

*на правах рукописи*

**БОРОБОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА**

**РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ИСКУССТВЕННЫХ  
ПОЛИЭПИТОПНЫХ АНТИГЕНОВ МЕЛАНОМЫ  
03.01.03 - молекулярная биология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Кольцово 2019**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:** Антонец Денис Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник теоретического отдела, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Ильичев Александр Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биоинженерии, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные оппоненты:** Коваленко Сергей Петрович, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией молекулярной генетики, ФГБНУ ФИЦ ФТМ, структурное подразделение «НИИ экспериментальной и клинической медицины»

Семенов Дмитрий Владимирович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск.

Защита состоится « 26 » апреля 2019 г. в 9-00 на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Н.М. Зубавичене

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Меланома - одно из наиболее опасных злокачественных новообразований кожи, отличается агрессивным характером роста и высокой частотой развития отдаленных метастазов. На сегодняшний день не существует универсального метода терапии, позволяющего эффективно бороться с клетками опухоли. Химиотерапия, которая до 2010 г. оставалась стандартным методом лечения пациентов с меланомой, позволяет добиться клинического эффекта в 10 % случаев, но не приводит к увеличению выживаемости больных. Высокая смертность и низкая эффективность лечения связаны с ранним метастазированием и формированием резистентности к классическим средствам терапии. В связи с этим возникает необходимость в разработке принципиально новых нетрадиционных подходов, которые позволят в будущем эффективно бороться с этим заболеванием.

За последние годы достигнут существенный прогресс в понимании молекулярных основ возникновения раковых клеток, а также механизмов взаимодействия опухоли и иммунной системы. Существуют данные, свидетельствующие в пользу того, что иммунная система способна самостоятельно распознавать и элиминировать клетки, несущие признаки антигенного отличия от клеток нормальных тканей. Такая отличительная особенность раковых клеток обусловлена присутствием на их поверхности антигенов, которые в норме отсутствуют или присутствуют в небольших количествах на поверхности здоровых клеток. Высокая иммуногенность опухолевых клеток послужила основой для развития такого подхода, как иммунотерапия, достигшая впечатляющих успехов за последние десятилетия. На сегодняшний день в клиническую практику внедрены препараты на основе цитокинов, блокаторов иммунных контрольных точек, а также терапевтические противораковые вакцины, показавшие обнадеживающие результаты в ряде клинических испытаний.

Разработка терапевтических вакцин является привлекательным направлением в иммунотерапии опухолей. В качестве основы для создания вакцины могут использоваться пептиды, опухолевые клетки или их лизаты, дендритные клетки, лимфоциты, а также молекулы нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). Перспективность разработки противораковых вакцин подтверждается тем фактом, что часть из них уже одобрены для использования в клинической практике. В качестве примера можно привести вакцину Sipuleucel-T (Provenge) против рака простаты и вакцину против глиобластомы (SurVaxM). Последним прорывом в области онкологии стало внедрение в клиническую практику препаратов на основе CAR-T-лимфоцитов (tisagenlecleucel-T, KTE-C19), показавших хорошие результаты в лечении гематологических опухолей. Несмотря на привлекательность, метод имеет определённые ограничения, главным образом, обусловленные серьезными побочными эффектами.

Значительный интерес представляет подход, основанный на дизайне полиэпитопных антигенов, использующих широкий спектр протективных T-клеточных эпитопов, а также на новых вакцинных стратегиях, учитывающих современные фундаментальные знания о путях презентации иммунной системе целевых антигенов. В

частности, одним из таких подходов является создание ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные полиэпитопные иммуногены, обеспечивающие эффективный противоопухолевый Т-клеточный ответ на основе оптимизации структуры, процессинга и презентации целевых полиэпитопных антигенов.

Данный подход представляется перспективным для создания нового поколения вакцин против злокачественных опухолей, так как создаваемые на его основе конструкции обладают следующими преимуществами по сравнению с традиционными и субъединичными вакцинами:

- они более безопасны, поскольку не содержат полноразмерных белков, которые потенциально могут быть либо токсичными, либо индуцировать аутоиммунный процесс, либо обладать иммуносупрессивным действием, в то же время, создаваемые вакцины могут включать эпитопы из различных опухолевых антигенов;
- включают большое количество CTL- и Т-хелперных эпитопов из наиболее перспективных антигенов, специфичных для злокачественной меланомы и ряда других опухолей;
- полиэпитопы могут быть подобраны с учетом распространенности различных алломорф молекул HLA I класса в человеческой популяции либо с учетом генетических особенностей конкретного пациента;
- не содержат эпитопов из белков нормальных тканей;
- полиэпитопы сконструированы так, чтобы максимизировать эффективность процессинга и презентации большинства целевых эпитопов;
- для увеличения эффективности индукции ответа  $CD4^+$  Т-лимфоцитов целевые полиэпитопы содержат дополнительные сигнальные последовательности (N-концевой лидерный пептид, и C-концевой фрагмент белка LAMP-1 человека).

**Целью настоящего исследования было** конструирование плазмидных ДНК, содержащих синтетические гены, кодирующие множественные цитотоксические и хелперные эпитопы антигенов клеток меланомы, а также изучение способности разработанных конструкций индуцировать противоопухолевый иммунный ответ.

**В ходе работы требовалось решить следующие задачи:**

1. Провести теоретический дизайн искусственных полиэпитопных иммуногенов, содержащих цитотоксические и хелперные эпитопы антигенов клеток меланомы.
2. Получить рекомбинантные плазмиды, которые содержат гены, кодирующие полиэпитопные иммуногены.
3. Исследовать экспрессию полиэпитопных генов в клетках эукариот, трансфицированных сконструированными плазмидными ДНК с помощью ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими МКА.

4. Изучить иммуногенность сконструированных ДНК-плазмидных конструкций по определению уровня продукции гранзима В  $CD8^+$  Т-лимфоцитами с использованием метода проточной цитофлуориметрии.
5. Оценить способность полиэпитопных антигенов стимулировать цитотоксическую активность аутологичных моноклеарных клеток периферической крови против клеток меланомы человека.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** В настоящей работе впервые получены ДНК-конструкции, кодирующие полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI, спроектированные с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных эпитопов по пути как МНС I, так и МНС II классов.

Получены доказательства синтеза целевых белков MEL-A0201 и MEL-TCI в эукариотических клетках, трансфицированных исследуемыми плазмидными ДНК. Показана иммуногенность созданных ДНК-конструкций, определяемая по уровню продукции гранзима В эффекторными Т-лимфоцитами.

Впервые продемонстрирована способность искусственных полиэпитопных иммуногенов индуцировать образование репертуара эффекторных лимфоцитов, обладающих киллерной активностью по отношению к опухолевым клеткам, в системе *ex vivo*.

Плазмидные конструкции pMEL-TCI и pMEL-A0201, полученные в ходе выполнения работы, защищены патентами РФ.

Результаты работы дают основания для расширения исследований по созданию полиэпитопных иммуногенов, как средств иммунотерапии и иммунопрофилактики онкологических заболеваний в будущем.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

ДНК-конструкции, кодирующие искусственные полиэпитопные иммуногены MEL-TCI и MEL-A0201, обеспечивают экспрессию целевых генов и наработку кодируемых ими белков в трансфицированных клетках.

Зрелые дендритные клетки человека, трансфицированные плазмидами pMEL-TCI и pMEL-A0201, обладают способностью индуцировать формирование цитотоксических  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В.

«Обученные» *ex vivo* трансфицированными дендритными клетками аутологичные лимфоциты обладают киллерной активностью в отношении клеток меланомы человека линии Mel Is.

Иммунный ответ против антигенов меланомы человека, индуцированный плазмидами pMEL-A0201 и pMEL-TCI, кодирующими искусственные антигены, превосходит по эффективности противоопухолевый ответ, индуцированный плазмидой pсDNA-MART-1, кодирующей полноразмерный меланомный антиген MART-1.

**Апробация работы и публикации.** Материалы работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, в том числе: конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, 2017); Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, Россия, 2018); конференции молодых ученых

биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio», (Кольцово, Россия, 2016); Всероссийской научно-практической конференции «Дни иммунологии в Сибири» (Новосибирск, Россия, 2015); "22-ом Международном симпозиуме имени Чарльза Гейдельбергера по изучению рака (Томск, Россия, 2018); международной конференции «Клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия клеток опухоли и микроокружения» (Томск, Россия, 2015), по итогам которых опубликовано 11 тезисов.

По материалам диссертации опубликованы 4 статьи, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций, получены 2 патента на изобретения.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 132 страницах, включает 16 рисунков, 4 таблицы, 3 приложения. Список литературы включает 191 источник.

**Личный вклад автора.** Все основные эксперименты, включая конструирование рекомбинантных плазмид, наработку препаративных количеств плазмидных ДНК, их очистку от эндотоксинов, рестрикционный анализ полученных ДНК-конструкций, трансфекцию клеток НЕК 293Т, выделение мононуклеаров периферической крови условно-здоровых доноров, получение зрелых дендритных клеток миелоидного происхождения и анализ их фенотипа, оценку иммуногенности и специфической активности сконструированных рекомбинантных плазмид, выполнены автором лично. Теоретический дизайн полиэпитопных иммуногенов (MEL-A0201 и MEL-TCI), а также статистический анализ полученных результатов проводился в сотрудничестве с канд. биол. наук Антоном Д.В. (теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Секвенирование образцов ДНК, кодирующих целевые гены, осуществлялось в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Лейкаферезный материал был предоставлен отделением переливания крови ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е. Н. Мешалкина» (зав. отделением Пак С.В.). Генотипирование доноров на наличие аллеля HLA-A\*02:01 выполнялось в отделении лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (зав. отделением, д-р мед. наук Шилова А.Н.).

