© Коллектив авторов, 2021

Ушакова Е.И., Лебедева Е.С., Багаев А.В., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И.

Комбинированная иммунотерапия метастатической карциномы у лабораторных мышей путем резекции первичного опухолевого узла и последующего перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агониста TLR4

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Успехи последнего десятилетия в разработке новых методов лечения пациентов с онкологическими заболеваниями связаны с применением блокаторов ингибирующих рецепторов и их лигандов (PD-1, PD-L1, CTLA4), агонистов активационных рецепторов клеток иммунитета, би- и триспецифических лигандов, способствующих противоопухолевому эффекту клеток иммунной системы, а также клеток CAR-T, CAR-NK, TIL, выращенных *ex vivo* для проведения клеточной терапии. Несмотря на то что многие из упомянутых вариантов иммунной терапии пациентов со злокачественными новообразованиями уже разрешены для применения или находятся на завершающих стадиях клинических испытаний, достигнутая эффективность лечения все еще далека от желаемого уровня. Следовательно, разработка новых методов иммунной терапии пациентов с онкологическими заболеваниями актуальна.

Цель исследования – изучение эффективности иммунотерапии солидной метастатической опухоли с использованием агониста TLR4 для перепрограммирования миелоидных клеток в микроокружении опухоли из проопухолевого состояния в противоопухолевое.

Материал и методы. В исследовании использовалась экспериментальная модель солидной метастатической карциномы 4T1 у мышей BALB/c. Клетки карциномы 4T1 инокулировали подкожно, после чего солидные опухоли выросли в 100 % случаев. Все животные с опухолью погибали в течение 30–35 дней от множественных метастазов в лимфатические узлы, селезенку, легкие, печень и другие органы.

В этой экспериментальной модели мы проводили хирургическое удаление первичной опухоли на стадии, когда она имела размер 2–3 мм (11-й день после инокуляции 15 тыс. клеток 4T1). На следующий день после резекции начинали иммунотерапию метастатической болезни. Для иммунотерапии применяли агонист TLR4 – кислый пептидогликан (КПГ) из растений, являющийся активным компонентом лекарственного препарата Иммуномакс (далее – КПГ). Препарат вводили раз в 4–5 дней, 7 инъекций на курс лечения. Исследовали скорость роста опухоли, время жизни животных, частоту рецидивов после резекции, количество метастатических колониеобразующих единиц в легких. Группы мышей, леченных комбинацией хирургической резекции и иммунотерапии, сравнивали с группами мышей, леченных только хирургической резекцией первичной опухоли или только иммунотерапией агонистом TLR4 КПГ.

Результаты проведенных экспериментов показали, что хирургическая резекция первичной опухоли не спасает животных от гибели, лишь отодвигает момент гибели приблизительно на 30 дней. Монотерапия TLR4-агонистом (без хирургической резекции первичной опухоли) тоже оказалась неэффективной. Скорость роста опухолей и продолжительность жизни животных не изменялись. Комбинация хирургического лечения и иммунотерапии, напротив, показала высокую лечебную эффективность при карциноме 4T1. Резекция первичной опухоли с последующим проведением курса инъекционной иммунотерапии агонистом TLR4 КПГ позволяет полностью избавиться от злокачественного новообразования (20 %) и значительно продлить жизнь остальных (80 %) животных.

Обсуждение содержит анализ возможных механизмов экспериментальной терапии агонистом TLR4, в основе которых лежит перепрограммирование макрофагов и дендрит-

Для корреспонденции
Атауллаханов Равшан Иноятович –
доктор медицинских наук, профессор,
руководитель отдела
иммунной биотехнологии,
заведующий лабораторией
активации иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

ных клеток в противоопухолевое состояние. Представлены экспериментальные данные, доказывающие целесообразность и эффективность применения агониста TLR4, способного осуществить такое перепрограммирование, в комплексном лечении животных с абсолютно летальной метастатической карциномой.

Выводы. 1. Самостоятельное применение TLR4-агониста КПП для лечения метастатической карциномы не оказывает значительного влияния на скорость роста первичной опухоли, процесс метастазирования и выживаемость мышей-опухоленосителей.

2. Применение TLR4-агониста КПП после хирургической резекции первичной карциномы для лечения абсолютно летальной метастатической болезни имеет высокую эффективность.

Ключевые слова: карцинома молочной железы 4T1; TLR4-агонист; Иммуномакс; иммунотерапия

Статья получена 23.07.2021. Принята в печать 26.09.2021.

Для цитирования: Ушакова Е.И., Лебедева Е.С., Багаев А.В., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Комбинированная иммунотерапия метастатической карциномы у лабораторных мышей путем резекции первичного опухолевого узла и последующего перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агониста TLR4. Иммунология. 2021; 42 (5): 490–501. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-490-501>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 20-15-00391.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ushakova E.I., Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Pichugin A.V., Ataullakhanov R.I.

Combined immunotherapy of metastatic carcinoma by resection of the primary tumor and subsequent reprogramming of macrophages and dendritic cells using a TLR4 agonist in laboratory mice

National Research Center – Institute of Immunology, Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. The successes of the last decade in the development of new methods of treating cancer patients are associated with the use of inhibitory receptor blockers and their ligands (PD-1, PD-L1, CTLA4); agonists of activation receptors of immune cells; bi- and tri-specific ligands that contribute to the antitumor effect of cells of the immune system; as well as CAR-T, CAR-NK, TIL cells grown *ex vivo* for cell therapy. Despite the fact that many of the aforementioned variants of immune therapy for cancer patients have already been approved for use or are in the final stages of clinical trials, the achieved treatment efficacy is still far from the desired level. Consequently, the development of new methods of immune therapy for cancer patients is urgent.

The aim of the investigation was to study the effectiveness of immunotherapy of a solid metastatic tumor using a TLR4 agonist for reprogramming myeloid cells in the tumor microenvironment from protumor state to antitumor one.

Material and methods. Experimental model of solid metastatic carcinoma 4T1 in BALB/c mice was used. 4T1 carcinoma cells were inoculated subcutaneously, after which solid tumors grew in 100 % of cases. All tumor-bearing animals died within 30–35 days from multiple metastases to the lymph nodes, spleen, lungs, liver and other organs. In this experimental model, we performed surgical removal of the primary tumor at its 2–3 mm size (11th day after inoculation of 15 thousand 4T1 cells). The next day after resection, immunotherapy against metastatic disease was started. The TLR4-agonist i.e. the acidic peptidoglycan (hereinafter APG) from the plant source that is an active component of a pharmaceutical drug Immunomax was used for immunotherapy. The drug was injected intraperitoneally every 4–5 days, in total – 7 injections per course of treatment. Groups of mice treated with a combination of surgical resection and immunotherapy were compared with groups of mice treated using either surgical resection

For correspondence

Ravshan I. Ataullakhanov – MD, PhD,
Professor, Head of the Department
of Immune Biotechnology,
Head of the Laboratory
of Immunity Activation,
NRC Institute of Immunology,
FMBA of Russia,
Moscow, Russian Federation

E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

of the primary tumor alone or immunotherapy with TLR4-agonist alone. The rate of tumor growth, the survival time of the animals, the frequency of relapses after resection, and the number of metastatic CFUs in the lungs were investigated.

