

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2024-20-1-114-123>

# Параметры опухолевого микроокружения как предиктор длительности клинической эффективности иммунотаргетной терапии при прогрессирующем или метастатическом раке эндометрия: пилотное многоцентровое наблюдательное исследование

А.А. Мальцева<sup>1</sup>, А.Ю. Калинин<sup>1</sup>, Н.В. Крахмаль<sup>1, 2</sup>, Н.М. Чернорубашкина<sup>3</sup>, Е.С. Мартынова<sup>4</sup>, Р.А. Зуков<sup>4</sup>, А.А. Гофман<sup>5</sup>, А.Б. Виллерт<sup>1</sup>, О.Н. Чуруксаева<sup>1</sup>, Л.А. Коломиец<sup>1, 2</sup>, Л.А. Таширева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»; Россия, 634009 Томск, Кооперативный переулок, 5;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634009 Томск, ул. Московский тракт, 2;

<sup>3</sup>ГБУЗ «Областной онкологический диспансер»; Россия, 664035 Иркутск, ул. Фрунзе, 32;

<sup>4</sup>КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского»; Россия, 660133 Красноярск, ул. 1-я Смоленская, 16;

<sup>5</sup>КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер»; Россия, 656045 Барнаул, Змеиногорский тракт, 110к

**Контакты:** Любовь Александровна Таширева [kleptsova@mail.ru](mailto:kleptsova@mail.ru)

**Введение.** Включение левватиниба в схему иммунотерапии у больных MSS/pMMR раком эндометрия (РЭ) обусловлено его способностью модулировать микроокружение опухоли, что позволяет использовать пембролизумаб в низкоиммунногенных опухолях. Тем не менее только у 30 % пациенток с прогрессирующим или метастатическим РЭ при комбинированном лечении пембролизумабом и левватинибом наблюдается клинический ответ. В связи с этим очевидна потребность в выявлении биомаркеров, позволяющих точно отбирать кандидаток для данного вида терапии.

**Цель исследования** – определение предикторной ценности субпопуляций лимфоцитов и макрофагов, экспрессии на них PD-1, экспрессии эстрогеновых рецепторов, а также плотности сосудов при иммунотаргетной терапии прогрессирующего или метастатического РЭ.

**Материалы и методы.** Проведено открытое нерандомизированное обсервационное ассоциативное исследование, включавшее в общей сложности 22 пациентки с прогрессирующим или метастатическим MSS/pMMR РЭ, которые получали терапию пембролизумабом и левватинибом. В качестве параметра для стратификации пациенток была использована продолжительность клинической эффективности. С помощью TSA-ассоциированной мультиплексной иммунофлуоресценции были проанализированы доли CD8+ Т-лимфоцитов, CD20+ В-лимфоцитов, FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и CD163+ макрофагов в образцах опухоли до начала иммунотаргетной терапии.

**Результаты.** Были обнаружены 3 параметра микроокружения, которые связаны с продолжительностью клинической эффективности: доля CD20+ В-лимфоцитов, доля FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении. Однако наибольшей предикторной ценностью обладало соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов, значение которого ниже 3,219 было ассоциировано с длительной клинической эффективностью у больных прогрессирующим или метастатическим РЭ.

**Выводы.** Соотношение цитотоксических и В-лимфоцитов в микроокружении является надежным предикторным маркером длительности периода клинической эффективности иммунотаргетной терапии при прогрессирующем или метастатическом РЭ.

**Ключевые слова:** рак эндометрия, иммунотаргетная терапия, предикторы ответа, выживаемость без прогрессирования

**Для цитирования:** Мальцева А.А., Калинин А.Ю., Крахмаль Н.В. и др. Параметры опухолевого микроокружения как предиктор длительности клинической эффективности иммунотаргетной терапии при прогрессирующем или метастатическом раке эндометрия: пилотное многоцентровое наблюдательное исследование. Опухоли женской репродуктивной системы 2024;20(1):114–23. DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2024-20-1-114-123>

## Tumor microenvironment parameters as a predictor of the duration of clinical effectiveness of immunotargeted therapy in advanced or metastatic endometrial cancer: A pilot multicenter observational study

A.A. Maltseva<sup>1</sup>, A.Yu. Kalinchuk<sup>1</sup>, N.V. Krakhmal<sup>1, 2</sup>, N.M. Chernorubashkina<sup>3</sup>, E.S. Martynova<sup>4</sup>, R.A. Zukov<sup>4</sup>, A.A. Gofman<sup>5</sup>, A.B. Villert<sup>1</sup>, O.N. Churuksaeva<sup>1</sup>, L.A. Kolomiets<sup>1, 2</sup>, L.A. Tashireva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativnyy Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia;

<sup>3</sup>Regional Oncology Dispensary; 32 Frunze St., Irkutsk 664035, Russia;

<sup>4</sup>Krasnoyarsk Regional Clinical Oncology Dispensary named after A.I. Kryzhanovskiy; 16 1-ya Smolenskaya St., Krasnoyarsk 660133, Russia;

<sup>5</sup>Altai Regional Oncology Dispensary; 10k Zmeinogorskiy Trakt, Barnaul 656045, Russia

**Contacts:** Lyubov Aleksandrovna Tashireva [lkleptsova@mail.ru](mailto:lkleptsova@mail.ru)

**Background.** The inclusion of lenvatinib in the immunotherapy regimen for patients with MSS/pMMR endometrial cancer (EC) is due to its ability to modulate the tumor microenvironment, which allows the use of pembrolizumab in low-immunogenic tumors. However, only 30 % of patients with advanced or metastatic EC have a clinical response when treated with pembrolizumab and lenvatinib. In this regard, there is an obvious need to identify biomarkers that allow accurate selection of candidates for this type of therapy.

**Aim.** To determine the predictive value of subpopulations of lymphocytes and macrophages, their expression of PD-1, expression of estrogen receptors, as well as vessel density in immunotargeted therapy for advanced or metastatic EC.

