



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2022.02); G01N 33/574 (2022.02); A61B 5/00 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2021139678, 29.12.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.12.2021Дата регистрации:  
11.05.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.12.2021

(45) Опубликовано: 11.05.2022 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул.  
Ленинградская, 70, ФГБУ "РНЦРХТ", Попова  
Алена Александровна

(72) Автор(ы):

Молчанов Олег Евгеньевич (RU),  
Майстренко Дмитрий Николаевич (RU),  
Гранов Дмитрий Анатольевич (RU),  
Попова Алена Александровна (RU),  
Семёнов Константин Николаевич (RU),  
Шаройко Владимир Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Российский научный центр  
радиологии и хирургических технологий  
имени академика А.М. Гранова"  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2403056 C1, 10.11.2010. RU  
2551232 C1, 20.05.2015. RU 2757590 C1,  
19.10.2021. RU 2616532 C1, 17.04.2017. WO  
2021107792 A1, 03.06.2021. WO 2016073380 A1,  
12.05.2016. Л.П. Гиголаева и др. Оценка  
эффективности неоадьювантной  
химиотерапии у больных с местно-  
распространенным BRCA-ассоциированным  
раком молочной железы. Злокачественные  
опухоли. Том (см. прод.)

(54) Способ оценки чувствительности опухоли к иммуноонкологическим препаратам

(57) Реферат:

Способ оценки чувствительности опухоли к иммуноонкологическим препаратам относится к медицине, точнее к онкологии, и может найти применение при лечении злокачественных новообразований. Способ заключается в том, что перед проведением лечения иммуноонкологическими препаратами у больного в крови (КР) и микроокружении (М) опухоли определяют относительное содержание Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+CD127-), активированных цитотоксических лимфоцитов (CD8+HLADR+), спонтанную продукцию IL-8 и

IL-10, индуцированную продукцию TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , затем по полученным значениям рассчитывают коэффициенты: K1 = TREG-M/TREG-KP; K2 = ЦТЛ-KP/ЦТЛ-M; K3 = IL-8-M/IL-8-KP; K4 = IL-10-M/IL-10-KP; K5 = IFN- $\gamma$ -KP/IFN- $\gamma$ -M; K6 = TNF- $\alpha$ -KP/TNF- $\alpha$ -M. При значении всех коэффициентов менее или равных 2 опухоль расценивается как чувствительная к иммуноонкологическим препаратам, а при повышении одного и/или более коэффициентов выше 2 опухоль расценивается как нечувствительная. Способ позволяет прогнозировать чувствительность опухоли к

иммуноонкологическим препаратам за счет четкого алгоритма действий, а также повысить

эффективность лечения за счет выбора наиболее адекватного варианта терапии. 4 табл.

(56) (продолжение):

8, N 3s1, 2018, с. 29-36. Wang L., Simons D.L., Lu X. et al., Connecting blood and intratumoral Treg cell activity in predicting future relapse in breast cancer. Nat. Immunol. 2019; 20 (9): 1220-1230.

R U 2 7 7 1 7 6 0 C 1

R U 2 7 7 1 7 6 0 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*G01N 33/574* (2006.01)  
*A61B 5/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/50 (2022.02); G01N 33/574 (2022.02); A61B 5/00 (2022.02)*(21)(22) Application: **2021139678, 29.12.2021**(24) Effective date for property rights:  
**29.12.2021**Registration date:  
**11.05.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **29.12.2021**(45) Date of publication: **11.05.2022 Bull. № 14**

Mail address:

**197758, Sankt-Peterburg, pos. Pesochnyj, ul.  
Leningradskaya, 70, FGBU "RNTSRKHT", Popova  
Alena Aleksandrovna**

(72) Inventor(s):

**Molchanov Oleg Evgenevich (RU),  
Maistrenko Dmitrii Nikolaevich (RU),  
Granov Dmitrii Anatolevich (RU),  
Popova Alena Aleksandrovna (RU),  
Semenov Konstantin Nikolaevich (RU),  
Sharoiko Vladimir Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe biudzhethnoe  
uchrezhdenie "Rossiiskii nauchnyi tsentr  
radiologii i khirurgicheskikh tekhnologii imeni  
akademika A.M. Granova" Ministerstva  
zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)**(54) **METHOD FOR ASSESSING THE SENSITIVITY OF A TUMOR TO IMMUNO-ONCOLOGICAL DRUGS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method for assessing the sensitivity of a tumor to immuno-oncological preparations refers to medicine, more specifically to oncology, and can be used in the treatment of malignant neoplasms. The method consists in the fact that before treatment with immuno-oncological drugs in a patient in the blood (B) and microenvironment (M) of the tumor, the relative content of T-regulatory cells (CD4+CD25+CD127-), activated cytotoxic lymphocytes (CD8+HLADR+), spontaneous production of IL-8 and IL-10, induced production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , then coefficients are calculated from the obtained values:

C1 = TREG-M/TREG-B;

C2 = CTL-B/CTL-M;

C3 = IL-8-M/IL-8-KP;

C4 = IL-10-M/IL-10-KP;

C5 = IFN- $\gamma$ -B/IFN- $\gamma$ -M;C6 = TNF- $\alpha$ -B/TNF- $\alpha$ -M.

If the value of all coefficients is less than or equal to 2, the tumor is regarded as sensitive to immuno-oncological drugs, and if one and/or more coefficients increase above 2, the tumor is regarded as insensitive.

EFFECT: method makes it possible to predict the sensitivity of a tumor to immuno-oncological drugs due to a clear algorithm of actions, as well as to increase the effectiveness of treatment by choosing the most appropriate therapy option.

1 cl, 4 tbl

Изобретение относится к медицине, точнее к онкологии, и может найти применение при лечении злокачественных новообразований.

Иммуноонкологические препараты в настоящее время являются наиболее интенсивно изучаемой и перспективной группой лекарственных средств для лечения различных  
5 опухолей. Мишенями для них выступают ко-ингибирующие молекулы и их лиганды. Большинство зарегистрированных препаратов относятся к ингибиторам PD-1/PD-L1.