Results of our experiments showed that surgical resection of the primary tumor does not save animals from death, only postpones the moment of death by about 30 days. Monotherapy with TLR4-agonist (without surgical resection of the primary tumor) also proved to be ineffective. The growth rate of tumors and the lifespan of the animals treated with APG only did not change. In contrast, the combination of surgical treatment and immunotherapy has shown high therapeutic efficacy in 4T1 carcinoma. Resection of the primary tumor followed by a course of immunotherapy with injections of a TLR4-agonist allows a complete elimination of the malignant neoplasm in 20 % and a significant prolongation of the life span of the remaining 80 % animals.

Discussion contains an analysis of the possible mechanisms of the TLR4-agonist therapeutic action, based on the reprogramming of macrophages and dendritic cells to their anti-tumor state. Experimental data are presented that prove the feasibility and effectiveness of the use of a TLR4 agonist, capable of this reprogramming, in the complex treatment of animals with absolutely lethal metastatic carcinoma.

Conclusions. 1. The TLR4 agonist (APG) stand-alone use for the treatment of metastatic carcinoma does not significantly affect the growth rate of the primary tumor, the process of metastasis and the survival of tumor-bearing mice.

2. After surgical resection of the primary carcinoma, the TLR4 agonist (APG) use is highly effective for treatment of the lethal metastatic disease.

Keywords: 4T1 breast carcinoma; TLR4-agonist; Immunomax; immunotherapy

Received 23.07.2021. Accepted 26.09.2021.

For citation: Ushakova E.I., Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Pichugin A.V., Ataulakhov R.I. Combined immunotherapy of metastatic carcinoma by resection of the primary tumor and subsequent reprogramming of macrophages and dendritic cells using a TLR4 agonist in laboratory mice. *Immunologiya*. 2021; 42 (5): 490–501. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-490-501> (in Russian)

Funding. This study was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 20-15-00391.

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

Введение

Иммунотерапия считается одним из перспективных направлений в лечении пациентов со злокачественными новообразованиями. Успехи последнего десятилетия, связанные с новыми иммунными технологиями, привлекли многих исследователей, фармпроизводителей и клиницистов к разработке и внедрению новых методов иммунологического лечения пациентов со злокачественными новообразованиями. К успешным можно отнести несколько следующих направлений: а) терапевтические антитела, блокаторы ингибирующих рецепторов контрольных точек и их лигандов, таких как PD-1, PD-L1, CTLA4; б) агонисты различных активационных рецепторов клеток, участвующих в иммунных реакциях; в) би- и триспецифические лиганды, способствующие противоопухолевому эффекту клеток иммунной системы; г) выращенные *ex vivo* препараты клеток, предназначенные для проведения клеточной терапии, в частности CAR-T-, CAR-НК-, TIL-клетки [1–8].

В рамках новых направлений иммунотерапии есть еще одно, интересное и перспективное – перепрограммирование клеток микроокружения опухоли. Микроокружение составляют незлокачественные клетки, являющиеся неотъемлемыми компонентами злокаче-

ственной опухоли. В состав микроокружения опухоли входят тканевые макрофаги (МФ), дендритные клетки (ДК), фибробласты, клетки сосудов, другие нормальные клетки той ткани, где возникла и растет опухоль [9]. Кроме того, компонентами микроокружения становятся клетки иммунного инфильтрата. Это клетки-пришельцы. Они мигрируют сквозь стенку кровеносных сосудов, выходя из кровотока в опухолевую ткань. Среди клеток инфильтрата наиболее представлены моноциты и гранулоциты, НК-, В- и Т-клетки различных типов и стадий дифференцировки [10]. Под перепрограммированием клеток микроокружения понимают фармакологические или биологические воздействия, которые индуцируют переключение транскрипционной программы клеток микроокружения в противоопухолевое состояние.

Несмотря на то что многие из упомянутых вариантов иммунной терапии пациентов с онкологическими заболеваниями уже разрешены для применения или находятся в завершающих стадиях клинических испытаний, достигнутая эффективность лечения все еще далека от желаемого уровня. Это означает, что разработка новых методов иммунной терапии актуальна. Ее цель – создание максимально эффективных препаратов и протоколов, позволяющих перевести болезнь в фазу

устойчивой ремиссии, значительно продлить безрецидивный период и, в самых успешных вариантах лечения, полностью излечить пациента от злокачественного новообразования.

В данной работе мы сообщаем об успешной комбинации хирургического и иммунологического лечения. В модели абсолютно летальной метастатической карциномы 4T1 у мышей BALB/c мы показали, что хирургическая резекция первичной опухоли с последующим проведением курса инъекционной иммунотерапии агонистом TLR4 позволяет полностью излечить от злокачественного новообразования 20 % животных и значительно продлить жизнь остальных 80 % животных.

Материал и методы

Экспериментальные животные. Мышей-самок линии BALB/c в возрасте 8–10 нед, полученных из питомника «Столбовая», содержали на стандартной диете в стандартных условиях вивария ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России. Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с Правилами исследовательской работы с лабораторными животными в Институте иммунологии ФМБА России (приказ от 12 ноября 2015 г.), сертифицированными Локальным комитетом по этике (Резолюция 4/17 от 13 июля 2017 г.).

Приготовление суспензий клеток легких. Ткань легких размельчали ножницами и пинцетом в стерильных условиях в чашке Петри в 5 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). Получившуюся суспензию мелких фрагментов ткани переносили в конические пробирки объемом 15 мл, добавляли коллагеназу I типа (0,3 мг/мл, Sigma, США, C0130), коллагеназу IV типа (0,5 мг/мл, Worthington, США, CLS-1) и ДНКазу (40 ЕД/мл, Roche, Швейцария), оставляли в CO₂-инкубаторе при 37 °C на 1 ч. Действие ферментов останавливали добавлением раствора фосфатного солевого буферного раствора (ФБ), содержащего 0,5 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Клетки и тканевые фрагменты осаждали центрифугированием, осадок ресуспендировали в 1 мл раствора ФБ-БСА, суспензию фильтровали через фильтр с размером пор 100 мкм. Тканевые фрагменты протирали через этот же фильтр с помощью поршня шприца. Фильтр дополнительно промывали ФБ-БСА до общего объема 30 мл. Клетки осаждали центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл раствора ФБ-БСА.

