

DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-4-13-25

Цитирование: Владимирова Л. Ю., Льянова А. А., Франциянц Е. М., Кутилин Д. С., Енгибарян М. А. Молекулярные механизмы резистентности к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта // Злокачественные опухоли 2018; 8(4):13-25

Молекулярные механизмы резистентности к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта

Л. Ю. Владимирова, А. А. Льянова, Е. М. Франциянц, Д. С. Кутилин, М. А. Енгибарян

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, Ростов-на-Дону, Россия

Для корреспонденции: rnioi@list.ru

Резюме: В обзоре проведен анализ современных данных о молекулярных механизмах резистентности к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта. Подробно описаны механизмы резистентности к моноклональным анти-ERBB-антителам и анти-PD1-антителам и пути ее преодоления. Проведенный анализ позволил выделить ряд факторов, которые необходимо учитывать при назначении терапии моноклональными антителами: активацию альтернативных рецепторных тирозин киназ; повышение экспрессии генов лигандов рецепторов; мутации в эффекторах и самих рецепторных тирозин-киназах; нарушение образования функциональных димеров рецепторов; изменения в белках и кодирующих их генах, ответственных за регуляцию каскадов апоптоза, митоза, эпителиально-мезенхимального перехода; секрецию противовоспалительных цитокинов и иммуносупрессорных метаболитов.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак языка и слизистой дна полости рта, моноклональные антитела, резистентность, ERBB-рецепторы, мутации, лизосомальная деградация, апоптоз, рецептор PD-1

Введение

Большинство онкологических заболеваний, происходящих из плоского эпителия верхнего отдела пищеварительного тракта, в том числе губ, полости рта, глотки (ротоглотки, гортаноглотки и носоглотки), гортани и околоносовых пазух, формируют группу плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ). В целом ПРГШ составляет 90 % всех видов рака головы и шеи и находится на 7-м месте по распространенности среди всех злокачественных новообразований в мире [1, 2]. В 2013 г. рак ротовой полости привел к 135000 смертей во всем мире [3]. Плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта составляет 95 % всех злокачественных новообразований полости рта, 65 % занимают опухоли языка и дна ротовой полости [4].

Стандартом лечения распространенного ПРГШ (в том числе плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта) является проведение лучевой терапии в сочетании с химиотерапией цетуксимабом (моноклональное антитело, подавляющее активность EGFR), платино-содержащими производными и фторурацилом (первая линия химиотерапии), таксанами и метотрексатом (вторая линия химиотерапии), а также хирургическим воздействием [1, 2].

Почти в 100 % случаев рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) экспрессируется при ПРГШ, причем его

экспрессия ассоциируется со снижением безрецидивной и общей продолжительности жизни. Химерное моноклональное антитело класса IgG1 – цетуксимаб, – кроме способности к блокаде EGFR, обладает рядом дополнительных свойств, усиливающих эффекты противоопухолевого лечения. Было проведено несколько крупных рандомизированных международных клинических исследований, показывающих эффективность включения цетуксимаба в схемы лечения больных с ПРГШ.

Появление в последние годы противоопухолевой терапии регуляторами иммунного ответа внесло революционные изменения в лечение рака [5].

Однако не у всех больных удается добиться положительных результатов, что подчеркивает необходимость индивидуализировать лекарственную терапию за счет определения критериев эффективности таргетной терапии, определения группы пациентов с рецидивным и метастатическим плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта, у которых лечение моноклональными антителами позволит достичь максимального клинического и экономического выигрыша. Для индивидуализации лекарственной терапии необходимо изучение молекулярных механизмов резистентности к лечению моноклональными антителами (мкАТ). Современным представлениям об этих механизмах и посвящен данный обзор.

Таблица 1. Моноклональные антитела, применяемые при ПРГШ, к рецепторам ERBB и некоторым другим поверхностным клеточным рецепторам, запускающим перекрывающиеся сигнальные пути, а также их лигандам [7]

Молекулярная мишень	Название антитела по USAN	Коммерческое или рабочее название/фирмы производителя	Эпитоп/механизм действия
1. ERBB1 (EGFR)	cetuximab	Erbitux®/Im-Clone (США), Bristol-Myers Squibb Company (США)	субдомен III/блокирует связывание с лигандом, АЗКЦ
	nimotuzumab	Theraloc®/Oncoscience (Германия), TheraCIM/CI-MYM Biosciences (Канада)	субдомен III EGFR
	zalutumumab	HuMax-EGFr/Genmab (Дания)	субдомен III EGFR
2. ERBB1 + CD64		MDX-447/Medarex (США), Merck KGaA	субдомен III EGFR/АЗКЦ (CD64)
3. VEGF	bevacizumab	Авастин, Аверга, Б-Маб	VEGF/связываются и ингибируют биологическую активность фактора роста эндотелия сосудов
4. PD-1	pembrolizumab	Кейтруда/Keytruda, Merck Opdivo/Bristol-Myers Squibb Company (США)	PD-1/блокирует взаимодействие между рецептором PD-1 на поверхности Т-клеток и PD-L1 и PD-L2 лигандами, находящимися на клетках опухоли
	nivolumab		
5. CTLA-4	ipilimumab	Yervoy/Bristol-Myers Squibb Company (США)	CTLA-4/является ингибитором CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), блокирует тормозные сигналы каскада CTLA-4, увеличивая количество противоопухолевых Т-хелперов
6. IGF-1R	figitumumab	CP-751,871/Pfizer	IGF-1/ингибирует связывание IGF с IGF-1R
7. IGF-1R	cixutumumab	IMC-A12 (A12)/ImClone Systems Incorporated (NY)	IGF-1/ингибирует связывание IGF с IGF-1R
8. MET	onartuzumab	MetMab/Roche (Швейцария)	HGFR/ингибирует связывание HGF с MET

Таргетная терапия моноклональными антителами плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта

В настоящее время принято для клинического применения порядка 30 препаратов мкАТ. Большая часть из них специфична к поверхностным клеточным рецепторам, в том числе к ERBB, VEGF, MET и IGF-1R, другая часть специфически связывает лиганды рецепторов (табл. 1) [6].

Избирательное воздействие мкАТ на раковые клетки основано на нескольких различных механизмах, таких как привлечение к опухоли клеток иммунной системы (антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)), прямое нарушение сигнала путем конкурентного связывания с рецептором, нарушение димеризации рецептора, направленная доставка токсинов или других действующих агентов [7].

Установлено, что до 80% опухолей при ПРГШ экспрессируют лиганды к рецептору PD-1 (PD-L1) и уровень этой экспрессии превышает аналогичный показатель в здоровых тканях [8]. Активность Т-клеток регулируется через систему опосредованных стимулирующих или же ингибирующих сигналов, которые запускаются через взаимодействие на уровне лигандов (L) рецепторов. Т-клетки содержат бесчисленное количество рецепторов – как активирующих (OX-40, GITR, CD28), так и ингибирующих (PD-1 и ассоциированный с Т-лимфоцитами цитотоксиче-

ский протеин 4-го типа CTLA-4, так называемые ингибиторы иммунного ответа). Собственно говоря, использование активации ингибирующих рецепторов и позволяет опухоли успешно избегать контроля со стороны иммунной системы [9].

На сегодняшний день уже есть клинические данные по применению двух анти-PD-1 препаратов при ПРГШ – ниволумаба и пембролизумаба [2].