PD-1 - ко-ингибирующая молекула, регулирующая функции компонентов врожденного и адаптивного иммунного ответа. Она экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, МФ (макрофаги), моноцитов, DC (дендритные клетки).  
10 В физиологических условиях она способствует формированию толерантности к аутоантигенам, в микроокружении опухоли - опухолевой иммунологической толерантности (Blood. 2009; 114 (8): 1537-1544). Лиганд PD-1 (PD-L1) - трансмембранный белок, который экспрессируется как на опухолевых, так и на иммунокомпетентных клетках (Т, В - лимфоциты, DC, МФ). Взаимодействие PD-1/PD-L1 приводит к  
15 деактивации Т-лимфоцитов, активации Т-регуляторных клеток и персистенции опухолевых клеток (Immunogenetics. 2018; 70 (2): 73-86). Экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках является предиктором благоприятного прогноза и маркером чувствительности к химиотерапии. Экспрессия PD-L1 на лимфоцитах в микроокружении является маркером чувствительности к блокаторам ко-ингибирующих молекул и показанием к их  
20 применению.

В настоящее время в Российской Федерации используются пять препаратов, относящихся к ингибиторам PD-1/PD-L1: Пембролизумаб, Ниволумаб, Атезолизумаб, Авелумаб, Дурвалумаб.

Пембролизумаб (Китруда) - IgG<sub>4</sub> - анти - PD1 антитело. Зарегистрирован более, чем  
25 в 60 странах мира. Применяется у больных раком легкого, злокачественной меланомой и почечно-клеточным раком. В отдельных случаях может применяться при местно-распространённым и метастатическим переходно-клеточным раком мочевого пузыря во второй линии после прогрессирования на фоне платино-содержащих  
30 химиотерапевтических режимов и в первой линии при наличии противопоказаний к использованию препаратов платины и экспрессии PD-L1 на иммунных клетках.

Атезолизумаб (Тецентрик) - гуманизированное IgG<sub>1</sub> анти-PD-L1 моноклональное антитело. Применяется у больных со злокачественной меланомой, печеночно-клеточным раком, почечно-клеточным раком, местно-распространённым и метастатическим  
35 переходно-клеточным раком по тем же показаниям, что и Пембролизумаб. В ряде случаев по решению лечащего врача и врачебной комиссии при других патологиях.

Ниволумаб (Опдиво) - гуманизированное IgG<sub>4</sub> анти-PD-1 моноклональное антитело. Применяется у больных со злокачественной меланомой, почечно-клеточным и раком легкого.

Дурвалумаб (Инфинзи) - гуманизированное IgG<sub>4</sub> анти-PD-L1 моноклональное антитело. Применяется у больных местно-распространенным и метастатическим  
40 переходно-клеточным раком во II линии, а также при опухолях легкого.

Авелумаб (Бавенцио) - гуманизированное IgG<sub>1</sub> анти-PD-L1 моноклональное антитело. Применяется у больных местно-распространенным и метастатическим переходно-  
45 клеточным раком во II линии и меланомой.

К настоящему времени известно несколько групп методов, определяющих чувствительность к иммуноонкологическим препаратам. Среди них выделяется две группы. Первая связана с оценкой экспрессии молекулы - мишени на поверхности

опухолевых или клеток микроокружения, а также показателями, отражающими возможность образования неоантигенов: мутационная нагрузка и микросателлитная нестабильность. Вторая связана с оценкой баланса иммуностимулирующих и иммуносупрессивных компонентов в микроокружении опухоли или в крови.

5 Предиктором эффективности и показанием к применению иммуноонкологических препаратов является степень экспрессии PD-L1 на поверхности клеток микроокружения и/или опухолевых клеток. Экспрессия более чем на 5% клеток микроокружения или более чем на 10% опухолевых является предиктором эффективности лечения (N. Engl. J. Med. 2016; 375 (18): 1767-1778). В некоторых случаях оценка экспрессии PD-L1  
10 осуществляется в баллах с использованием тест-системы 22C3 (DAKO PharmaDx), в которой учитывается отношение PD-L1 на опухолевых клетках, лимфоцитах и макрофагах к общему числу детектируемых опухолевых клеток, помноженное на 100 (CPS, combined positive score). В этом случае предиктором эффективности является CPS  $\geq 10$  (Lancet Oncol. 2020; 21 (1): 44-59).

15 Известен способ предсказания эффективности иммунотерапии путем оценки мутационной нагрузки. Мутационная нагрузка (ТМБ, tumor mutational burden) рассчитывается как отношение общего числа мутаций на единицу генома. Потенциально мутационная нагрузка приводит к образованию новых антигенов и активации Т-клеточного ответа. Для некоторых опухолей, таких как меланома, колоректальный  
20 рак, рак легкого, мутационная нагрузка, определяемая методами сиквенса следующего поколения (NGS) является предиктивным маркером для иммуноонкологических препаратов, не связанным с PD-L1 статусом. Мутационная нагрузка коррелирует с частотой лимфоидной инфильтрации опухоли. Предиктором эффективности иммунотерапии для большинства опухолей является мутационная нагрузка более 10  
25 мут/МБ (2018; 7 (10): e1490854).

Известен способ предсказания эффективности иммунотерапии путем оценки микросателлитной нестабильности. Микросателлитная нестабильность (MSI, microsatellite instability) - фенотип, обусловленный дефицитом механизмов репарации ДНК (dMMR, deficient mismatch repair). MSI ассоциирована с высокой частотой образования  
30 неоантигенов, и, как следствие, чувствительностью к иммуноонкологическим препаратам. Некоторые варианты опухолей (колоректальный рак, рак эндометрия) характеризуются высокой частотой MSI (MSI -H: 20%-30%) (N. Engl. J. Med. 2015; 372 (26): 2509-2520).

Общий недостаток методов предсказания эффективности иммунотерапии за счет  
35 оценки экспрессии молекул-мишеней и мутаций, связанных с образованием неоантигенов, является отсутствию оценки влияния иммуносупрессивных компонентов, которые блокируют действия препаратов.