Культуры клеток *in vitro*. Линия клеток 4T1 карциномы молочной железы (ATCC, США, Cat. No. CRL-2539) была получена от профессора М.Г. Агаджаняна (Institute for Molecular Medicine, Huntington Beach, CA). Линия клеток 4T1, постоянно экспрессирующая белок с зеленой флуоресценцией (GFP, green fluorescent protein), была получена путем трансфекции клеток карциномы 4T1 лентивирусным вектором pLV-neo-EGFP с последующей сортировкой GFP^{high}-клеток на приборе BD FACS Aria II (Becton Dickinson, США) (возбуждение – 488 нм, флуоресценция – 515–545 нм). Чистота отсортированной популяции составляла 98 %.

Все клеточные культуры инкубировали в полной среде (ПС) на основе DMEM с 25 мМ HEPES, дополненной смесью незаменимых аминокислот, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США, Cat. No. SV30160.03, уровень эндотоксина ≤ 10 EU/мл), 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия и 10 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂.

Экспериментальная модель карциномы 4T1 у мышей BALB/c. Для создания солидной опухоли мышам BALB/c подкожно вводили клетки карциномы 4T1 в количестве 15 тыс. клеток на мышь. Сольные опухоли образовывались у всех мышей после инокуляции клеток 4T1. Видимые опухолевые образования размером около 1–2 мм появлялись уже через 8–9 дней после инокуляции 15 тыс. клеток карциномы 4T1. Через 25–30 дней опухоли достигали размеров 1–1,5 см в диаметре. Гибель мышей-опухоленосителей происходила начиная с 21–22-го дня. Все животные-опухоленосители погибали в течение 30–35 дней после инокуляции от множественных метастазов в различные органы: лимфатические узлы, печень, легкие и др.

Хирургическое удаление опухоли. Для анестезии мышей использовали внутримышечные инъекции гидрохлорида тилетамина и гидрохлорида золазепама в дозе 0,005 мг/кг и гидрохлорида ксилазина в дозе 0,2 мл/кг. Кожу в области операционного участка брили и обрабатывали раствором спирта. После наступления хирургической стадии наркоза опухоли удаляли стерильными хирургическими инструментами. Край раны сшивали с помощью рассасывающихся хирургических нитей с полигликолидным покрытием USP 4-0 (ВолотьTM, Россия). Операционный шов обрабатывали мазью с антибиотиком (тетрациклин). Начиная со следующего дня после резекции первичной опухоли проводили иммунотерапию агонистом TLR4. В качестве TLR4-агониста использовали кислый пептидогликан (КПГ), являющийся активным компонентом лекарственного препарата Имуномакс [11]. КПГ вводили мышам внутрибрюшинно в разовой дозе 14 мкг. Инъекции повторяли каждые 4–5 дней. Курс лечения состоял из 7 инъекций.

Количественный анализ метастатических колониеобразующих единиц (КОЕ) в ткани легкого методом лимитирующих разведений. Суспензию клеток из ткани легких готовили, как описано выше. Различные количества клеток легких культивировали в полной среде в течение 6–7 дней, чтобы каждая КОЕ успела образовать колонию достаточно большого размера. Максимальное количество клеток в культуре составляло 1/10 часть от всей суспензии, приготовленной из ткани правого и левого легких. Культуры с пошагово уменьшающимся количеством клеток легкого получали титрованием с шагом 5. Всего делали 16 шагов титрования. Количество одиночных колоний клеток карциномы 4T1 при лимитирующих разведениях позволяло вычислить общее количество опухолевых КОЕ в исходной ткани легких.

Культуры дендритных клеток и макрофагов *in vitro*. Дифференцировку ДК и МФ костного мозга мышей осуществляли *in vitro* в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) (Sigma, США). В асептических условиях выделяли бедренные и большие берцовые кости мышей. Костный мозг вымывали шприцом (игла 25G) в чашку Петри с ФБ-БСА и тщательно суспендировали. Полученную суспензию клеток переносили в коническую пробирку объемом 15 мл. Клетки осаждали центрифугированием (213 g, 4 °C, 10 мин), надосадочную жидкость удаляли. Клеточный осадок встряхивали, эритроциты удаляли осмотическим лизисом, приливая к осадку 4,5 мл воды для инъекций на 20 с, мгновенно восстанавливали изотоничность, добавляя 0,5 мл 10-кратного раствора Хэнкса, общий объем суспензии доводили до 10 мл раствором ФБ-БСА. Ядродержащие клетки осаждали центрифугированием (213 g, 4 °C, 10 мин), надосадочную жидкость удаляли и клетки ресуспендировали в 1 мл ПС. Количество клеток определяли в камере Горяева при окрашивании трипановым синим. Для культивирования в чашки Петри диаметром 10 см помещали 10 млн клеток костного мозга в 10 мл ПС с добавлением 10 нг/мл ГМ-КСФ и 50 мкМ β -МЕ. Клетки культивировали при 37 °C и 5 % CO₂. Через 3–4 дня в культуры вносили 10 мл ПС с теми же добавками. На 6-й день клетки собирали аккуратным пипетированием, осаждали центрифугированием (213 g, 4 °C, 10 мин), осадок ресуспендировали.

Анализ противоопухолевой активности МФ и ДК *in vitro*. В лунки 96-луночного планшета для культивирования помещали 500 клеток карциномы 4T1 или ее варианта 4T1-GFP, экспрессирующего зеленый флуоресцентный белок. МФ и ДК были получены с помощью ГМ-КСФ из клеток костного мозга мышей, как описано выше. Для анализа противоопухолевой активности МФ и ДК помещали в лунки планшета вместе с 500 опухолевыми клетками. Отношение «эффektor : мишень» было равным 50 : 1. В часть культур вносили агонист TLR4 КПП (5 мкг/мл). Культуры клеток инкубировали в течение 5 дней при 37 °C и 5 % CO₂. Рост опухолевых клеток сравнивали в монокультуре и в совместной культуре с МФ и ДК, в присутствии агониста TLR4 или в его отсутствии. В день анализа клетки 4T1-GFP собирали с помощью раствора трипсин-ЭДТА с солями Хэнкса («ПанЭко», Россия) и анализировали с помощью проточного цитометра BD FACS Aria II (Becton Dickinson, США). Для цитофлуориметрического анализа клетки карциномы 4T1-GFP окрашивали DAPI и подсчитывали точное количество живых 4T1-GFP-клеток в каждой лунке планшета, используя калибровочные шарики (Invitrogen, США).

Колонии опухолевых клеток 4T1 фиксировали в 2 % параформальдегиде (Sigma, США) и окрашивали 0,5 % раствором метиленового синего. Окрашенные колонии опухолевых клеток фотографировали, площадь колоний и интенсивность окраски рассчитывали с помощью программы ImageJ (NIH, США).