**Materials and methods.** An open-label non-randomized observational association study was performed, involving a total of 22 patients with advanced or metastatic MSS/pMMR EC treated with pembrolizumab and lenvatinib. Duration of clinical effectiveness was used as a parameter to stratify patients. Using TSA-associated multiplex immunofluorescence, the proportions of CD8+ T lymphocytes, CD20+ B lymphocytes, FoxP3+ T regulatory lymphocytes and CD163+ macrophages in tumor samples before the start of immunotargeted therapy were analyzed.

**Results.** Three microenvironmental parameters were found to be associated with duration of clinical efficacy: the proportion of CD20+ B cells, the proportion of FoxP3+ T regulatory lymphocytes, and the ratio of CD8+/CD20+ lymphocytes in the tumor microenvironment. However, the CD8+/CD20+ lymphocyte ratio had the greatest predictive value; a value below 3.219 was associated with long clinical efficacy in patients with advanced or metastatic EC.

**Conclusion.** The ratio of cytotoxic and B-lymphocytes in the microenvironment is a reliable predictor marker of the duration of the period of clinical effectiveness of immunotargeting therapy in advanced or metastatic EC.

**Keywords:** endometrial cancer, immunotargeted therapy, predictors of response, progression-free survival

**For citation:** Maltseva A.A., Kalinchuk A.Yu., Krakhmal N.V. et al. Tumor microenvironment parameters as a predictor of the duration of clinical effectiveness of immunotargeted therapy in advanced or metastatic endometrial cancer: A pilot multicenter observational study. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of Female Reproductive System* 2024;20(1):114–23. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2024-20-1-114-123>

### Введение

В России в 2022 г. рак эндометрия (РЭ) занял 3-е место по заболеваемости среди всех злокачественных новообразований у женщин [1]. На прогноз, тактику лечения пациенток, а также риск рецидива заболевания после первичного лечения влияют стадия и гистологические характеристики опухоли. При III и IV стадиях 5-летняя выживаемость составляет 50 и 15 % соответственно [2, 3]. Тактика лечения пациенток после прогрессирования РЭ зависит от некоторых факторов, однако в качестве 1-й линии системной терапии «золотым стандартом» себя зарекомендовала комбинация паклитаксела и карбоплатина [4]. Выбор 2-й и следующих линий химиотерапии ограничен в связи с неудовлетворительными показателями эффективности препаратов.

Так, на фоне монотерапии таксанами или доксорубицином частота объективного ответа составляет лишь 20 % [5, 6]. В 2017 г. было одобрено применение пембролизумаба в качестве терапии 2-й линии при микросателлитнеустойчивых (microsatellite instable, MSI) опухолях вне зависимости от их типа, в том числе и для РЭ [7], а в 2020 г. для микросателлитстабильных (microsatellite stable, MSS) опухолей — комбинация пембролизумаба и левнатиниба. Тем не менее добиться подтвержденного объективного ответа при применении левнатиниба в сочетании с пембролизумабом удалось только у 32,4 % пациенток [8]. Таким образом, требуется оптимизация сопроводительной диагностики для проведения иммунотаргетной терапии при прогрессирующем РЭ. Следует отметить, что положительная экспрессия PD-L1

не является показанием для назначения пембролизумаба и не имеет прогностической значимости при РЭ [9]. Этот факт подтверждает высказанное нами ранее предположение о том, что предсуществующее микроокружение опухоли вносит существенное влияние в реализацию эффектов иммунотерапии, которое зачастую не зависит от экспрессии PD-L1 [10].

Современные достижения в поиске дополнительных предикторных маркеров иммунотаргетной терапии весьма скудны и ограничены данными о том, что положительная экспрессия рецепторов к эстрогену (ER) ассоциировалась со значительным преимуществом в длительности периода без прогрессирования [11], а также о том, что высокий уровень мутационной нагрузки давал преимущества при иммунотаргетной терапии [12]. Среди биомаркеров эффективности терапии пембролизумабом в монорежиме называют опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, высокое соотношение CD8<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов [13]. Подобного рода исследования для MSS прогрессирующего РЭ не проводились.

Основным противоопухолевым механизмом действия ленватиниба является антиангиогенная активность, реализуемая за счет ингибирования рецепторов фактора роста эндотелия сосудов 1–3, рецептора фактора роста фибробластов 4, рецептора фактора роста тромбоцитов  $\alpha$ , RET и KIT [14]. Наряду с этим имеются сведения об иммуномодулирующем свойстве ингибиторов ангиогенеза. В мышинной модели ленватиниб существенно снижал популяцию опухолеассоциированных макрофагов и увеличивал долю CD8<sup>+</sup> Т-клеток, что приводило к повышению противоопухолевой активности ингибиторов PD-1 [15, 16]. У пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой рецидивные опухоли, леченные ленватинибом, имели более низкую экспрессию PD-L1 и инфильтрацию Т-регуляторных лимфоцитов по сравнению с соответствующими первичными опухолями [17].

**Цель исследования** – определение предикторной ценности субпопуляций лимфоцитов и макрофагов, экспрессии на них PD-1, экспрессии ER, а также плотности сосудов при иммунотаргетной терапии прогрессирующего или метастатического РЭ.

### Материалы и методы

**Пациенты.** В исследование были включены 22 пациентки с прогрессирующим или метастатическим MSS/pMMR РЭ, получавшие терапию по следующей схеме: пембролизумаб 200 мг внутривенно капельно 30-минутная инфузия каждые 3 нед + ленватиниб 20 мг 1 раз в сутки внутрь ежедневно в Научно-исследовательском институте онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Красноярском краевом онкологическом диспансере, Иркутском онкологическом диспансере

и Алтайском краевом онкологическом диспансере. Продолжительность клинической эффективности (ПКЭ) использовалась как первичная конечная точка, на основании оценки которой формировались группы сравнения. ПКЭ определялась как время от начала иммунотаргетной терапии до прогрессирования заболевания, смерти у пациенток, достигших полного ответа, частичного ответа или стабилизации заболевания в течение 24 нед или даты последнего наблюдения данных пациенток [18]. ПКЭ является наиболее выигрышной первичной конечной точкой, используемой в клинических исследованиях, в которых стабилизация заболевания с целью продления выживаемости является основной целью.