Известна группа методов предсказания эффективности иммунотерапии, связанная с оценкой баланса проканцерогенных и антиканцерогенных компонентов  
40 микроокружения на разных этапах взаимодействия. Согласно концепции «иммуноредактирования», постулированной Dunn G. с соавторами, можно выделить три фазы взаимодействия иммунной системы и опухоли: элиминация, равновесие и ускользание. Фаза элиминации представляет собой аналог «иммунологического надзора», описанного ранее. В этот период происходит распознавание и элиминация  
45 опухолевых клеток факторами врожденного и адаптивного иммунитета. Для фазы равновесия характерно наличие сформировавшихся опухолевых масс. Длительность ее от нескольких месяцев до десятков лет. В этот период факторы адаптивного иммунитета уничтожают часть опухолевых клеток, в результате чего клиническое

течение приобретает характер длительной стабилизации, появляются изменения сывороточной концентрации и функции периферических иммунологических компонентов. Фаза ускользания - финальный этап взаимодействия опухоли и иммунной системы. Она самая короткая и необратимая. В этот период реализуются все варианты иммуносупрессивных воздействий, включая продукцию гуморальных факторов (цитокины, хемокины, матриксные металлопротеиназы (ММР), галектины, ганглиозиды), повышение концентрации Treg, TAM (опухоль - ассоциированные макрофаги), клеток с высокой активностью IDO (индоламин-2,3 - диоксигеназа), а также потеря  $\zeta$ -цепи TCR (Т-клеточный рецептор), снижение экспрессии MHC I и эффекторных цитокинов (Nat. Immun. 2002; 3 (11): 991-998.93).

Изучение микроокружения опухоли является важным компонентом оценки прогноза заболевания. С клинической точки зрения микроокружение можно оценивать количественно, качественно, с учетом субпопуляционного состава, по наличию «иммунологической подписи», отражающей экспрессию группы генов, отвечающих за генерацию иммунного ответа, а также по присутствию третичных лимфоидных структур. Кроме того, в настоящее время имеется возможность оценивать концентрацию и продукцию цитокинов лимфоидными элементами крови и микроокружения.

Наличие лимфоидной инфильтрации, составляющей 50-60% от объема стромы, как правило, говорит о хорошем прогнозе и потенциальной чувствительности к иммуноонкологическим препаратам и химиотерапии.

Оценка субпопуляций клеток миелоидного и лимфоидного ряда как в периферической крови, так и в микроокружении является более точным методом оценки прогноза. Среди клеток лимфоидного ряда изучалась роль лимфоцитов (CTL, Treg, В-лимфоциты), миелоидного - моноцитов/макрофагов (M1,2), дендритных клеток (DC), супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). Прогностическое значение, кроме того, имеют компоненты врожденного иммунитета: натуральные киллеры (NK), нейтрофилы, эозинофилы (BMJ Cancer. 2018; 18 (1): 556).

К настоящему времени показано, что моноциты и клетки моноцитарной линии связаны с канцерогенезом, а также с прогнозом и эффективностью различных вариантов лечения. В микроокружении опухоли и периферической крови существует две субпопуляции МФ (макрофаги) - M1 и M2. M1 - классически активируемые МФ, поляризация которых из предшественников происходит под действием липополисахарида, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . M2 - сборное название группы клеток макрофагального ряда, индуцирующихся под влиянием IL-4, IL-13, IL-10, TGF- $\beta$ , Fc-рецепторов, комплемента и глюкокортикоидов. M2 образуются из моноцитов периферической крови, рекрутированных в очаг хемокиновыми лигандами (CCL-2, MCP-1), колоние-стимулирующими факторами (M-CSF, CSF-1) и сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), концентрация которых повышена в зонах с низким давлением кислорода. В зонах хронической гипоксии в макрофагах синтезируются гипоксия - индуцированные факторы (HIF-1 и HIF-2). Они дерепрессируют синтез ряда белков, повышающих ангиогенный потенциал опухоли (VEGF, bFGF, PDGF), инвазивный потенциал, метастазирование и EMT (MMP, CCL2, CCL18). Кроме того, в них отмечается избыточная экспрессия аргиназы (Arg) и IDO, снижающих концентрацию аргинина и триптофана, необходимых для нормального функционирования Т - лимфоцитов и NK (BMC Cancer. 2018; 18). В периферической крови больных концентрация M2 существенно выше по сравнению с M1, что коррелирует с коротким безрецидивным периодом. M2 макрофаги чаще встречаются в крови больных с отдаленными метастазами.

MDSC представляют собой гетерогенную группу клеток, образующихся из кроветворного предшественника - не зрелых миелоидных клеток (IMC, CD31+CD11b+CD15+). В норме созревание происходит в костном мозге и селезенке. В микроокружении опухоли под действием гуморальных факторов (VEGF, IL-3, IL-4, IL-6) и лигандов хемокинов (CXCL2, 5, 12; CCL2, 5) блокируется их дальнейшая дифференцировка, и они накапливаются в первичных и метастатических очагах. У человека выявляется две субпопуляции MDSC: гранулоцитарные MDSC (gMDSC, CD11b+CD14-CD15+CD33+) и моноцитарные MDSC (mMDSC, CD11b+CD14+CD15-CD33+HLADR-low). MDSC - ключевые компоненты в индукции иммуносупрессии на фоне хронического воспаления. За счет активных метаболитов кислорода и азота они индуцируют анергию эффекторных клеток, способствуя рекрутингу Treg в опухоль и поляризации предшественников МФ в сторону M2. Кроме того, они стимулируют ангиогенез и способствуют поддержанию популяции CSC (стволовые опухолевые клетки). Высокая концентрация MDSC коррелирует с объемом опухолевой массы. MDSC обладают предиктивной значимостью в плане эффективности химиотерапии и иммунотерапии. Вероятность положительного эффекта связана с увеличением соотношения gMDSC/mMDSC. Вместе с другими показателями (CTL (CD8+)) mMDSC являются положительным прогностическим фактором в отношении отдаленных результатов (Oncotarget. 2017; 8(2):3649-65).