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., США). Результаты экспериментов по выборкам представляли в виде медианы и процентилей (25-й и 75-й процентиля). Статистический анализ данных осуществляли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и логрангового критерия. Функцию выживаемости оценивали по методу Каплана–Майера. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Агонист TLR4 не оказывает влияния на рост 4T1-карциномы *in vitro* и *in vivo*

В качестве агонистов TLR4 мы использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) и растительный КПП. ЛПС из грам-отрицательных бактерий – это классический агонист TLR4, и он не нуждается в представлении. КПП менее известен. По этой причине дадим краткую характеристику этого агониста. Кислый пептидогликан, выделенный из растительного сырья, имеет молекулярную массу более 1 млн Да, оказывает прямое активирующее действие на ДК и МФ. КПП действует на клетки через рецептор TLR4, что было доказано с использованием специальных клеточных линий HEK-Blue (Invivogen, США), экспрессирующих только один из рецепторов: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 или TLR9 [12].

Исследование возможного влияния TLR4-агонистов на карциному молочной железы 4T1 мы начали с изучения прямого действия агонистов на опухолевые клетки 4T1 в культуре *in vitro*. Клетки 4T1 адгезивные, поэтому скорость роста этих клеток в культуре мы анализировали по относительной площади, занятой колониями опухолевых клеток. Колонии опухолевых клеток окрашивали метиленовым синим (рис. 1А). Внесение агонистов TLR4 (КПП и ЛПС) в культуры *in vitro* клеток карциномы 4T1 не влияло на жизнеспособность и скорость размножения этих клеток. Иными словами, TLR4-агонисты не оказывали прямого влияния на клетки карциномы 4T1 (рис. 1А, Б).

Бактериальный ЛПС имеет высокую токсичность, и по этой причине его применение в клинической практике резко ограничено. Напротив, КПП не отличается токсичностью, широко и успешно применяется в качестве основы лекарственного препарата для коррекции ослабленного иммунитета, а также для лечения пациентов с различными инфекционными заболеваниями. Учитывая указанные различия в токсичности, в качестве агониста TLR4 в экспериментах *in vivo* мы использовали КПП.

Мышам BALB/c подкожно инокулировали по 15 тыс. клеток карциномы 4T1 для инициации роста солидной опухоли. Через 3 дня после инокуляции начинали курс подкожных инъекций КПП в дозе 14 мкг, что соответствует оптимальной иммуностимулирующей дозе КПП для мышей [13]. Инъекции КПП повторяли каждые 4–5 дней, общим числом 6–7 введений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что инъекционное введение агониста TLR4 КПП в дозе 14 мкг на мышью не влия-

Рис 1. Агонисты TLR4 кислый пептидогликан (КППГ) и липополисахарид (ЛПС) не оказывают влияния на рост 4T1-карциномы *in vitro* и *in vivo*

Репрезентативные изображения лунок с колониями клеток 4T1, окрашенных метиленовым синим. А и Б: 4T1 – монокультура клеток карциномы 4T1; 4T1 + ЛПС – монокультура клеток карциномы 4T1 в присутствии 5 мкг/мл ЛПС; 4T1 + КППГ – монокультура клеток карциномы 4T1 в присутствии 5 мкг/мл КППГ; В – динамика роста опухолей у индивидуальных мышей после подкожной инокуляции 15 тыс. клеток карциномы 4T1 в контрольной группе мышей ($n = 7$) и в группе, получившей терапию КППГ (разовая доза 14 мкг/мышь, $n = 7$); Г – медианные значения объемов опухолей в группах мышей, представленных на рис. 1В; Д – выживаемость животных после подкожной инокуляции клеток карциномы 4T1 без терапии ($n = 10$) или с последующей терапией агонистом TLR4 КППГ ($n = 10$).

яет на частоту возникновения солидных опухолей 4T1 и скорость их роста (рис. 1В, Г). Несмотря на регулярные внутрибрюшинные инъекции агониста КППГ опухоли возникли у 100 % мышей, которым инокулировали 15 тыс. клеток 4T1. Скорость роста опухолей в группе, получавшей инъекции агониста TLR4, не отличалась от скорости роста опухолей в контрольной группе, получавшей инъекции физиологического раствора 0,9 % NaCl, а также терапия агонистом TLR4 не оказывала влияния на выживаемость мышей (рис. 1Д).

Эффективная экспериментальная терапия метастатической болезни при карциноме 4T1 с помощью инъекций TLR4-агониста

Далее мы исследовали влияние агониста TLR4 КППГ на метастатическую болезнь после резекции первичного опухолевого узла. Сама по себе резекция первичной опу-

холи 4T1 не спасала мышей от гибели. После хирургического удаления первичной опухоли все без исключения мыши погибали от множественных метастазов в лимфатические узлы, печень, легкие и другие органы. На рис. 2А представлена кривая гибели мышей после хирургической резекции небольшой опухоли (2–3 мм) на 11-й день после инокуляции 15 тыс. клеток карциномы 4T1. Мыши после резекции первичной опухоли жили примерно на 25–30 дней дольше по сравнению с животными, которым резекцию первичной опухоли не делали.

Причина метастатической болезни – ранняя диссеминация клеток карциномы 4T1 из первичного опухолевого узла. Уже к моменту резекции, несмотря на небольшой размер первичной опухоли, метастатические клетки в изобилии были диссеминированы по организму. В частности, на 11-й день после подкожной инокуляции 15 тыс. клеток 4T1-карциномы мы исследовали

Рис. 2. Экспериментальная терапия карциномы 4Т1 с помощью хирургического удаления первичного опухолевого узла.

А – выживаемость животных после подкожной инокуляции 15 тыс. клеток карциномы 4Т1 с последующей резекцией первичной опухоли ($n = 10$) на 11-й день или без резекции ($n = 10$); *Б* – схема метода лимитирующих разведений для определения количества колониобразующих единиц (КОЕ) карциномы 4Т1 в ткани легких мышей-опухоленосителей; *В* – количество КОЕ, обнаруженное в легких мышей на 11-й день после подкожной инокуляции 15 тыс. клеток 4Т1-карциномы. Точками представлены значения КОЕ по индивидуальным животным.

ткань легкого, чтобы определить, имеются ли в ней метастатические клетки опухоли и сколько их. Методом лимитирующих разведений мы определили, что в легких к этому сроку уже обнаруживается от 1 до 4 тыс. (в среднем 2 тыс.) метастатических КОЕ карциномы 4Т1 (рис. 2). Этот факт свидетельствует о том, что на 11-й день после инокуляции в момент резекции первичной опухоли метастатические клетки карциномы 4Т1 уже распространились в отдаленные органы, где они дали рост множественных метастазов, что и вызвало 100-процентную гибель животных. В такой экспериментальной модели можно изучать влияние лекарственных соединений на метастатическую болезнь при карциноме 4Т1. Мы исследовали возможное влияние агониста TLR4 на метастатическую болезнь после резекции карциномы 4Т1 у мышей BALB/c.

Курсовая экспериментальная терапия мышей инъекциями КПП после хирургической резекции первичной опухоли 4Т1 показала эффективность такого подхода для лечения метастатической болезни. Начиная со следующего дня после резекции первичной опухоли, мы проводили внутривентрально инъекции агониста TLR4. Инъекции повторяли каждые 4–5 дней. Курс лечения состоял из 7 инъекций. Результаты представлены на рис. 3.