**Иммуногистохимический анализ.** Иммуногистохимическое окрашивание проводили в соответствии со стандартными протоколами на тканях первичной опухоли с помощью иммуноштейнера Bond Max (Leica, США). Срезы депарафинизировали и регидратировали, инкубируя в ксилоле, этаноле и воде. Эндогенную пероксидазную активность блокировали с помощью блока эндогенных ферментов. Демаскировку антигена проводили в ЭДТА-буфере (рН 9,0). Использовали антитела против CD31 (клон 1A10, Leica, США) и против ER (клон 6F11, Leica, США) в соответствии с инструкциями производителя. Контрокрашивание выполняли раствором гематоксилином Майера (Leica, США) и заключали средой «Витрогель». Окрашивание оценивали с помощью микроскопа Axio Scope A1 (Zeiss, Германия). Количественно определяли плотность микрососудов в соответствии с методом, описанным A.J. Guidi и соавт. [19]. Подсчет проводили в “hot spots” в 10 полях зрения ( $\times 400/0,65$ ), значение выражали как среднее количество микрососудов в поле зрения ( $0,237 \text{ мм}^2$ ). Микрососуд определялся как любая эндотелиальная клетка с коричневым иммуноокрашиванием. Экспрессию эстрогеновых рецепторов выражали в % экспрессирующих клеток на 100 клеток опухоли.

**TSA-ассоциированный многоцветный иммунофлуоресцентный анализ.** Мультиплексное окрашивание было выполнено по методике, описанной ранее [20]. Использовались следующие антитела: против CD3 (Dako, 4B12), против CD8 (Dako, C8/144B), против CD20 (Dako, L260), против PD-1 (Abcam, NAT105), против FOXP3 (CellMarque, EP340). Анализ изображений проводили в программном обеспечении InForm<sup>®</sup>. Долю клеток рассчитывали в процентах от числа всех клеток стромы.

**Статистический анализ.** Статистический анализ проведен с помощью программы Prism 10 (GraphPad, США). Для анализа достоверности различий количественных признаков использовали критерии Манна–Уитни или Краскела–Уоллиса, для сравнения категориальных переменных – точный критерий Фишера, для оценки предикторной эффективности признака –

ROC-анализ с расчетом площади под кривой (AUC), доверительного интервала (ДИ), а также чувствительность и специфичность порогового значения параметра. Выживаемость без прогрессирования оценивали как время от начала иммунотаргетной терапии в рамках исследования до первого случая прогрессирования или смерти, в зависимости от того, что наступит раньше. Кривые выживаемости с ДИ были построены с помощью метода Каплана–Мейера. Однофакторный и многофакторный анализ выживаемости без прогрессирования проводили с помощью регрессионного анализа Кокса. Переменные со значением  $p < 0,05$  в однофакторном анализе включались в многофакторный анализ.

### Результаты

Все пациентки были разделены на 2 группы: с короткой ПКЭ ( $n = 8$ ) и длительной ПКЭ ( $n = 14$ ). Медиана выживаемости без прогрессирования составила 4,5 и 13,5 мес у больных с короткой и длительной ПКЭ соответственно. При сравнении основных клинико-патологических параметров у пациенток 2 групп не было обнаружено достоверных различий. Характеристика пациенток представлена в таблице.

Поскольку в комбинации с пембролизумабом применяется препарат ленватиниб, точкой приложения которого являются рецепторы тирозинкиназ, задействованные в проангиогенных механизмах, мы предположили, что плотность сосудов в опухоли до терапии может различаться и иметь ассоциацию с эффектом терапии. Плотность сосудов в первичной опухоли у больных с длительной ПКЭ составила 24,3 (12,70–49,00), что не отличалось от таковой у больных с короткой ПКЭ – 23,7 (20,60–26,60),  $p = 0,86$ .

Еще одним прогностически значимым маркером при РЭ является экспрессия ER. В нашем исследовании не было обнаружено достоверной ассоциации доли опухолевых клеток, экспрессирующих ER, с длительностью ответа на проводимую иммунотаргетную терапию (у больных с длительной ПКЭ – 52,5 (20,96–96,25) %, у больных с короткой ПКЭ – 99,0 (40,00–100,00) %,  $p = 0,57$ ).

При оценке частоты встречаемости исследуемых клеточных популяций в микроокружении РЭ не было обнаружено различий в 2 группах больных. Оценка количественных различий позволила установить 2 клеточные популяции, ассоциированные с ПКЭ у пациенток с прогрессирующим РЭ (рис. 1).