DC (дендритные клетки) - это высокоспециализированная субпопуляция, основной функцией которой является поглощение, процессинг и презентация антигенов в составе главного комплекса гистосовместимости I и II типа (MHC I и II) в комбинации с ко-стимулирующими молекулами Th (CD4+) непосредственно, и опосредованно - CTL (цитотоксические лимфоциты). Их активация происходит под действием «сигналов опасности», исходящих от опухолевых клеток, включающих хемокины и неоантигены. «Созревание» DC, помимо презентации антигенов, включает экспрессию ко-стимулирующих молекул (CD40, ICAM I, CD80/86, CD83), секрецию широкого спектра цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) и миграцию в лимфатические узлы, где происходит запуск программы активации Th. У человека морфологически и функционально различают две субпопуляции DC: миелоидные (mDC) и плазмацитоидные (pDC). mDC - классические DC, имеющие фенотип CD11c+CD4+CD45RO+, экспрессирующие MHC I, II и запускающие иммунный ответ при контакте с растворимыми антигенами. pDC с фенотипом CD11c-CD4+CD45RA+CD123+ и экспрессией MHC I поглощают клеточно-ассоциированные антигены. Данные о прогностической и предсказательной роли DC у больных онкологических больных противоречивы. По данным ряда исследователей, их высокий уровень в крови является благоприятным прогностическим фактором в отношении общей выживаемости (Cancer Microenviron. Off J. Int. Cancer Microenviron. Soc. 2019; 12(23):119-132).

Treg - субпопуляция, составляющая примерно 5-10% от общего числа периферических лимфоцитов здорового человека и примерно 50% от популяции лимфоцитов с маркерами CD4+CD25+. Впервые описаны Sakaguchi et al. в 1995 году. В настоящее время им отводят ключевую роль в предотвращении развития аутоиммунных реакций и иммуносупрессии в процессе канцерогенеза. Среди CD4+CD25+ FoxP3 выделяются две субпопуляции.

Одна из них имеет фенотип CD4+CD25<sup>hi</sup>CTLA<sup>hi</sup>FoxP3 и образуется в тимусе из недифференцированных лимфоцитов, другая, с фенотипом CD4+CD25<sup>variable</sup>CTLA<sup>hi</sup>FoxP3, возникает из периферических Th под действием избыточной концентрации глюкокортикоидов, эстрогенов, IL-2 и TGF- $\beta$ . Однако по функциям они идентичны. Механизм действия их связан с контактным ингибированием, секрецией супрессорных цитокинов (IL-10, IL-35, TGF- $\beta$ ), а также прямым лизисом иммунокомпетентных клеток

(Cancer Microenviron. Off J. Int. Cancer Microenviron. Soc. 2019; 12(23):119-132).

НК (натуральные киллеры) образуются из общего лимфоидного предшественника в костном мозге, откуда в дальнейшем распространяются в первичные и вторичные лимфоидные органы, а также в легкие печень, кровь. У человека выявляются две

5 субпопуляции НК: CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> (цитокин-продуцирующая) и CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> (цитотоксическая). Кроме того, выделяют несколько групп НК в зависимости от степени зрелости, определяемой экспрессией маркеров CD27 и CD11b. Незрелые НК их не экспрессируют. В процессе созревания сначала появляется CD27, затем CD11b. НК с фенотипом CD27<sup>+</sup> обладают наилучшей способностью к секреции цитокинов, с фенотипом CD11b<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> максимальной цитолитической активностью. НК могут элиминировать клетки, не экспрессирующие МНС I, а этот механизм используют зрелые опухоли клетки и CSC для предотвращения атаки со стороны CTL. Потенциально НК являются наиболее эффективными клетками в борьбе с опухолью, но под действием факторов микроокружения (TGF- $\beta$ , аденозин) они приобретают фенотип CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> и начинают экспрессировать проангиогенные факторы (MMP9, VEGF), что повышает инвазивный потенциал и приводит к истощению Т-клеток. Под влиянием опухолевых клеток на мембране НК снижается экспрессия активирующих рецепторов (NKp30, NKG2D, DNAM1) и повышается экспрессия ингибирующих (NKG2A, CD85j) (113, 114). Низкое содержание НК в крови является предиктором низкой эффективности неoadьювантной химиотерапии при ТНРМЖ. Экспрессия CD 163 и CXCR4 в НК микроокружения является маркером раннего рецидива (Front. Immunol. 2019;10:1205).

Прогностическая значимость субпопуляций Т-лимфоцитов (Th, CD4<sup>+</sup>; CTL, CD8<sup>+</sup>) при разных опухолях отражена во многих публикациях. Преобладание в периферической крови зрелых форм по сравнению с недифференцированными (CD45RA<sup>+</sup>CD95- CD27<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>) и клетками памяти у больных с отдаленными метастазами является благоприятным фактором прогноза в отношении общей выживаемости и предиктором эффективности иммунотерапии (Int. J. Cancer. 2011; 131 (7): 1611-1620).

30 Существует еще одна популяция лимфоидных клеток, влияющих на канцерогенез и формирование иммуносупрессивного микроокружения - врожденные лимфоидные клетки (ILCs). ILCs возникают из общего лимфоидного предшественника с другими лимфоцитами. К настоящему времени выделяют три типа ILCs: ILC1s, ILC2s, ILC3s. Под действием IL-12, IL-15 и IL-18 ILC1s секретируют IFN- $\gamma$ , стимулируя МФ и DC; ILC2s секретируют IL-5, IL-9, IL-13 и амфирегулин, усиливая секреторную активность Treg; ILC3s стимулируют стромальные клетки. ILC1s обладают противоопухолевой активностью. ILC3s вместе со стромальными клетками стимулируют формирование лимфогенных метастазов (Cancer Res. 2017; 77(5):1083-1096).

В истории изучения чувствительности опухоли к иммунотерапии было предложено несколько классификаций, основанных на составе, плотности и локализации иммунокомпетентных клеток. Единственная классификация, которая вошла в широкую клиническую практику - иммунологический индекс, который используется для прогнозирования у больных колоректальным раком. Сущность его заключается в подсчете субпопуляций CD3<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в центре и инвазивном крае опухоли. Индекс варьирует от 0 (низкая плотность и отсутствие обоих типов клеток в обоих регионах) до 14 (высокая плотность и локализация обоих типов клеток в обоих регионах). В литературе эти два крайних варианта получили название «горячая» и «холодная» опухоль (J. Pathol. 2014; 232: 199-209).