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Теоретический дизайн полиэпитопных иммуногенов**

Дизайн полиэпитопных иммуногенов MEL-A0201 и MEL-TCI осуществлялся с использованием программного обеспечения TEpredict (<http://tepredict.sourceforge.net>.) и PolyCTLDesigner (<http://tepredict.sourceforge.net/PolyCTLDesigner.html>). На основе анализа литературных данных были выбраны 6 антигенов меланомы, в составе которых были предсказаны цитотоксические эпитопы, обладающие наибольшей аффинностью связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA) I класса. Далее осуществлялось предсказание аффинности связывания этих пептидов с

комплексом TAP. В случае необходимости для увеличения эффективности взаимодействия с TAP на N-конец пептидов добавлялись остатки аланина. На следующем этапе проводился дизайн поли-CTL-эпитопного фрагмента с использованием вырожденного спейсерного мотива [ARSP][DLIT][LGA][VKA] с оптимизацией протеасомного расщепления. При этом при выборе наилучших спейсеров для каждой пары эпитопов проводилась минимизация числа нецелевых эпитопов, образующихся при стыковке пептидов.

Для наиболее эффективной индукции Т-клеточного иммунного ответа необходимо стимулировать ответ как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в связи с этим следующей задачей было конструирование поли-Th-эпитопного фрагмента. Для этого с помощью TEpredict проводилось предсказание в составе выбранных раковых антигенов Th-эпитопов с наиболее широкой специфичностью по отношению к различным аллморфам HLA II. С помощью PolyCTLDesigner было выбрано 6 фрагментов длиной от 20 до 30 а.о., содержащих наибольшее количество Th-эпитопов. Полиэпитопные конструкции также содержат универсальный хелперный эпитоп PADRE для усиления иммуногенности. Дополнительно на N-конец обоих полиэпитопов был добавлен сигнальный пептид (ER-signal) белка HER2 (P04626) (MELAALCRWGLLLALLPPGAAS), направляющий образующийся полипептид в ЭПР, а на С-конец было добавлено 11 последних аминокислотных остатков белка LAMP-1 человека (RKRSHAGYQTI), обеспечивающих перенаправление полипептида из секреторного пути на деградацию в лизосомы, где его пептидные фрагменты, образующиеся в результате протеолиза, могут связываться с рециркулирующими молекулами MHC II.

В результате были спроектированы два полиэпитопных иммуногена. «Аллелеспецифический» иммуноген содержит эпитопы, рестриктированные аллельным вариантом молекулы HLA-A\*02:01. «Универсальный» полиэпитопный иммуноген содержит эпитопы, рестриктированные 12 мажорными аллельными вариантами молекул HLA I класса (HLA-A\*01:01, A\*02:01, A\*03:01, A\*11:01, A\*24:02, A\*68:01, B\*07:02, B\*08:01, B\*35:01, B\*18:01, B\*44:02, B\*27:05). Кроме того, в состав целевых иммуногенов непосредственно перед мотивом LAMP-1 был включен Gag-эпитоп EPFRDYVDRFYKTLR для мониторинга экспрессии продуктов экспрессии целевых генов с помощью МКА 29F2/30A6, которые специфически связываются с этим «маркерным» эпитопом (EPFRDYVDRFYKTLR). На 5'-конце последовательностей обоих генов добавлен сайт эндонуклеазы рестрикции BmtI / NheI (GCTAGC), на 3' – сайт HindIII (AAGCTT) (Рис. 1).

А)

GCTAGC CCGCCACC ATGGAATTAGCCGCGCTGTGCAGGTGGGGTCTTCTTCTAGCCCTGCTCCCTCCGGGGGCC  
 GCTTCCGCCATGGACGCAATTTTTGGCTCTCTGGCTCTGATGGACAAATCCCTGCACGTGTCCATCCTAATACT  
 ATCCATTATCTTTATCGCTCTGGGCATACTGACTGTCAATTCTCGGGGTCGCCATCATGCCCAAGGCTGGTTTAC  
 TTATTGCCGACCTGAAGCTCATGTGGATCACCCAGTGTTCCTGGCCATTTACTGCTGAGAAAATATCGGGTC  
 GCAGACGCCAAGCACCTTACATCTTTGCAACATGTTTGTCCGATGGCAAGTACGTCCTCGTCACTTGCCTCGG  
 TCTCGCCCTTCTCAAATTCCTGTGGGGCCCTCGAGCTCTGGCCGCCATTGGATTCTAATCATAGTTTTAGTGA  
 TGATAGCTATCTGTATCCTGGAGTCGCTATTTTCGCGCAGCAGATCTGGTCTGTATGCAACTGCTGTTCCGGGATT  
 GCCACACTTAAAGTTATTTGGGACGTCCTTTCCGGGATACCGGACGGCTCCCTGGCTCAGGACGCTCCGCCACT

GGCCATACTCTTTTTTCTTCGGCCTTACTTAGCATCGCATAACATATTCGCAACGTGTCTAGGGCTCGCATTTC  
TCGCAATGTTGAAAAACACAGTAGCCCTGCTTATTATTGTGCTGGCAATCATCGCCGACGCCGCAAATTCGTT  
GCAGCATGGACACTGAAAGCCGCAGCTAAGAGAGAAGAGGCTGCCGGGATTGGAATCCTTACTGTAATCCTGGG  
CGTGCTTTTACTAATCGGCTGCTGGTACTGCAGGCGGAGGAACGGCTATCGTGCTCTTATGGATAAAAGTAAGC  
GACTGAGCTATGACGGTCTCCTCGGCGACAACCAGATTATGCCTAAGACAGGTTTCTGATCATCGTGCTCGTT  
ATGATCGCTATGGAGGGGGGCCATGCTCCTGAGGAGAAAAGGATGAGCCAAAACAGACTGCTGATTCTCATTCT  
GAGCATCATCTTTATCAAGGGTACATACGCGAGCGAAGAAGTCATTTGGAAGCGGAGCTTTTCCAGGACATTT  
TGCACGACAAGATTATTGATCTGGTCCACTTGCTTCTCCGTAAGTATAGGGTTAAAGGCCTTATTACCAAGGCC  
GAAATGCTGGGCAGTGTGAAACGCAAGGCCAGCTCAAGCCTACAACCTGGTGTTCGGCATCGAACTGATGGAGGT  
TGATCCCATTGGGCACTTGTATATCTTCGCCACTTGTCTGGGGCTGTCTACGATGGACTTAAGCGAGTTTCTG  
GGAACATCCTCACCATTGCTTAACTGCAGCAGACCACCGGCAGTTGCAATTGTCCATATCCTCATGCCTGCAG  
CAGCTGAGCTTGCTGATGTGGATCACACAGTGTGTTGAGCCATTTAGAGATTACGTTGATAGATTCTACAAGAC  
ACTGAGGAGGAAACGGTCCCATGCAGGTTATCAGACAATT TAGTGATGAAGCTT

B)

