На правах рукописи

Куликова Екатерина Владимировна

ИНДУКЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА *IN VITRO* ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ, ТРАНСФИЦИРОВАННЫМИ ПОЛИЭПИТОПНЫМИ ДНК-КОНСТРУКЦИЯМИ

14.03.09 –Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск-2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор **Сенников Сергей Витальевич**

Официальные оппоненты:

Чердынцева Надежда Викторовна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский научно-исследовательский институт онкологии», заместитель директора по научной работе, заведующий лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии.

Трунов Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», руководитель лаборатории иммунологии репродукции.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «___ _____» 2015 г. в __часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук **Белогородцев С.Н.**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

На современном этапе проблема онкологических заболеваний особенно актуальна, что связано не только с ростом числа онкобольных, но и с малой эффективностью традиционных методов лечения. Особое внимание заслуживает рак толстого кишечника и прямой кишки (колоректальный рак). Ежегодно по всему миру регистрируется свыше 945 тыс. случаев заболевания колоректальным раком и примерно 492 тыс. смертельных исходов от этого злокачественного новообразования [Weitz J., 2005]. Классическими методами лечения больных колоректальным раком считается хирургическое вмешательство, химиотерапия и лучевая терапия, однако результаты применения этих методов в целом остаются не достаточно эффективными [Meyerhardt J., 2005]. Показано, что выживают в течение 5 лет только 50% больных с опухолями как толстой, так и прямой кишки [Evans C., 2006]. В связи с этим остро стоит проблема поиска новых высокоспецифичных и более эффективных методов терапии данного заболевания.

В настоящее время, прогресс в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями связан с существенным прорывом в молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии, а также с пониманием причин возникновения опухолевого роста и закономерностей патогенетических механизмов злокачественного перерождения. В организме существует целый ряд механизмов и систем, позволяющих ему противостоять возникновению и развитию опухоли. К ним, прежде всего, относят иммунную систему, работа которой направлена на распознавание и элиминацию клеток, несущих признаки антигенного отличия от нормальных тканей человека.

Исследованиями последних десятилетий показано, что при колоректальном раке, как и при других злокачественных новообразованиях, не происходит формирования протективного противоопухолевого иммунного ответа [Москалева Е.Ю., 2002; Evans C., 2006]. Это может быть обусловлено несколькими причинами: недостаточной иммуногенностью опухолевых клеток, способностью опухоли вызывать местную или системную иммунодепрессию различными факторами (IL-10, трансформирующий фактор роста-β, фактор роста эндотелия сосудов) со снижением активности Т-лимфоцитов, с нарушением механизма представления опухоль-ассоциированных антигенов [Agrawal B., 1998; Nakayama H., 2000; Evans C., 2006; Данилова А.Б., 2011]. В настоящее время, одним из наиболее перспективных подходов в лечении онкологических больных является селективная активация Т-клеточного противоопухолевого иммунитета с помощью иммунокомпетентных клеток. Ключевым звеном в реализации этой задачи являются антигенпрезентирующие клетки, в частности, дендритные клетки (ДК). Дендритные клетки считают наиболее мощными стимуляторами иммунных реакций организма, они способны распознавать и представлять антигены Т- и В-лимфоцитам в комплексе с молекулами МНС I и II классов, которые экспрессируются в большом количестве на поверхности клеток наряду с костимуляторными молекулами (CD80, CD86) [Fujii S., 2004; Heath W.R., 2004]. Поэтому зрелые ДК демонстрируют высокую способность презентировать опухоль-ассоциированые антигены *in vitro* [Nersting J., 2003] и *in vivo* [Avigan D., 2004]. Однако функциональная активность ДК у онкологических больных значительно снижена [Almand B., 2001;Балдуева И.А., 2003]. Основной причиной этого считают нарушения в процессе созревания ДК до функционально-активных форм [Almand B., 2000]. В связи с этим получение функционально-активных ДК *in*

vitro и активация их опухоль-ассоциированными антигенами для стимуляции цитотоксического ответа является перспективным при разработке противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток и позволяет мобилизовать защитные системы организма больного, используя естественные пути распознавания опухолевых антигенов и их последующую элиминацию.

Существует множество методов получения ДК *in vitro*, стимулирующих противоопухолевый ответ, к числу которых относятся нагрузка клеток белками опухоль-ассоциированных антигенов, а также введение кДНК или мРНК, кодирующих данные антигены [Nair S.K., 2002; Morse M.A., 2005; Wu Y.G., 2010]. В частности, трансфекция дендритных клеток с помощью плазмидных и вирусных конструкций, несущих нуклеотидные последовательности, которые кодируют полные опухоль-ассоциированные антигены или селектированные эпитопы, позволяет получать наиболее специфичную иммуностимуляцию и делает процесс более стандартизованным. Данное преимущество связано с тем, что можно подобрать наиболее иммуногенные эпитопы при данной патологии, опираясь на уже известные литературные данные и компьютерное моделирование. До настоящего времени ДНК-конструкции для активации противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке не разрабатывались и не исследовались. В связи с этим, исследование по изучению эффективности индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, содержащими эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, представляется актуальным и перспективным направлением в создании методов и подходов активации противоопухолевого иммунного ответа при исследуемой патологии.

Цель работы:

Изучить эффективность индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов.

Задачи:

1. Охарактеризовать по фенотипическим и функциональным показателям дендритные клетки, генерированные из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком.
2. Оценить эффективность доставки ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов при колоректальном раке, в дендритные клетки путем магнитной трансфекции и исследовать их влияние на дифференцировку и созревание дендритных клеток.
3. Исследовать влияние дендритиных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, на индукцию цитотоксического ответа в культуре мононуклеарных клеток и опухолевых клеток больных колоректальным раком и сравнить его с влиянием дендритных клеток, нагруженных лизатом опухолевых клеток.

4. Исследовать влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, на экспрессию цитотоксических молекул перфорина мононуклеарными клетками периферической крови больных колоректальным раком.