Достоинством предложенной классификации является то. Что она проста в



применении и валидирована на больших популяциях. Недостатки связаны с тем, что учитывается влияние лишь иммуноактивирующих компонентов, в то время как абсолютное большинство исследований подтверждают, что иммуносупрессивные компоненты играют более существенную роль.

5 Позднее была предложена более совершенная классификация, включающая 4 подтипа опухолей с разными клеточными и молекулярно-биологическими характеристиками: 1) горячие опухоли: высокая степень инфильтрации Т-клетками, гиперэкспрессия ко-стимулирующих и ко-ингибирующих молекул: CTLA-4, TIM-3, LAG-3; 2) измененные иммуносупрессивные: инфильтрация Т-лимфоцитами низкая или отсутствует, присутствуют растворимые иммуносупрессивные медиаторы (IL-10, TGF-β), присутствуют MDSC, гиперэкспрессированы CTLA-4, TIM-3, LAG-3; 3) измененные иммуно-исключенные: инфильтрация Т-лимфоцитами отсутствует, выражены гипоксия и неоангиогенез, гиперэкспрессированы онкогены; 4) холодные опухоли: отсутствует инфильтрация Т-лимфоцитами, нет признаков реализации иммунного ответа (Nat. Rev. Drug. Discov. 2019; 18(3): 197-218).

Недостаток предложенной классификации заключается в том, что она имеет описательный характер. Авторами не предлагается алгоритм практического применения.

В классическом варианте генерация эффективного адаптивного иммунного ответа, включающая все этапы созревания DC и презентацию антигенов в составе MHC (главного комплекса совместимости) эффекторным клеткам, происходит во вторичных лимфоидных органах (селезенка, лимфатические узлы). Детальное изучение микроокружения позволило выявить, что непосредственно в опухоли образуются третичные лимфоидные органы (TLO), в которых дублируются эти процессы. TLO состоят из Т-зон, содержащих в большом количестве DC и В - герминогенных центров. В них происходит активация, пролиферация и дифференцировка Т и В клетки, в результате чего происходит образование CTL, эффекторных Th и В-клеток, продуцирующих антитела, а также клеток памяти. Структурно TLO схожи с лимфатическими узлами. Помимо зон созревания, они включают стромальные клетки и венулы с высоким эндотелием (HEV). TLO чаще локализуются по периферии опухоли (Front. In immunol. 2019; 10: 1398).

В большинстве проведенных исследований авторы приходят к выводу о том, что формирование TLO является благоприятным прогностическим фактором в отношении иммунотерапии при разных опухолях. Но методология исследования до настоящего времени не является универсальной. Поэтому в публикациях оцениваются разные компоненты TLO: плотность HEV, количество TLO в биоптате, субпопуляционный состав, профиль экспрессии генов. Это является существенным недостатком этого метода, не позволяющим широко внедрять его в практику.

Анализ паттерна экспрессии генов в микроокружении - один современных методов анализа, позволяющий предсказывать эффективность иммуно- и химиотерапии. В 2016 году Miller L.D. с соавторами провели анализ 22268 проб 314 больных. Они классифицировали опухоли на потенциально иммунологически активные (immune benefit-enabled, IBE, 179 человек) и иммунологически не активные (immune benefit-disabled, IBD, 135 человек). IBE характеризуются экспрессией генов, связанных с Th1 (Т-хелперы) поляризацией (IFNG, IRF1, STAT1), клеточно-опосредованной цитотоксичностью (GZMB, GNL1, PRF1, GZMH), хемоаттракцией (CXCL9, CXCL10, CX3CL1, CCL5), регуляцией активации CTL (CTLA-4, CD80, CD86) и адгезии (ICAM1); IBD - гиперэкспрессией TGFB1. Проанализировав профиль экспрессии генов, авторы выявили ключевые сигнальные пути, активированные в обоих подтипах: TNF-α и IFN-γ в IBE; TGF-β - в IBD. IBE является

благоприятным, а IBD - не благоприятны фактором прогноза в отношении безрецидивной выживаемости. IBE - предиктор хорошего ответа на иммунотерапию, IBD - плохого (Cancer Immunol. Res. 2016; 4 (7): 600-610).

В предложенном подходе существует два серьезных недостатка. Во-первых, на современном этапе анализ множественных мутаций в практической деятельности представляет собой сложную и дорогую задачу, что ограничивает его внедрение. Во-вторых, наличие мутаций в компонентах различных путей создает лишь условия для формирования иммуносупрессивного фенотипа, а реализуются они или нет, зависит от массы эпигенетических факторов и других компонентов микроокружения.

Наиболее близким к предлагаемому является способ, предложенный группой исследователей из США (Wang L., Simons D.L., Lu X. et al. Connecting blood and intratumoral T<sub>reg</sub> cell activity in predicting future relapse in breast cancer. Nat. Immunol. 2019; 20 (9): 1220-1230).

Авторы детально проанализировали биологический потенциал, прогностическую и предсказательную значимость внутриопухолевых и периферических Т-регуляторных клеток (Трег). К настоящему времени в литературе описано три субпопуляции Трег: Трег I (CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>lo</sup>), Трег II (CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>hi</sup>), Трег III (CD45RA<sup>+</sup>FOXP3<sup>lo</sup>). Во многих публикациях Трег II описываются также как клетки с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>.

На первом этапе исследователи продемонстрировали биологическую идентичность Трег в микроокружении опухоли и в крови. У 17% из 118 нелеченых больных раком мочевого пузыря в крови выявлялись Трег I, в 19% Трег II, и в 64% - Трег III. При этом в микроокружении 90% составляли Трег II, которые по своему биологическому потенциалу (фосфорилирование STAT1, STAT3, STAT5; экспрессия ферментов, способствующих реализации иммуносупрессивной функции (CD39, CD73), экспрессия ко-стимулирующих молекул (TIGIT, PD-1, CTLA-4, ICOS, GITR, CD134)) аналогичны выявляемым в крови.