GCTAGCCCGCCACCATGGAACCTCGCCGCTCTGTGTAGGTGGGGACTCTTGCTTGCCCTCCTCCCCCTGGGGCG  
GCCTCCTTTTTTAGTTCGCACTCCTCTCCATTGCCGACCGACGCCGGAATGGGTACAGGGCACTTGCCCTGGT  
CGGGGCCAGGCCCTCCAAGCAGCCACTGTCAATTTGGGACGTAAGTAGCGGCATCCCTGACGGAAAGGAGGTGA  
TGTGGGAGGTATTGAGCATCGCTGACGCCGAAGCCGCCGGCATCGGTATTTTACTGCTGACGGGAAGTCAAAG  
GCATCCTCCTCGCTGCAGCTGGCCATATATAGAGCCCTCATGGATAAGAGTTTGTGCTGCTGATCATTGTACT  
CGGCGTGATTTTCGCAGACGCCAAGCAGCGGATTACAGGGGGTGAGCAGGTGGCATCCCTGTTCCGCGCAGTTA  
TCACAAAAGCCGATCTGATACCAGTATCTAGCAGCTTTAGTTATGCACTATATGTTAAAGTTTTGGAATACGTT  
ATCGCAATTGCGTACCCCCCTCTTACGAGTGGGTCCTGGCCGATCTGTACTTTTTTCCCGTGATTTTCAGTAA  
GGCGGATCTTATTGAGATCCTATTCGGGATTAGCCTGGCGGCAGAGCCGGTCGTGCCAACGCACCGCCAGCCG  
ACCTGGAGGCAGCGTTCTTCTGAGCACTCTGGCTATTCTCAAAGTCTGCATGCAGCTGCTTTTTGGCATCGCC  
ATTGCAAAATTAGAGTATGTGATTAAGGTGTGAGCCGAGATGCACAAGCCGCCACCTCATCTTCTTCCCCGCC  
AGACGCGGCAGCTAGTGGCCTGAATGGCTGTTGTGCACTATTAACCGCTGCCGATCATCGACAGCTCCACCTGT  
TGCTAAGAAAGTACCGAGTCGCCGACGGTGTGGAGAGCAGACTCCTTGAGTTCTATCTCCGGGATTTGATTGAT  
CCGGAATCTTTCAGCCAGGCCATCTTAAAGCTGGCACAAGACGCTCCACCCTGCCGGCAGACTCTGTGCTTGA  
GGTGTTCGAGGGCAGGGCAGACGGTAAGTACGAGGATTACTTTCCGAAATTTTTGCCCTCCTCGTGAAGGCTG  
GCCTACTGATTATAGTGCTGATCATGCCAAGGCTGGCCTGTTAATCGCCGATTTTTTGTGGGGACCTAGGGCT  
TTAGCTTCTGATTTAAAGGCCATGCCAGGGAGGACGCCACTTTATCGCAGACGCTCGTTACGAATTTCTGTG  
GGGACCGGCAGATCTCCAGATCCCCGTTTACCTAGCTTCGCTCTGCTTATTATCGTCCTCGCAATCATTGCGG  
AAGAGGCCGACGGCATCGGGATCGCCATTCCGGCTGACCGCAGCCGACCACAGGCTCATCCTGATTCTGTGCATC  
ATATTTGCTGACGCAGAGGCCCTTGGGTTAGTTGGAGCTCAGAGAGACGCAAAGGCCGACTCTGGCGACTTCGG  
TCTCCAGGTGCCTTGGTGCATTTCTTACTCCTAAAGTATGCCGACTTGTATAGGGCCCAGAAAGTACCA  
AGGCCCTCGAGTTCTACTTGGCCATGCCATTCCGCCGACGAGAAGCTGATCCTACCGGGCACTCGTATGCATTT  
CTCATTATCGTTCTGGTCATGATTGCTGACGGGCCCGCGGCCAGGGATTGCCGAAGCGCTGGGCCTGGTGTG  
CGTGCAGGCGGACGGTTCGCTGGCCAAAGACGCTCCGCCTCTCGCAGAGCACTCGGCATATGGGGAGCCAGGG  
CCGATCCAACGTCCACAGCTACGTTCTGGCCCTTGCAATCCCAGCTCGTATAAAGACGCGCTGCCTGACTTG  
CAGCTGGTATTCCGGTATCGAGCTCGCTGACCTCCCGACCACTATGAATTATCCCCTGGCTCAAGCAGCCCTCAG  
CAGAAAAGTGGCACGGGACCTTGTGACTTGTGTTGGGACTGAGTTACGCTATTGCAAAGGCATGCTACGAGTTCC  
TCTGGGGTCTGCTGACGCATTACCGTGAGCGGCAACATACTGACCGCTGACGGTAAATCATCGACTCTTCTG  
TCTATTTTACAAGCAGACCTCAAGACACAGATATTTCCAACCGTTCGCCCTGCAGACGGCAAGTACAAGCATTG  
CTTTCCTGAAATATTTGCGGATGCCAGGCCTTGCAAGGCCGAGGAGCAGGCGGATCAGGATGCCCCCTCCCTTG  
CAGTTCCAGCCGACGGAAAAGGTCATTCTTACGTTTTGGTGACCTGTGACAGCAGTGCAGGGTTAGATTTTTT  
TTCCCCTCATTGGCTCTGATGGATAAGTCACTACACGTGCTGATGGGGTGTGATGTGGATCACTCAATGTTT  
TCTGAGAGACTTGGTGTCAAGCACCTACTGTCTATTTTCCAGGCCGATGGCGTTGCCGATTTGGTCCGGTTTC  
TACTGCGGACCTGTGCAAGCCAGAGGAAGGTCTGCAGGCACGTGATGGCATATTAAGTGTATCCTGGGAGTG  
GCCGATCTGACAGTGATACTCGGGGTGCTGTTAGCCTACCCCTCTCTACGAAGATGCACTGGCCGACCCAAC  
CTCTTATCCCAGCCTGTACGCAATCGGGAAAGCCAAATTTGTAGCTGCTTGGACTCTGAAGGCCGCCGGAAGA  
GAGAGGAAGCTGCAGGGATAGGTATTCTGACTGTGATCCTCGGGTCTGTTACTAATTGGGTGCTGGTATTGC

AGACGCCGGAACGGCTACCGGGCGTTAATGGATAAATCCAAGCGACTGTCATACGATGGCCTGCTGGGGGACAA  
CCAGATCATGCCGAAAACCGGGTTTTCTGATAATTGTGCTGGTGATGATCGCAATGGAGGGCGGCCACGCTCCGG  
AGGAGAAACGAATGTCCCAAATAGGCTGTTGATCTTGATCCTCTCGATAATTTTTATAAAGGGGACGTACGCC  
TCTGAAGAGGTGATCTGGAAAAGGAGCTTCTCCCAAGACATTTTGCACGACAAGATCATTGACCTCGTTTCATCT  
TTTGCTCCGCAAGTACCGCGTGAAGGGCTTGATCACTAAGGCTGAGATGTTGGGATCTGTCAAGAGGAAGGCGA  
GCAGCTCTCTGCAGCTCGTCTTTGGCATTGAGCTCATGGAAGTTGATCCAATTGGTCATCTATACATTTTTGCT  
ACTTGCTGGGACTGTCTACGATGGCTTGAAGCGTGTAGCGGCAATATATTAACAATACGCTTAACGGCCGC  
CGACCACCGACAGTTACAACCTCTCTATCAGCTCTTGCCTGCAGCAACTGTCTTTACTCATGTGGATTACCCAGT  
GCTTCGAGCCCTTAGGGACTACGTGGATCGATTCTATAAAACCCTACGGCGGAAACGGTTCGCACGCCGGGTAC  
CAGACTATA **TAGTGATGA** **AAGCTT**

Рисунок 1. Последовательности искусственных генов: А) *MEL-A0201* (1535 п.н.); Б) *MEL-TCI* (3428 п.н.). Перед иницирующим кодоном ATG (выделен полужирным шрифтом и подчеркнут) размещена последовательность Козак (CCGCCACC). В конце кодирующей последовательности находятся три стоп-кодона (TAGTGATGA)

Последовательности спроектированных генов были синтезированы в ЗАО «Евроген» химико-ферментативным методом.

В качестве отрицательного контроля использовалась плазмида pсDNA 3.1, не содержащая вставки. В качестве положительного контроля при тестировании ДНК-конструкций, кодирующих иммуногены *MEL-A0201* и *MEL-TCI*, использовалась ДНК-конструкция, кодирующая полноразмерный раковый антиген MART-1, являющийся одним из опухолевых маркеров клеток меланомы. Аминокислотная последовательность MART-1-антигена была взята из базы данных NCBI. Антиген MART-1 был спроектирован в виде последовательности нативного белка MART-1 без дополнительных сигналов для оптимизации процессинга (Рис. 2).

**GAATTC** **CCGCCACC** **ATG**GGCTAGCATGCCAAGAGAAGATGCTCACTTCATCTATGGTTACCCCAAGAAGGGGCAC  
GGCCACTCTTACACCACGGCTGAAGAGGCCGCTGGGATCGGCATCCTGACAGTGATCCTGGGAGTCTTACTGCT  
CATCGGCTGTTGGTATTGTAGAAGACGAAATGGATACAGAGCCTTGATGGATAAAAGTCTTCATGTTGGCACTC  
AATGTGCCTTAACAAGAAGATGCCACAAGAAGGGTTTTGATCATCGGGACAGCAAAGTGTCTCTTCAAGAGAAA  
AACTGTGAACCTGTGGTTCCCAATGCTCCACCTGCTTATGAGAACTCTCTGCAGAACAGTCACCACCACCTTA  
TTCACCTACCGGT

Рисунок 2. Последовательность гена нативного белка MART-1 (354 п.н.)

### **Создание рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI**

Для конструирования целевых плазмид использовали ранее полученную плазмиду pсDNA-TCI, несущую синтетический ген *TCI* в составе вектора pсDNA3.1 и плазмиды pAL-TA-MEL-A0201 и pAL-MEL-TCI, содержащие полиэпитопные гены *MEL-A0201* и *MEL-TCI*.

Фрагменты ДНК, содержащие целевые гены получали путем гидролиза эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *HindIII* плазмид pAL-TA-MEL-A0201 (рис. 3) и pAL-TA-MEL-TCI (рис. 4).

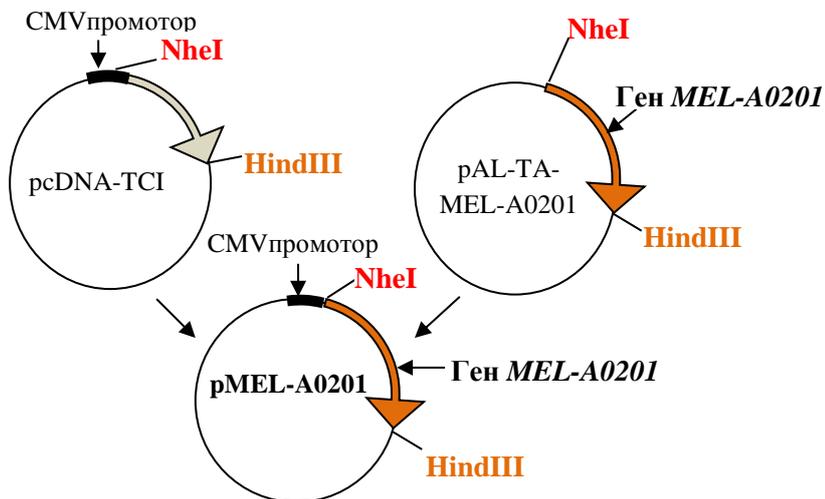


Рисунок 3. Схема конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pMEL-A0201

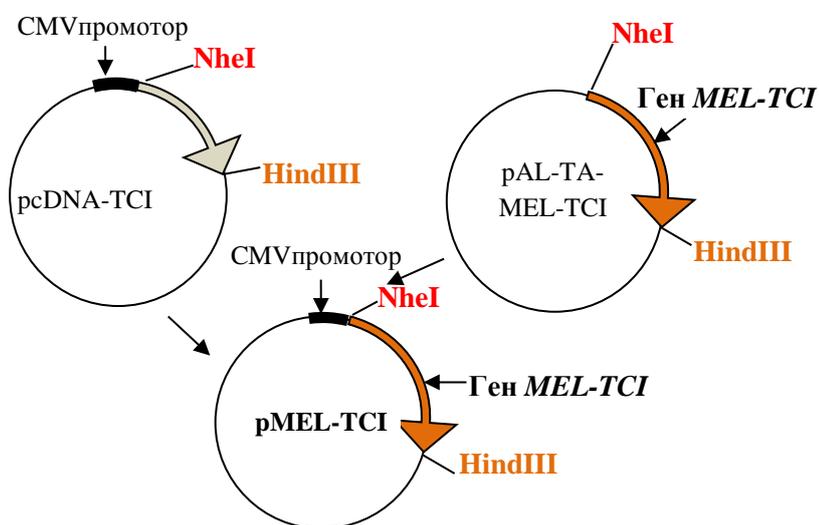


Рисунок 4. Схема конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pMEL-TCI

Для подтверждения структуры генов *MEL-A0201*, *MEL-TCI*, *MART-1* в составе полученных рекомбинантных плазмид pMEL-A0201, pMEL-TCI, pcDNA-MART-1 использовался рестрикционный анализ и секвенирование.

