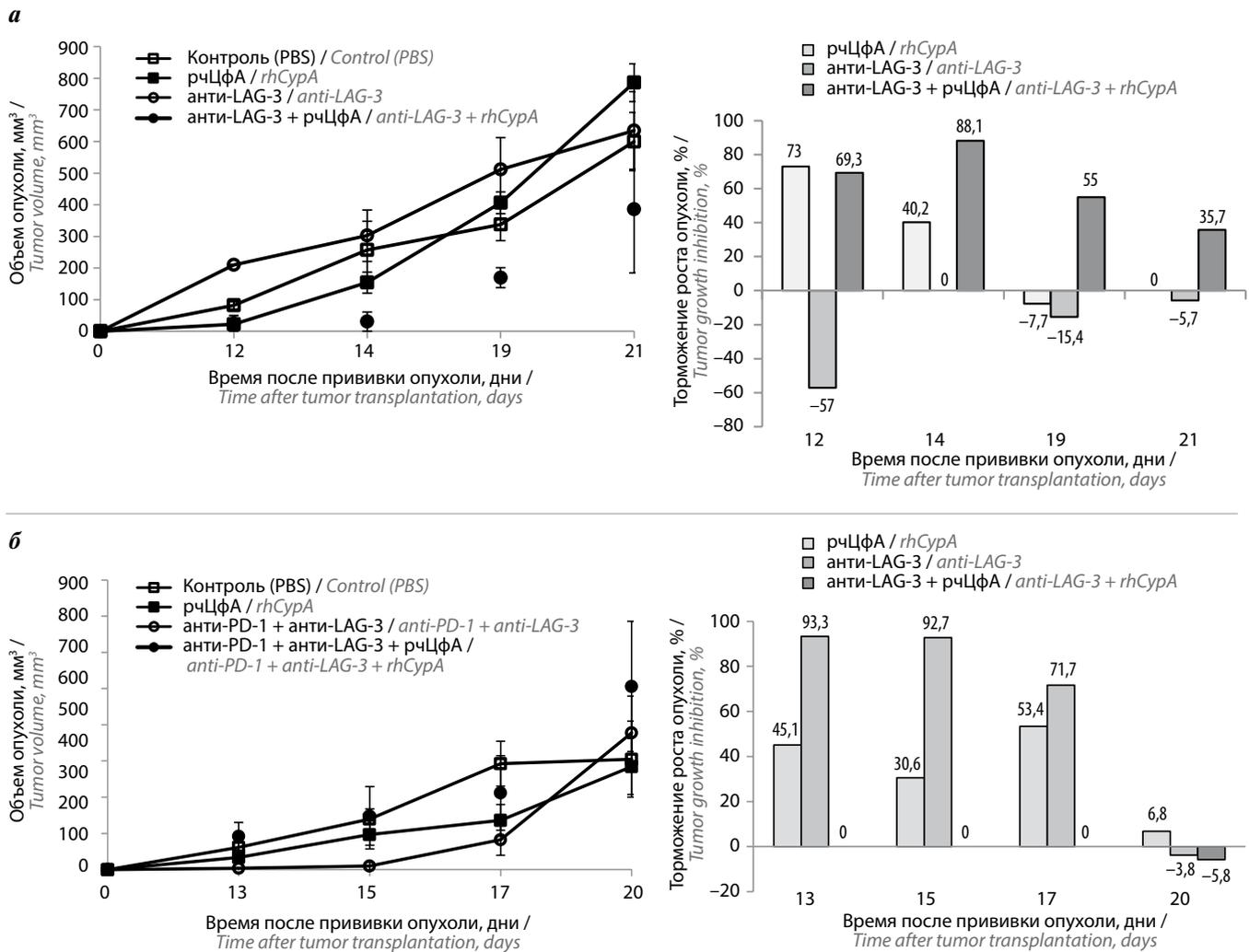
**Рис. 2.** Синергический противоопухолевый эффект рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦфА) в комбинации с анти-CTLA-4 блокирующими антителами в модели меланомы В16 *in vivo*: а – средний объем опухоли (мм<sup>3</sup>) в указанные сроки после прививки меланомы В16; б – индексы торможения роста опухоли (%) в указанные сроки после прививки меланомы В16; в – динамика гибели животных и показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ) (%). Мышам C57BL/6 прививали подкожно меланому В16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли вводили внутривенно блокирующие моноклональные антитела к CTLA-4 в дозе 100 мкг/мышь. Рекомбинантный циклофилин А человека вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. В качестве контроля мышам аналогично вводили только анти-CTLA-4 моноклональные антитела или рчЦфА. Животным без терапии вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) аналогично схеме введения рчЦфА. Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 5–7)