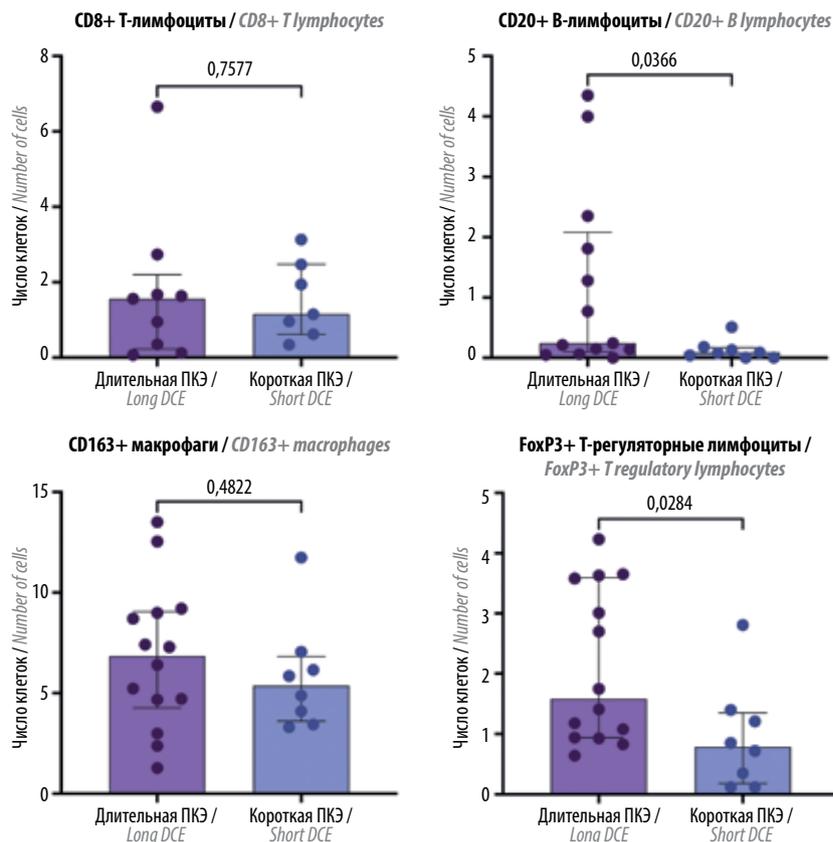
Клинико-патологические параметры пациенток с прогрессирующим или метастатическим раком эндометрия  
Clinicopathological parameters of patients with advanced or metastatic endometrial cancer

Показатель Parameter		Короткая ПКЭ Short DCE	Длительная ПКЭ Long DCE	<i>p</i>
Возраст, лет Age, years		63,1 ± 7,8	59,9 ± 7,3	0,34
Стадия по FIGO, <i>n/N</i> (%) FIGO stage, <i>n/N</i> (%)	IA	0/8 (0)	2/14 (14,3)	0,42
	IB	2/8 (25,0)	1/14 (7,1)	
	II	2/8 (25,0)	4/14 (28,6)	
	IIIA	1/8 (12,5)	3/14 (21,4)	
	IIIC	0/8 (0)	2/14 (14,3)	
	IVB	3/8 (37,5)	2/14 (14,3)	
Гистологический тип опухоли, <i>n/N</i> (%) Histological type, <i>n/N</i> (%)	Эндометриоидная опухоль Endometrioid tumor	7/8 (87,5)	9/14 (64,3)	0,41
	Серозная опухоль Serous tumor	1/8 (12,5)	3/14 (21,4)	
	Карциносаркома Carcinosarcoma	0/8 (0)	2/14 (14,3)	
Степень злокачественности опухоли, <i>n/N</i> (%) Tumor grade, <i>n/N</i> (%)	I	2/8 (25,0)	2/14 (14,3)	0,15
	II	1/8 (12,5)	8/14 (57,1)	
	III	4/8 (50,0)	2/14 (14,3)	
	Нет данных No data	1/8 (12,5)	2/14 (14,3)	

Окончание таблицы  
End of table

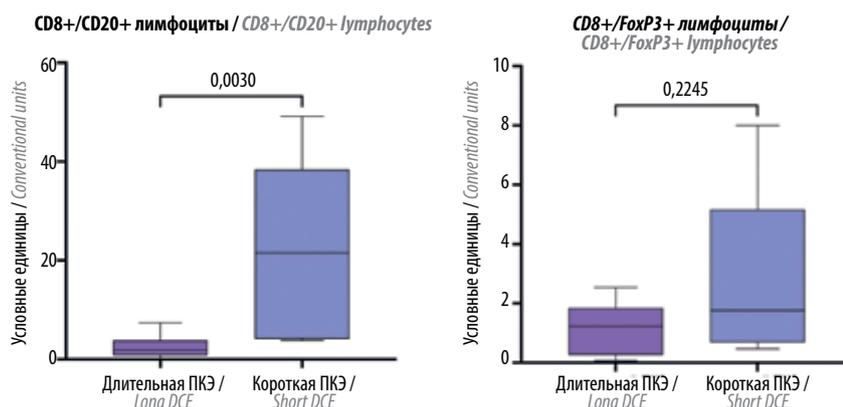
Показатель Parameter		Короткая ПКЭ Short DCE	Длительная ПКЭ Long DCE	<i>p</i>
Глубина инвазии миометрия, <i>n/N</i> (%) Myometrium involvement, <i>n/N</i> (%)	Нет No	1/8 (12,5)	0/14 (0)	0,24
	<50 %	3/8 (37,5)	3/14 (21,4)	
	>50 %	4/8 (50,0)	11/14 (78,6)	
Лимфоваскулярная инвазия, <i>n/N</i> (%) Lymphovascular invasion, <i>n/N</i> (%)	Нет No	2/8 (25,0)	8/14 (57,1)	0,34
	Есть Yes	3/8 (37,5)	3/14 (21,4)	
	Нет данных No data	3/8 (37,5)	3/14 (21,4)	
Висцеральные метастазы, <i>n/N</i> (%) Visceral metastases, <i>n/N</i> (%)	Нет No	1/8 (12,5)	4/14 (28,6)	0,61
	Есть Yes	7/8 (87,5)	10/14 (71,4)	

**Примечание.** ПКЭ – продолжительность клинической эффективности.  
*Note.* DCE – duration of clinical effectiveness.



**Рис. 1.** Количество CD8+ Т-лимфоцитов, CD20+ В-лимфоцитов, FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и CD163+ макрофагов в опухолевом микроокружении у больных прогрессирующим или метастатическим раком эндометрия в зависимости от продолжительности клинической эффективности (ПКЭ) иммунотаргетной терапии

**Fig. 1.** The proportion of CD8+ T lymphocytes, CD20+ B lymphocytes, FoxP3+ T regulatory lymphocytes, and CD163+ macrophages in the tumor microenvironment in patients with advanced or metastatic endometrial cancer according to the duration of clinical effectiveness (DCE) of immunotargeted therapy