На втором этапе авторы разработали методику оценки ответа лимфоцитов на цитокины с иммуносупрессивным эффектом (TGF-β, IL-10), а также на IFN-γ и IL-4. Активность TGF-β оценивалась по фосфорилированию компонентов сигнального пути SMAD2 и SMAD3, IL-10 - сигнального пути STAT1, IL-6 - STAT6 и IFN-γ - STAT3. Выявлено, что продолжительность безрецидивного периода достоверно выше в подгруппах больных, где культура лимфоцитов реагировала на IL-4 (p=0,008) и IFN-γ (p=0,01) по сравнению с подгруппами, где отмечалась реакция на TGF-β (p=0,007) и IL-10 (p=0,04).

На третьем этапе была разработана методика интегральной оценки реакции Трег на цитокиновые сигналы ее связь с результатами лечения. Авторы предложили использовать индекс цитокиновых сигналов (CSI, cytokine signaling index), который представляет собой сумму Z-оценок каждого из цитокинов: IL-4, IFN-γ, TGF-β, IL-10. Z-оценка - это мера относительного разброса, наблюдаемого или измеренного значения, которая показывает, сколько стандартных отклонений составляет его разброс

относительно среднего значения:  $Z = \frac{x - M}{S}$ , где x - значение параметра, M - среднее

значение, S - стандартное отклонение. Продemonстрировано, что CSI коррелирует со стадией заболевания, степенью дифференцировки и поражением лимфатических узлов. CSI коррелирует с вероятностью наступления раннего рецидива.

На заключительном этапе исследователи предложили методику оценки

иммуносупрессивной функции Трег в микроокружении опухоли. Они предположили, что для подавления эффектов других клеток необходимо контактное взаимодействие Трег с ними, что соответствует дистанции между ядрами клеток меньше 20 нм. В качестве критерия сравнения авторы взяли соотношение цитотоксических лимфоцитов (CD8+) и Трег, что является одной из признанных методик определения иммуносупрессивности микроокружения и чувствительности к иммуноонкологическим препаратам. Было продемонстрировано, что отношение CD8+ к числу Трег, ядра которых находятся ближе 20 нм к ядрам TAM (опухоль-ассоциированных макрофагов), pDC (плазмацитоидных дендритных клеток) и опухолевых клеток, четко коррелирует с отношением CD8+ к Трег. Таким образом, это показатель можно использовать для оценки иммуночувствительности опухоли.

Достоинство этого метода по сравнению с другими заключается в том, что он дает четкий алгоритм, позволяющий оценить чувствительность опухоли.

Но у метода, по нашему мнению, есть ряд существенных недостатков. Во-первых, он основан на анализе биологического потенциала только одного компонента микроокружения - Трег. Трег, безусловно, являются одними из ключевых клеток микроокружения, но не меньший вклад в формирование иммуносупрессивного потенциала вносят и другие клетки: M2 - макрофаги, MDSC, опухоль-ассоциированные фибробласты. Таким образом, выводы, построенные на оценке лишь одного типа клеток, не являются корректными. Во-вторых, в работе авторы основывают свои выводы на основе оценки индекса цитокиновых сигналов (CSI), который представляет собой сумму Z-оценок для каждого из цитокинов, что делает его применимым лишь в пределах изучаемой когорты, так как для других совокупностей данных Z-оценки потребую пересчета, что и пришлось делать авторам при анализе разных подгрупп. Таким образом, использование этого параметра не позволяет сделать методику универсальной. В-третьих, авторы предположили, что для реализации иммуносупрессивного потенциала Трег должны вступать в контактное взаимодействие с другими клетками. Авторы предложили использовать соотношение CD8+ лимфоцитов и Трег, находящимися в контакте с другими клетками (расстояние между ядрами должно было быть менее 20 нм) в качестве предиктора иммуносупрессии. В то же время, они подтверждают, что этот параметр полностью коррелирует с соотношением CD8+/Трег, не приводя аргументов в пользу преимуществ более сложной методики. Таким образом, представляется преждевременным рекомендовать использовать для прогноза подсчет Трег, находящихся в контакте с другими клетками.

Технический результат настоящего изобретения состоит в повышении эффективности лечения за счет точной оценки чувствительности опухоли к иммуноонкологическим препаратам до начала лечения.

Этот результат достигается тем, что в известном способе, включающем определение Т-регуляторных клеток в микроокружении опухоли и в крови, согласно изобретению, дополнительно определяют их относительное содержание в крови (ТРЕГ-КР) и микроокружении опухоли (ТРЕГ-М), и дополнительно определяют относительное содержание активированных цитотоксических лимфоцитов (CD8+HLADR+) в крови (ЦТЛ-КР) и микроокружении опухоли (ЦТЛ-М); спонтанную продукцию IL-8 и IL-10 в микроокружении опухоли (IL-8-М, IL-10-М) и культуре клеток крови (IL-8-КР, IL-10-КР); индуцированную продукцию IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в микроокружении опухоли (IFN- $\gamma$ -М, TNF- $\alpha$ -М) и культуре клеток крови (IFN- $\gamma$ -КР, TNF- $\alpha$ -КР), затем по полученным значениям рассчитывают коэффициенты:

$$K1 = \text{ТРЕГ-М} / \text{ТРЕГ-КР};$$

K2 = ЦТЛ-КР/ ЦТЛ-М;

K3 = IL-8-М/ IL-8-КР;

K4 = IL-10-М/ IL-10-КР;

K5 = IFN- $\gamma$ -КР / IFN- $\gamma$ -М;

5 K6 = TNF- $\alpha$ -КР / TNF- $\alpha$ -М;

и при значении всех коэффициентов менее или равных 2 опухоль расценивается как чувствительная к иммуноонкологическим препаратам, а при повышении одного и/или более коэффициентов выше 2 опухоль расценивается как нечувствительная.

10 Занимаясь профессионально в течение ряда лет лечением онкологических больных, мы изучали различные варианты иммунотерапии, а также фундаментальные и клинические аспекты взаимодействия опухоли и иммунной системы. На первом этапе нами предварительно проводилась оценка динамики иммунологических показателей с различными непосредственными результатами лечения. С 2016 года в клинической практике стали появляться иммуноонкологические препараты из группы ингибиторов 15 PD-1 и PD-L1: Пембролизумаб, Ниволумаб, Атезолизумаб, Авелумаб, Дюрвалумаб. Показаниями для их применения является экспрессия молекул-мишеней (PD-1/PD-L1) в опухолевой ткани или в, ряде случаев, даже без подтверждения экспрессии, когда это предполагается стандартами лечения (почечно-клеточный рак).