**Fig. 2.** Synergic anti-tumor effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) and anti-CTLA-4 blocking antibodies in the melanoma B16 model *in vivo*: a – the mean tumor volume (mm<sup>3</sup>) at the indicated time points post-tumor transplantation; б – tumor growth inhibition indices (%) at the indicated time points post-tumor transplantation; в – the survival curve of tumor-bearing mice and the increase in life span index (LSI) (%). C57BL/6 mice were subcutaneously transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, blocking monoclonal antibodies to CTLA-4 were injected intravenously at the dose of 100 μg/mouse. Recombinant human cyclophilin A was injected subcutaneously at the dose of 100 μg/mouse on days 6–10 post-tumor transplantation. Mice similarly dosed with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies or rhCypA only were used as controls. Mice without therapy were injected with phosphate-buffered saline (PBS) similarly to rhCypA injections. Data of one of two representative experiments are shown as mean ± standard error of the mean (n = 5–7)

на 7-й день по окончании терапии (13–15-й и 17-й дни после прививки меланомы В16 соответственно) (см. рис. 3, б). Однако комбинированная рчЦфА + ICI-терапия не подавила роста меланомы В16, и на всем сроке наблюдения (до 20-го дня после прививки опухоли) средний объем опухоли в данной группе был сопоставим со значениями в контроле (PBS) (см. рис. 3, б). Полученные данные свидетельствуют об отмене противоопухолевых эффектов двойной анти-PD-1 + анти-LAG-3-терапии при ее комбинировании с курсовым введением рчЦфА.

**Противоопухолевые эффекты рекомбинантного циклофилина А в комбинации с блокирующими антителами анти-PD-L1, анти-CD276 и анти-PD-L2.** Известно, что меланома В16 и компоненты ее микроокружения экспрессируют ингибиторные молекулы PD-L1, PD-L2 и CD276 [16, 29–31], что опосредует подавление эффекторных функций опухоль-инфильтрирующих Т-клеток [1, 4, 6].

В нашей работе при анти-PD-L1-терапии наблюдался незначительный противоопухолевый эффект с торможением роста меланомы В16 на 58,9 % только