Научная новизна работы

Разработана ДНК-конструкция pCI-UB-POLYEPI, кодирующая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака, для индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro*. Показано, что зрелые дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEPI, индуцируют способность мононуклеарных клеток лизировать опухолевые клетки-мишени после совместного культивирования, о чем говорит повышение цитотоксической активности мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток и увеличение количества перфорин-позитивных Т-лимфоцитов в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком. Установлено, что использование для трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкции pCI-UB-POLYEPI так же эффективно для индукции цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком, как и использование дендритных клеток, нагруженных лизатом опухолевых клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

Использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов CEA, EpCAM и MUC4, является эффективным способом стимуляции цитотоксического потенциала мононуклеарных клеток. Полученные данные указывают на то, что уровень стимуляции мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от вида сигнальной последовательности в составе плазмидной конструкции. Применение для трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкции, кодирующей последовательность убиквитина, является более эффективным способом активации мононуклеарных клеток больных колоректальным раком, чем использование ДНК-конструкции, кодирующей сигнальную последовательность легкой каппа-цепи иммуноглобулинов, что может говорить о различных механизмах влияния данных сигнальных последовательностей на процессинг и презентацию эпитопов.

Практическая значимость работы заключается в экспериментальном обосновании способа модуляции клеточного иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток, который может быть основой новой альтернативной клеточной технологии лечения колоректального рака. Получен патент на изобретение № 2507265 «Рекомбинантная плазмидная ДНК pCI-UB-POLYEPI, содержащая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака, и способ ее применения для стимуляции специфического противоопухолевого иммунного ответа против клеток колоректального рака».

Основное положение, выносимое на защиту

Использование ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака, для доставки антигенного материала в дендритные клетки эффективно для индукции противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа у больных колоректальным раком *in vitro*, так же как и использование лизата опухолевых клеток для нагрузки дендритых клеток.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1) Семинарах экспериментального отдела НИИФКИ (Новосибирск, 2012, 2013, 2014, 2015); 2) 8-й отчетной конференции НИИКИ СО РАМН «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике» (Новосибирск, 21-23 июня 2011 года); 3) VII региональной конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В.Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 27 апреля 2012 года); 4) «Конференции по дендритным клеткам и их роли при норме и патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума – 2013 (Нижний Новгород, 30 июня-05 июля 2013 года); 5) «XV международном конгрессе по иммунологии» (Италия, Милан, 22-27 августа 2013 года); 6) 1-м Российском онкологическом научно-образовательном форуме с международным участием «Белые Ночи 2015» (Санкт-Петербург, 8-10 июня 2015 года).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ. Получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора в проведение исследования

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 196 источников, из них 184 зарубежных. Работа иллюстрирована 14 рисунками, 3 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования

В работе использовалась гепаринизированная венозная кровь (70 мл) и образец опухоли от 49 пациентов, больных колоректальным раком, полученных на базе городского центра колопроктологии ГБУЗ НСО ГКБ №11 (г. Новосибирск), и на базе ГБУЗ НСО ГКБ №1 (г. Новосибирск). Критерием отбора служило отсутствие дооперативного вмешательства, проведения химио- и/или радиотерапии. От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследования. Так же была использована гепаринизированная венозная кровь (9 мл) от 5 условно здоровых доноров, полученная в пункте заготовки крови №1 ГБУЗ НСО «Новосибирского центра крови» (г. Новосибирск). Характеристика пациентов приведена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов, больных колоректальным раком.

Пол	М – 44,9% (22/49) Ж – 55,1% (27/49)
Возраст	Средний возраст – 65,5 (42-83)
Диагноз	На основании гистологического исследования всем пациентам поставлен диагноз аденокарцинома различной локализации толстого кишечника I-IV стадии: I-II стадии – 71,4% (35/49) III-IV стадии – 28,6% (14/49)

Получение зрелых дендритных клеток

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови больных колоректальным раком выделяли стандартным методом на градиенте плотности фиколл-урографина (ρ=1,077) [Boyum A., 1968]. Методом адгезии на пластике получали прилипшую фракцию МНК. К прилипшей фракции МНК в концентрации 1 млн/мл добавлялись 50 нг/мл rhGM-CSF, 100 нг/мл rhIL-4 (Peprotech, США) на срок 48ч для получения незрелых ДК. Для антигенной активации к полученным незрелым ДК добавляли опухолевые антигены (лизат опухолевых клеток) (100 мкг/мл). Лизат получали путём механической гомогенизации образца опухоли с последующим 3-х кратным циклом замораживания-оттаивания и измерением содержания белка в лизате на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США). Для получения зрелых ДК на 2 сутки после добавления лизата опухолевых клеток к культуре незрелых ДК добавляли rhTNF-α (25 нг/мл) (Peprotech, США) и инкубировали в течение 24 часов. Параллельно вели группу дендритных клеток, созревание которых происходило без добавления опухолевых антигенов.

Получение аутологичных опухолевых клеток

Опухолевые клетки получали методом холодной трипсинизации образца опухоли, полученного от больного при оперативном вмешательстве. Количество полученных клеток оценивали в камере Горяева, после чего клетки замораживали в FCS с 10 % DMSO. За сутки до посадки на тест по определению цитотоксического эффекта клетки размораживали и оставляли в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки.

Магнитная трансфекция и оценка эффективности трансфекции дендритных клеток

Зрелые дендритные клетки, к которым не добавлялся лизат опухолевых клеток, в объеме 0,5 мл в 48-луночном планшете подвергались процедуре трансфекции. Для трансфекции были использованы плазмиды pCI-neo, pCI-UB, pCI-Sec (контрольные), pCI-UB-POLYEPI, pCI-Sec-POLYEPI (любезно предоставленные к.б.н. Филипенко М.Л., ИХБФМ СО РАН). Процедура магнитной трансфекции осуществлялась с помощью реактивов фирмы Promokine (Германия), протокол проведения основывался на предложенной производителем схеме с образованием комплекса плазмиды с MATra-A реагентом в соотношении 0,3мкг плазмиды на 0,3мкл реагента. Трансфицированные клетки инкубировали в течение суток в атмосфере 5% CO_2 при 37^0C. Оценка эффективности трансфекции осуществлялась с помощью набора для ник-трансляции Promo-Fluor-500 Nick Translation Labeling Kit (Promokine, Германия) на стадии зрелых дендритных клеток. После процедуры ник-трансляции полученные

зонды подвергались стандартной очистке [Молекулярная…, 1991]. Гибридизация трансфицированных клеток осуществлялась по методу Flow-Fish [Rufer N., 1999]. Оценку процента клеток, содержащих плазмиду, проводили на проточном цитофлуориметре в моноцитарном регионе.