**Рис. 2.** Соотношение CD8+/CD20+, CD8+/FoxP3+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении у больных прогрессирующим или метастатическим раком эндометрия в зависимости от продолжительности клинической эффективности (ПКЭ) иммунотаргетной терапии

**Fig. 2.** The proportion of CD8+/CD20+, CD8+/FoxP3+ lymphocytes in the tumor microenvironment in patients with advanced or metastatic endometrial cancer according to the duration of clinical effectiveness (DCE) of immunotargeted therapy

У пациенток, имеющих длительную ПКЭ, доля CD20+ В-лимфоцитов в микроокружении опухоли была выше, чем у пациенток с короткой ПКЭ (0,24 (0,10–2,08) % против 0,08 (0,01–0,17) % соответственно,  $p = 0,04$ ). Кроме того, различия были обнаружены в доле FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов, которая была выше у пациенток, имеющих длительную ПКЭ (1,58 (0,93–3,59) % против 0,78 (0,17–1,35) % соответственно,  $p = 0,03$ ). Клинически значимой связи между ответом на терапию и долями CD8+ Т-лимфоцитов и CD163+ макрофагов не было выявлено (CD8+: длительный ответ – 1,56 (0,23–2,20) %, короткий – 1,15 (0,62–2,47) %,  $p = 0,75$ ; CD163+: длительный ответ – 6,84 (4,25–9,04) %, короткий – 5,36 (3,60–6,82) %,  $p = 0,48$ ).

Поскольку пембролизумаб связывается с PD-1 на клетках, мы сравнили долю PD-1+ клеток у больных в зависимости от ПКЭ. Доля PD-1+ клеток в микроокружении опухоли у больных с длительной ПКЭ составляла 0,62 (0,00–1,74) %, а у больных с короткой ПКЭ – 0,61 (0,02–1,23) %,  $p = 0,72$ . Также не было обнаружено достоверных различий в долях PD-1+ субпопуляций CD8+ Т-лимфоцитов, CD20+ В-лимфоцитов, FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и CD163+ макрофагов ( $p < 0,05$ ).

Поскольку изучаемые нами клетки относятся к разным типам иммунновоспалительной реакции, был проведен расчет соотношений CD8+/CD20+, CD8+/FoxP3+ лимфоцитов (рис. 2).

Достоверно большее соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов в микроокружении опухоли было обнаружено у больных с короткой ПКЭ (21,50 (4,13–38,36)) по сравнению с больными, у которых ПКЭ была длительной (1,83 (0,77–3,83),  $p = 0,003$ ). Соотношение CD8+/FoxP3+ лимфоцитов в опухолевом микро-

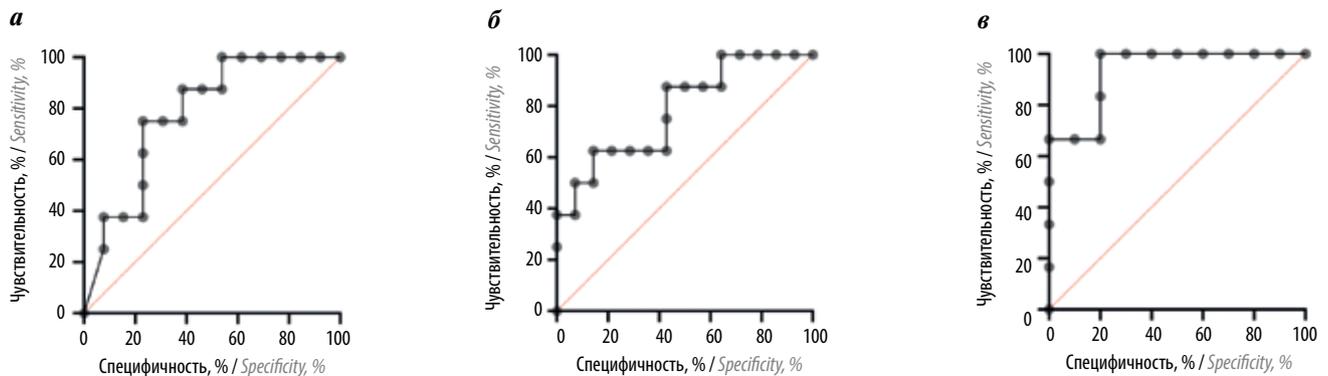
окружении не различалось у 2 исследуемых групп пациенток ( $p = 0,22$ ).

Далее с помощью ROC-анализа проводилось исследование предикторной ценности найденных параметров, для того чтобы выбрать наиболее чувствительный и специфичный (рис. 3).

Обнаружено, что с короткой ПКЭ связаны доля CD20+ В-лимфоцитов ниже 0,135 % (AUC (95 % ДИ) = 0,77 (0,58–0,98),  $p = 0,036$ , чувствительность 75,00 %, специфичность 76,92 %), доля FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов ниже 0,89 % (AUC (95 % ДИ) = 0,78 (0,58–0,98),  $p = 0,029$ , чувствительность 62,50 %, специфичность 85,71 %), соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов выше 3,219 (AUC (95 % ДИ) = 0,93 (0,81–1,00),  $p = 0,004$ , чувствительность 100 %, специфичность 80,00 %). Таким образом, при иммунотаргетной терапии у больных РЭ наибольшей предикторной ценностью обладает соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении.