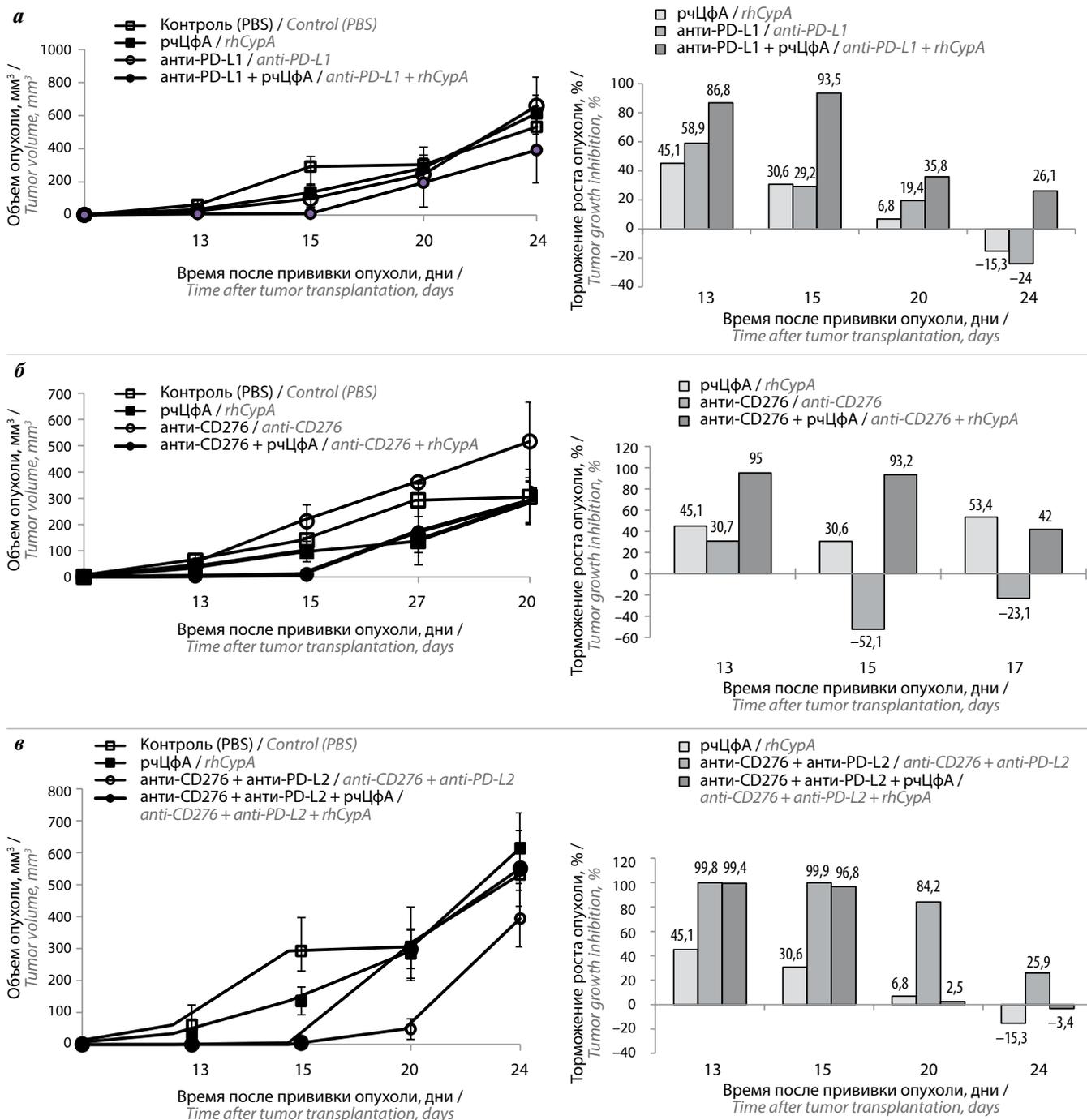
**Рис. 3.** Эффекты комбинации рекомбинантного циклофилина А человека (рЦЦФА) и блокаторов белка гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и рецептора программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) на рост меланомы B16 in vivo. Мышам C57BL/6 прививали подкожно меланому B16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли внутривенно вводили блокирующие моноклональные антитела (Mat) к молекуле LAG-3 (а) или одновременно к LAG-3 и PD-1 (б) в дозе 100 мкг/мышь каждого Mat. Рекомбинантный циклофилин А человека вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. В качестве контроля мышам аналогично вводили только Mat или рЦЦФА. Животным без терапии вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) аналогично схеме введения рЦЦФА. На указанные сроки после прививки меланомы B16 измеряли объем опухоли (мм<sup>3</sup>) и рассчитывали показатели торможения роста опухоли (%) после сочетанной иммунотерапии с использованием рЦЦФА и анти-LAG-3-Mat (а) или комбинации анти-LAG-3- и анти-PD-1-Mat (б). Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4–7)

**Fig. 3.** Effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) in combination with inhibitors of lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) and programmed cell death 1 (PD-1) on melanoma B16 growth in vivo. C57BL/6 mice were subcutaneously transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, blocking monoclonal antibodies (mAbs) to LAG-3 (a) or simultaneously to LAG-3 and PD-1 (b) were injected intravenously at the dose of 100 µg/mouse each mAb. Recombinant human cyclophilin A was injected subcutaneously at the dose of 100 µg/mouse on days 6–10 post-tumor transplantation. Mice similarly dosed with mAbs or rhCypA only were used as controls. Mice without therapy were injected with phosphate-buffered saline (PBS) similarly to rhCypA injections. At the indicated time points post-tumor transplantation, the tumor volume (mm<sup>3</sup>) was measured and tumor growth inhibition indices (%) were calculated after the combined immunotherapy with rhCypA and anti-LAG-3 mAbs (a) or the combination of anti-LAG-3 and anti-PD-1 mAbs (b). Data of one of two representative experiments are shown as mean ± standard error of the mean (n = 4–7)