Определение фенотипа дендритных клеток

Для оценки фенотипа ДК были использованы соответствующие меченые флюорохромом моноклональные антитела anti-CD14-PE («Сорбент», Москва), anti-CD83-FITC (BD Pharmingen, США), anti-CD86-PE (BD Pharmingen, США), anti-HLA-DR-PerCP (BD Pharmingen, США) с последующим анализом при помощи проточного цитофлуориметра FACS Aria (BD, США) в моноцитарном регионе.

Оценка функциональной активности дендритных клеток

Эндоцитозная способность полученных дендритных клеток оценивалась по захвату FITC-Dextran (Sigma). Анализ меченых клеток проводили при помощи проточного цитофлуориметра FACS Aria (BD, США) в моноцитарном регионе.

Совместное культивирование дендритных клеток и мононуклеарных клеток

Полученные дендритные клетки, как нагруженные лизатом опухолевых клеток, так и трансфицированные плазмидами pCI-neo, pCI-UB, pCI-Sec, pCI-UB-POLYEPI, pCI-Sec-POLYEPI, подвергались совместному культивированию с мононуклеарными клетками неприлипшей фракции (в концентрации 1 млн/мл) в течение 96 часов для праймирования специфического антигена (в соотношении ДК:МНК=1:10). В качестве контроля использовались мононуклеарные клетки неприлипшей фракции, культивированные в тех же условиях, а также клетки, культивированные в присутствии ДК, которым не представлялся опухолевый антиген и которые не были трансфицированы плазмидами (группа МНК+ДК0).

Определение цитотоксического эффекта мононуклеарных клеток на клетки опухоли колоректального рака

Анализ цитотоксического эффекта проводился с помощью оценки содержания лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в кондиционной среде при совместном культивировании человеческой популяции клеток (ДК+МНК) и опухолевых клеток колоректального рака. Процедура проводилась согласно инструкции производителя набора (Promega, США). После совместного культивирования МНК неприлипшей фракции и ДК, трансфицированных плазмидами или нагруженных лизатом опухолевых клеток, а также культивирования клеток контрольных групп в течение 96 часов, клеточную суспензию отмывали, а затем рассаживали полученные клетки в объеме 50 мкл с концентрацией клеток 1 млн/мл совместно с предварительно размороженными аутологичными клетками опухоли в соотношении 10:1 и культивировали в течение 16-18 часов. Схема рассадки клеток предложена фирмой-производителем используемого набора «CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay». Цитотоксический эффект рассчитывался по формуле, предложенной фирмой-производителем используемого набора, и выражался в процентах: % цитотоксичности = ((ОП(экспериментальный лизис)-ОП(спонтанный лизис клеток-эффекторов)-ОП(спонтанный лизис опухолевых клеток))/(ОП(максимальный лизис опухолевых клеток)-ОП(спонтанный лизис опухолевых клеток)))*100%.

Определение содержания перфорин-позитивных клеток

После совместного культивирования МНК неприлипшей фракции и ДК, трансфицированных плазмидами, а также культивирования клеток контрольных групп в течение 96 часов определяли содержание мононуклеарных клеток,

экспрессирующих внутриклеточный белок перфорин с помощью мечения моноклональными антителами anti-CD8-APC-H7 (BD Pharmingen, США) и anti-perforin-FITC (BD Pharmingen, США). Количество перфорин-позитивных клеток оценивали на проточном цитофлуориметре FACS Aria (BD, США) в лимфоцитарном регионе.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программы «Statistica 7.0». Проверка выборки на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. При ненормальном распределении выборки, для статистической проверки использовались непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона, данные представлялись в виде медианы и квартильного диапозона значений (25% и 75%). В пояснениях к иллюстрациям количество лиц в группе обозначено n.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика фенотипических и функциональных показателей дендритных клеток, полученных из адгезирующей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком

Для получения незрелых дендритных клеток моноциты прилипшей фракции периферической крови больных колоректальным раком культивировались по протоколу с добавлением GM-CSF (50 нг/мл) и IL-4 (100 нг/мл) в течение 96 часов. Для созревания полученных незрелых дендритных клеток мы инкубировали незрелые ДК в течение 24 часов в присутствии TNF-α в дозе 25 нг/мл. Для идентификации популяции дендритных клеток мы оценивали фенотип полученных клеток по экспрессии маркеров CD14, CD83, HLA-DR, CD86, а также их функциональные свойства по способности захватывать меченый декстран. На рисунке 1 представлены уровни экспрессии маркеров CD14, CD83, CD86 и HLA-DR на поверхности зрелых дендритных клеток по сравнению с незрелыми дендритными клетками пациентов больных колоректальным раком. Нами было показано достоверное снижение содержания клеток с поверхностным маркером моноцитов CD14 и увеличение содержания клеток с маркерами CD83, CD86, HLA-DR, а также дубль-позитивных клеток HLA-DR/CD83. Таким образом, под действием использованных цитокинов моноциты больных колоректальным раком дифференцируются в зрелые ДК при применении данного клеточного протокола.

Согласно цели нашей работы, для дальнейших исследований необходимо было получить зрелые трансфицированные дендритные клетки и нужно было проверить, влияет ли процедура магнитной трансфекции на фенотипический статус уже зрелых ДК. Насколько нам известно, на сегодняшний день опубликованных данных по влиянию магнитной трансфекции на дифференцировку и созревание дендритных клеток не имеется, однако при использовании других видов трансфекции, например трансдукции, не было выявлено негативного воздействия на фенотипический статус дендритных клеток [Ordemann J., 2002; Wei J., 2008]. После проведения процедуры магнитной трансфекции зрелых ДК исследуемые маркеры CD83, CD86 и HLA-DR остаются на том же уровне, что и у зрелых ДК, не подвергавшихся трансфекции. Таким образом, магнитная трансфекция в нашем протоколе получения дендритных клеток из моноцитов периферической крови больных колоректальным раком не оказывает влияния на их дифференцировку и созревание.