Далее 0,5 мкг фрагмента соответствующего гена лигировали в стандартных условиях с 0,1 мкг плазмиды pcDNA-TCI, гидролизованной эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *HindIII*. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5F', из клонов, выросших на среде с ампициллином, выделяли плазмидную ДНК и подвергали рестрикционному анализу с помощью эндонуклеаз рестрикции *NheI*, *HindIII*, и *BglII*, *PsiI*. При анализе результатов электрофоретического разделения продуктов гидролиза ДНК pMEL-A0201 и pMEL-TCI выявлялись фрагменты, соответствующие теоретически рассчитанным. В качестве контроля для сравнения, кроме маркера молекулярной массы, использовали гидролизат теми же эндонуклеазами ДНК-плазмиды pcDNA-TCI.

Далее проводили наработку препаративного количества ДНК рекомбинантных плазмид. Для этого проводилась серия из 11 выращиваний штаммов в качалочных колбах, наработана биомасса, из которой ДНК выделяли в препаративных количествах с использованием набора фирмы Promega. Для оценки качества выделенной плазмидной ДНК измеряли оптическое поглощение при длинах волн 260-280 нм и проводили электрофорез в 1 % агарозе. Охарактеризованные препараты плазмид были использованы для трансфекции эукариотических клеток.

### **Изучение экспрессии полиэпитопных генов в клетках эукариот, трансфицированных плазмидами pMEL-TCI, pMEL-A0201 и pcDNA-MART-1**

Для исследования способности полученных плазмид вызывать синтез соответствующих полиэпитопных белков в эукариотических клетках была проведена магнитная трансфекция клеток НЕК 293Т плазмидными ДНК pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1. Трансфекция проводилась в 24-луночных планшетах (по 0,6 мкг плазмиды на лунку) с помощью магнитного реагента MatraA (0,6 мкл на лунку) согласно инструкции фирмы-производителя набора PromoKine. Клетки снимали на 2 сутки после трансфекции. Экспрессия целевых генов в трансфицированных клетках исследовалась с помощью ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими МКА.

### ***Определение синтеза специфической мРНК с помощью ОТ-ПЦР***

Экспрессию генов, кодируемых плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1, оценивали по синтезу специфической мРНК. Для этого сначала выделяли суммарную РНК из клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1, а затем нарабатывали кДНК в реакции обратной транскрипции. Полученную кДНК использовали для проведения ПЦР с использованием пар праймеров к генам *MEL-A0201*, *MEL-TCI* и *MART-1*.

Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле. Результаты, представленные на рис. 5, показывают, что размеры амплифицированных фрагментов соответствуют теоретически рассчитанным продуктам амплификации. Эти данные подтверждают наличие в суммарной фракции кДНК последовательностей, кодирующих гены *MEL-A0201*, *MEL-TCI*, *MART-1*, и, следовательно, указывают на экспрессию генов и синтез специфических мРНК.

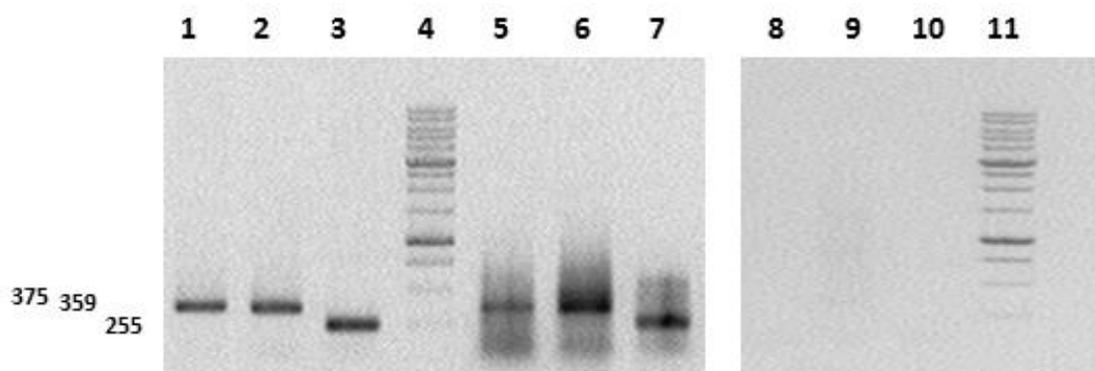


Рисунок 5. Регистрация мРНК генов *MEL-A0201*, *MEL-TCI* и *MART-1* в препаратах суммарной РНК, выделенной из клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1. Суммарную РНК использовали для получения кДНК в ОТ-ПЦР. На электрофореграмме в 1% агарозном геле представлены продукты ПЦР, полученные на матрице кДНК. Дорожки: 4, 11 – маркер молекулярных весов (M12 «СибЭнзим»), фрагменты 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500 и 250 п.н.; 1, 2 и 3 – продукты ПЦР 375, 359, 255 п.н., полученные с использованием в качестве матрицы исходных плазмид pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 соответственно (положительный контроль); 5, 6 и 7 – продукты ПЦР, полученные с использованием кДНК, полученной в ОТ-ПЦР; 8, 9 и 10 – результаты ПЦР с суммарной РНК, выделенной из клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 (без стадии обратной транскрипции, контроль на отсутствие в препаратах ДНК целевых плазмид)

#### ***Определение продуктов экспрессии целевых генов в трансфицированных клетках с помощью электрофореза и иммуноблоттинга***

Трансфицированные плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 клетки НЕК 293Т анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле с последующим переносом разделенных клеточных белков на нитроцеллюлозный фильтр и проведением окрашивания с помощью МКА антител 29F2/30A6 и конъюгата с щелочной фосфатазой. На рис. 6 представлен электрофорез лизатов клеток НЕК 293Т, трансфицированных соответствующими плазмидами, и иммуноблоттинг с МКА 29F2/30A6 к эпитопу-маркеру, включенному в состав всех исследуемых белков. В качестве положительного контроля для оценки качества прохождения иммуноблота использовали рекомбинантный белок ТВ1, несущий в своем составе эпитоп, узнаваемый МКА 29F2/30A6.

Результаты, представленные на рис. 6, показывают, что в трансфицированных клетках присутствуют целевые белки, выявляемые МКА 29F2/30A6, что подтверждает их синтез, направляемый целевыми ДНК-конструкциями.

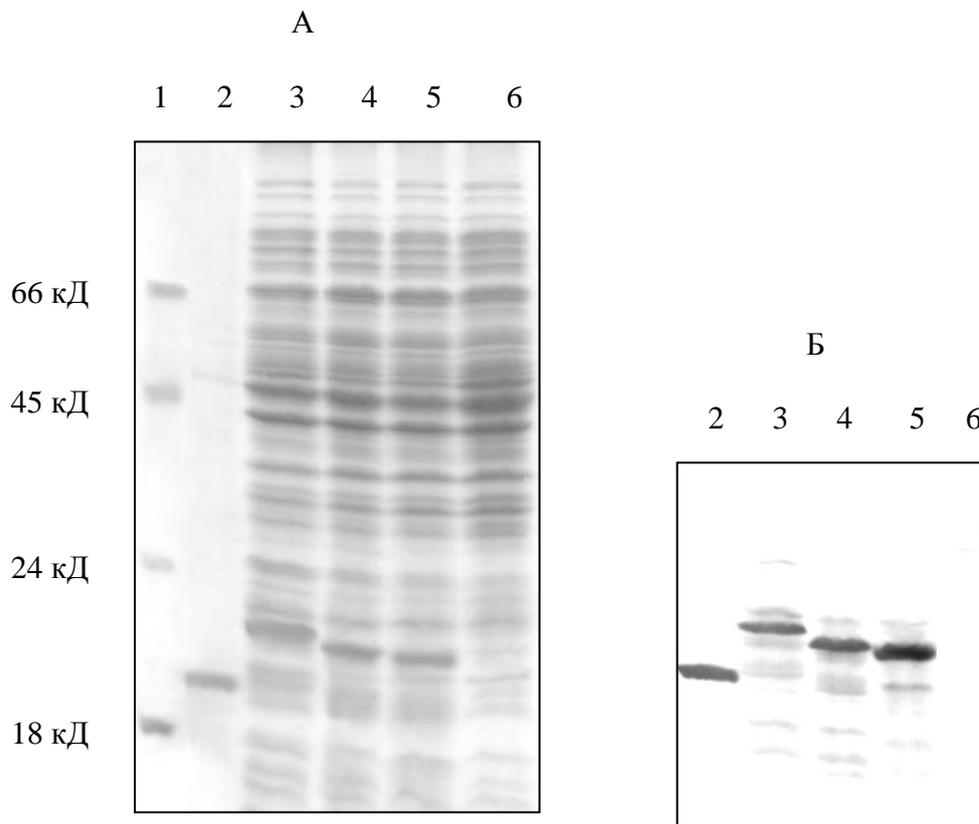


Рисунок 6. А) электрофорез лизатов клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI, pcDNA-MART-1 и векторной плазмидой pcDNA3.1 в 15 % ПААГ; Б) иммуноблоттинг белков после разделения в 15 % ПААГ с моноклональными антителами 29F2/30A6 (к маркерному эпитопу). На дорожках: 1-маркер молекулярной массы (18, 24, 45 и 66 кД); 2-очищенный белок ТВ1 (положительный контроль); 3-лизат клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидой pMEL-A0201; 4-лизат клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидой pMEL-TCI; 5-лизат клеток НЕК 293Т, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART-1; 6-лизат клеток НЕК 293Т, трансфицированных векторной плазмидой pcDNA3.1 (отрицательный контроль)