на 3-й день по окончании терапии (13-й день после прививки опухоли) (рис. 4, а). Результаты других исследований также показали кратковременный эффект анти-PD-L1-терапии [32]. Введение блокирующих анти-CD276-антител не привело к подавлению роста меланомы B16 (рис. 4, б). Напротив, начиная с 5-го дня по окончании терапии (15-й день после прививки

опухоли) отмечена тенденция к стимуляции роста опухоли в группе анти-CD276-терапии (см. рис. 4, б).

Комбинированная иммунотерапия с использованием рЦЦФА и анти-PD-L1-Mat улучшила противоопухолевые эффекты IC1-терапии с торможением роста меланомы B16 на 86,8–93,5 % до 15-го дня после прививки опухоли (5-й день по окончании терапии)



**Рис. 4.** Влияние комбинации рекомбинантного циклофилина А и блокаторов лигандов 1 (PD-L1) и 2 (PD-L2) рецептора программируемой клеточной гибели 1 и молекулы CD276 на рост меланомы B16 in vivo. Мышам C57BL/6 подкожно прививали меланому B16. На 6-й и 9-й дни после прививки опухоли внутривенно вводили блокирующие моноклональные антитела (Мат) к молекулам PD-L1 (а), CD276 (б) или одновременно CD276 и PD-L2 (в) в дозе 100 мкг/мышь каждого Мат. Рекомбинантный циклофилин А вводили подкожно на 6–10-й дни после прививки опухоли в дозе 100 мкг/мышь. В качестве контроля мышам аналогично вводили только Мат или рЧЦФА. Животным без терапии вводили фосфатно-солевой буфер (PBS) аналогично схеме введения рЧЦФА. На указанные сроки после прививки меланомы B16 измеряли объем опухоли (мм<sup>3</sup>) и рассчитывали показатели торможения роста опухоли (%) после комбинированной иммунотерапии с использованием рЧЦФА и анти-PD-L1-Мат (а), анти-CD276-Мат (б) или комбинации анти-CD276- и анти-PD-L2-Мат (в). Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего (n = 4–7)

**Fig. 4.** Effects of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) in combination with programmed cell death-ligand 1 (PD-L1), programmed cell death-ligand 2 (PD-L2), and CD276 inhibitors on melanoma B16 growth in vivo. C57BL/6 mice were subcutaneously (s/c) transplanted with melanoma B16. On days 6 and 9 post-tumor transplantation, blocking monoclonal antibodies (mAbs) to PD-L1 (a), CD276 (б), or simultaneously to CD276 and PD-L2 (в) were injected intravenously at the dose of 100 µg/mouse each. Recombinant human cyclophilin A was injected subcutaneously at the dose of 100 µg/mouse on days 6–10 post-tumor transplantation. Mice similarly dosed with mAbs or rhCypA only were used as controls. Mice without therapy were injected with phosphate-buffered saline (PBS) similarly to rhCypA injections. At the indicated time points post-tumor transplantation, the tumor volume (mm<sup>3</sup>) was measured and tumor growth inhibition indices (%) were calculated after the combined immunotherapy with rhCypA and anti-PD-L1 mAbs (a), anti-CD276 mAbs (б), or the combination of anti-CD276 and anti-PD-L2 mAbs (в). Data of one of two representative experiments are presented as mean ± standard error of the mean (n = 4–7)

(см. рис. 4, а). Как было отмечено выше, курсовое введение рЧЦФА индуцирует накопление в опухоли CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>-Т-клеток (см. рис. 1, д), предположительно более чувствительных по сравнению с CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами к анти-PD-1/PD-L1-терапии в связи с высоким уровнем экспрессии PD-1 (см. табл. 1). Этот эффект рЧЦФА может обуславливать его синергическое действие в сочетании с анти-PD-L1-антителами (см. рис. 4, а).