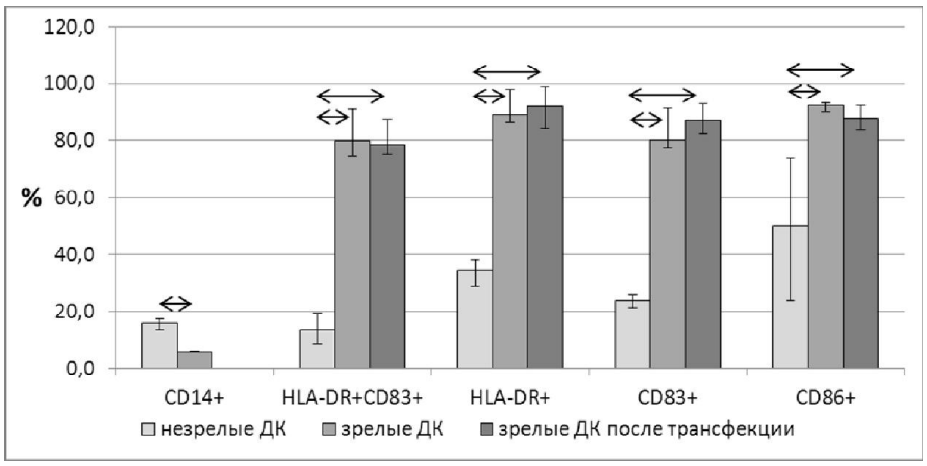

Рис. 1 Уровень экспрессии поверхностных маркеров на дендритных клетках больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=6. Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Уилкоксона).

Для исследования способности полученных незрелых дендритных клеток больных колоректальным раком захватывать антиген мы провели оценку их активности с помощью FITC-декстрана в отношении рецептор-опосредованного эндоцитоза при +4˚С и при +37˚С. При +4˚С происходит только неспецифическое связывание декстрана с поверхностными рецепторами, тогда как при +37˚С связанный декстран проникает в клетку за счет эндоцитоза. Степень захвата FITC-декстрана дендритными клетками определялась по формуле: deltaMFI = $MFI_{37^{\circ}C}$ – $MFI_{4^{\circ}C}$, где $MFI_{37^{\circ}C}$ – интенсивность флюоресценции меченых клеток при +37˚С, а $MFI_{4^{\circ}C}$ – интенсивность флюоресценции меченых клеток при +4˚С.

При определении этого показателя было выявлено, что интенсивность захвата антигена незрелыми дендритными клетками больных колоректальным раком достоверно выше по сравнению со зрелыми дендритными клетками этих же больных. Это свидетельствует об эффективном захвате антигена незрелыми ДК по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза и о сохранении способности зрелых ДК к неспецифическому связыванию декстрана без проникновения его в клетку (рисунок 2).

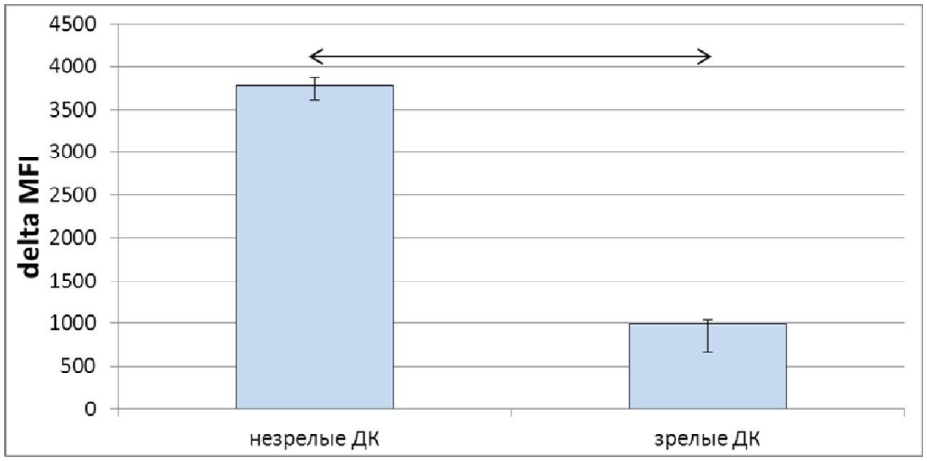

Рис. 2. Эндоцитозная активность дендритных клеток больных колоректальным раком в зависимости от степени зрелости. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=6. Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Уилкоксона).

Таким образом, суммарные данные по фенотипическим и функциональным показателям полученных ДК показали возможность генерации в условиях применяемого 5-дневного клеточного протокола зрелых, потенциально способных к процессингу опухоль-ассоциированных антигенов из прилипающей фракции периферической крови пациентов больных колоректальным раком.

Характеристика плазмидных конструкций, несущих последовательности эпитопов опухоль-ассоциированных антигенов

В нашей работе для трансфекции дендритных клеток были использованы плазмидные конструкции pCI-UB-POLYEPI и pCI-Sec-POLYEPI, несущие последовательности, кодирующие эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов: карциноэмбрионального антигена (CEA), молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), муцина 4 (MUC4). Данные антигены на высоком уровне экспрессируются на клетках различных эпителиальных злокачественных опухолей, включая колоректальный рак, что делает их потенциальными кандидатами для применения в вакцинотерапии онкологических заболеваний. Разработка и синтез плазмидных конструкций были проведены совместно с группой фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (руководитель Филипенко М.Л.). Плазмидные конструкции также имеют в своем составе несколько дополнительных последовательностей, ответственных за неспецифическое усиление клеточного иммунного ответа, за аффинность эпитопов к TAP транспортеру и за эффективное расщепление наработанного полиэпитопного белка на отдельные эпитопы и их эффективную транслокацию.