После хирургической резекции первичной опухоли и последующего лечения агонистом TLR4 КПП у 20 % мышей рецидивы опухоли не возникали. Мыши выглядели вполне здоровыми в течение 210 дней после начала лечения. Такой длительный период наблюдения составляет примерно 2/3 продолжительности жизни мышей BALB/c, что позволяет заключить, что у 20 % животных предпринятая экспериментальная терапия позволила достичь полного избавления от метастатической карциномы. У остальных 80 % животных рецидивы возникали и метастатическая болезнь развивалась, но существенно медленнее, чем у мышей с резекцией первичной опухоли без последующей терапии агонистом TLR4 КПП. Продолжительность жизни мышей после терапии агонистом TLR4 увеличивалась на 66 % по сравнению с таковой без применения агониста TLR4 (рис. 3).

Агонист TLR4 индуцирует противоопухолевую активность макрофагов и дендритных клеток *in situ*

Интересно было бы понять механизмы лечебного эффекта агониста TLR4 КПП при метастатической болезни 4Т1. Полное излечение 20 % животных от метастатической болезни могло быть связано с цитотоксическим эффектом тканевого микроокружения на

Рис. 3. Результаты 3 независимых экспериментов по динамике гибели мышей после резекции первичной карциномы 4T1 и последующего курса инъекций физиологического раствора (кривая черного цвета) или агониста TLR4 КППГ (кривая серого цвета). В каждой группе было по 10 мышей

единичные колониеобразующие клетки карциномы 4T1, распространившиеся по организму еще до резекции первичной опухоли. Несколько тысяч метастатических КОЕ, выявленных в ткани легких на 11-й день после подкожной инокуляции 15 тыс. клеток 4T1 (см. рис. 2В), могли погибнуть и не дать развиваться метастатической болезни в результате цитотоксического действия клеток микроокружения, индуцированных к противоопухолевому действию агонистом TLR4.

Мы ранее показали, что агонист TLR4 КППГ индуцирует транскрипционное перепрограммирование МФ и ДК в противоопухолевое состояние [14–22]. TLR4-активированные МФ и ДК оказывают выраженный цитотоксический эффект на клетки различных опухолей. На рис. 4 представлены данные о цитотоксическом действии TLR4-активированных МФ и ДК на клетки карциномы 4T1.

Совместное культивирование клеток 4T1 с МФ и ДК в присутствии агониста TLR4 приводит к сильному ингибированию жизнеспособности и роста клеток карциномы 4T1 (рис. 4А). Противоопухолевая активность МФ и ДК прямо зависит от концентрации агониста TLR4. В частности, при концентрациях КППГ от 0,1 мкг/мл и выше мы наблюдаем значительный противоопухо-

левый эффект, вплоть до полной ликвидации карциномы 4T1 в совместной культуре активированных МФ и ДК с клетками опухоли (рис. 4Б).

Мы предполагаем, что подобная активация МФ и ДК в тканях, куда попали метастатические КОЕ, может приводить к эффективной элиминации злокачественных клеток *in situ*, предотвращая рост метастатических опухолей во множестве отдаленных органов и тканей. Это гипотеза, которая требует дальнейшего изучения.

Обсуждение

Высокая летальность при раке молочной железы (РМЖ) обусловлена высоким полиорганым метастазированием. Резекция первичного опухолевого узла – наиболее распространенный клинический сценарий у пациентов со злокачественными новообразованиями, в том числе РМЖ. Это действенная лечебная мера, но ее недостаточно для полного выздоровления. Долгосрочные результаты лечения РМЖ показали, что, помимо ранних рецидивов, могут развиваться поздние рецидивы с пиками через 1,5 года и 5 лет после хирургической резекции. Метастатические очаги могут возникать в любой фазе заболевания, до и после резекции первичной опухоли [23]. Риск рецидива очень высок, хотя он и снижается в течение 2–5 лет после операции, но на протяжении

Рис. 4. Противоопухолевый эффект TLR4-активированных макрофагов (МФ) и дендритных клеток (ДК) в совместной культуре *in vitro* с клетками карциномы 4Т1

А – размер колоний клеток 4Т1-карциномы в совместной культуре с МФ/ДК в присутствии агониста TLR4 КППГ (5 мкг/мл) по сравнению с такими же совместными культурами клеток без агониста; *Б* – зависимость противоопухолевого действия МФ/ДК от концентрации TLR4-агониста КППГ.

последующих 7 лет остается постоянным и составляет примерно 4 % в год [24]. В целом, вероятность реактивации опухолевого процесса остается значительной в течение как минимум 20 лет после радикальной операции [25]. Поэтому избавление от метастатической болезни и предотвращение развития рецидива опухоли – главные задачи при лечении пациентов с РМЖ и пациентов с онкологическими заболеваниями в целом.

Карцинома 4Т1 у мышей BALB/c – это скоротечное смертельное заболевание. Все животные гибнут от множественных метастазов в среднем в течение 28 дней после инокуляции злокачественных клеток. Как известно, развитие полноценной иммунной реакции в ответ на иммунизацию требует не менее 14–20 дней. Следовательно, ко времени ожидаемого иммунного ответа у мышей с карциномой 4Т1 уже разовьется не только большая солидная опухоль, но и произойдет диссеминация множественных метастазов этой опухоли в лимфатические узлы, печень, легкие и в другие органы. Чтобы повысить вероятность развития иммунного ответа против антигенов опухоли и надеяться на заметное влияние иммунного ответа на прогрессию опухолевого заболевания, мы удаляли первичную опухоль. Хирургическая резекция опухоли существенно сокращала общую массу злокачественной ткани в организме мыши и, как видно на рис. 2А, увеличивала продолжительность жизни животных с карциномой 4Т1 с 35 до 62 дней. Однако простое удаление опухоли не приводило к полному излечению от опухолевого процесса, что обусловлено наличием метастазов в легких и в других органах на момент удаления опухоли (рис. 2В).