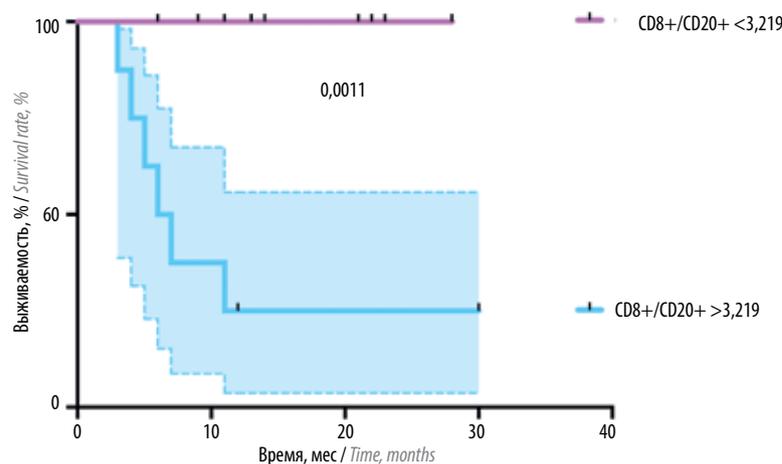
Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ Кокса позволил показать, что соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении является независимым прогностическим фактором короткой выживаемости без прогрессирования (отношение рисков 16,39 (33,06–87,52),  $p = 0,001$ ) при иммунотаргетной терапии у больных прогрессирующим или метастатическим РЭ (рис. 4).

У пациенток с соотношением CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении менее 3,219 за период наблюдения не было отмечено прогрессирования заболевания, в то время как у 75 % пациенток с соотношением CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении более 3,219 прогрессирование заболевания наблюдалось ( $p = 0,001$ ).



**Рис. 3.** Результаты ROC-анализа предикторной ценности доли CD20+ В-лимфоцитов (а), FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов (б) и соотношения CD8+/CD20+ лимфоцитов (в) в опухолевом микроокружении у больных прогрессирующим или метастатическим раком эндометрия при иммунотаргетной терапии

**Fig. 3.** Results of ROC analysis of the predictive value of the proportion of CD20+ B lymphocytes (a), FoxP3+ T regulatory lymphocytes (б), and the ratio of CD8+/CD20+ lymphocytes (в) in the tumor microenvironment in patients with advanced or metastatic endometrial cancer during immunotargeted therapy



**Рис. 4.** Кривые выживаемости без прогрессирования (метод Каплана–Мейера с доверительными интервалами) больных прогрессирующим или метастатическим раком эндометрия в зависимости от соотношения CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении

**Fig. 4.** Progression-free survival curves (Kaplan–Meier method with confidence intervals) for patients with advanced or metastatic endometrial cancer depending on the ratio of CD8+/CD20+ lymphocytes in the tumor microenvironment

## Обсуждение

Использование иммунотаргетной терапии у больных РЭ, по данным KEYNOTE-775, считается эффективным у 40 % пациенток [21]. В свою очередь, наш обобщенный опыт использования комбинации пембролизумаба и ленватиниба при прогрессирующем или метастатическом MSS/pMMR РЭ показывает, что достичь контроля над болезнью возможно у 60 % больных с медианой выживаемости без прогрессирования, равной 13,5 мес. В качестве клинического критерия деления пациенток на когорты в нашем исследовании была выбрана ПКЭ, поскольку оптимальна для исследований, в которых стабилизация заболевания с целью продления выживаемости является основной целью. Следует отметить, что по основным клинико-патологическим параметрам, ассоциированным с прогнозом при РЭ, пациентки с короткой и длительной ПКЭ

в нашем исследовании не различались. Основной гипотезой представленного исследования являлось то, что особенности клеточного состава опухолевого микроокружения могут быть ассоциированы с ПКЭ иммунотаргетной терапии. Данные, полученные нами, подтверждают высказанную гипотезу. Сразу 3 параметра микроокружения были связаны с ПКЭ: доля CD20+ В-лимфоцитов, доля FoxP3+ Т-регуляторных лимфоцитов и соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении. Однако наибольшей предикторной ценностью обладало соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов, значение которого ниже 3,219 было ассоциировано с длительным ПКЭ. Иными словами, низкое число CD8+ лимфоцитов и/или высокое число CD20+ лимфоцитов сопряжено с эффективностью иммунотаргетной терапии у больных прогрессирующим или метастатическим РЭ. Поскольку количество

CD8+ лимфоцитов не было ассоциировано с ответом на терапию, вероятно, большее значение играет именно количество CD20+ лимфоцитов.

В ткани РЭ В-лимфоциты существуют преимущественно в третичных лимфоидных структурах, но обнаруживаются и изолированно в строме. Функция В-лимфоцитов в эндометрии не вполне выяснена, как было отмечено в обзоре М. Shen и соавт. [22]. Однако возможно, что В-лимфоциты внутри третичных лимфоидных структур функционируют как упорядоченные антиген-презентирующие клетки для окружающих Т-клеток, поскольку они экспрессируют маркеры активации, такие как CD69, HLA-DR и CD83, в большей степени, чем периферические В-лимфоциты [23]. Данные о том, что В-лимфоциты обладают предикторной значимостью при иммунотерапии РЭ, в литературе отсутствуют. Однако существуют работы, посвященные исследованию предикторной значимости В-лимфоцитов при иммунотерапии широкого ряда других злокачественных новообразований. В частности, в исследовании Z. Wu и соавт. определен кластер В-лимфоцитов, связанных с хорошим ответом на иммунотерапию у больных меланомой, глиобластомой, немелкоклеточным раком легкого, плоскоклеточной карциномой головы и шеи и почечно-клеточной карциномой. Дальнейший анализ, проведенный авторами, показал, что в ответивших на терапию опухолях было умеренно больше В-лимфоцитов памяти и значительно меньше наивных В-лимфоцитов [24]. В другом исследовании демонстрировалось, что количество В-лимфоцитов в исходной опухоли и после иммунотерапии было увеличено у больных, ответивших на терапию, по сравнению с не ответившими ( $p < 0,05$ ) [25]. Рассуждая о механизмах участия В-лимфоцитов в реализации эффектов иммунотерапии, необходимо отметить, что в литературе описана способность В-лимфоцитов выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток [26]. Данный факт может объяснить значимую связь большего количества В-лимфоцитов с высокой эффективностью пембролизумаба, поскольку косвенно свидетельствует о вероятности наличия иммунного ответа в опухоли. Интересно, что литературы о вкладе В-лимфоцитов в механизмы действия ленватиниба нами обнаружено не было.