Продуктом наработки плазмидной конструкции является полиэпитопный белок. Для конструирования полиэпитопного белка проводили анализ аминокислотных последовательностей антигенов CEA, EpCAM, MUC4, отбор MHC I и MHC II эпитопов выполняли с помощью компьютерного предсказания и анализа существующих экспериментальных данных.

Одним из перспективных методов усиления иммуногенности ДНК-конструкции является изменение типа процессинга белка и презентации пептидов. Это может быть достигнуто за счет добавления в состав ДНК-конструкции специализированных сигнальных последовательностей белков, например убиквитина или каппа-цепи иммуноглобулинов, что было использовано при разработке плазмидных конструкций pCI-UB-POLYEPI и pCI-Sec-POLYEPI. Ковалентно связанный с полиэпитопным белком убиквитин направляет его в протеасому в сочетании с N -дестабилизирующим аминокислотным остатком аргинина [Rodriguez F., 1997; Huebener N., 2008], а сигнальная последовательность легкой каппа-цепи иммуноглобулинов - в эндоплазматический ретикулум, что, вероятно, в обоих случаях будет способствовать большей доступности белка для представления по MHC I пути и усилению клеточного ответа. Насколько нам известно, до настоящего времени сигнальные последовательности в составе конструкций для трансфекции в дендритные клетки не применяли, но использовали в ДНК-вакцинах для непосредственного введения в организм, в частности убиквитин. Так, в одной из работ было показано, что пероральная иммунизация мышей ДНК-вакциной, кодирующей 3 эпитопа тирозингидроксилазы к антигену H2-Kk MHC класса I и мутантный убиквитин, с ослабленным Salmonella Typhimurium SL7207 освобождала мышей от спонтанных печеночных метастазов [Huebener N., 2008]. Этот эффект отчетливо зависел в том числе от убиквитина.

<u>Оценка эффективности доставки ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, в дендритные клетки методом магнитной трансфекции</u>

В литературе встречаются примеры трансфекции как незрелых, так и зрелых ДК, а в одной из работ было продемонстрировано, что ДК, трансфицированные после добавления созревающего стимула, более эффективно представляют антиген по сравнению с ДК, трансфицированными до созревания [Bonehill A., 2004]. Предварительными исследованиями нашей лаборатории было показано, что магнитная трансфекция зрелых дендритных клеток полиэпитопной ДНК-конструкцией эффективна для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* [Максютов А.З., 2014]. Поэтому в нашем протоколе получения дендритных клеток был использован метод магнитной трансфекции на стадии зрелых дендритных клеток. Определение эффективности трансфекции проводили методом ник-трансляции, с последующей гибридизацией зонда с трансфицированными клетками и оценкой процента клеток, несущих экспериментальную ДНК-конструкцию методом проточной цитофлуориметрии. Результаты с использованием материала от 5 доноров показали среднюю эффективность магнитной трансфекции в пределах 70% для популяции моноцитов в культуре зрелых дендритных клеток (на рисунке 3 представлены данные от 1-го донора).

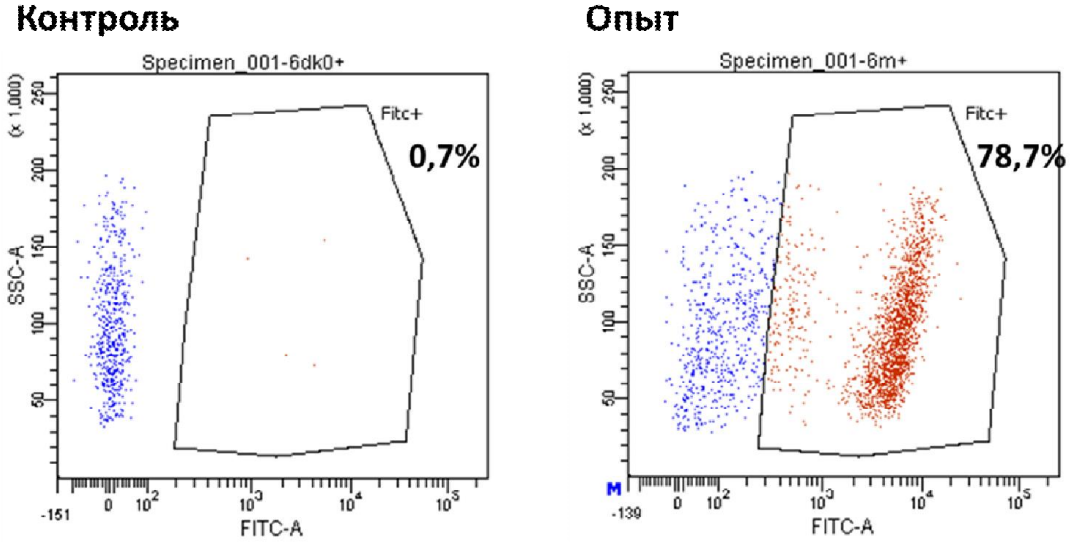

Рис. 3. Типичные точечные диаграммы при оценке эффективности трансфекции зрелых дендритных клеткок плазмидой pCI-UB-POLYEPI с реагентом MaTRa-A, с использованием зонда, полученного из этой же плазмиды, методом гибридизации Flow-Fish. По оси Y – боковое светорассеяние клеток, по оси X – флуоресценция Atto488 по каналу FITC. Примечание: контроль – проба без трансфекции, опыт – проба с трансфекцией. В каждую пробу был добавлен зонд в концентрации 3 мкг/мл.

По литературным данным известно, что невирусная трансфекция обладает низкой эффективностью, однако в отличие от вирусной трансфекции, она не имеет риска индукции аутоиммунного ответа или возникновения мутации [Chen Y.Z., 2010]. В данной работе магнитная трансфекция обладала хорошей эффективностью, определяемой по количеству плазмидной ДНК, доставленной в дендритные клетки, поэтому для последующих исследований был использован этот вид невирусной трансфекции.