При сочетании рЧЦФА и анти-CD276-Мат наблюдалось подавление роста меланомы В16 на 93–95 % до 15-го дня после прививки опухоли (см. рис. 4, б). Стоит отметить, что, несмотря на усиление эффективности анти-PD-L1- и анти-CD276-ICI-терапии при сочетании с курсовым введением рЧЦФА, синергическое действие комбинированной иммунотерапии было кратковременным, и ее эффекты отмечались только на ранних сроках (до 5-го дня) после окончания терапии (рис. 4, а, б).

С учетом исходной неэффективности анти-CD276-терапии (см. рис. 4, б) на следующем этапе работы мы оценили противоопухолевое действие комбинации блокирующих антител анти-CD276 и анти-PD-L2 (см. рис. 4, в). Одновременное введение двух ICIs вызвало значительное подавление роста меланомы В16: показатель ТРО составил 99,8 % на 3–5-й дни и 84,2 % на 10-й день по окончании терапии (13, 15 и 20-й дни после прививки опухоли соответственно) (см. рис. 4, в). Рекомбинантный циклофилин А не проявил аддитивных эффектов в комбинации с двумя ICIs на ранних сроках по окончании терапии (3–5-й дни), и показатели ТРО при рЧЦФА + ICI-терапии были сопоставимы с аналогичными показателями при ICI-терапии (рис. 4, в). Однако начиная с 10-го дня по окончании комбинированной иммунотерапии (20-й день после прививки опухоли) наблюдалась отмена эффекта блокирующих антител с тенденцией к стимуляции роста меланомы в этой экспериментальной группе (см. рис. 4, в).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании был оценен противоопухолевый эффект комбинированной иммунотерапии с использованием рЧЦФА и блокаторов функциональных различных контрольных точек иммунитета.

Гликопротеин цитотоксических лимфоцитов 4 (CTLA-4) экспрессируется на всех активированных Т-лимфоцитах [11, 33] и регуляторных Т-клетках (Treg) [33]. Посредством связывания с лигандами CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках CTLA-4 подавляет активацию и пролиферацию Т-клеток [33, 34]. Блокирование данного рецептора элиминирует или снижает активность Treg и обусловленную этим иммуносупрессию, а также усиливает эффекторные функции Т-клеток [11, 33].

Белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) экспрессируют истощенные Т-клетки в опухолевом ми-

кроокружении [11]. При взаимодействии LAG-3 с его лигандами подавляется передача сигнала от Т-клеточного рецептора, ингибируется Т-клеточная пролиферация и продукция ИФН- $\gamma$  [33]. Блокирование LAG-3 стимулирует инфильтрацию опухоли CD8<sup>+</sup>-Т-клетками, усиливает продукцию ИФН- $\gamma$ , подавляет активность Treg в опухолевом микроокружении [33], а также улучшает функциональную активность дендритных клеток, макрофагов и NK-клеток [11].

Рецептор программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) преимущественно экспрессируется на примированных антигеном активированных Т-клетках [11]. Данный рецептор взаимодействует с PD-L1 и PD-L2, что приводит к подавлению активации и пролиферации Т-клеток и снижению продукции цитотоксических цитокинов [12]. Стоит отметить, что PD-L1 регулирует несколько ингибиторных путей в Т-клетках, взаимодействуя, помимо PD-1, с CD80 и CD86 [11]. Лиганд PD-1 также индуцирует формирование и усиливает иммуносупрессорные функции Treg [12]. Блокирование взаимодействия PD-1 с PD-L1/PD-L2 отменяет анергию Т-клеток и стимулирует их эффекторные функции [11].

Наряду с PD-L1 и PD-L2 различные клетки опухолевого микроокружения экспрессируют другую ингибиторную молекулу – CD276 (B7-H3) [11, 13, 33]. CD276 подавляет пролиферацию CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, а также снижает продукцию ИФН- $\gamma$  и ряда цитокинов, в том числе ИЛ-2 [13, 33]. Было показано, что блокирование B7-H3 подавляет активность Treg, усиливает активацию эффекторных Т-клеток и стимулирует инфильтрацию опухоли NK-клетками и CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами [11, 13].