Ниволумаб – это полностью человеческое моноклональное антитело к рецептору PD-1, относящееся к иммуноглобулинам класса G (IgG). По результатам исследования, медиана общей выживаемости (ОВ) в группе пациентов, получавших ниволумаб, была на уровне 7,5 мес., а в группе стандартной терапии – 5,1 мес. Однако из 236 пациентов, получавших лечение ниволумабом, прогрессия отмечена у 59% пациентов [10].

Более перспективным препаратом в иммунотерапии ПРГШ является ингибитор рецепторов PD-1 пембролизумаб – моноклональное антитело (IgG4-k), обладающее высоким сродством с рецептором PD-1. Продемонстрирована высокая эффективность препарата у пациентов с рецидивным и метастатическим ПРГШ, рефрактерным к предыдущему лечению препаратами платины или цетуксимабом [11]. Однако, несмотря на высокую клиническую эффективность, у более чем 50% пациентов к анти-PD-1-терапии имеется резистентность, механизмы которой также целесообразно рассмотреть в данном обзоре.

Механизмы резистентности к моноклональным антителам у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта

Применение цетуксимаба было самым успешным при лечении ПРГШ и одобрено FDA. Далее рассмотрим механизмы резистентности к моноклональным анти-ERBB-антителам.

Невосприимчивость к терапии с использованием антител, специфичных по отношению к ERBB-рецепторам, может быть первичной, приобретенной и механической. Наиболее детально и систематически резистентность изучена в отношении трастузумаба (trastuzumab) и цетуксимаба (cetuximab) [12], однако до сих пор исследователи продолжают выявлять все новые аспекты этой проблемы [13]. Несмотря на значительные различия в функционировании рецепторов ERBB1 и ERBB2, установлен ряд общих механизмов резистентности, возникающих при направленном воздействии на них.

1. Активация альтернативных рецепторных тирозинкиназ (РТК), запускающих те же сигнальные каскады, что и ERBB-рецепторы, является одним из распространенных механизмов резистентности к анти-ERBB-антителам. Активация альтернативных путей передачи сигнала для компенсации уменьшения передачи сигналов от EGFR может быть осуществлена благодаря другим членам семейства ERBB, IGF-1R и Met.

Р. Ли (R. Li) и соавторами [14] показано, что в трастузумаб-резистентных опухолевых клетках рецептор инсулиноподобного фактора роста IGF1R способен взаимодействовать с рецептором ERBB2, образуя с ним гетеродимеры и индуцируя его фосфорилирование и последующую передачу сигнала. В нескольких линиях клеток ПРГШ после стимуляции IGF или EGF обнаружена гетеродимеризация IGF-1R/EGFR. Блокирование IGF1R антителами dalotuzumab или cixutumumab возвращает чувствительность клеток к трастузумабу. Запуск обходных сигнальных каскадов через IGF1R коррелирует также с резистентностью к терапии, направленной на другие РТК, включая EGFR [12].

В клеточных линиях карциномы носоглотки резистентность цетуксимаба была связана с амплификацией и избыточной экспрессией гена H-Ras, что связано с повышением активности сигнального пути IGF-1R [15]. Кроме того, лечение с помощью анти-IGF-1R A12-антител в комбинации с цетуксимабом было более эффективным средством снижения клеточной пролиферации и миграции в клеточных линиях ПРГШ, чем любой из агентов по отдельности [16].

В литературе активация передачи сигналов от HER2 ассоциируется с резистентностью к цетуксимабу, так как передача сигналов от него происходит через те же, что и у EGFR (HER1), эффекторы. При использовании *in vitro* модели с приобретенной резистентностью к цетук-

симабу наблюдалось заметное повышение статуса фосфорилирования С-концевого фрагмента HER2. Комбинированная терапия афатинибом (необратимым двойным ингибитором EGFR/HER2) и цетуксимабом привела к резкому сокращению резистентных к цетуксимабу объемов опухолей по сравнению с монотерапией [17]. Аналогичным образом исследование, проведенное К. Йонесака (K. Yonesaka) и соавторами [18], показало, что резистентность к цетуксимабу может быть вызвана активацией сигнального пути ERBB2 в результате амплификации ERBB2, что приводит к постоянной активации ERK1/2. Часто упоминаемые амплификации являются видом генетического полиморфизма, возникающим в результате несбалансированных хромосомных перестроек (copy number variation, CNV). Результатом подобных хромосомных перестроек может явиться повышение числа копий гена и, следовательно, повышенная экспрессия его продукта – белка [19]. Восстановление чувствительности к цетуксимабу было достигнуто путем ингибирования ERBB2 или путем разрушения гетеродимера ERBB2/ERBB3 как *in vitro*, так и *in vivo* [18].

В процессе лечения анти-ERBB1-антителами может активироваться еще один обходной сигнальный путь. При блокировании рецептора ERBB1 мутация или амплификация гена MET (рецептор фактора роста гепатоцитов, C-MET или HGFR) либо увеличение экспрессии лиганда HGF приводит к постоянной активации PI3K/Akt сигнального пути [20], обычно активируемого ERBB3. Рецептор C-MET образует гетеродимеры с ERBB3 и, вовлекая каскадные белки src и PI3K, полностью замещает функцию передачи сигнала заблокированного ERBB1 [21]. Роль MET в резистентности к анти-EGFR-терапии была исследована в ряде работ. Так, Д. Лиска (D. Liska) с соавторами [22] обнаружили гиперэкспрессию MET у 58% обследованных пациентов с рецидивирующим/метастатическим ПРГШ и показали, что ингибирующее действие цетуксимаба может быть компенсировано избыточной экспрессией лиганда HGF [22].

Особое внимание исследователей привлекает вклад рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR) в развитие резистентности опухолевых клеток к анти-ERBB-терапии. Причиной резистентности может быть, как и в случае других РТК, активирование обходного сигнального пути Akt/PI3K, опосредованное рецептором VEGFR1. Применение мкАТ, специфичных по отношению к VEGFR1, позволяет восстановить восприимчивость опухолевых клеток к воздействию анти-ERBB-антител. Необходимо отметить, что эффект комбинированного применения анти-EGFR- и анти-VEGFR-антител наблюдается только в отсутствие у пациента активирующих мутаций в гене KRAS [23].

2. Молекулярные изменения в эффекторах сигнального пути ERBB. Частой причиной резистентности к анти-ERBB-антителам является конститутивная актива-

ция медиаторов нижележащих сигнальных путей. Так, показано, что аномальная передача сигналов от EGFR может быть вызвана молекулярными изменениями в нижестоящих эффекторах EGFR, в частности в белках K-Ras, PIK3CA, PTEN и STAT, что способствует устойчивости к анти-EGFR-таргетной терапии. Активирующие мутации KRAS или PIK3CA ассоциированы с потерей ответа на добавление анти-ERBB1-антител к стандартной химиотерапии. Опухоли, в которых детектируется дикий тип KRAS, чувствительны к панитумабу (panitumumab) и цетуксимабу (cetuximab), тогда как мутации в кодонах 12 и 13 экзона 2 гена KRAS приводят к стабилизации функционально активного комплекса RAS-GTP и непрерывной передаче сигнала по RAF-MAPK-пути [24].

Экспрессия гена K-RAS также может регулироваться путем изменения в связывании микроРНК (миРНК). Семейство LET-7 микроРНК подавляет гены семейства RAS, в том числе и K-RAS, после связывания со специфическими сайтами в 3'-UTR Ras мРНК. Идентифицирован однонуклеотидный полиморфизм (Т на G) в LET-7 комплементарном сайте (LCS6) 3'-UTR K-RAS. Этот полиморфизм изменяет связывание LET-7, что приводит к увеличению экспрессии K-RAS. В ряде исследований изучали роль этого полиморфизма как прогностического биомаркера для анти-EGFR-терапии. При раке полости рта данный полиморфизм связан с плохим прогнозом [25].