В клинических регистрационных исследованиях иммуноонкологических препаратов 20 показано, что они в ряде случаев оказываются не эффективными при наличии экспрессии молекул-мишеней, а в других наоборот, дают эффект даже при отсутствии таковой. Таким образом, вопрос о предсказании эффективности лечения при использовании иммуноонкологических препаратов остается открытым.

Мы изучали динамику иммунологических показателей в крови, а также особенности 25 микроокружения опухоли у больных на фоне положительного эффекта при использовании иммуноонкологических препаратов и при прогрессировании.

Анализы проводились в иммунологической лаборатории ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М.Никифорова МЧС России на лазерном проточном цитометре Cytomics FC 500 (BECKMAN COULTER Inc., USA) с использованием моноклональных антител и 30 расходных материалов компаний BECKMAN COULTER Inc., IMMUNOTECH S.A.S., ООО «Протеиновый контур» и ООО «Цитокин». Спектр исследуемых параметров и их референсные интервалы отражены в таблицах 1 (субпопуляции лимфоцитов периферической крови) и 2 (параметры цитокинового профиля).

Референсных пределов, отражающих концентрацию иммунокомпетентных клеток 35 и продукцию цитокинов, в настоящее время не существует. Оценка иммунологических параметров микроокружения осуществлялась теми же методами, что и в крови.

Алгоритм разработки метода определения чувствительности к иммуноонкологическим препаратам включал три этапа. На первом этапе проводился 40 однофакторный анализ, где в качестве переменных были включены все иммунологические параметры (таблицы 1, 2) периферической крови, а также ряд показателей в микроокружении: цитотоксические лимфоциты, Т-хелперы, натуральные киллеры, ТНК- клетки, Т-регуляторные клетки, а также цитокины (спонтанная и индуцированная продукция): IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ . На втором этапе проводился многофакторный анализ, в котором исключались взаимовлияющие 45 компоненты. На третьем этапе в многофакторный анализ были включены коэффициенты, отражающими отношение внутриопухолевой и периферической концентрации цитокинов. Результаты однофакторного и многофакторного анализа приведены в таблице 3 (параметры, связанные с длительностью безрецидивного периода).

Для разработки метода использованы данные 45 больных с разными нозологическими формами, включая почечно-клеточный (15 больных), меланому (8 больных), трижды негативный рак молочной железы (10 больных), инвазивный рак мочевого пузыря (12 больных). Для валидации использовалась группа клинически отслеженных больных (43 человека) с теми же нозологическими формами: почечно-клеточный (20 больных), меланому (6 больных), трижды негативный рак молочной железы (8 больных), инвазивный рак мочевого пузыря (9 больных).

В группе валидации (43 больных) при проведении лечения по стандартным показаниям в 30-50% случаях отмечено прогрессирование после первого цикла лечения. При оценке опухоли к иммуноонкологическим заболеваниям расхождение между прогнозом и наблюдаемой эффективностью лишь у двоих человек (таблица 4: расхождения между прогнозируемой эффективностью и клиническим ответом при использовании стандартных показаний и разработанного метода).

Сущность способа заключается в следующем.

Перед проведением лечения иммуноонкологическими препаратами у больного в крови (КР) и микроокружении (М) опухоли определяют относительное содержание Т-регуляторных клеток (CD4+CD25+CD127-), активированных цитотоксических лимфоцитов (CD8+HLADR+), спонтанную продукцию IL-8 и IL-10, индуцированную продукцию TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , затем по полученным значениям рассчитывают коэффициенты:

K1 = ТРЕГ-М/ ТРЕГ-КР;

K2 = ЦТЛ-КР/ ЦТЛ-М;

K3 = IL-8-М/ IL-8-КР;

K4 = IL-10-М/ IL-10-КР;

K5 = IFN- $\gamma$ -КР / IFN- $\gamma$ -М;

K6 = TNF- $\alpha$ -КР / TNF- $\alpha$ -М;

и при значении всех коэффициентов менее или равных 2 опухоль расценивается как чувствительная к иммуноонкологическим препаратам, а при повышении одного и/или более коэффициентов выше 2 опухоль расценивается как нечувствительная.

Далее больной получает лечения согласно принятым стандартам. Данные, полученные при использовании предлагаемого метода, могут быть учтены при коррекции тактики лечения по решению лечащего врача или врачебной комиссии.

К настоящему времени предложенный способ прошел клиническую апробацию у 88 больных. Данные 45 (почечно-клеточный рак - 15; меланома - 8; трижды негативный рак молочной железы - 10; инвазивный рак мочевого пузыря - 12) из них использовались для разработки метода и 43 (почечно-клеточный рак - 20; меланома - 6; трижды негативный рак молочной железы - 8; инвазивный рак мочевого пузыря - 9) - для валидации. Лишь у двоих больных наблюдалось расхождение предсказанной чувствительности к иммунотерапии и наблюдаемой эффективности.

Способ по сравнению с известными аналогами имеет ряд существенных преимуществ.

1. Позволяет с использованием четкого алгоритма прогнозировать чувствительность опухоли к иммуноонкологическим препаратам.

2. Основан на использовании современных достижений молекулярной биологии и клеточной иммунологии.

3. Позволяет повысить эффективность лечения за счет выбора наиболее адекватного варианта терапии.

Способ оценки чувствительности опухоли к иммуноонкологическим препаратам разработан в группе молекулярно-биологического прогнозирования и индивидуализации

лечения ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ и к настоящему времени прошел клиническую апробацию у 88 пациентов с положительным результатом.