#### ***Анализ экспрессии целевых генов с помощью иммунохимического окрашивания препаратов трансфицированных клеток***

Трансфицированные клетки НЕК 293Т фиксировали 4 % раствором формальдегида 30 мин при комнатной температуре. Промывали раствором PBS 3 раза. Инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. Промывали трижды раствором PBS. К каждой лунке добавляли 200 мкл раствора PBS и 100 мкл моноклональных антител 29F2/30A6. Инкубировали 1 час при комнатной температуре. Не связавшиеся антитела удаляли отмывкой в PBS. Специфически связавшиеся антитела выявляли с помощью меченых пероксидазой антител кролика против IgG мыши. Окрашивание проводили добавлением 200 мкл раствора следующего состава: 0,5 мг/мл диаминобензидин фосфата, 0,01 % раствор перекиси водорода, 50 мМ трис-НСl (рН 7,4), 50 мМ имидазол. Окраску проводили в темноте при комнатной температуре 3 минуты, затем препарат тщательно промывали дистиллированной водой. Наличие окрашенных клеток устанавливали с помощью микроскопа Olympus.

При иммунохимическом окрашивании препаратов трансфицированных клеток в качестве отрицательного контроля использовали препараты клеток НЕК 293Т,

трансфицированных векторной плазмидой pcDNA3.1, в качестве положительного контроля – клетки, трансфицированные плазмидой pcDNA-TCl (рис. 7).

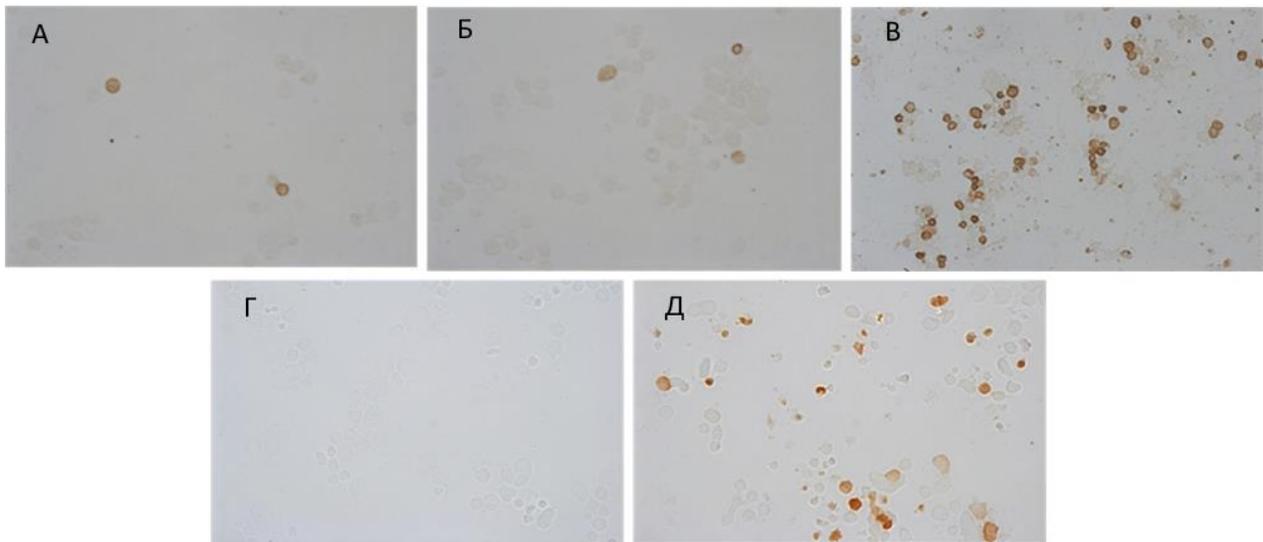


Рисунок 7. Иммунохимическое окрашивание препаратов клеток HEK 293Т, трансфицированных плазмидами ДНК. А) pMEL-A0201, Б) pMEL-TCl, В) pcDNA-MART-1, Г) pcDNA3.1 – отрицательный контроль, Д) pcDNA-TCl – положительный контроль. Окрашивание с помощью моноклональных антител 29F2/30A6 и конъюгата антител кролика против IgG мыши с пероксидазой хрена

Данные, представленные на рис. 7, показывают, что окрашивание клеток наблюдалось только при трансфекции клеток HEK 293Т плазмидами pMEL-A0210, pMEL-TCl и pcDNA-MART-1, а также плазмидой pcDNA-TCl (положительный контроль) и не наблюдалось при трансфекции исходным вектором pcDNA3.1. Максимальное количество окрашенных клеток – 25 % – наблюдалось в случае трансфекции плазмидой pcDNA-MART-1, кодирующей полноразмерный белок MART-1, тогда как в случае трансфекции плазмидами pMEL-A0201 и pMEL-TCl, кодирующими искусственные полиэпитопные иммуногены, количество окрашенных клеток составило  $\approx 1,6\%$ . Низкий уровень окрашенных клеток при трансфекции плазмидами pMEL-A0201 и pMEL-TCl, по-видимому, обусловлен быстрой деградацией целевых иммуногенов, поскольку они были спроектированы таким образом, чтобы обеспечить высокую скорость процессинга для освобождения CTL-эпитопов.

### ***Система индукции противоопухолевого ответа ex vivo на основе стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови человека***

Узким местом в создании Т-клеточных вакцин является оценка их биологической (специфической) активности. Лабораторные животные не являются адекватной системой для этих целей из-за отличий по антигенам МНС, ТАР и т. п., в силу чего неизбежно встает вопрос о возможности экстраполяции результатов на человека. В последнее время для оценки биологической активности Т-клеточных вакцин разрабатываются методы с использованием ПМНК здоровых доноров, генотипированных по антигенам МНС I класса. В данной системе

иммунокомпетентные эффекторные Т-лимфоциты генерируются в результате совместного культивирования их предшественников с аутологичными ДК миелоидного происхождения, презентующими целевые антигены. Эта система позволяет изучить иммуногенность и способность целевых плазмидных ДНК индуцировать специфическую активность эффекторных клеток в наиболее релевантной системе. Поэтому исследование разработанных ДНК-конструкций было решено проводить в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo* с использованием ПМНК условно здоровых доноров (рис. 8).

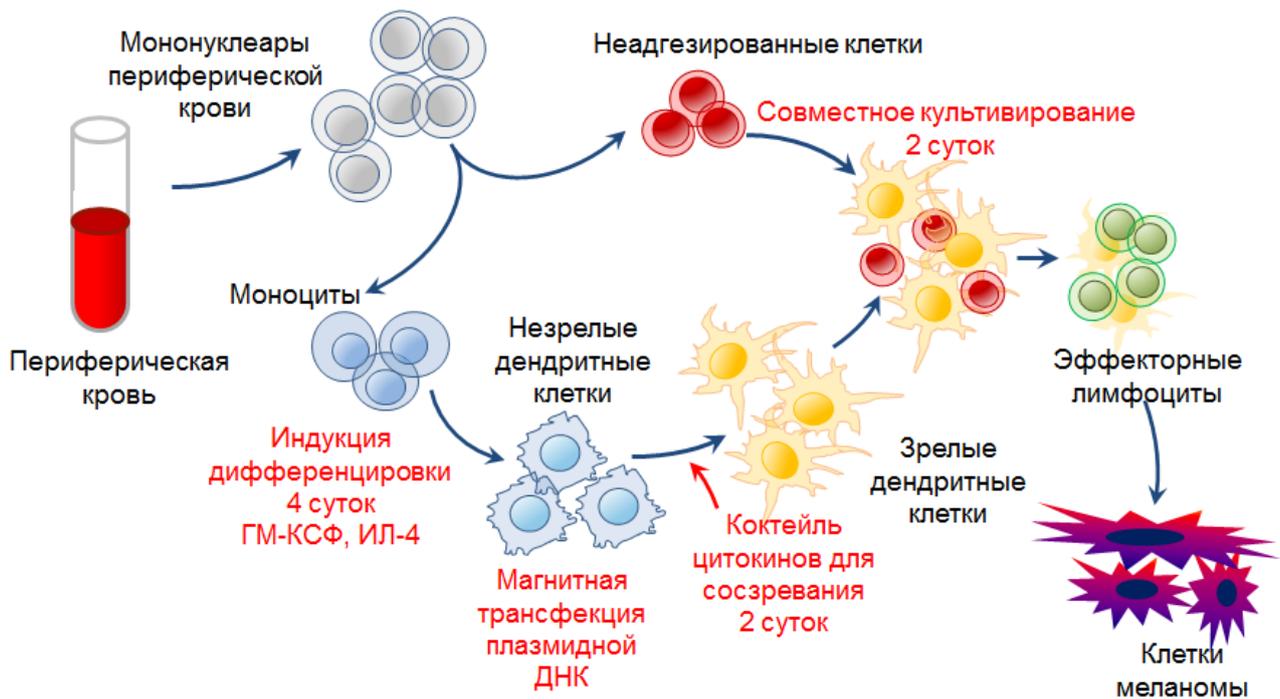


Рисунок 8. Схема оценки иммуногенности и цитотоксической активности плазмидной ДНК в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*

Для проведения этих исследований были выбраны доноры, несущие аллели группы HLA-A\*02:01.