Еще одним членом семейства протоонкогенов RAS является H-RAS. Мутации в H-Ras были описаны в литературе и варьируют от 0 до 22%. Т. Рампиас (T. Rampias) с соавторами [26] показали, что сайлэнсинг H-RAS в мутантной по H-RAS линии клеток ПРГШ восстанавливает чувствительность к цетуксимабу, что вызвано непосредственным снижением уровня ERK1/2 [26].

В MAPK-сигнальном пути ниже от K-RAS расположены белки из семейства фосфатаз с двойной специфичностью (DUSP). DUSP-белки участвуют в механизме отрицательной обратной связи сигнального пути MAPK. Оба белка – цитоплазматический DUSP5 и ядерный DUSP6 – могут дефосфорилировать ERK1/2, тем самым блокируя сигнал MAPK-каскада [27]. DUSP-белки можно рассматривать в качестве белков-онкосупрессоров, и потеря их экспрессии способствует конститутивной активации ERK и неконтролируемому клеточному росту. Снижение экспрессии DUSP6 наблюдалось в опухолевой ткани у 75% пациентов с плоскоклеточным раком носоглотки [28], что может быть вызвано либо путем потери гетерозиготности локуса DUSP6, либо путем метилирования его промотора [29]. Показано, что функционирование цетуксимаба в эпидермоидных раковых клетках A431 зависит от EGFR лигандов, понижающих экспрессию DUSP6 и EMT-ассоциированных белков (белков, ассоциированных с эпителиально-мезенхимальным переходом) [30].

Помимо активации сигнального пути RAS/RAF/MAPK, EGFR также опосредует активацию PI3K/Akt-пути.

Следовательно, изменения в белках, участвующих в PI3K/Akt-пути, могут также играть важную роль в резистентности к анти-EGFR-терапии.

Мутации в белке PIK3CA встречаются у 11% пациентов с ПРГШ [31] и связаны с активацией Akt сигнального пути [33]. Мутация в 20-й экзоне гена PIK3CA выявлена в клеточной линии ПРГШ, что приводит к постоянной активации Akt. Кроме того, постоянная активация MAPK или Akt, или обоих наблюдается при ПРГШ и в клеточных линиях толстой кишки, показывающих ограниченную эффективность терапии цетуксимабом [34].

Потеря функций белком опухолевого супрессора PTEN также приводит к постоянной активации пути PI3K/Akt, однако у Cal27 клеток ПРГШ (с подавленной экспрессией PTEN) лечение цетуксимабом приводило к снижению уровня AKT и ERK1/2 [35].

Резистентность к трастузумабу (trastuzumab) может быть обусловлена также значительным изменением уровня экспрессии гена фосфатазы PTEN, что приводит к нарушению регуляции сигнального каскада PI3K/Akt и усилению передачи сигнала как *in vitro*, так и *in vivo*. Ингибиторы протеинкиназы PI3K восстанавливают чувствительность к трастузумабу [36].

В исследовании [37] отмечено также, что в некоторых цетуксимаб-резистентных линиях усиливается активность Src-киназ и передача сигнала в ядро. Стимуляция EGFR приводит к активации Src-киназ, которые могут влиять на клеточную пролиферацию и выживание путем активации семейства транскрипционных факторов STAT, особенно STAT3 и STAT5. Повышенные уровни Src-киназ были обнаружены при ПРГШ и других злокачественных опухолях. Результаты, полученные исследователями, указывают на то, что ингибиторы Src могут быть полезны в преодолении анти-EGFR резистентности путем уменьшения уровней активированного STAT3 и STAT5 [37].

Семейство белков STAT играет важную роль в передаче сигналов выживания и противоапоптозных сигналов, которые инициируются посредством активации EGFR [38]. Таким образом, нарушение регуляции сигнального пути STAT причастно к злокачественной трансформации. Активация STAT3 приводит к активации нескольких белков, в том числе белков выживания Bcl-XL, Bcl-2 и сурвивина [39]. При ПРГШ активация STAT3 связана с передачей сигнала от JAK и Src, а также частично от EGFR [40]. Было показано, что антипролиферативное действие цетуксимаба, а также цетуксимаб-индуцированного апоптоза выражено сильнее в клетках с нокаутном гена STAT3 по сравнению с контрольными клетками [39]. Эти противоопухолевые эффекты были также замечены для клеток ПРГШ *in vitro* и *in vivo* с использованием эрлотиниба в комбинации с ловушкой фактора транскрипции STAT3 [41]. На основе этих результатов совместная таргетная терапия STAT3 и EGFR кажется перспективной при ПРГШ.

3. Повышенная экспрессия генов лигандов ERBB-рецептора, являющегося мишенью терапевтического антитела, также может приводить к усилению передачи сигнала и невосприимчивости к терапевтическим антителам. Резистентность к трастузумабу может возникать, например, при гиперэкспрессии в опухолевых клетках природного лиганда ERBB1 (EGFR), трансформирующего фактора роста α (TGF- α). Связывание лигандов с EGFR приводит к его гомодимеризации или гетеродимеризации с членами семейства ERBB-рецепторов, что приводит к инициации нижестоящих сигнальных путей. Таким образом, повышенная экспрессия его лигандов может способствовать резистентности к цетуксимабу.

Х. Хатакэяма (H. Hatakeyama) с соавторами [41] показали, что цетуксимаб-чувствительные линии ПРГШ-клеток становятся устойчивыми к цетуксимабу при стимуляции лигандом HB-EGF. Обнаружено также, что активация EGFR может быть вызвана тремя лигандами – амфирегулином, HB-EGF и TGF- α – даже в присутствии цетуксимаба [41]. У 45 % пациентов, получающих комбинированное лечение ПРГШ цетуксимабом-доцетакселом, были обнаружены высокие уровни амфирегулина [42]. Кроме того, исследование *in vivo* показало, что у перевиваемых ПРГШ, выращенных в присутствии цетуксимаба, развивается резистентность опухолевых клеток, которые экспрессируют относительно высокие уровни TGF- α по сравнению с необработанными цетуксимабом опухолями мышей. Комбинированная терапия с цетуксимабом и антителами, блокирующими TGF, предотвращает развитие таких резистентных опухолевых клеток [43].

Показано, что эффективность терапии анти-EGFR и анти-VEGFR-антителами снижается в условиях гипоксии за счет повышенной экспрессии генов таких проангиогенных факторов, как FGF и PDGF- β , которые могут рестимулировать ангиогенез опухоли VEGF-независимым образом [44].

4. Нарушение образования функциональных димеров ERBB-рецепторов. Обнаружено, что гиперэкспрессия EGFR и повышение тирозинкиназной активности в резистентных к цетуксимабу клетках приводит к активации HER2/neu и HER3 и запуску сигнальных каскадов посредством гетеродимера HER2/neu/HER3 [45]. Таким образом, именно лишенный киназной активности HER3 играет важную роль в возникновении резистентности опухолей к антителам, направленным на EGFR или HER2. Анти-HER2/neu-антитело пертузумаб, препятствующее димеризации рецептора, способно восстанавливать чувствительность опухолевых клеток к анти-EGFR-антителам [46].