При проведении данного исследования мы получили подтверждение того, что в микроокружении опухолей больных с длительным ответом на иммунотаргетную терапию повышено число Т-регуляторных лимфоцитов. Одним из возможных механизмов действия пембролизумаба является супрессия функции FoxP3+/CD4+ Т-регуляторных клеток [27]. Кроме того, в исследованиях при гепатоцеллюлярной карциноме показано, что высокие уровни FGFR4 и Foxp3 обеспечивали иммунную толерантность и лучший ответ на терапию ленватинибом и пембролизумабом [17]. Это согласуется с полученными нами результатами у больных РЭ.

Найденный нами предикторный параметр ПКЭ при иммунотаргетной терапии в многофакторном анализе оказался и прогностическим, причем независимо от основных клинико-патологических параметров, традиционно связанных с прогнозом. В 2023 г. Международная федерация акушеров-гинекологов (International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO), пересматривая систему стадирования РЭ, обсуждала возможность использования молекулярной классификации и введение оценки лимфоваскулярной инвазии и размера метастазов в лимфатических узлах [28]. Анализ The Cancer Genome Atlas (TCGA) привел к комплексной классификации РЭ на 4 отдельные геномные группы: ультрамутированный POLE (POLEmut), гипермутированный с MSI-H или MMRd, p53-мутантный (p53abn) и неспецифический [29]. Каждой группе соответствует свой прогноз, при этом случаи с POLEmut РЭ обычно демонстрируют наилучший прогноз, а с p53abn РЭ – наихудший, в то время как остальные 2 категории имеют промежуточный прогноз. В нашем исследовании молекулярные типы РЭ не определяли, хотя статус MSS/pMMR исключает принадлежность наших больных к гипермутированному подтипу. Данные литературы указывают на прогностическую значимость выраженности инфильтрации микроокружения опухоли при разных молекулярных типах. Например, отмечено высокое содержание CD3+CD8+ и CD3+CD8-опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в опухолях POLE, а также увеличение количества В-клеток и плазматических клеток в строме опухолей POLE. Кроме того, недавние исследования показывают, что при РЭ количество В-лимфоцитов значительно выше в группах низкого риска, нежели в группах высокого риска [30]. Эти данные также подтверждают обнаруженную в нашем исследовании прогностическую ценность соотношения CD8+/CD20+ лимфоцитов при прогрессирующем или метастатическом РЭ.