Выделенные из периферической крови условно здоровых доноров мононуклеарные клетки далее использовались для получения фракции моноцитов, из которых в дальнейшем в присутствии коктейля цитокинов получали зрелые дендритные клетки.

### Стимуляция созревания дендритных клеток и подтверждение их фенотипа

Для эффективной активации дендритными клетками цитотоксических Т-клеток необходимо, чтобы наряду с представлением антигена в комплексе с МНС ДК экспрессировали на поверхности костимуляторные молекулы CD80 и CD86, свидетельствующие об уровне функциональной зрелости и обеспечивающие взаимодействие с Т-лимфоцитами. Эти маркеры экспрессируются на поверхности ДК в процессе их созревания. Кроме молекул CD80 и CD86 иммунофенотип зрелых ДК миелоидного происхождения характеризуется экспрессией молекул CD11с. В системе

*ex vivo* зрелые ДК получают с помощью культивирования в среде в присутствии коктейля цитокинов для созревания. В настоящем исследовании зрелые ДК получали в соответствии с протоколом, разработанным на основе анализа литературных данных. Магнитная трансфекция незрелых ДК, проводимая согласно инструкции фирмы-производителя набора PromoKine, и дальнейшее культивирование в среде в присутствии ростовых факторов способствовали созреванию до конечной стадии, которая характеризуется появлением на поверхности маркеров зрелых ДК.

На рис. 9 представлены данные иммунофенотипирования популяции зрелых ДК, полученные методом проточной цитофлуориметрии.

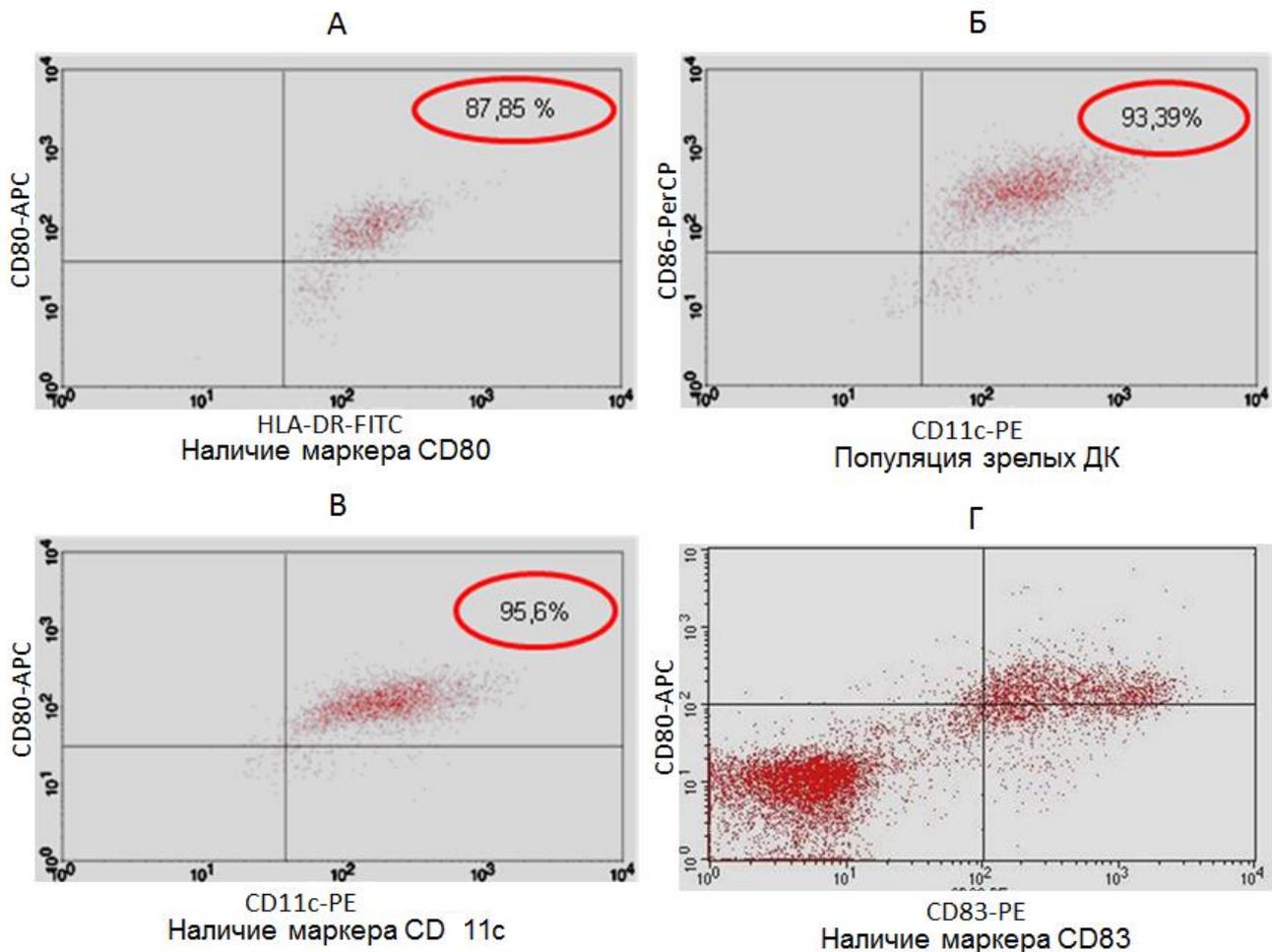


Рисунок 9. Результаты фенотипирования популяции зрелых дендритных клеток с помощью проточной цитометрии (FACS Calibur, BD) с использованием флуоресцентно-меченых МКА: А) HLA-DR-FITC и CD80-APC; Б) CD86-PerCP и CD11c-PE; В) CD80-APC и CD11c-PE; Г) CD80-APC и CD83-PE

Результаты фенотипирования свидетельствуют о том, что более 80 % популяции ДК, полученных в системе *ex vivo*, являются позитивными по маркерам CD80, CD86, CD11c, включая HLA-DR (рис. 9). Наличие маркеров CD80, CD83 и CD11c позволяет говорить о том, что используемый нами протокол позволяет получать популяцию зрелых ДК миелоидного происхождения.

## Анализ способности изучаемых конструкций стимулировать продукцию гранзима В эффекторными Т-лимфоцитами

Цитотоксические лимфоциты могут лизировать опухолевые клетки посредством перфорин- или гранзим-зависимого механизма. Гранзим В - сериновая протеаза, которая накапливается в секреторных гранулах цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток и индуцирует апоптоз клеток-мишеней. В нашей работе мы определяли содержание клеток, экспрессирующих внутриклеточный белок гранзим В в культуре ПМНК здоровых доноров после сокультивирования с ДК (в соотношении 10:1), трансфицированными препаратами целевых ДНК-конструкций. В качестве отрицательного контроля использовалась совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных исходным вектором pcDNA3.1. В качестве положительного контроля была использована совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных pcDNA-MART-1 с геном, кодирующим полноразмерный меланомный антиген MART-1.

Для стимуляции ПМНК в совместной культуре с ДК, трансфицированными исследуемыми плазмидными ДНК pMEL-TCI и pMEL-A0201, использовался пул синтетических пептидов, в состав которых входят эпитопы из шести антигенов, ассоциированных с клетками меланомы и которые входят в состав ДНК-конструкций. В случае конструкции pcDNA-MART-1, кодирующей полноразмерный меланомный антиген MART-1, использовался пул синтетических пептидов, которые содержат эпитопы белка MART-1, рестриктированные молекулами HLA-A\*02:01 (таблица 1).

Таблица 1

Синтетические пептиды, выбранные для стимуляции предшественников CTL в совместной культуре ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1

Пептиды		
pMEL-TCI	pMEL-A0201	pcDNA-MART-1
EADPTGHSY	IMPKAGLLI	RRRNGYRAL
SVLEVFEGR	CILESLFRA	YRALMDKSL
YRAREPVTK	YIFATCLGL	ALMDKSLHV
YEDYFPEIF	FLWGPRALA	GYPKKGHGH
EHSAYGEPR	LMWITQCFL	DKSLHVGTVQ
ESRLLEFYI	HLLLRKYRV	PAYEKLSAE
LTAADHRQL	ALMDKSLHV	GYRALMDKS
IRLTAADHR		RNGYRALMD
RRRNGYRAL		
HLLLRKYRV		
YRALMDKSL		
MPREDAHFI		
ALMDKSLHV		

В качестве контролей для оценки неспецифической стимуляции использовали РМА с I<sub>0</sub> в концентрациях 30 нг/мл и 1 мкг/мл соответственно.