5. Возникновения специфических мутаций в ERBB-рецепторах. Резистентность к лечению ингибиторами РТК возникает также вследствие генетической нестабильности опухолевых клеток и возникновения специфических мутаций в ERBB-рецепторах, обуславливающих их кон-

ститутивную тирозинкиназную активность. Одной из наиболее распространенных мутаций, обнаруженных в 50 % случаев приобретенной резистентности, является мутация EGFR T790M. Эта мутация приводит к значительному увеличению аффинности связывания АТФ-рецептором и к полной резистентности к АТФ-конкурентным низкомолекулярным ингибиторам гефитинибу и эрлотинибу. Применение необратимого неконкурентного ингибитора ERBB1 и ERBB2 lapatinib и его комбинации с cetuximab позволяет преодолеть этот вид резистентности [47]. Эти мутации редко встречаются при ПРГШ. Данные литературы свидетельствуют о том, что частота таких активирующих мутаций у больных ПРГШ находится в диапазоне от 0 до 15,7 % [48].

Наличие делеции внеклеточного домена у EGFRvIII приводит к устойчивости к терапевтическому антителу цетуксимабу, несмотря на сохранение способности антитела связываться со своим эпитопом в домене III. В отличие от дикого типа EGFR, EGFRvIII преимущественно активирует путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K-путь). Мутантная форма EGFRvIII ассоциируется с увеличением пролиферации, роста опухоли, клеточной подвижности и инвазии и устойчивости к анти-EGFR-терапии [49]. Нейтрализовать рецептор EGFRvIII позволяет специально разработанное антитело mAbh806 (мкАТ806), специфичное по отношению к этой форме EGFR [50]. Частота мутации EGFRvIII при ПРГШ варьирует, достигая, по данным ряда авторов, 48 % [51].

6. Резистентность к трастузумабу может возникать также в результате **повышения стабильности ERBB2-рецептора при взаимодействии с шапероном HSP90**. На модели трастузумаб-резистентных p95HER2 гиперэкспрессирующих опухолей показано, что длительное введение *in vivo* ингибиторов HSP90, например антибиотика гелданамицина, приводит к устойчивому снижению экспрессии ERBB2 и его усеченной формы p95HER2 и ингибированию активации Akt с последующей индукцией апоптоза [52].

7. Нарушение лизосомальной деградации рецептора и транслоцирование в ядро клетки. Часть рецепторов EGFR иногда избегает интернализации и лизосомальной деградации и транслоцируется в ядро [53]. Ядерные EGFR функционируют в качестве фактора транскрипции циклина D1, iNOS, b-myb и COX-2 и в качестве стабилизатора ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), что приводит к активации сигнального пути оксида азота и повышению продолжительности G1/S клеточного цикла [54]. Таким образом, пролиферативный потенциал раковых клеток усиливается. Наличие ядерного EGFR не только ассоциируется с плохим прогнозом, но и с резистентностью к терапии [55]. При плоскоклеточном раке полости рта ядерный EGFR обнаружен у 24,3 % больных [56].

Далее рассмотрим некоторые **другие потенциальные механизмы резистентности**.

Auoga-киназы A и B являются высоко консервативными серин/треонин-киназами, играющими существенную роль в митозе [57]. Избыточная экспрессия этих киназ часто присутствует во многих типах злокачественных опухолей, в случае ПРГШ избыточная экспрессия Auoga-киназы A обнаруживается в 90 % опухолей. Сверхэкспрессия Auoga-киназы A коррелирует с прогрессированием опухоли, метастазирующим фенотипом и сокращением срока жизни и поэтому считается отрицательным прогностическим маркером [57].

Недавние исследования свидетельствуют о роли Auoga-киназы A в ответе на терапию. Сверхэкспрессия Auoga-киназы A вызывает активацию двух важных молекул, участвующих в регуляции резистентности к лекарственным средствам, – Akt и NF- κ B [58]. Лечение ПРГШ-клеток цетуксимабом и ингибитором рап-Auoga-киназы R763 привело к быстрому и эффективному снижению уровня S10HH3 – субстрата Auoga-киназы [57].

Результаты исследования [59] показали, что цетуксимаб обладает способностью ингибировать рост клеток с диким типом p53, но не в p53-мутировавших клетках. Опухолевый супрессор белок p53 играет ключевую роль в контроле клеточного цикла, и, следовательно, утрата его функции приводит к процессу канцерогенеза. А восстановление функции p53 в резистентных клетках приводит к повышенной чувствительности к цетуксимабу [60].

В 2011 г. С. Хольц (С. Holz) с соавторами обнаружили ПРГШ-клетки с мезенхимальной морфологией и повышенным миграционным потенциалом, менее чувствительные к облучению и цетуксимабу [61]. Эпителиально-мезенхимальный переход характеризуется потерей эпителиальных свойств клеток и приобретением мезенхимных фенотипических признаков, в результате чего опухолевые клетки отделяются от соседних клеток и мигрируют в окружающие ткани [62]. TGF- β вместе с сигнальным путем Ras – мощные индукторы EMT [63]. В 2010 г. И. Скворцова (I. Skvortsova) с коллегами предположили, что маркеры EMT с-Мус, Е-кадгерин и виментин могут рассматриваться как прогностические биомаркеры для больных ПРГШ, получавших цетуксимаб в комбинации с лучевой терапией [64].

Важно отметить, что дефицит кислорода оказывает значительное влияние на клинический ответ при лечении рака, и было показано, что гипоксические участки опухоли часто содержат жизнеспособные клетки, которые по своей природе более устойчивы к лечению лучевой терапией или химиотерапией [65]. В солидных опухолях человека, в том числе ПРГШ, часто имеются очаги, которые испытывают тяжелую степень кислородного голодания (гипоксию). Интересно отметить, что доклинические и клинические исследования подтверждают важную связь между гипоксией и позитивной регуляцией EGFR

при онкологических заболеваниях, характеризующихся отсутствием генетических изменений данного рецептора [66]. Например, при агрессивном ПРГШ человека иммуногистохимические данные показали индуцированную гипоксией активацию EGFR [67]. Эти результаты были подтверждены в исследовании [68], где сообщалось о локализации EGFR и маркера гипоксии пимонидазола у пациентов с ПРГШ в основном на большом расстоянии от кровеносных сосудов. Установлено также, что отсутствие клинических ответов на EGFR-направленную терапию может быть преодолено путем проведения анти-EGFR-терапии с дополнительными подходами, ориентированными на HIF. Например, подавление HIF-1 с помощью микро-RНК улучшает ответ цетуксимаб-резистентных клеток ПРГШ на комбинацию цетуксимаба с радиотерапией [69].

В ряде случаев резистентность к терапевтическим антителам имеет скорее не молекулярную, а механическую природу. Не всегда ERBB-онкогены легко доступны для нацеленных на них терапевтических антител. Так, в солидных опухолях экстрацеллюлярный матрикс затрудняет диффузию терапевтических антител и маскирует их рецепторные мишени. На модельных опухолях с гиперэкспрессией онкомаркера HER2/неу было показано, что внутриопухолевая экспрессия пептидного гормона релаксина приводит к деградации белков экстрацеллюлярного матрикса и в результате способствует улучшению терапевтического эффекта трастузумаба [70].

Механизмы резистентности к анти-PD-1-терапии

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек – блокаторов CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4), PD-1 (programmed death 1) и его лиганда (PD-L1) – произвело революцию в лечении злокачественных новообразований. Но несмотря на высокую клиническую эффективность, у 50–60 % пациентов присутствует первичная резистентность к анти-PD-1-терапии. Имеется много данных о молекулярно-генетических маркерах опухоли, а также опухолевого микроокружения, связанных с первичной резистентностью к анти-PD-1-терапии. Однако нет ни одного рекомендованного маркера для отбора пациентов, нуждающихся в анти-PD-1-терапии. На данный момент имеются скудные данные по механизмам развития вторичной резистентности к анти-PD-1-терапии, а также по эффективности различных методов лечения таких пациентов [71, 72].