### Выводы

Оценка соотношения CD8+/CD20+ лимфоцитов в опухолевом микроокружении позволяет с чувствительностью 100 % и специфичностью 80 % стратифицировать больных прогрессирующим или метастатическим РЭ на группы с короткой и длительной ПКЭ терапии комбинацией пембролизумаба и ленватиниба. Кроме того, соотношение CD8+/CD20+ лимфоцитов обладает независимой связью с длительностью выживаемости без прогрессирования, а для его оценки требуется проведение рутинного иммуногистохимического исследования, что позволяет рассматривать данный показатель в качестве простого и эффективного сурrogатного маркера при назначении иммунотаргетной терапии при MSS/pMMR прогрессирующем или метастатическом РЭ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Шахзадова А.О., Старинский В.В., Лисичникова И.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. Сибирский онкологический журнал 2023;22(5):5–13. DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13  
Shakhzadova A.O., Starinskiy V.V., Lisichnikova I.V. The state of cancer care for the population of Russia in 2022. Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology 2023; 22(5):5–13. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-5-5-13
- Rütten H., Verhoef C., van Weelden W.J. et al. Recurrent endometrial cancer: Local and systemic treatment options. *Cancers (Basel)* 2021;13(24):6275. DOI: 10.3390/cancers13246275
- Del Carmen M.G., Boruta D.M., Schorge J.O. Recurrent endometrial cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2011;54(2):266–77. DOI: 10.1097/GRF.0b013e318218c6d1
- Нечушкина В.М., Коломиец Л.А., Кравец О.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака тела матки и сарком матки. *Злокачественные опухоли* 2022;12(3S2–1):260–75. DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-260-275  
Nechushkina V.M., Kolomiets L.A., Kravets O.A. et al. Practical recommendations for drug treatment of uterine cancer and uterine sarcomas. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors* 2022;12(3S2–1):260–75. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-260-275
- Makker V., Colombo N., Casado Herráez A. et al. Lenvatinib plus pembrolizumab for advanced endometrial cancer. *N Engl J Med* 2022;386(5):437–48. DOI: 10.1056/NEJMoa2108330
- Fleming G.F. Second-line therapy for endometrial cancer: The need for better options. *J Clin Oncol* 2015;33(31):3535–40. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.7225
- Marcus L., Lemery S.J., Keegan P., Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the treatment of microsatellite instability-high solid tumors. *Clin Cancer Res* 2019;25(13):3753–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4070
- Makker V., Colombo N., Casado Herráez A. et al. Lenvatinib plus pembrolizumab in previously treated advanced endometrial cancer: Updated efficacy and safety from the randomized phase III study 309/KEYNOTE-775. *J Clin Oncol* 2023;41(16):2904–10. DOI: 10.1200/JCO.22.02152
- Maiorano B.A., Maiorano M.F.P., Cormio G. et al. How immunotherapy modified the therapeutic scenario of endometrial cancer: A systematic review. *Front Oncol* 2022;12:844801. DOI: 10.3389/fonc.2022.844801
- Таширева Л.А., Муравьева Д.Т., Попова Н.О. и др. Параметры микроокружения опухоли определяют эффективность анти-PD-1/PD-L1-терапии. *Биохимия* 2021;86(11):1677–86. DOI: 10.31857/S0320972521110063  
Tashireva L.A., Muravyova D.T., Popova N.O. et al. Tumor micro-environment parameters determine the effectiveness of anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Biokhimiya = Biochemistry* 2021;86(11):1677–86. (In Russ.). DOI: 10.31857/S0320972521110063
- Liontos M., Papanota A.M., Svarna A. et al. Immunohistochemical expression of ER and p53 as predictive biomarkers of immunotherapy in endometrial cancer. *JCO* 2023;41(16 Suppl):e17626. DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16\_suppl.e17626
- Goodman A.M., Sokol E.S., Frampton G.M. et al. Microsatellite-stable tumors with high mutational burden benefit from immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2019;7(10):1570–3. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0149
- De Jong R., Leffers N., Boezen H. et al. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2009;114(1):105–10. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.03.022
- Yamamoto Y., Matsui J., Matsushima T. et al. Lenvatinib, an angiogenesis inhibitor targeting VEGFR/FGFR, shows broad antitumor activity in human tumor xenograft models associated with microvessel density and pericyte coverage. *Vasc Cell* 2014;6:18. DOI: 10.1186/2045-824X-6-18
- Kato Y., Tabata K., Kimura T. et al. Lenvatinib plus anti-PD-1 antibody combination treatment activates CD8+ T cells through reduction of tumor-associated macrophage and activation of the interferon pathway. *PLoS One* 2019;14(2):e0212513. DOI: 10.1371/journal.pone.0212513
- Kimura T., Kato Y., Ozawa Y. et al. Immunomodulatory activity of lenvatinib contributes to antitumor activity in the Hepa1-6 hepatocellular carcinoma model. *Cancer Sci* 2018;109(12):3993–4002. DOI: 10.1111/cas.13806
- Yi C., Chen L., Lin Z. et al. Lenvatinib targets FGF receptor 4 to enhance antitumor immune response of anti-programmed cell death-1 in HCC. *Hepatology* 2021;74(5):2544–60. DOI: 10.1002/hep.31921
- Delgado A., Guddati A.K. Clinical endpoints in oncology – a primer. *Am J Cancer Res* 2021;11(4):1121–31.
- Guidi A.J., Berry D.A., Broadwater G. et al. Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(6):486–92. DOI: 10.1093/jnci/92.6.486
- Таширева Л.А., Попова Н.О., Алифанов В.В. и др. Иммунологические предикторы терапевтической эффективности применения эрибулина при местно-распространенном или метастатическом раке молочной железы: пилотное исследование. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2021;17(4):48–55. DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-4-48-55  
Tashireva L.A., Popova N.O., Alifanov V.V. et al. Immunological predictors of the therapeutic efficacy of eribulin in locally advanced or metastatic breast cancer: A pilot study. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of Female Reproductive System* 2021;17(4):48–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2021-17-4-48-55
- Makker V., Colombo N., Casado Herráez A. et al. Study 309-KEYNOTE-775 Investigators. Lenvatinib plus pembrolizumab for advanced endometrial cancer. *N Engl J Med* 2022;386(5):437–48. DOI: 10.1056/NEJMoa2108330
- Shen M., O'Donnell E., Leon G. et al. The role of endometrial B cells in normal endometrium and benign female reproductive pathologies: A systematic review. *Hum Reprod Open* 2021;2022(1):hoab043. DOI: 10.1093/hropen/hoab043
- Shen M., Child T., Mittal M. et al. B cell subset analysis and gene expression characterization in mid-luteal endometrium. *Front Cell Dev Biol* 2021;9:709280. DOI: 10.3389/fcell.2021.709280
- Wu Z., Zhou J., Xiao Y. et al. CD20+CD22+ADAM28+ B cells in tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Front Immunol* 2022;13:865596. DOI: 10.3389/fimmu.2022.865596
- Cowan M., Xie P., Chen S. et al. Immune markers of response to pembrolizumab and guadecitabine in platinum resistant ovarian cancer utilizing multiplex immunohistochemistry (mIHC). *Gynecol Oncol* 2021;162(1):S28, S29. DOI: 10.1016/S0090-8258(21)00699-5
- Sharonov G.V., Serebrovskaya E.O., Yuzhakova D.V. et al. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2020;20(5):294–307. DOI: 10.1038/s41577-019-0257-x
- Flynn J.P., Gerriets V. Pembrolizumab. In: *StatPearls. Treasure Island: StatPearls*, 2023.
- Zheng W. Molecular classification of endometrial cancer and the 2023 FIGO staging: Exploring the challenges and opportunities for pathologists. *Cancers* 2023;15:4101. DOI: 10.3390/cancers15164101
- Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C., Schultz N. et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497(7447):67–73. DOI: 10.1038/nature12113
- Zhao Z., Zheng B., Zheng J. et al. Integrative analysis of inflammatory response-related gene for predicting prognosis and immunotherapy in glioma. *J Mol Neurosci* 2023;73(7–8):608–27. DOI: 10.1007/s12031-023-02142-x

**Вклад авторов**

А.А. Мальцева: получение данных для анализа, написание статьи;

А.Ю. Калинин, Н.В. Крахмаль, Н.М. Чернорубашкина, Е.С. Мартынова, Р.А. Зуков, А.А. Гофман, А.Б. Виллерт, О.Н. Чуруксаева: получение данных для анализа;

Л.А. Коломиец: редактирование статьи;

Л.А. Таширева: разработка дизайна исследования, редактирование статьи, получение финансирования.

**Authors' contributions**

A.A. Maltseva: obtaining data for analysis, writing the article;

A.Yu. Kalinchuk, N.V. Krakhamal, N.M. Chernorubashkina, E.S. Martynova, R.A. Zukov, A.A. Gofman, A.B. Villert, O.N. Churuksaeva: obtaining data for analysis;

L.A. Kolomiets: editing the article;

L.A. Tashireva: study design development, editing the article, obtaining funding.

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

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10033-П).

**Funding.** The study was performed with financial support from the Russian Science Foundation (grant No. 20-75-10033-P).

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Протокол исследования одобрен этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН». Все пациентки подписали информированное согласие на проведение исследования и использование персональных данных.

**Compliance with patient rights and principles of bioethics.** The study protocol was approved by the ethics committee of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences. All patients signed an informed consent on participation in the study and the use of their personal data.