Результаты определения количества CD8<sup>+</sup> клеток, продуцирующих гранзим В, полученные в опытных и контрольных группах, представлены как процент от общего количества CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в пробе, значение которого оценивалось на основе

анализа данных проточной цитофлуориметрии (рис. 10). Среди ПМНК, стимулированных ДНК-конструкцией pMEL-A0201, обнаруживается в среднем 4,67 % ( $\pm 0,09$  – ошибка среднего) гранзим-положительных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов; среди ПМНК, культивированных с ДК, трансфицированными плазмидой pcDNA3.1 –  $3,88 \pm 0,18$ ;  $4,2 \pm 0,28$  – среди ПМНК, стимулированных ДК, трансфицированными конструкцией pMEL-TCI; и  $4,33 \pm 0,09$  – среди ПМНК, стимулированных ДК, трансфицированными pcDNA-MART-1. Статистический анализ результатов, представленных на рис. 10, показал, что в группе MEL-TCI среди ПМНК относительное количество гранзим-положительных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов достоверно превосходит результат, полученный в группах MART1 и pcDNA3.1 ( $p = 0,018$ ). Отличия между остальными группами были недостоверными.

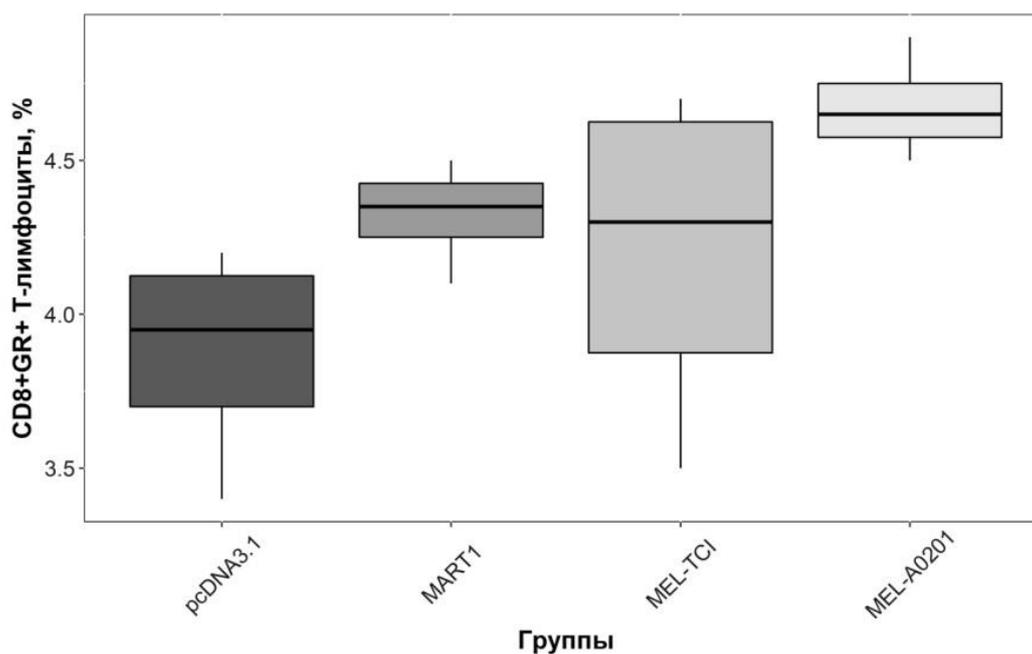


Рисунок 10. Результаты исследования количества CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В в совместной культуре ПМНК условно здоровых доноров с помощью метода ICS ( $n = 4$ ). Группы: pcDNA3.1 – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой; MART1 – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART-1, кодирующей полноразмерный белок MART-1; MEL-TCI – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMEL-TCI; MEL-A0201 – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMEL-A0201

### **Анализ результатов исследований цитотоксической активности активированных эффекторных клеток по отношению к клеткам-мишеням (культуре клеток меланомы человека Mel Is)**

Наиболее важной характеристикой противоопухолевого иммунного ответа является способность эффекторных лимфоцитов распознавать и убивать раковые клетки, в данном случае клетки меланомы. Поскольку основным механизмом элиминации опухолевых клеток является их непосредственный лизис, то мы провели исследование цитотоксической активности ПМНК, активированных дендритными клетками, трансфицированными целевыми плазмидными ДНК, против клеток меланомы человека линии Mel Is, экспрессирующей на поверхности антиген MART-1.

В лунках 96-луночного планшета, содержащих 200 мкл среды RPMI-1640 10 % FBS, культивировали клетки меланомы Mel Is плотностью  $2 \times 10^5/\text{см}^2$  при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>, в течение ночи. На следующий день в культуру опухолевых клеток смеси осуществлялось внесение стимулированных аутологичных ПМНК с дендритными клетками в соотношении 1:10 (мишень : эффектор). Планшет с клетками инкубировался в течение 6 часов. Цитотоксическая активность эффекторных клеток определялась колориметрическим методом, позволяющим провести количественное определение содержания лактат-дегидрогеназы – цитозольного фермента, выделяющегося из лизированных клеток. Значения оптической плотности контрольных лунок вычитались из значений оптических плотностей экспериментальных лунок. В эксперименте использовались следующие контроли: 1) лунки, содержащие только культуральную среду; 2) лунки с клетками Mel Is без добавления смеси ПМНК + ДК (оценивался спонтанный лизис); 3) лунки с клетками Mel Is, к которым (согласно методике) добавлялся лизирующий реагент (положительный контроль).

Результаты исследования цитотоксической активности эффекторных Т-лимфоцитов представлены на рис. 11.

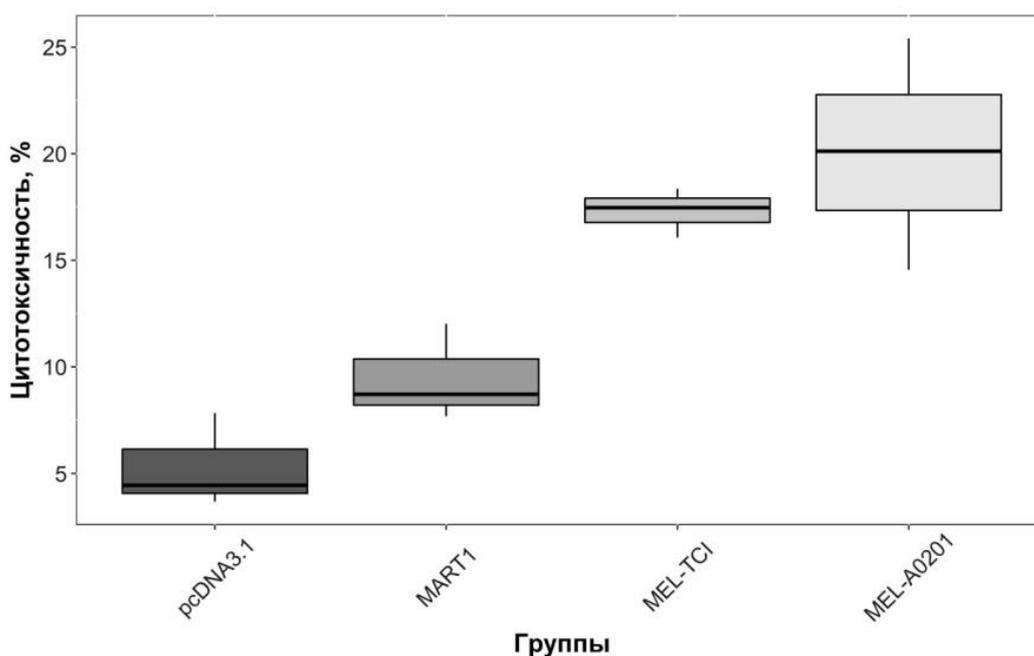


Рисунок 11. Результаты исследования цитотоксического ответа активированных эффекторных Т-лимфоцитов совместной культуры ПМНК условно здоровых доноров в опытных и контрольных группах против линии клеток меланомы человека Mel Is (n = 3). Группы: pcDNA3.1 – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой; MART1 – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART-1, кодирующей полноразмерный белок MART-1; MEL-TCl – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMEL-TCl; MEL-A0201 – совместная культура ПМНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMEL-A0201

Статистический анализ полученных результатов показал, что цитотоксическая активность ПМНК, индуцированных конструкциями pcDNA-MART-1 (среднее 9,47 %, ошибка среднего: 1,31), pMEL-TCl ( $17,3 \pm 0,67$ ) и pMEL-A0201 ( $20,03 \pm 3,13$ ),

достоверно превосходит по эффективности индукции цитотоксический ответ, наблюдавшийся в совместной культуре ПМНК с ДК, трансфицированными векторной плазмидой pcDNA3.1 ( $5,32 \pm 1,28$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Кроме того, цитотоксический ответ, индуцированный целевыми ДНК-конструкциями pMEL-A0201 и pMEL-TCI достоверно превзошел по эффективности цитотоксический ответ, индуцированный плазмидой pcDNA-MART-1, кодирующей полноразмерный белок MART-1 ( $p = 0,035$ ). При этом различия между цитотоксическим ответом, индуцированным препаратами pMEL-A0201 и pMEL-TCI, недостоверны ( $p = 0,26$ ).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия на современном этапе является перспективным направлением в лечении злокачественных новообразований. За последние десятилетия в клинической практике в борьбе с опухолью нашли применение препараты на основе цитокинов, ингибиторов протеинкиназ и иммунных контрольных точек, а также подходы с использованием иммунных клеток (аутологичных или аллогенных). Особое внимание уделяется созданию терапевтических противораковых вакцин, некоторые из них находятся на стадии клинических испытаний. Накопленные данные свидетельствуют в пользу того, что для эффективной борьбы с опухолью необходимо, чтобы в организме происходила наработка широкого репертуара цитотоксических Т-лимфоцитов, обладающих способностью селективно распознавать и убивать раковые клетки. Наиболее безопасным и эффективным способом индукции противоопухолевого иммунного ответа, на наш взгляд, является подход с использованием ДНК-конструкций, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные антигены. Важное их преимущество заключается в том, что в составе одной конструкции могут быть объединены Т-клеточные эпитопы из различных раковых антигенов.