Механизмы первичной резистентности можно условно разделить на две группы: события, происходящие в клетках опухоли, и микроокружения – хотя они тесно связаны друг с другом. К первой группе можно отнести: активирующие мутации в гене BRAF, потерю PTEN, активацию WNT-каскада, секрецию VEGF и противовоспалительных

цитокинов, гиперэкспрессию CD155 [71]. Ко второй группе – экспрессию CTLA-4, Tim3, LAG3, TIGIT, IDO1 клетками микроокружения [73].

Мутации, которые увеличивают стабильность β -катенина, могут снижать экспрессию лиганда хемокина CCL4, значимого для миграции дендритных клеток (ДК). Наиболее вероятным механизмом этого является активация свободным β -катенином ATF3 (activation transcription factor 3) ингибитора транскрипции CCL4 (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β). Результат – нарушение антигенпрезентации от BATF3-ДК к CD8+ Т-лимфоцитам [74]. Сниженная экспрессия CCL4 ассоциируется с отсутствием TILs и резистентностью к анти-PD1-терапии [72].

Гиперэкспрессия WNT5A и включение неканонического сигнального пути WNT в опухолевых клетках повышает их метастатическую способность и способствует прогрессии заболевания, а также положительно коррелирует с первичной резистентностью к анти-PD-1-терапии [75]. Доказано, что WNT5A, связываясь со своим рецептором на поверхности ДК, повышает экспрессию IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygenase-1). Таким образом, блокада канонического пути WNT или ATF3 может повысить эффективность анти-PD-1-терапии.

Повышенное значение VEGF, TGF и IL10 в опухолевом микроокружении также способствует развитию резистентности к анти-PD1-терапии, предотвращая активацию опухоль-специфических Т-лимфоцитов. Ко-экспрессия других ингибиторных рецепторов в дополнение к PD-1, таких как TIM3 (T-cell immunoglobulin mucin 3), LAG3 (lymphocyte activation gene 3), CTLA4 и BTLA (B and T lymphocyte attenuator), ассоциируется с развитием резистентности к анти-PD1-терапии [76].

Tim3 экспрессируется на поверхности активированных CD8+ Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1-го типа, макрофагов. Лигандом Tim3 является галектин 9. Повышение экспрессии Tim3 на поверхности TILs во время анти-PD-1-терапии является маркером развивающейся резистентности на моделях аденокарциномы легкого с мутациями EGFR T790M/L858R и KRAS. Совместная блокада Tim3 и PD-1 была эффективна на мышиных моделях аденокарциномы легкого с резистентностью к анти-PD-1-терапии [77].

TIGIT экспрессируется на поверхности Treg, CTLs, NK-клеток, его лигандами являются CD155 и CD112. TIGIT и его лиганды – CD155, CD112, а также молекулы-двойники с противоположными функциями – CD226, CD96 регулируют активность NK-и Т-клеток. Увеличение влияния CD155/CD112 и TIGIT приводит к ингибированию противоопухолевого иммунного ответа и может лежать в основе первичной резистентности к анти-PD-1-терапии [78].

Резистентность к анти-PD1-терапии может быть обусловлена секрецией иммуносупрессорных метабо-

литов. IDO (индол-амин-2,3-диоксигеназа) и IDO2, стимулируя катаболизм триптофана, супрессируют Т-клеточный иммунитет. Для многих опухолей человека характерен повышенный синтез IDO и IDO2, в частности вследствие инактивации опухолевого супрессора Bin1 (транскрипционный репрессор). Другим иммуносупрессорным метаболитом является аденозин. A2aR, лигандом которого является аденозин, ингибирует Т-клеточный ответ, способствуя экспрессии CD4+Т-клетками FOXP3, т.е. дифференцировке в Т-регуляторные клетки. После гибели клетки секретируют аденозин. В дополнение на Т-регуляторных клетках высокоэкспрессирован CD39, который конвертирует экстрацеллюлярный АТФ в АМФ, и CD73, конвертирующий АМФ в аденозин. Таким образом, взаимодействие A2aR с аденозином способствует дифференцировке Т-клеток в Т-регуляторные клетки, которые, в свою очередь, образуют самоамплифицирующую нишу в опухоли [79]. Повышенная экспрессия PD-1, ко-экспрессия множественных ингибиторных рецепторов и продукция иммуносупрессивных метаболитов оказывают влияние на чувствительность опухоли к анти-PD1-терапии. Кроме того, гетерогенность, присущая большинству опухолей, позволяет одновременно реализовываться множественным механизмам резистентности.

В то время как эффекторные CD8+Т-клетки продемонстрировали свою необходимость для эффективности анти-PD1-терапии, на основе результатов последних исследований можно сделать предположение, что Т-клетки памяти также важны для чувствительности опухоли к ингибиторам чекпойнтов. При сравнении опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов до и после анти-PD1-терапии было выявлено, что у чувствительных пациентов большую часть популяции Т-лимфоцитов занимала субпопуляция эффекторных клеток памяти CD8+Тem; в свою очередь, TILs резистентных пациентов содержали значительно меньшее количество Tem. Следовательно, индукция Т-клеток с фенотипом эффекторной памяти имеет важное значение для эффективности анти-PD1-терапии, а резистентность к анти-PD1-терапии ограничивает индукцию Т-клеток памяти [79].

Гиперэкспрессия PD-L1 коррелирует с усилением клинического ответа при анти-PD1-терапии в отношении PD1-рецепторов при различных злокачественных опухолях. Тем не менее клиническая эффективность ингибиторов PD-1 наблюдается в том числе у пациентов с отсутствием экспрессии PD-L1, но с гораздо меньшей частотой, чем при наличии экспрессии этого вида рецепторов [80].

Следует отметить, что применение цетуксимаба приводит к селекции опухолевых клеток в сторону снижения иммунозависимости в основном в группе ВПЧ-позитивного рака с низкой экспрессией PD-L1, что снижает эффективности ниволумаба после терапии цетуксимабом [5].

На сегодняшний день основными предполагаемыми механизмами развития вторичной резистентности к ан-

ти-PD-1-терапии являются: дисфункция интерферонового пути в клетках опухоли (мутации в JAK1-2), мутации в $\beta 2$ -микро-глобулине (B2M), экспрессия других иммунных чекпойнтов.

JAK/STAT сигнальный путь в настоящий момент считается одним из наиболее значимых путей, приводящих к пролиферации и дифференцировке клеток врожденного и приобретенного иммунитета. ИФН I и II типов являются активаторами этого сигнального пути. Семейство JAK-киназ включает JAK1, JAK2, JAK3, TYK2. После активации JAK1 и JAK2 происходят фосфорилирование и активация STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), который в последующем образует гомодимер, транслоцируется в ядро и связывается с промоторами IRF (interferon responsive factor). Это приводит к повышению экспрессии множества генов, в том числе MHC-I, TAP1 (transporter associated with antigen processing 1). Снижение активности JAK/STAT-пути в клетках затрудняет антигенпрезентацию CD8+T-лимфоцитам, тем самым подавляя клеточный иммунный ответ [71].

Заключение

Проведенный анализ данных литературы позволяет выделить следующие факторы, потенциально связанные с резистентностью к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта:

1. Активация альтернативных рецепторных тирозинкиназ, включая молекулярные изменения (активирующие мутации, амплификации) в самих рецепторных тирозинкиназах. Для прогнозирования эффективности терапии цетуксимабом целесообразно проводить скрининг мутаций в генах ERBB2 и MET, а также оценку их транскрипционной активности.
2. Повышенная экспрессия генов лигандов рецепторов. Оценка уровня экспрессии генов лигандов HGF и TGF- α можно рекомендовать в качестве маркеров

резистентности к терапии моноклональными антителами.