Для оценки способности полученных дендритных клеток, трансфицированных экспериментальными плазмидами, стимулировать клеточный иммунный ответ в культуре МНК был проведен анализ цитотоксического потенциала МНК после совместного культивирования с трансфицированными ДК.

Модуляция эффекторных функций мононуклеарных клеток с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетическими конструкциями

Влияние зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетическими конструкциями, на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток больных колоректальным раком

Цитотоксические Т-клетки – главный компонент противоопухолевого иммунного ответа, поскольку они могут напрямую лизировать клетки опухоли и секретировать иммуномодулирующие цитокины IL-2, TNF-α, GM-CSF и IFN-γ, которые оказывают опосредованное воздействие на злокачественные клетки. Протективный противоопухолевый иммунный ответ включает в себя разрушение злокачественных клеток, поэтому была проведена оценка цитотоксической активности МНК, активированных трансфицированными ДК, против аутологичных опухолевых клеток с помощью количественного определения содержания цитозольного фермента лактатдегидрогеназы, выделяющегося из разрушенных опухолевых клеток. На рисунке 4 представлены данные по цитотоксическому тесту мононуклеарных клеток, сокультивированных с ДК, трансфицированными первой плазмидной конструкцией pCI-UB-POLYEPI, в отношении аутологичных опухолевых клеток. Показано, что трансфицированные конструкцией дендритные клетки достоверно повышают цитотоксическую активность мононуклеарных клеток, что может свидетельствовать об активной транскрипции конструкции, трансляции полиэпитопного белка в дендритных клетках и об эффективном представлении эпитопов опухоль-ассоциированных антигенов в комплексе с молекулами МНС на поверхности клеток.

При применении для трансфекции ДК второй плазмидной конструкции pCI-Sec-POLYEPI было установлено, что дендритные клетки, трансфицированные этой конструкцией, отличались по эффекту на МНК от дендритных клеток, трансфицированных первой плазмидной конструкцией. На рисунке 5 показано, что группа МНК, сокультивированных с дендритными клетками, трансфицированными pCI-Sec-POLYEPI, не оказали цитотоксического эффекта на клетки опухоли. Это может быть связано с тем, что тип процессинга и презентации пептида у второй плазмидной конструкции не настолько эффективен, как у первой.

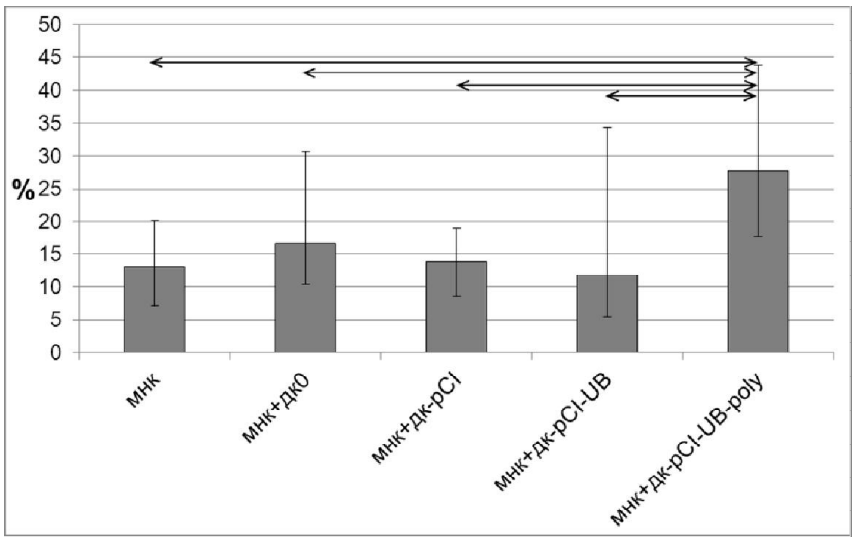

Рис. 4. Цитотоксическая активность МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК, против аутологичных опухолевых клеток больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=34. Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Манна-Уитни). Примечание: Здесь и на рис. 7,8. МНК – мононуклеарные клетки, не подвергшиеся совместному культивированию с дендритными клетками; МНК+ДК0 – совместная культура МНК и нетрансфицированных ДК; МНК+ДК-pCI - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI; МНК+ДК-pCI-UB – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-UB; МНК+ДК-pCI-UB-poly - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-UB-POLYEPI.

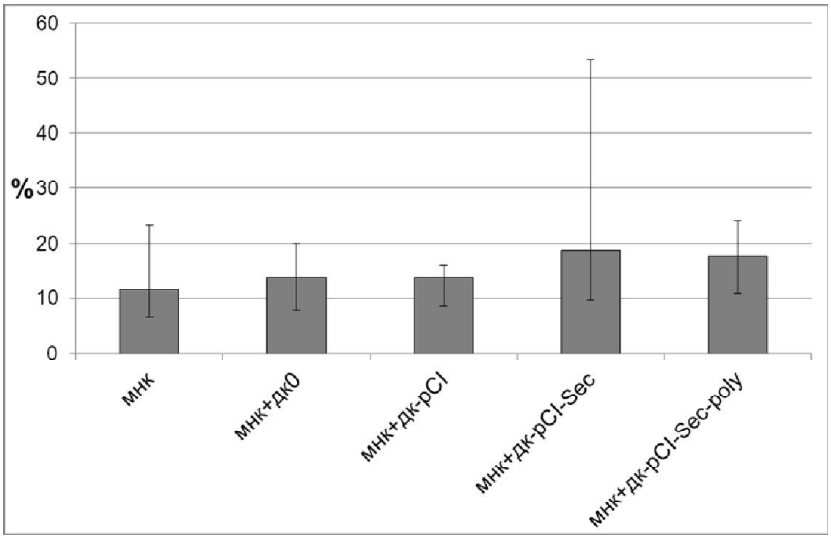

Рис. 5. Цитотоксическая активность МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК, против аутологичных опухолевых клеток больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=15 (группы МНК+ДК-pCI-Sec и МНК+ДК-pCI-Sec-poly, n=7). Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Манна-Уитни). Примечание: МНК – мононуклеарные клетки, не подвергшиеся совместному культивированию с дендритными клетками; МНК+ДК0 – совместная культура МНК и нетрансфицированных ДК; МНК+ДК-pCI - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI; МНК+ДК-pCI-Sec – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-Sec; МНК+ДК-pCI-Sec-poly - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-Sec-POLYEPI.