Как правило, злокачественные метастазирующие опухоли подавляют иммунные реакции, создают мощное иммуносупрессивное микроокружение, защищающее злокачественные клетки. Свой «побег» или защиту от иммунитета опухоли совершают самыми разными

способами: нарушают презентацию опухолевых антигенов на злокачественных клетках, убирают с поверхности злокачественных клеток молекулы МНС (главный комплекс гистосовместимости), привлекают в опухоль клетки-регуляторы (супрессоры), тормозящие иммунные реакции, экспрессируют на клеточной поверхности или выделяют в жидкую фазу факторы, которые либо блокируют функцию клеток иммунитета, либо индуцируют их гибель. Словом, злокачественные опухоли прибегают к целому ряду самых разнообразных ухищрений, чтобы уйти от иммунной атаки, заблокировать ее или вовсе не дать ей развиваться. В таких иммуносупрессивных условиях индуцировать иммунные реакции против антигенов опухоли непросто. Необходимо предпринять специальные меры: обеспечить высвобождение антигенов опухоли и презентацию антигенных эпитопов в комплексе с МНС-I и МНС-II на поверхности профессиональных антиген-презентирующих клеток (МФ, ДК), активировать антиген-презентирующие клетки, чтобы на их поверхности появились коактивационные рецепторы CD40, CD80, CD86, необходимые для индукции ответа когнитивных Т-клеток, стимулировать продукцию антиген-презентирующими клетками цитокинов, которые необходимы для полноценной активации Т-клеток, распознавших антиген и получивших коактивационный сигнал через контакт с CD40, CD80, CD86. Наконец, для развития полноценной адаптивной иммунной реакции на антигены опухоли необходимо преодолеть иммуносупрессию, которая сформирована прогрессивно растущей опухолью.

Прямое действие использованного нами агониста TLR4 КППГ направлено на МФ и ДК [14, 17, 26]. Ранее мы доказали, что КППГ включает противоопухолевую программу в ДК и МФ. Этот агонист TLR4 повышает экспрессию коактивационных молекул CD40, CD80, CD86, МНС-II на поверхности ДК, стимулирует выра-

ботку иммуностимулирующих цитокинов и хемокинов (ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-8, моноцитарный хемотаксический фактор-1, макрофагальный воспалительный белок-1, RANTES) [15–20, 26]. Эти первичные клетки-мишени (ДК и МФ) с помощью своих цитокинов могут активировать противоопухолевые свойства вторичных клеток-мишеней – гранулоцитов и НК-клеток [12]. Вместе взятые указанные активационные процессы во всех звеньях врожденного иммунитета могут усиливать антиген-специфические адаптивные иммунные реакции, в том числе против опухоли.

Мы пока не установили, каким образом такие фармакодинамические механизмы КПП, активирующие врожденные и адаптивные иммунные реакции, позволяют ликвидировать метастатические КОЕ в легких и в других органах мыши. Любопытно, что без резекции первичной опухоли инъекции этого агониста TLR4 были не способны подавить или хотя бы замедлить рост опухолей 4Т1 у мышей BALB/c (рис. 1В, Г). Только после резекции первичной опухоли эффект экспериментального лечения агонистом TLR4 проявился со всей силой. Это доказывалось отсутствием метастатических клеток в легких мышей, ответивших на терапию агонистом КПП полным выздоровлением. Мы полагаем, что резекция первичной опухоли, во-первых, уменьшала опухолевую нагрузку, во-вторых, снижала общее иммуносупрессивное влияние карциномы 4Т1 на организм мыши, в-третьих, ликвидировала источник новых метастатических клеток-мигрантов, способных образовывать новые колонии в удаленных тканях. Только в этих условиях активация МФ и ДК *in situ*, непосредственно в тканях, куда добрались метастатические КОЕ, была способна предотвратить образование и рост метастатических опухолей, что в конечном счете привело к полному выздоровлению 20 % животных и значительному пролонгированию жизни остальных 80 % животных, получавших экспериментальное лечение, состоявшее в хирургическом удалении первичной опухоли и последующей иммунотерапии агонистом TLR4.

Налицо факт выздоровления части мышей от абсолютно летальной метастатической болезни при карциноме 4Т1 в результате лечения агонистом TLR4 КПП, который активирует ДК и МФ. Это может означать, что перепрограммированные ДК и МФ способны убивать клетки карциномы 4Т1 в диссеминированных метастатических узлах. Другой возможный сценарий состоит в том, что перепрограммированные ДК и МФ могли эффективно инициировать адаптивные иммунные реакции против антигенов опухоли 4Т1, а адаптивные механизмы, опосредованные Т-клетками и антителами, обеспечили элиминацию опухолевых метастазов.

Наши данные об эффективной экспериментальной иммунотерапии агонистом TLR4 КПП после хирургического удаления основной опухоли дают основания для дальнейших исследований, чтобы подобные лечебные эффекты могли быть достигнуты и в клинической практике при лечении пациентов с онкологическими заболеваниями.

Выводы

1. Самостоятельное применение TLR4-агониста КПП для лечения метастатической карциномы не оказывает значительного влияния на скорость роста первичной опухоли, процесс метастазирования и выживаемость мышей-опухоленосителей.

2. Применение TLR4-агониста КПП после хирургической резекции первичной карциномы для лечения абсолютно летальной метастатической болезни имеет высокую эффективность.

Вклад авторов. Ушакова Е.И. – постановка эксперимента, анализ результатов; Лебедева Е.С. – анализ данных, участие в написании статьи; Багаев А.В. – анализ противоопухолевой активности макрофагов и дендритных клеток; Пичугин А.В. – проточная цитометрия, анализ и обсуждение полученных данных; Атауллаханов Р.И. – идея, план исследования, анализ результатов, написание статьи.

■ Литература

1. Zhou J., Dudley M.E., Rosenberg S.A., Robbins P.F. Selective growth, *in vitro* and *in vivo*, of individual T cell clones from tumor-infiltrating lymphocytes obtained from patients with melanoma. *J Immunol.* 2004; 173 (12): 7622–9. PMID: 15585890. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7622>
2. Wang M., Shu X., Li M., Zhang Y., Yao Y., Huang X., Wei P., He Z., Lu J., Ying Y. A novel strategy conjugating PD-L1 polypeptide with doxorubicin alleviates chemotherapeutic resistance and enhances immune response in colon cancer. *Res Sq.* 2021; 1–19. DOI: <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-420385/v1>
3. Ostrand-Rosenberg S., Horn L.A., Alvarez J.A. Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2016; 176: 139–48. PMID: 25792524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-015-1677-5>
4. O'Day S.J., Hamid O., Urba W.J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer.* 2007; 110: 2614–27. PMID: 18000991. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23086>
5. Mullins S.R., Vasilakos J.P., Deschler K., Grigsby I., Gillis P., John J., Elder M.J., Swales J., Timosenko E., Cooper Z., Dovedi S.J., Leishman A.J., Luheshi N., Elvecrog J., Tilahun A., Goodwin R., Herbst R., Tomai M.A., Wilkinson R.W. Intratumoral immunotherapy

with TLR7/8 agonist MEDI9197 modulates the tumor microenvironment leading to enhanced activity when combined with other immunotherapies. *J Immunother Cancer.* 2018; 8: 711. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-711>