3. Молекулярные изменения (мутации и амплификации) в нижележащих эффекторах рецепторных тирозинкиназ. Мутации и амплификации генов H-Ras, K-Ras, PIK3CA, PTEN, STAT, PIK3CA и DUSP6 можно рекомендовать в качестве маркеров резистентности к терапии моноклональными антителами. А оценку мутаций в генах BRAF, PTEN и STAT целесообразно проводить для определения эффективности (отсутствия резистентности) анти-PD1-терапии.
 4. Нарушение образования функциональных димеров рецепторов, повышение стабильности рецептора при взаимодействии с шапероном или транслокация рецептора в клеточное ядро. Для выявления больных с заведомой резистентностью к цетуксимабу необходимо провести определение уровня экспрессии HSP90 при отсутствии изменений в генах, перечисленных в пунктах 1–3.
 5. Молекулярные изменения в белках и кодирующих их генах, ответственных за регуляцию каскадов апоптоза, пролиферации и митоза, эпителиально-мезенхимального перехода, секрецию VEGF, противовоспалительных цитокинов, иммуносупрессорных метаболитов (IDO и IDO2). Определение мутаций в гене p53 и экспрессии генов Auroга-киназы A, c-Мус и E-кадгерина могут быть ценными прогностическими маркерами резистентности к цетуксимабу, также как определение экспрессии генов CCL4, IDO, WNT5A, VEGF, TGF, IL10, JAK1 и JAK2 может быть ценным прогностическим маркером резистентности к анти-PD1-терапии.
 6. Сформировавшиеся условия локальной (опухолевой) гипоксии. Определение маркера гипоксии пимонидазола и экспрессии HIF1 возможно использовать для оценки резистентности к терапии моноклональными антителами.
- Данные по исследованиям перечисленных выше предиктивных и прогностических маркеров необходимо учитывать при отборе больных плоскоклеточными опухолями языка и слизистой дна полости рта для применения моноклональных антител (цетуксимаба, пембролизумаба и ниволумаба).

Информация об авторах

Любовь Ю. Владимирова, д. м. н., проф., руководитель отдела лекарственного лечения опухолей, руководитель отделения противоопухолевой лекарственной терапии № 1, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: vlu@aanet.ru

Аза А. Льянова, врач-онколог отделения противоопухолевой лекарственной терапии № 1, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: blackswan-11@mail.ru

Елена М. Франциянц, д. м. н., проф., руководитель лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: super.gormon@yandex.ru.

Денис С. Кутилин, к. б. н., с. н. с. лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: fired2007@rambler.ru

Марина А. Енгигбарян, к. м. н., зав. отделением опухолей головы и шеи, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Россия, e-mail: rnioi@list.ru

DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-4-13-25

For citation: Vladimirova L. Yu., Lyanova A. A., Frantsiyants E. M., Kutilin D. S., Engibaryan M. A. Molecular mechanisms of resistance to monoclonal antibodies therapy patients with squamous cell carcinoma of the tongue and mucosa of the oral cavity. *Malignant Tumours* 2018; 8(4):13-25 (In Russ.)

Molecular mechanisms of resistance to monoclonal antibody therapy in patients with squamous cell carcinoma of the tongue and mucosa of the oral cavity

L. Yu. Vladimirova, A. A. Lyanova, E. M. Frantsiyants, D. S. Kutilin, M. A. Engibaryan

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia
For correspondence: rnioi@list.ru

Abstract: The review analyzes current data on the molecular mechanisms of resistance to monoclonal antibodies in patients with squamous cell carcinoma of the tongue and mucosa of the oral cavity. The mechanisms of resistance to monoclonal anti-ERBB and anti-PD1 antibodies and ways to overcome it are described in detail. The analysis made it possible to identify a number of factors that should be taken into account when assigning therapy with monoclonal antibodies: activation of alternative receptor tyrosine kinases, increased expression of receptor ligand genes, mutations in effectors and the receptor tyrosine kinases themselves, disruption of the formation of functional receptor dimers, changes in proteins and coding for them genes responsible for the regulation of cascades of apoptosis, mitosis, epithelial-mesenchymal transition, secretion of anti-inflammatory cytokines and immunosuppressive metabolites.

Keywords: squamous cell carcinoma of the tongue and mucosa of the oral cavity, monoclonal antibodies, resistance, ERBB receptors, mutations, lysosomal degradation, apoptosis, PD-1 receptor

Information about the authors

Liubov Yu. Vladimirova, MD, DSc Med, Professor, Head of the Department of Medical Treatment, Head of the Tumor Drug Therapy Department No. 1, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: vlu@aaanet.ru

Aza A. Lyanova, MD, oncologist, Tumor Drug Therapy Department No. 1, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: blackswan-11@mail.ru

Elena M. Frantsiyants, MD, DSc Med, Professor, Head of the Laboratory of Immunophenotyping of Tumors, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: super.gormon@yandex.ru.

Denis S. Kutilin, MD, PhD Biol, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: fired2007@rambler.ru

Marina A. Engibaryan, MD, PhD Med, Head of the Department of Head and Neck Tumors, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: mar457@yandex.ru

Литература • References

1. Архипова О. Е., Черногубова Е. А., Лихтанская Н. В., Тарасов В. А., Кит О. И., Еремеева А. А., Матишов Д. Г. Анализ встречаемости онкологических заболеваний в Ростовской области. Пространственно-временная статистика // Наука Юга России. 2013. Т. 9. №3. С. 7–14. [Arkhipova O. E., Chernogubova E. A., Likhtanskaya N. V., Tarasov V. A., Kit O. I., Eremeeva A. A., Matishov D. G. Analiz vstrechaemosti onkologicheskikh zabolevanii v Rostovskoi oblasti. Prostranstvenno-vremennaya statistika (Analysis of the occurrence of cancer in the Rostov region. Spatio-temporal statistics). *Nauka Yuga Rossii*. 2013. Vol. 9. No. 3. P. 7–14 (In Russ.).]
2. Мудунов А. М., Нариманов М. Н., Сафаров Д. А. Новые возможности иммунотерапии в лечении распространенного рецидивного плоскоклеточного рака органов головы и шеи // Опухоли головы и шеи. 2017. Т. 7. №2. С. 99–105. [Mudunov A. M., Narimanov M. N., Safarov D. A. New opportunities for immune therapy in patients with disseminated recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Opukholi golovy i shei*. 2017. Vol. 7. No. 2. P. 99–105 (In Russ.).]