Результаты нашего исследования показали, что наиболее выраженное и продолжительное противоопухолевое действие иммунотерапии меланомы В16 наблюдалось при использовании рЧЦФА в сочетании с блокаторами CTLA-4 и LAG-3 (см. рис. 2, 3, а). Поскольку CTLA-4 широко экспрессируется на Т-клетках организма, анти-CTLA-4-терапия оказывает системный эффект по сравнению с ингибитором LAG-3 [11, 33]. Вследствие этого рЧЦФА + анти-CTLA-4-терапия была значительно эффективнее рЧЦФА + анти-LAG-3-терапии, она вызывала более сильное и пролонгированное подавление роста опухоли и значительно улучшала показатели выживаемости экспериментальных животных (см. рис. 2). Наблюдаемый синергический эффект комбинированной иммунотерапии, возможно, был обусловлен костимуляционным действием рЧЦФА в отношении Т-лимфоцитов [23], эффекторные функции которых поддерживались за счет блокирования данных ингибиторных рецепторов. Кроме того, рЧЦФА мог усилить действие ICI-терапии посредством модуляции опухолевого микроокружения и обогащения его функционально активными эффекторами (см. рис. 1).

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности использования

комбинации нескольких ICIs для достижения наилучших терапевтических эффектов [11–13]. В частности, комбинированная анти-PD-1- + анти-LAG-3-иммунотерапия одобрена для лечения метастатической меланомы [14]. Стоит особо отметить, что в нашей работе при оценке сочетанного действия рЧЦФА одновременно с анти-PD-1- и анти-LAG-3-Мат наблюдалась рЧЦФА-опосредованная отмена противоопухолевого эффекта двойной ICI-терапии (см. рис. 3, в). Исходя из этого можно предположить, что блокирование одновременно двух супрессорных путей в Т-клетках в опухолевом микроокружении [34] в сочетании с воздействием иммуностимулирующего рЧЦФА [22, 23] вызывает избыточную активацию Т-лимфоцитов, что может привести к их активационному апоптозу или анергии.

При этом интересно, что рЧЦФА в комбинации одновременно с анти-CD276- и анти-PD-L2-Мат не отменял эффекта двойной ICI-терапии (см. рис. 4, в). Поскольку ингибиторные молекулы CD276, PD-L1 и PD-L2 экспрессируются на опухолевых [12, 13, 33], антигенпрезентирующих (дендритных клетках и макрофагах) [11, 34] и стромальных клетках опухолевого микроокружения [11, 33], их блокаторы действуют на Т-лимфоциты опосредованно. Вследствие этого при сочетанном действии рЧЦФА и данных ICIs поддержание функциональной активности Т-клеток может быть менее эффективным по сравнению с комбинированным эффектом рЧЦФА и ICIs, блокирующими ингибиторные рецепторы непосредственно на Т-клетках (CTLA-4, PD-1, LAG-3). На это может указывать краткосрочность синергического действия рЧЦФА в комбинации с анти-PD-L1- или анти-CD276-антителами (см. рис. 4, а, б) по сравнению с рЧЦФА +

+ анти-CTLA-4- и рЧЦФА + анти-LAG-3-иммунотерапией (см. рис. 2, 3, а).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов противоопухолевой активности рЧЦФА выявило его способность стимулировать накопление Т-клеток в инфильтрате меланомы B16 и модулировать экспрессию отдельных контрольных точек иммунитета в микроокружении данной опухоли (см. рис. 1, табл. 1). Ранее также было показано, что рЧЦФА усиливает эффекторные функции опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов [23]. В совокупности эти эффекты рЧЦФА могут обуславливать его синергию в комбинации с ICIs, действие которых направлено на отмену анергии Т-клеток и поддержание их функциональной активности. Наиболее выраженное и пролонгированное синергическое противоопухолевое действие наблюдалось при сочетании рЧЦФА с ингибиторами CTLA-4 и LAG-3. Между тем комбинация рЧЦФА одновременно с блокаторами PD-1 и LAG-3 приводит к отмене противоопухолевых эффектов как рЧЦФА-монотерапии, так и двойной ICI-терапии предположительно из-за индукции активационного апоптоза или анергии Т-клеток в опухолевом микроокружении вследствие получения ими избыточных костимуляторных сигналов.