В данной работе проводилось изучение иммуногенности и цитотоксической активности генно-инженерных конструкций, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены меланомы. В ходе исследований было показано, что введение ДНК-конструкций в эукариотические клетки приводит к наработке целевых белков, которые процессируются и представляются в комплексе с молекулами МНС на поверхности АПК. В результате происходит активация эффекторных Т-лимфоцитов. Также было показано, что эффекторные клетки, полученные в результате стимуляции ПМНК трансфицированными ДК, обладают киллерной активностью в отношении клеток меланомы человека линии Mel Is. Кроме того, активированные *ex vivo* CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты обладали способностью продуцировать гранзим В после стимуляции антигенами. Преимуществом сконструированных плазмидных ДНК является то, что они кодируют эпитопы опухолевых антигенов, ввиду чего индуцируемый иммунный ответ будет направлен исключительно против опухолевых клеток, не оказывая влияния на клетки здоровых тканей. Такой подход позволяет свести к минимуму нежелательные эффекты, обусловленные введением вакцины. Сконструированные генно-инженерные конструкции, как нами было показано, обладают способностью стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, что, в свою очередь, позволяет их рассматривать в качестве кандидатов при разработке противоопухолевых вакцин в будущем.

## ВЫВОДЫ

1. С помощью программного обеспечения TEpredict / PolyCTLDesigner спроектированы последовательности двух искусственных полиэпитопных иммуногенов MEL-TCI и MEL-A0201, содержащих множественные цитотоксические и хелперные эпитопы опухолевых антигенов меланомы. Первый «универсальный» иммуноген (MEL-TCI) содержит эпитопы, рестриктированные множественными аллельными вариантами молекул HLA I класса, тогда как второй «аллелеспецифический» иммуноген (MEL-A0201) содержит эпитопы, рестриктированные только одним алломорфом HLA-A\*02:01. Рассчитанные иммуногены спроектированы с учетом оптимизации их процессинга внутри эукариотических клеток.
2. Сконструированы плазмиды pMEL-A0201 и pMEL-TCI, кодирующие искусственные полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI, а также плазида pcDNA-MART-1, кодирующая полноразмерный раковый антиген MART-1, которая использовалась в качестве положительного контроля в экспериментах по изучению биологической активности целевых ДНК-конструкций.
3. Показано, что плазмиды pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 обеспечивают синтез целевых мРНК и белков (экспрессию генов) в трансфицированных эукариотических клетках.
4. В системе *ex vivo* с использованием мононуклеаров периферической крови условно здоровых доноров показано, что генно-инженерные конструкции pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 обладают способностью индуцировать формирование цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В.
5. Показано, что ДНК-конструкции pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 обладают способностью индуцировать цитотоксическую активность аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови против клеток меланомы человека линии Mel Is. Статистический анализ полученных данных свидетельствует о том, что плазмиды pMEL-A0201 и pMEL-TCI, кодирующие спроектированные искусственные антигены, более эффективно индуцируют противоопухолевый иммунный ответ по сравнению с плазмидой pcDNA-MART-1, кодирующей последовательность полноразмерного ракового антигена MART-1.

## СПИСОК РАБОТ, ПУБЛИКАЦИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи*

1. Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Karpenko L.I., Plyichev A.A., Bazhan S.I. Design of Artificial Immunogens Containing Melanoma-associated T-cell Epitopes // Current Gene Therapy – 2018. – V. 18. – № 6. – P. 375 - 385. doi.org/10.2174/1566523218666181113112829
2. Боробова Е.А., Жеравин А.А. Иммуноterapia меланомы // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 65-75.

3. Старостина Е.В., Боробова Е.А., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Терапевтические вакцины против меланомы // Биотехнология. – 2017. – Т. 33. – № 6. – С. 4–11.
4. Боробова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Смирнова О.Ю., Щербаков Д.Н., Волкова О.Ю., Орешкова С.Ф., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Кандидаты ДНК-вакцин против меланомы: дизайн, конструирование и оценка экспрессии целевых генов в эукариотических клетках // Вестник НГУ: - 2012. - №5. – С.23-30.

*Тезисы конференций*

1. Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Oreshkova S.F., Shcherbakov D.N., Smirnova O.Yu., Bazhan S.I., Plyichev A.A., Karpenko L.I., Danilenko E.D., Gamalei S.G., Usova S.V., Bogryantseva M.P. Preclinical studies of the DNA vaccine against melanoma // Сборник тезисов “The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research”, Томск, 17-19 сентября, 2018. – С. 15.
2. Starostina E.V., Borobova E.A., Karpenko L.I. Optimization of dendritic cell maturation protocol to assess the specific activity of anticancer DNA-vaccines in *ex vivo* system // Сборник тезисов “The 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research”, Томск, 17-19 сентября, 2018. – С 106-107.
3. Боробова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Орешкова С.Ф., Щербаков Д.Н., Смирнова О.Ю., Бажан С.И., Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Даниленко Е.Д., Гамалей С.Г., Усова С.В., Богрянцева М.П. Терапевтическая вакцина против меланомы // Сборник тезисов Конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины», Томск, 24 мая 2018. – С. 175.
4. Боробова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Орешкова С.Ф., Щербаков Д.Н., Смирнова О.Ю., Бажан С.И., Ильичев А.А., Карпенко Л.И., Даниленко Е.Д., Гамалей С.Г., Усова С.В., Богрянцева М.П. Therapeutic vaccine against melanoma // Сборник тезисов IV Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов OpenBio, Кольцово, 24-26 октября, 2017. – С. 211-213.
5. Starostina E.V., Antonets D.V., Borobova E.A., Karpenko L.I., Reguzova A.U., Smirnova O.U., Plyichev A.A., Bazhan S.I. DNA-vaccines against melanoma: Design and investigation of antigenic properties // Сборник тезисов международной конференции “Cellular and molecular mechanism of tumour – microenvironment crosstalk”, Томск, 9 - 12 июля, 2015. – С. 57-58.
6. Старостина Е.В., Боробова Е.А., Орешкова С.Ф., Смирнова О.Ю. Карпенко Л.И. Отработка условий культивирования рекомбинантного штамма *Escherichiacoli*DH5 $\alpha$ FI/pMEL-TCI – продуцента ДНК-вакцины против меланомы» // Сборник тезисов Научно-практической конференции по медицинской микологии «XVII Кашкинские чтения», Проблемы медицинской микологии, Санкт-Петербург, 9-11 июня, 2014. – Т. 16. № 2, С. 132.
7. Старостина Е.В., Боробова Е.А., Антонец Д.В., Регузова А.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Исследование кандидатных ДНК-вакцин против меланомы pMEL-TCI-A0201 и pMEL-TCI в условиях *in vitro* и *ex vivo* // Материалы

научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», Новосибирск, 26-28 сентября 2013. – С. 205-206.

8. Старостина Е.В., Боробова Е.А., Антонец Д.В. рMEL-TCl-A0201 и рMEL-TCl - кандидаты ДНК-вакцины против меланомы: конструирование и анализ экспрессии // Сибирский онкологический журнал Приложение № 1. VIII Конференция молодых ученых-онкологов памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии». Томск, 26 апреля, 2013. – С. 86-87.
9. Боробова Е.А., Старостина Е.В., Антонец Д.В., Смирнова О.Ю., Щербаков Д.Н., Орешкова С.Ф., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Характеризация рекомбинантных плазмид – кандидатов ДНК-вакцины против меланомы // Сборник тезисов II Международного форума «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент новой инновационной экономики», Новосибирск, 22-23 марта, 2013. – С. 248-255.
10. Старостина Е.В., Боробова Е.А., Смирнова О.Ю., Антонец Д.В., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. ДНК-вакцина против меланомы, кодирующая поли-CTL-эпитопный иммуноген // Сборник тезисов Международной заочной научно-практической конференции, Тамбов, 31 января, 2012. – С. 126-127.
11. Бажан С.И., Старостина Е.В., Боробова Е.А., Антонец Д.В., Волкова О.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Дизайн ДНК-вакцины, кодирующей множественные T-клеточные эпитопы антигенов меланомы // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика», Новосибирск, 14-17 ноября, 2011. – С.78.

#### *Патенты*

1. Антонец Д.В., Боробова Е.А., Ильичёв А.А., Карпенко Л.И., Орешкова С.Ф., Смирнова О.Ю., Старостина Е.В., Бажан С.И. Искусственный ген *MEL-TCl*, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген MEL-TCl, рекомбинантная плазмидная ДНК рMEL-TCl, обеспечивающая экспрессию искусственного гена MEL-TCl и искусственный белок-иммуноген MEL-TCl, содержащий CTL- и Th-эпитопы антигенов меланомы, рестриктированные множественными аллелями HLA I и II класса. Патент РФ № 2650872 от 17.04.2018.
2. Антонец Д.В., Бажан С.И., Ильичёв А.А., Карпенко Л.И., Боробова Е.А., Старостина Е.В., Смирнова О.Ю., Орешкова С.Ф. Искусственный ген *MEL-TCl-A0201*, кодирующий полиэпитопный белок-иммуноген MEL-TCl-A0201, рекомбинантная плазмидная ДНК рMEL-TCl-A0201, обеспечивающая экспрессию искусственного гена *MEL-TCl-A0201* и искусственный белок-иммуноген MEL-TCl-A0201, содержащий множественные CTL- и Th-эпитопы антигенов меланомы. Патент РФ № 252283 от 21.05.2014.