(57) Формула изобретения

5 Способ оценки чувствительности опухоли к иммуноонкологическим препаратам, включающий определение у пациента Т-регуляторных клеток CD4+CD25+CD127- в микроокружении опухоли и крови, отличающийся тем, что дополнительно определяют их относительное содержание в крови (ТРЕГ-КР) и микроокружении опухоли (ТРЕГ-М) и дополнительно определяют относительное содержание активированных  
10 цитотоксических лимфоцитов (CD8+HLADR+) в крови (ЦТЛ-КР) и микроокружении опухоли (ЦТЛ-М); спонтанную продукцию IL-8 и IL-10 в микроокружении опухоли (IL-8-М, IL-10-М) и культуре клеток крови (IL-8-КР, IL-10-КР); индуцированную продукцию IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в микроокружении опухоли (IFN- $\gamma$ -М, TNF- $\alpha$ -М) и культуре клеток крови (IFN- $\gamma$ -КР, TNF- $\alpha$ -КР), затем по полученным значениям рассчитывают  
15 коэффициенты:

$$K1 = \text{ТРЕГ-М/ТРЕГ-КР};$$

$$K2 = \text{ЦТЛ-КР/ЦТЛ-М};$$

$$K3 = \text{IL-8-М/IL-8-КР};$$

$$K4 = \text{IL-10-М/IL-10-КР};$$

$$20 K5 = \text{IFN-}\gamma\text{-КР/IFN-}\gamma\text{-М};$$

$$K6 = \text{TNF-}\alpha\text{-КР/TNF-}\alpha\text{-М};$$

и при значении всех коэффициентов менее или равных 2 опухоль расценивается как чувствительная к иммуноонкологическим препаратам, а при повышении одного и/или более коэффициентов выше 2 опухоль расценивается как нечувствительная.

25

30

35

40

45

Таблица 1.

Фенотип	Субпопуляция лимфоцитов	Референсный интервал. Относительное содержание (%)	Референсный интервал. Абсолютное содержание ( $\times 10^9/\text{л}$ )
CD3+CD16-	Зрелые Т-лимфоциты	52 – 76	950 – 1800
CD3+CD8+	Цитотоксические лимфоциты	23 – 40	450 – 850
CD3+CD4+	Т-хелперы	31 – 46	570 – 1100
CD4+CD8+	Дубль-позитивные Т-клетки	0,1 – 1,1	5 – 15
CD3-CD16+CD56+	Натуральные киллеры	9 – 19	180 – 420
CD3-CD8+;	Активированные натуральные киллеры	1,5 – 6	18 – 150
CD16+CD56+HLA DR+		0 – 5	0 – 120
CD3+CD16+CD56+	TNK – Клетки	0,1 – 8	5 – 200
CD19+	В-лимфоциты	6 – 18	150 – 450
CD25+	Клетки с рецепторами к интерлейкину – 2	2 – 11	90 – 300
CD95+	Клетки с маркерами апоптоза	2 – 7	50 – 160
CD4+CD25+FoxP3	Т- регуляторные клетки (Treg)	0,3 – 10	0 – 110
CD3+ HLA DR+	Активированные Т-клетки	0 – 5	0 – 120
HLA DR+	Активированные антиген-презентирующие клетки	6 – 22	150 – 550
$\alpha\beta$ –Т	Альфа/бета Т - клетки	60 – 80	925 – 1965
$\gamma\delta$ – Т	Гамма/дельта Т – клетки	2 – 7	20 – 115

Референсный интервал содержания лимфоцитов периферической крови:  
относительное содержание – от 19 до 37 %, абсолютное – от 1200 до 2500  $\times 10^9/$

Таблица 2.

Цитокин	Референсный интервал		
	Спонтанная продукция	Индукцированная продукция	Концентрация в сыворотке
Интерлейкин-1 $\beta$ (IL-1, пг/мл)	0 – 50	1000 – 5000	0 – 50
Интерлейкин-2 (IL-2, пг /мл)	0 – 5	10 – 100	0
Интерлейкин-4 (IL-4, пг/мл)	0 – 50	100 – 400	0 – 50
Интерлейкин-6 (IL-6, пг/мл)	0 – 50	1000 – 3000	0 – 50
Интерлейкин-8 (IL-8, пг/мл)	0 – 100	1000 – 5000	0 – 50
Интерлейкин-10 (IL-10, пг/мл)	0 – 50	100 –400	0 – 50
Интерлейкин-12 (IL-12, пг/мл)	0 – 50	100 – 600	0 – 50
Интерферон- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ , пг/мл)	0 – 50	100 – 500	0 – 50
Интерферон- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ , пг/мл)	0 – 50	1000 – 5000	0 – 50
Фактор некроза опухолей- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ , пг/мл)	0 – 50	500 – 1500	0 – 50



Таблица 3.

Однофакторный анализ	Многофакторный анализ
IL-4 (спонтанная, индуцированная продукция, в сыворотке и микроокружении)	-
IL-6 (спонтанная, индуцированная продукция, в сыворотке и микроокружении)	-
IL-8 (спонтанная, индуцированная продукция в сыворотке и микроокружении)	К3 (IL-8-М/ IL-8-КР)
IL-10 (спонтанная, индуцированная продукция в сыворотке и микроокружении)	К4 (IL-10-М/ IL-10-КР)
TNF- $\alpha$ (спонтанная, индуцированная продукция в сыворотке и микроокружении)	К6 (TNF- $\alpha$ -КР / TNF- $\alpha$ -М)
IFN- $\gamma$ (спонтанная, индуцированная продукция в сыворотке и микроокружении)	К5 (IFN- $\gamma$ -КР / IFN- $\gamma$ -М)
CD4+CD25+FoxP3 (Т-регуляторные клетки)	К1 (ТРЕГ-М/ ТРЕГ-КР)
CD8+HLA DR+ (активированные цитотоксические лимфоциты)	К2 (ЦТЛ-КР/ ЦТЛ-М)

К1-2 – коэффициенты соотношения относительного содержания Т-регуляторных клеток и активированных цитотоксических лимфоцитов в крови (КР) и микроокружении (М); К3-4 – коэффициенты соотношений спонтанной продукции IL-8 и IL-10 в микроокружении опухоли и крови; К5-6 - коэффициенты соотношений индуцированной продукции TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в микроокружении опухоли и крови

Таблица 4.

Нозологическая форма	Число больных, получавших лечение по стандартным показаниям	Прогрессирование после первого цикла лечения	Расхождение с предсказанием по разработанной методике
Почечно-клеточный рак	20	8 (40%)	1
Меланома	6	3 (50%)	0
Трижды негативный рак молочной железы	8	4 (50%)	0
Инвазивный рак мочевого пузыря	9	3 (30%)	1