Результаты данной работы косвенно указывают на способность рЧЦФА регулировать функциональную активность Т-клеток в микроокружении опухоли и свидетельствуют о перспективности его использования в комбинации с отдельными блокаторами контрольных точек иммунитета для иммунотерапии онкологических заболеваний.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rui R., Zhou L., He S. Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks. *Front Immunol* 2023;14:1212476. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1212476
- Ren X., Guo S., Guan X. et al. Immunological classification of tumor types and advances in precision combination immunotherapy. *Front Immunol* 2022;13:790113. DOI: 10.3389/fimmu.2022.790113
- Tsimberidou A.M., Fountzilas E., Nikanjam M., Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev* 2020;86:102019. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102019
- Toor S.M., Sasidharan Nair V., Decock J., Elkord E. Immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2020;65:1–12. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.021
- Jia H., Yang H., Xiong H., Luo K.Q. NK cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Front Immunol* 2023;14:1303605. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1303605
- Sanchez-Correa B., Lopez-Sejas N., Duran E. et al. Modulation of NK cells with checkpoint inhibitors in the context of cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(5):861–70. DOI: 10.1007/s00262-019-02336-6
- Wang L., Geng H., Liu Y. et al. Hot and cold tumors: Immunological features and the therapeutic strategies. *MedComm* 2020;4(5):e343. DOI: 10.1002/mco2.343
- Webb E.S., Liu P., Baleeiro R. et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *J Biomed Res* 2018;32(5):317–26. DOI: 10.7555/JBR.31.20160168
- Naidoo J., Page D.B., Li B.T. et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol* 2015;26(12):2375–91. DOI: 10.1093/annonc/mdv383
- Alsaab H.O., Sau S., Alzhrani R. et al. PD1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol* 2017;8:561. DOI: 10.3389/fphar.2017.00561
- Khair D.O., Bax H.J., Mele S. et al. Combining immune checkpoint inhibitors: established and emerging targets and strategies to improve outcomes in melanoma. *Front Immunol* 2019;10:453. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00453
- Wang Y., Wang Y., Ren Y. et al. Metabolic modulation of immune checkpoints and novel therapeutic strategies in cancer. *Semin Cancer Biol* 2022;86(Pt. 3):542–65. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.02.010