3. Global, regional, and national age – sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. GBD 2013 Mortality Causes of Death Collaborators. *The Lancet*. 2014. Vol. 385. No. 9963. P. 117-171.
4. Гельфанд И. М., Романов И. С., Минкин А. У. Тактика лечения плоскоклеточного рака полости рта стадий cT1–2cN0M0 // Опухоли головы и шеи. 2014. Т. 2. С. 33–36. [Gelfand I. M., Romanov I. S., Minkin A. U. Treatment policy for stages cT1–2cN0M0 oral squamous cell carcinoma. *Opukholi golovy i shei*. 2014. Vol. 2. P. 33–36 (In Russ.)].
5. Мудунов А. М. Ниволумаб в лечении рефрактерного рецидивного и метастатического плоскоклеточного рака органов головы и шеи. Результаты клинического исследования III фазы CheckMate 141 // Опухоли головы и шеи. 2017. №3. С. 74–86. [Mudunov A. M. Nivolumab in the treatment of refractory recurrent and metastatic head and neck squamous cell carcinoma. The results of a phase III clinical trial (CheckMate 141). *Opukholi golovy i shei*. Vol. 3. P. 74–86 (In Russ.)].
6. Льянова А. А., Владимирова Л. Ю., Франциянц Е. М., Кутилин Д. С., Енгибарян М. А. Молекулярные основы современной таргетной терапии плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта моноклональными антителами // Злокачественные опухоли. 2017. Т. 7 (4). С. 77–87. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-4-77-87. [Lyanova A. A., Vladimirova L. Yu., Frantsiyants E. M., Kutilin D. S., Engibaryan M. A. Molecular basis of modern targeted therapy for squamous cell carcinoma of the tongue and oral mucosa with monoclonal antibodies. *Zlokachestvennye opukholi* (Malignant Tumours). 2017. Vol. 7 (4). P. 77–87 (In Russ.)].
7. Поляновский О. Л., Лебеденко Е. Н., Деев С. М. ERBB онкогены – мишени моноклональных антител // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 3. С. 289–311. [Polanovski O. L., Lebedenko E. N., Deyev S. M. ERBB oncogene proteins as targets for monoclonal antibodies. *Biochemistry* (Moscow). 2012. Vol. 77. No. 4. P. 289–311 (In Russ.)].
8. Zandberg D. P., Strome S. E. The role of the PD-L1: PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2014. Vol. 50. P. 627–632.
9. Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011. Vol. 480. P. 480–489.
10. Ferris R., Blumenschein G., Fayette J. et al. Nivolumab for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med*. 2016. Vol. 375 (19). P. 1856–1867.
11. Bauml J., Siewert T., Pfister D. G. et al. Preliminary results from KEYNOTE-055: Pembrolizumab after Cisplatin and Cetuximab failure in Head and Neck squamous cell carcinoma. ASCO Annual Meeting, Best of ASCO designation: 2016. *J. Clin. Oncol*. 2016. Vol. 34 (suppl). abstr 6011.
12. Jager M., Schoberth A., Ruf, P., Hess J., Lindhofer H. *Cancer Res*. 2009. Vol. 69. P. 4270-4276.
13. Sonnenblick A., Brohee S., Fumagalli D., Rothe F., Vincent D. et al. Integrative proteomic and gene expression analysis identify potential biomarkers for adjuvant trastuzumab resistance: analysis from the Fin-her phase III randomized trial. *Oncotarget*. 2015. Vol. 6 (30). P. 30306–16.
14. Li R., Pourpak A., Morris S. W. *J. Med. Chem*. 2009. Vol. 27. P. 4981–5004.
15. Zuo Q., Shi M., Li L. et al. Development of cetuximab-resistant human nasopharyngeal carcinoma cell lines and mechanisms of drug resistance. *Biomed. Pharmacother*. 2010. Vol. 64. P. 550–558.
16. Riesterer O., Yang Q., Raju U. et al. Combination of anti-IGF-1R antibody A12 and ionizing radiation in upper respiratory tract cancers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2011. Vol. 79. P. 1179–1187.
17. Quesnelle K. M., Grandis J. R. Dual kinase inhibition of EGFR and HER2 overcomes resistance to cetuximab in a novel in vivo model of acquired cetuximab resistance. *Clin. Cancer Res*. 2011. Vol. 17. P. 5935–5944.
18. Yonesaka K., Zejnullahu K., Okamoto I. et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci. Transl. Med*. 2011. Vol. 3. 99ra86.
19. Кутилин Д. С., Айрапетова Т. Г., Анистратов П. А., Пыльцин С. П., Лейман И. А. и др. Изменение относительной копийности генетических локусов во внеклеточной ДНК у пациентов с аденокарциномой легкого // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2017. №3–2 (195–192). С. 74–82. [Kutilin D. S., Airapetova T. G., Anistratov P. A., Pylytsin S. P., Leiman I. A. Relative copy number variation of genetic loci in the cell-free DNA in patients with lung adenocarcinoma. *Estestvennye nauki* (Natural Science). 2017. No. 3-2. P. 74–82 (In Russ.)].
20. Sierra J. R., Tsao M. S. c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol*. 2011. Vol. 3. P. S21 – S35.
21. Birkeland A. C., Swiecicki P. L., Brenner J. C., Shuman A. G. A review of drugs in development for the personalized treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*. 2016. Vol. 1 (4). P. 379–385.
22. Liska D., Chen C. T., Bachleitner-Hofmann T. et al. HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation. *Clin. Cancer. Res*. 2011. Vol. 17. P. 472–482.

23. Tol J., Punt C. J. *Clin. Ther.* 2010. Vol. 32. P. 437–453.
24. Allegra C. J., Jessup J. M., Somerfield M. R., Hamilton S. R., Hammond E. H., Hayes D. F et al. *J. Clin. Oncol.* 2009. Vol. 27. P. 2091–2096.
25. Christensen B. C., Moyer B. J., Avissar M. et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis*. 2009. Vol. 30. P. 1003–1007.
26. Rampias T., Giagini A., Matsuzaki H. et al. Genetic alterations in HRAS gene in relation to outcome and response to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. Paper presented at: ASCO Annual Meeting. June 1-5, 2012, Chicago.
27. Arkell R. S., Dickinson R. J., Squires M. et al. DUSP6/MKP-3 inactivates ERK1/2 but fails to bind and inactivate ERK5. *Cell Signal*. 2008. Vol. 20. P. 836–843.
28. Wong V. C., Chen H., Ko J. M. et al. Tumor suppressor dual-specificity phosphatase 6 (DUSP6) impairs cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) – associated phenotype. *Int. J. Cancer*. 2012. Vol. 130. P. 83–95.
29. Okudela K., Yazawa T., Woo T. et al. Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: Its mechanism and potential role in carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 2009. Vol. 175. P. 867–881.
30. Oliveras-Ferreras C., Vazquez-Martin A., Cufi S. et al. Stem cell property epithelial-to-mesenchymal transition is a core transcriptional network for predicting cetuximab (Erbix) efficacy in KRAS wildtype tumor cells. *J. Cell. Biochem.* 2011. Vol. 112. P. 10–29.
31. Ligresti G., Militello L., Steelman L. S. et al. PI3CA mutations in human solid tumors: Role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle*. 2009. Vol. 8. P. 1352–1358.
32. Pedrero J. M., Carracedo D. G., Pinto C. M. et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2005. Vol. 114. P. 242–248.
33. Rebucci M., Peixoto P., Dewitte A. et al. Mechanisms underlying resistance to cetuximab in the HNSCC cell line: Role of AKT inhibition in bypassing this resistance. *Int. J. Oncol.* 2011. Vol. 38. P. 189–200.
34. Mriouah J., Boura C., Pinel S. et al. Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int. J. Oncol.* 2010. Vol. 37. P. 1555–1563.
35. Nagata Y., Lan K. H., Zhou X. *Cancer Cell*. 2004. Vol. 6. P. 117–127.
36. Wheeler D. L., Iida M., Kruser T. J., Nechrebecki M. M., Dunn E. F. et al. *Cancer Biol. Ther.* 2009. Vol. 8. P. 696–703.
37. Kijima T., Niwa H., Steinman R. A. et al. STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo. *Cell Growth Differ.* 2002. Vol. 13. P. 355–362.
38. Bonner J. A., Yang E. S., Trummel H. Q. et al. Inhibition of STAT-3 results in greater cetuximab sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiother. Oncol.* 2011. Vol. 99. P. 339–343.
39. Onishi A., Chen Q., Humtsoe J. O. et al. STAT3 signaling is induced by intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 2008. Vol. 314. P. 377–386.
40. Boehm A. L., Sen M., Seethala R. et al. Combined targeting of epidermal growth factor receptor, signal transducer and activator of transcription-3, and bcl-X (L) enhances antitumor effects in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol. Pharmacol.* 2008. Vol. 73. P. 1632–1642.
41. Hatakeyama H., Cheng H., Wirth P. et al. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. e12702.
42. Tinhofer I., Klinghammer K., Weichert W. et al. Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin. Cancer Res.* 2011. Vol. 17. P. 5197–5204.
43. Bedi A., Chang X., Noonan K. et al. Inhibition of TGF- β enhances the in vivo antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy. *Mol. Cancer Ther.* 2012. Vol. 11. P. 2429–2439.
44. Dempke W. C., Heinemann V. *Eur. J. Cancer*. 2009. Vol. 45. P. 1117–1128.
45. Sergina N. V., Rausch M., Wang D., Blair J., Hann B., Shokat K. M., Moasser M. M. *Nature*. 2007. Vol. 445. P. 437–441.
46. Wheeler D. L., Huang S., Kruser T. J., Nechrebecki M. M., Armstrong E. A. et al. *Oncogene*. 2008. Vol. 27. P. 3944–3956.
47. Hopper-Borge E. A., Nasto R. E., Ratushny V., Weiner L. M., Golemis E. A., Astsaturov I. *Expert. Opin. Ther. Targets*. 2009. Vol. 13. P. 339–362.
48. Hama T., Yuza Y., Suda T. et al. Functional mutation analysis of EGFR family genes and corresponding lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis*. 2012. Vol. 29. P. 19–25.
49. Wheeler S. E., Suzuki S., Thomas S. M. et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene*. 2010. Vol. 29. P. 5135–5145.