6. Miliotou A.N., Papadopoulou L.C. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2018; 19: 5–18. PMID: 29667553. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>
7. Gellrich F., Schmitz M., Beissert S., Meier F. Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma – An Update. *J Clin Med.* 2020; 9 (1): 223. PMID: 31947592. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9010223>
8. Bhatia S., Miller N.J., Lu H., Longino N.V., Ibrani D., Shinohara M.M., Byrd D.R., Parvathaneni U., Kulikauskas R., Ter Meulen J., Hsu F.J., Koelle D.M., Nghiem P. Intratumoral G100, a TLR4 agonist, induces antitumor immune responses and tumor regression in patients with merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2020; 25 (4): 1185–95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0469>. Intratumoral
9. Wei R., Liu S., Zhang S., Min L., Zhu S. Cellular and extracellular components in tumor microenvironment and their application in early diagnosis of cancers. *Anal Cell Pathol.* 2020; 2020: 6283796. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/6283796>

10. Kaufman H.L., Wolchok J.D. General Principles of Tumor Immunotherapy. Basic and clinical applications of tumor immunology. Springer Netherlands. 2008, 503 p. ISBN 978-1-4020-6086-1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6087-8>
11. Атауллаханов Р.М., Пичугин А.В., Мельникова Т.М., Хаитов Р.М. Способ получения вещества, обладающего иммуностимулирующей, противовирусной и антибактериальной активностью, вещество, полученное этим способом, и фармацевтическая композиция на его основе. Патент РФ 2195308, приоритет от 16.11.2001, зарегистрирован в Государственном реестре изобретений 27.12.2002.
12. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., Davtyan A., Novakimyan A., Tukhvatulin A., Davtyan H., Shcheblyakov D., Logunov D., Chulkina M., Savilova A., Trofimov D., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ataulakhanov R.I. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. *J Translational Medicine*. 2014; 12 (1): 322. PMID: 25432242. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-014-0322-y>
13. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Шишкова Н.М., Мастер-нак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ульянова Л.И., Стеценко О.Н. Клеточные механизмы иммуномодулирующего действия препарата «Иммуномакс». *Иммунология*. 2005; 26 (2): 111–20.
14. Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataulakhanov R.I. Anti-cancer mechanisms in two murine bone marrow-derived DC subsets activated with Toll-like receptor 4 agonists. *J Immunol*. 2019; 200 (8): 2656–69. PMID: 29500244. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1701126>. Anti-cancer
15. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Гараева А.Я., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Кооперативное взаимодействие сигнальных путей рецепторов TLR4, TLR9 и NOD2 в макрофагах мыши. *Иммунология*. 2018; 39 (1): 4–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-4-11>
16. Lebedeva E., Bagaev A., Pichugin A., Chulkina M., Lysenko A., Tutykhina I., Shmarov M., Logunov D., Naroditsky B., Ataulakhanov R. The differences in immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector. *BMC immunology*. 2018; 19 (1): 26. PMID: 30055563. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12865-018-0264-x>
17. Никонова А.А., Пичугин А.В., Чулкина М.М., Лебедева Е.С., Гайсина А.Р., Шиловский И. П., Атауллаханов Р.И., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Иммуномакс – агонист TLR4 – влияет на фенотип легочных макрофагов при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у мышей. *Acta Naturae*. 2018; 10 (4): 95–99. PMID: 30713767.
18. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Синергическое усиление транскрипции генов интерферонов 1-го типа и цитокинов при активации макрофагов и дендритных клеток сочетанием двух агонистов PRR. *Иммунология*. 2017; 38 (1): 64–71. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-1-64-71>
19. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М., Атауллаханов Р.И. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. *Иммунология*. 2017; 38 (2): 118–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-118-123>
20. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. NF-KB-, но не MAPK сигнальный путь определяет синергический ответ макрофагов на одновременную активацию двух типов рецепторов TLR4 + NOD2 или TLR9 + NOD2. *Иммунология*. 2017; 38 (2): 76–82. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-76-82>
21. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Лысенко А.А., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Атауллаханов Р.И. Механизмы усиления агонистами TLR4 экспрессии целевого белка в составе аденовирусного вектора в антигенпрезентирующих клетках. *Иммунология*. 2017; 38 (6): 295–306. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-6-295-306>
22. Багаев А.В., Пичугин А.В., Лебедева Е.С., Лысенко А.А., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М., Гинцбург А.Л. Влияние TLR-агонистов на экспрессию в антигенпрезентирующих клетках целевого белка-антигена, закодированного в аденовирусном векторе экспрессии целевого белка в составе аденовирусного вектора в антигенпрезентирующих клетках. *Иммунология*. 2015; 36 (4): 188–95.
23. Demicheli R., Abbattista A., Miceli R., Valagussa P., Bonadonna G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: Further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat*. 1996; 41 (2): 177–85. PMID: 8944336. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01807163>
24. Saphner T., Tormey D.C., Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol*. 1996; 14 (10): 2738–46. PMID: 8874335. DOI: <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.1996.14.10.2738>
25. Karrison T.G., Ferguson D.J., Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91 (1): 80–5. PMID: 9890174. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/91.1.80>
26. Пичугин А.В., Багаев А.В., Чулкина М.М., Бержицкая Д.А., Шишкова Н.М., Атауллаханов Р.И. Иммуномодулятор «Иммуномакс» активизирует дендритные клетки. *Иммунология*. 2015; 36 (4): 200–5.

■ References

1. Zhou J., Dudley M.E., Rosenberg S.A., Robbins P.F. Selective Growth. *In vitro* and *in vivo*, of individual T cell clones from tumor-infiltrating lymphocytes obtained from patients with melanoma. *J Immunol*. 2004; 173 (12): 7622–9. PMID: 15585890. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7622>
2. Wang M., Shu X., Li M., Zhang Y., Yao Y., Huang X., Wei P., He Z., Lu J., Ying Y.A. Novel strategy conjugating PD-L1 polypeptide with doxorubicin alleviates chemotherapeutic resistance and enhances immune response in colon cancer. *Res Sq*. 2021; 1–19. DOI: <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-420385/v1>
3. Ostrand-Rosenberg S., Horn L.A., Alvarez J.A. Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 176: 139–48. PMID: 25792524. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-015-1677-5>
4. O'Day S.J., Hamid O., Urba W.J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer*. 2007; 110: 2614–27. PMID: 18000991. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23086>
5. Mullins S.R., Vasilakos J.P., Deschler K., Grigsby I., Gillis P., John J., Elder M.J., Swales J., Timosenko E., Cooper Z., Dovedi S.J., Leishman A.J., Luheshi N., Elvecrog J., Tilahun A., Goodwin R., Herbst R., Tomai M.A., Wilkinson R.W. Intratumoral immunotherapy with TLR7/8 agonist MEDI9197 modulates the tumor microenvironment leading to enhanced activity when combined with other immunotherapies. *J Immunother Cancer*. 2018; 8: 711. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-711>
6. Miliotou A.N., Papadopoulou L.C. CAR T-cell therapy: a new era in cancer immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018; 19: 5–18. PMID: 29667553. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1389201019666180418095526>
7. Gellrich F., Schmitz M., Beissert S., Meier F. Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma – An Update. *J Clin Med*. 2020; 9 (1): 223. PMID: 31947592. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9010223>
8. Bhatia S., Miller N.J., Lu H., Longino N.V., Ibrani D., Shinohara M.M., Byrd D.R., Parvathaneni U., Kulikauskas R., Ter Meulen J., Hsu F.J., Koelle D.M., Nghiem P. Intratumoral G100, a TLR4 agonist, induces antitumor immune responses and tumor regression in patients with merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2020; 25 (4): 1185–95. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0469>. Intratumoral
9. Wei R., Liu S., Zhang S., Min L., Zhu S. Cellular and extracellular components in tumor microenvironment and their application in early diagnosis of cancers. *Anal Cell Pathol*. 2020; 2020: 6283796. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/6283796>
10. Kaufman H.L., Wolchok J.D. General Principles of Tumor Immunotherapy. Basic and Clinical Applications of Tumor Immunology. Springer Netherlands. 2008, 503 p. ISBN 978-1-4020-6086-1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6087-8>
11. Ataulakhanov R.I., Pichugin A.V., Mel'nikova T.M., Khaikov R.M. A method of producing a substance with immunostimulating, antiviral and antimicrobial activity, a substance produced by this method and its pharmaceutical compositions. Russian Patent Application RU 2195308, priority date: November 11, 2001. (in Russian)

12. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., Davtyan A., Hovakimyan A., Tukhvatulin A., Davtyan H., Shcheblyakov D., Logunov D., Chulkina M., Savilova A., Trofimov D., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ataulakhanov R.I. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. *J Translational Medicine*. 2014; 12 (1): 322. PMID: 25432242. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-014-0322-y>

13. Ataulakhanov R.I., Pichugin A.V., Shishkova N.M., Master-nak T.B., Malkina E.Yu., Ulyanova L.I., Stetsenko O.N. Cellular mechanisms of immunomodulating action of «Immunomax». *Immunologiya*. 2005; 2: 111–20. (in Russian)

14. Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataulakhanov R.I. Anti-cancer mechanisms in two murine bone marrow-derived DC subsets activated with Toll-like receptor 4 agonists. *J Immunol*. 2019; 200 (8): 2656–69. PMID: 29500244. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1701126>. Anti-cancer

15. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Garaeva A.Y., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. The cooperative interaction of TLR4-, TLR9- and NOD2-signaling pathways in mouse macrophages. *Immunologiya*. 2018; 39 (1): 4–11. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-4-11> (in Russian)

16. Lebedeva E., Bagaev A., Pichugin A., Chulkina M., Lysenko A., Tutykhina I., Shmarov M., Logunov D., Naroditsky B., Ataulakhanov R. The differences in immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector. *BMC immunology*. 2018; 19 (1): 26. PMID: 30055563. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12865-018-0264-x>

17. Nikonova A., Pichugin A., Chulkina M., Lebedeva E., Gaisina A., Shilovskiy I., Ataulakhanov R., Khaitov M., Khaitov R. The TLR4 Agonist Immunomax Affects the Phenotype of Mouse Lung Macrophages during Respiratory Syncytial Virus Infection. *Acta Naturae*. 2018; 10 (4): 95–9. PMID: 30713767. (in Russian)

18. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. Synergistic activation of gene transcription encoding type I interferons and cytokines in macrophages and dendritic cells by the combinations of two PRR-agonists. *Immunologiya*. 2017; 38 (1): 64–71. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-1-64-71> (in Russian)

Сведения об авторах

Ушакова Екатерина Игоревна – мл. науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ekaterina.ushakova95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2143-1021>

Лебедева Екатерина Семеновна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ekaterinalebedeva2612@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

Багаев Александр Владиславович – науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: bavmofc@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8680-854X>

Пичугин Алексей Васильевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: pichalvas@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

Атауллаханов Равшан Иноятович – д-р мед. наук, проф., руководитель отдела иммунной биотехнологии, зав. лаб. активации иммунитета отдела иммунной биотехнологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>

19. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Lebedeva E.S., Chulkina M.M., Ataulakhanov R.I. Synergistic cytokine production by murine dendritic cells in response to their simultaneous activation with pairs of agonists of different innate immune receptors. *Immunologiya*. 2017; 38 (1): 118–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-118-123> (in Russian)

20. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Ataulakhanov R.I. NF-κB-, but not MAPK-signaling pathway determines synergistic response of macrophages to the simultaneous activation of two types receptors TLR4 + NOD2 or TLR9 + NOD2. *Immunologiya*. 2017; 38 (2): 76–82. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-76-82> (in Russian)

21. Lebedeva E.S., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Pichugin A.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Naroditsky B.S., Ataulakhanov R.I. Mechanisms of TLR4 agonists enhance the expression of target protein in the composition of the adenoviral vector into antigen presenting cells. *Immunologiya*. 2017; 38 (6): 295–306. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-6-295-306> (in Russian)

22. Bagaev A.V., Pichugin A.V., Lebedeva E.S., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Naroditsky B.S., Ataulakhanov R.I., Khaitov R.M., Gintsburg A.L. Influence of TLR-agonists on expression by antigen-presenting cells of the target protein antigen encoded in adenoviral vector. *Immunologiya*. 2015; 36 (4): 188–95. (in Russian)

23. Demicheli R., Abbattista A., Miceli R., Valagussa P., Bonadonna G. Time distribution of the recurrence risk for breast cancer patients undergoing mastectomy: Further support about the concept of tumor dormancy. *Breast Cancer Res Treat*. 1996; 41 (2): 177–85. PMID: 8944336. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01807163>

24. Saphner T., Tormey D.C., Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol*. 1996; 14 (10): 2738–46. PMID: 8874335. DOI: <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.1996.14.10.2738>

25. Karrison T.G., Ferguson D.J., Meier P. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst*. 1999; 91 (1): 80–5. PMID: 9890174. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/91.1.80>

26. Pichugin A.V., Bagaev A.V., Chulkina M.M., Berzhitskaya D.A., Shishkova N.M., Ataulakhanov R.I. Immunomodulator «Immunomax» activates dendritic cells. *Immunologiya*. 2015; 36 (4): 200–5. (in Russian)

Authors' information

Ekaterina I. Ushakova – Junior Researcher, Immunity Activation Lab., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ekaterina.ushakova95@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2143-1021>

Ekaterina S. Lebedeva – PhD, Senior Researcher, Immunity Activation Lab., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ekaterinalebedeva2612@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0384-9299>

Alexander V. Bagaev – Researcher, Immunity Activation Lab., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: bavmofc@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8680-854X>

Alexey V. Pichugin – PhD, Leader Researcher, Immunity Activation Lab., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: pichalvas@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-5356-3331>

Ravshan I. Ataulakhanov – MD, PhD, Prof., Head of Department of Immune Biotechnology, Head of Immunity Activation Lab., NRC Institute of Immunology of FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4767-6409>