13. Zhou W.T., Jin W.L. B7-H3/CD276: an emerging cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2021;12:701006. DOI: 10.3389/fimmu.2021.701006
14. Albrecht L.J., Livingstone E., Zimmer L., Schadendorf D. The latest option: nivolumab and relatlimab in advanced melanoma. *Curr Oncol Rep* 2023;25(6):647–57. DOI: 10.1007/s11912-023-01406-4
15. Duan Q., Zhang H., Zheng J., Zhang L. Turning cold into hot: firing up the tumor microenvironment. *Trends Cancer* 2020;6(7):605–18. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.02.022
16. Mehdi A., Attias M., Mahmood N. et al. Enhanced anticancer effect of a combination of s-adenosylmethionine (SAM) and immune checkpoint inhibitor (ICPi) in a syngeneic mouse model of advanced melanoma. *Front Oncol* 2020;10:1361. DOI: 10.3389/fonc.2020.01361
17. Berraondo P., Sanmamed M.F., Ochoa M.C. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2019;120(1):6–15. DOI: 10.1038/s41416-018-0328-y
18. Bharadwaj U., Zhang R., Yang H. et al. Effects of cyclophilin A on myeloblastic cell line KG-1 derived dendritic like cells (DLC) through p38 MAP kinase activation. *J Surg Res* 2005;127(1):29–38. DOI: 10.1016/j.jss.2005.02.020
19. Xu Q., Leiva M.C., Fischkoff S.A. et al. Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J Biol Chem* 1992;267(17):11968–71.
20. Dawar F.U., Xiong Y., Khattak M.N.K. et al. Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion. *J Leukoc Biol* 2017;102(4):989–92. DOI: 10.1189/jlb.3RU0317-090RR
21. Kalinina A., Golubeva I., Kudryavtsev I. et al. Cyclophilin A is a factor of antitumor defense in the early stages of tumor development. *Int Immunopharmacol* 2021;9:107470. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107470
22. Kalinina A., Silaeva Y., Kazansky D., Khromykh L. The role of recombinant human cyclophilin A in the antitumor immune response. *Acta Naturae* 2019;11(2):63–7. DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67
23. Kalinina A., Kazansky D., Khromykh L. Recombinant human cyclophilin A in combination with adoptive T-cell therapy improves the efficacy of cancer immunotherapy in experimental models *in vivo*. *Biochemistry (Moscow)* 2023;88:590–9. DOI:10.1134/S0006297923050024
24. Kalinina A., Kolesnikov A., Kozyr A. et al. Preparative production and purification of recombinant human Cyclophilin A. *Biochemistry (Moscow)* 2022;87:259–68. DOI: 10.1134/S0006297922030063
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. Guidelines for pre-clinical drug evaluations. Pt. 1. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.).
26. Ma J., Yan S., Zhao Y. et al. Blockade of PD-1 and LAG-3 expression on CD8+ T cells promotes the tumoricidal effects of CD8+ T cells. *Front Immunol* 2023;14:1265255. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1265255
27. Woo S.R., Turnis M.E., Goldberg M.V. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 2012;72(4):917–27. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620
28. Wei Y., Li Z. LAG3-PD-1 Combo overcome the disadvantage of drug resistance. *Front Oncol* 2022;12:831407. DOI: 10.3389/fonc.2022.831407
29. Ji S., Lee J., Lee E.S. et al. B16 melanoma control by anti-PD-L1 requires CD8+ T cells and NK cells: application of anti-PD-L1 Abs and Trp2 peptide vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2021;17(7):1910–22. DOI: 10.1080/21645515.2020.1866951
30. Singh M., Khong H., Dai Z. et al. Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation. *J Immunol* 2014;193(9):4722–31. DOI: 10.4049/jimmunol.1401160
31. Garcia M.G., Deng Y., Murray C. et al. Immune checkpoint expression and relationships to anti-PD-L1 immune checkpoint blockade cancer immunotherapy efficacy in aged versus young mice. *Aging Cancer* 2022;3(1):68–83. DOI: 10.1002/aac2.12045
32. Iwai Y., Ishida M., Tanaka Y. et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(19):12293–7. DOI: 10.1073/pnas.192461099
33. Dutta S., Ganguly A., Chatterjee K. et al. Targets of immune escape mechanisms in cancer: basis for development and evolution of cancer immune checkpoint inhibitors. *Biology (Basel)* 2023;12(2):218. DOI: 10.3390/biology12020218
34. He Y., Rivard C.J., Rozeboom L. et al. Lymphocyte-activation gene-3, an important immune checkpoint in cancer. *Cancer Sci* 2016;107(9):1193–7. DOI: 10.1111/cas.12986

#### Вклад авторов

А.А. Калинина: проведение экспериментов, анализ результатов, статистический анализ, анализ литературы, написание текста статьи; Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых: анализ результатов, редактирование.

#### Authors' contributions

A.A. Kalinina: conducting experiments, results analysis, statistical analysis, literature analysis, article writing; D.B. Kazansky, L.M. Khromykh: results analysis, editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Калинина / A.A. Kalinina: <https://orcid.org/0000-0002-6912-5579>  
 Д.Б. Казанский / D.B. Kazansky: <https://orcid.org/0000-0002-4179-8421>  
 Л.М. Хромых / L.M. Khromykh: <https://orcid.org/0000-0002-5793-0271>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00004).

**Funding.** The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 22-75-00004).

**Соблюдение правил биоэтики**

Протокол исследования одобрен локальным комитетом биоэтики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

**Compliance with principles of bioethics**

The study protocol was approved by the local Ethical committee on animal experimentation of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.