50. Johns T. G., Adams T. E., Cochran J. R., Hall N. E., Hoyne P. A., Olsen M. J., Kim Y. S. et al. Identification of the epitope for the epidermal growth factor receptor-specific monoclonal antibody 806 reveals that it preferentially recognizes an untethered form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 30375–30384.
51. Chau N. G., Perez-Ordóñez B., Zhang K. et al. The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol.* 2011. Vol. 3. P. 11.
52. Chandarlapaty S., Scaltriti M., Angelini P., Ye Q., Guzman M., Hudis C. A. et al. *Oncogene*. 2010. Vol. 29. P. 325–334.
53. Lippman M. T., Hartley J. A., Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer Res.* 2011 Vol. 71. P. 1103–1114.
54. Hung L. Y., Tseng J. T., Lee Y. C. et al. Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36. P. 4337–4351.
55. Hoshino M., Fukui H., Ono Y. et al. Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology*. 2007. Vol. 74. P. 15–21.
56. Lo H. W., Xia W., Wei Y. et al. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 338–348.
57. Hoellein A., Pickhard A., von Keitz F. et al. Aurora kinase inhibition overcomes cetuximab resistance in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncotarget*. 2011. Vol. 2. P. 599–609.
58. Wu C. C., Yu C. T., Chang G. C. et al. Aurora-A promotes gefitinib resistance via a NF- κ B signaling pathway in p53 knockdown lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 405. P. 168–172.
59. Huether A., Hopfner M., Baradari V. et al. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2005. Vol. 70. P. 1568–1578.
60. Huang S., Benavente S., Armstrong E. A. et al. P53 modulates acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Res.* 2011. Vol. 71. P. 7071–7079.
61. Holz C., Niehr F., Boyko M. et al. Epithelial-mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. *Radiother. Oncol.* 2011. Vol. 101. P. 158–164.
62. Cowling V. H., Cole M. D. E-cadherin repression contributes to c-Myc-induced epithelial cell transformation. *Oncogene*. 2007. Vol. 26. P. 3582–3586.
63. Thiery J. P. Epithelial – mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003. Vol. 15. P. 740–746.
64. Skvortsova I., Skvortsov S., Raju U. et al. Epithelial- to-mesenchymal transition and c-myc expression are the determinants of cetuximab-induced enhancement of squamous cell carcinoma radioresponse. *Radiother. Oncol.* 2010. Vol. 96. P. 108–115.
65. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007. Vol. 26. P. 225–239.
66. Wouters A., Boeckx C., Vermorken J. B., Van den Weyngaert D., Peeters M., Lardon F. The intriguing interplay between therapies targeting the epidermal growth factor receptor, the hypoxic micro environment and hypoxia-inducible factors. *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 19. P. 907–917.
67. Wang X., Schneider A. HIF-2-mediated activation of the epidermal growth factor receptor potentiates head and neck cancer cell migration in response to hypoxia. *Carcinogenesis*. 2010. Vol. 31. P. 1202–1210.
68. Hoogsteen I. J., Marres H. A., van den Hoogen F. J. et al. Expression of EGFR under tumor hypoxia: Identification of a subpopulation of tumor cells responsible for aggressiveness and treatment resistance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2012. Vol. 84. P. 807–814.
69. Lu H., Liang K., Lu Y. et al. The anti-EGFR antibody cetuximab sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cells to radiation in part through inhibiting radiation-induced upregulation of HIF-1. *Cancer Lett.* 2012. Vol. 322. P. 78–85.
70. Beyer I., Li Z., Persson J., Liu Y., van Rensburg R., Yumul R., Zhang X. B., Hung M. C., Lieber A. *Mol. Ther.* 2011. Vol. 19. P. 479–489.
71. Жуликов Я. А., Самойленко И. В., Демидов Л. В. Механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии // Российский биотерапевтический журнал. 2018. Т. 17. № 1. С. 34–46. [Zhulikov Ya. A., Samoylenko I. V., Demidov L. V. Mechanisms of resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic cutaneous melanoma. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*. 2018. Vol. 17. No. 1. P. 34–46 (In Russ.)].
72. Саяпина М. С. Иммунорегуляторные функции ингибиторов PD-1/PD-L1 и развитие к ним резистентности // Злокачественные опухоли. 2017. Т. 7 (2). С. 94–99. [Sayapina M. S. Immunoregulatory functions of PD-1/PD-L1 inhibitors and development of resistance to them. *Zlokachestvennye opukholi* (Malignant Tumours). 2017. Vol. 7 (2). P. 94–99 (In Russ.)].

73. Dempke W. C. M., Fenchel K., Uciechowski P., Dale S. P. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment – the more the better? *Eur. J. Cancer*. 2017. Vol. 74. P. 55–72.
74. Ramos R. N., Piaggio E., Romano E. Mechanisms of resistance to immune checkpoint antibodies. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2017. DOI: 10.1007/164_2017_11. PMID: 28315073.
75. Hugo W., Zaretsky J. M., Sun L. et al. Genomic and transcriptomic features of response to Anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell*. 2016. Vol. 165 (1). P. 35–44.
76. Thommen D. S. et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol. Res.* 2015. Vol. 3. No. 12. P. 344–355.
77. Koyama S., Akbay E. A., Li Y. Y. et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. P. 10501.
78. Kurtulus S., Sakuishi K., Ngiow S. F. et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2015. Vol. 125 (11). P. 4053–4062.
79. Ribas A. et al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol. Res.* 2016. Vol. 4. No. 3. P. 194–203.
80. Garon E. B., Rizvi N. A., Hui R. et al. Pembrolizumab for the treatment of nonsmall-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015. Vol. 372 (21). P. 2018–2028.