Так как плазмидная конструкция pCI-UB-POLYEPI привлекает в своем механизме процессинга и презентации в первую очередь убиквитин-протеасомную систему деградации белков, а конструкция pCI-Sec-POLYEPI эффективную доставку в эндоплазматический ретикулум, то можно сделать вывод о том, что в данной модели исследования для эффективного представления эпитопов на поверхности дендритных клеток более значимую роль играет активная деградация белка, чем его направление в ЭПС. Также можно предположить, что при трансфекции ДК конструкцией pCI-Sec-POLYEPI расщепление наработанного полиэпитопного белка, и, соответственно, представление эпитопов на поверхности клеток происходит медленнее и требует более длинного по времени протокола, и в рамках протокола в данной работе этот механизм полностью не реализуется. Таким образом, ДК, трансфицированные конструкцией pCI-UB-POLYEPI, повышают цитотоксическую активность МНК против клеток колоректального рака, как мы предполагаем, за счет более эффективной деградации синтезированного полиэпитопного белка.

Классическим способом доставки антигена в дендритные клетки для индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* является нагрузка дендритных клеток лизатом опухолевых клеток [Figdor C.G., 2004]. Для объективной оценки эффективности использования разработанной ДНК-конструкции было важно сравнить его с классическим подходом в рамках одной работы. Для части пациентов были проведены дополнительные эксперименты, включающие использование ДК, нагруженных антигенами опухолевых лизатов. По нашим данным применение таких дендритных клеток так же достоверно стимулирует цитотоксический ответ МНК против аутологичных опухолевых клеток, причем это влияние сопоставимо с влиянием ДК, трансфицированных конструкцией pCI-UB-POLYEPI (рисунок 6). Таким образом, рассмотренные способы индукции противоопухолевого иммунного ответа в культуре МНК оказались сходными по эффективности.

Тем не менее, лизат может содержать белки, подавляющие иммунный ответ [Dong B., 2014], а остаточные опухолевые клетки в организме пациента могут изменять свой антигенный профиль в ходе лечения, что может затруднить использование лизата в вакцинах на основе ДК [Чердынцева Н.В., 2013]. Полиэпитопные ДНК-конструкции не содержат последовательности иммуносупрессивных эпитопов и имеют низкий риск аутоиммунного ответа. Конструкция включает в себя последовательности иммуногенных эпитопов нескольких ОАА, что позволяет достичь широкого перекрытия антигенного состава и, таким образом, увеличить шансы эффективной стимуляции противоопухолевого иммунного ответа.

Поскольку индукция цитотоксичности была выявлена у первой плазмидной конструкции pCI-UB-POLYEPI, представлялось интересным исследовать механизмы, приводящие к развитию цитотоксического потенциала у мононуклеарных клеток под действием дендритных клеток, трансфицированных этой конструкцией, *in vitro*, а именно, изучить оказываемое ДК влияние на экспрессию перфорина МНК.

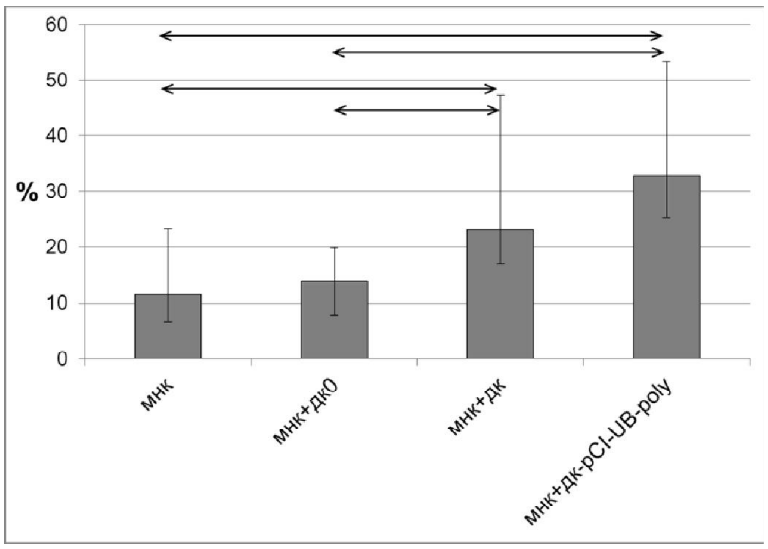

Рис. 6. Цитотоксическая активность МНК, сокультивированных с трансфицированными или нагруженными лизатом опухолевых клеток ДК, против аутологичных опухолевых клеток больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=15. Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Манна-Уитни). Примечание: МНК – мононуклеарные клетки, не подвергшиеся совместному культивированию с дендритными клетками; МНК+ДК0 – совместная культура МНК и нетрансфицированных ДК; МНК+ДК - совместная культура МНК и ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток; МНК+ДК-pCI-UB-poly - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-UB-POLYEPI.

Влияние зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетической конструкцией, на экпрессию перфорина мононуклеарными клетками in vitro

Цитотоксичность является сложным многофакторным процессом, приводящим к гибели клетки-мишени с помощью цитотоксических эффекторных клеток. Одним из механизмов цитотоксичности против опухолевых клеток, наряду с Fas-зависимым цитолизом и такими индукторами апоптоза, как TRAIL, TNF-α, является гранулозависимый эндоцитоз, основными медиаторами которого являются перфорин, гранзим и гранулизин. Перфорин является фактором, вызывающим образование пор в цитоплазматической мембране, через которые в цитоплазму клеток-мишеней проникает фактор гранзим В, что приводит к гранзим В-опосредованному апоптозу этих клеток [Rousalova I., 2010]. Для проверки предположения о роли перфорин-зависимого механизма лизиса опухолевых клеток определялось, как влияют трансфицированные ДК на экспрессию внутриклеточного белка перфорина МНК больных колоректальным раком при совместном культивировании. При анализе выборки пациентов было показано достоверное увеличение процента перфорин-позитивных клеток в популяции лимфоцитов в группе МНК, культивированных с трансфицированными конструкцией pCI-UB-POLYEPI ДК, по сравнению с контрольными группами (рисунок 7).

По данным литературы при колоректальном раке $CD8^+$ Т-клетки играют основную роль в формировании противоопухолевого иммунного ответа, главным образом, в цитотоксичности [Merika E., 2010; Pernot S., 2014], поэтому в этом исследовании также изучался эффект трансфицированных ДК на экспрессию перфорина $CD8^+$ лимфоцитами периферической крови больных колоректальным раком. При определении содержания перфорин-позитивных клеток среди $CD8^+$ Т-

лимфоцитов в популяции МНК так же было выявлено достоверное повышение процента клеток в группе МНК, сокультивированных с дендритными клетками, трансфицированными конструкцией pCI-UB-POLYEPI, по сравнению со всеми остальными группами (рисунок 8). Таким образом, можно говорить о стимулирующем влиянии дендритных клеток, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-UB-POLYEPI, на количество лимфоцитов, несущих гранулы перфорина. Ранее было показано, что введение пациентам с колоректальным раком рекомбинантного белка EpCAM приводило к образованию EpCAM-специфических Т-клеток, среди которых перфорин-продуцирующими клетками были преимущественно $CD8^+$ лимфоциты [Mosolits S., 2004].

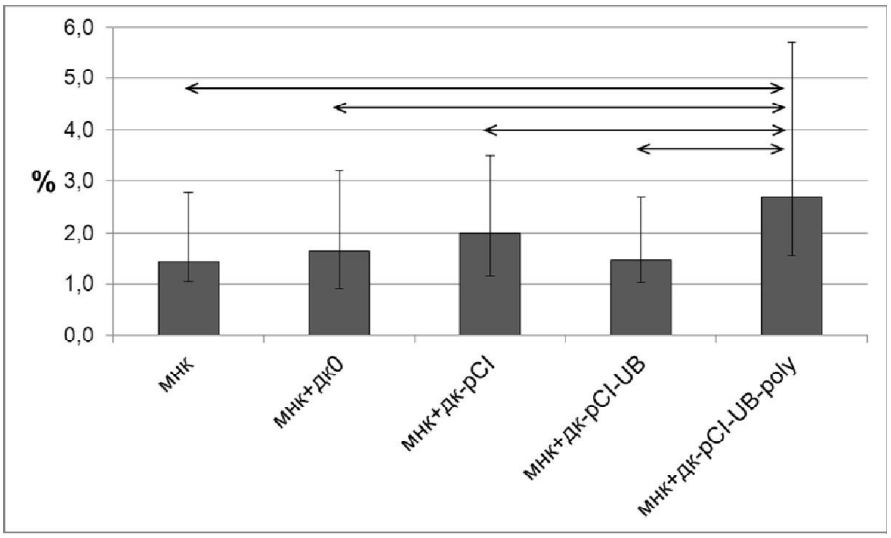

Рис. 7. Относительное содержание перфорин-позитивных клеток в популяции лимфоцитов культуры МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=12. Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Уилкоксона).

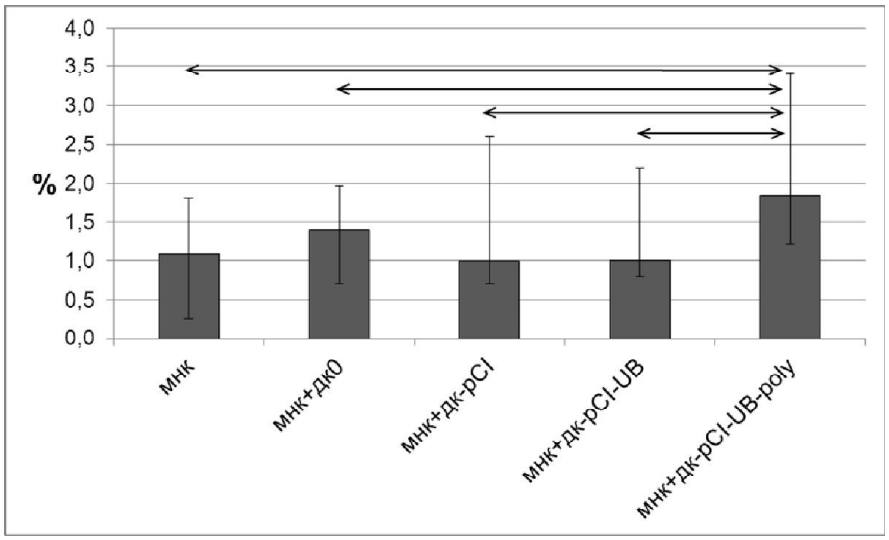

Рис. 8. Относительное содержание перфорин-позитивных клеток среди $CD8^+$ Т-лимфоцитов в популяции МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=9. Стрелками указаны достоверные различия между группами (p<0,05) (критерий Уилкоксона).

В результате проведенных исследований показана возможность получения зрелых дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, и индукция противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке с помощью трансфицированных дендритных клеток и аутологичных мононуклеарных клеток *in vitro*. Совместное культивирование аутологичных ДК, трансфицированных конструкцией pCI-UB-POLYEPI, и МНК больных колоректальным раком стимулирует цитотоксическую активность МНК против аутологичных опухолевых клеток и способствует формированию пула цитотоксических перфорин-позитивных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Дендритные клетки, генерированные из прилипающей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком, обладают фенотипическими и функциональными свойствами, присущими зрелым антигенпрезентирующим клеткам, что говорит о возможности генерации дендритных клеток при данной патологии в условиях культивирования в течение 5-дневного клеточного протокола.
2. Использование для доставки в клетки ДНК-конструкций метода магнитной трансфекции не оказывает влияния на дифференцировку и созревание дендритных клеток и приводит к повышению процента клеток, несущих плазмидную конструкцию, кодирующую эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, что говорит об эффективном переносе генетического материала в дендритные клетки и сохранении клетками фенотипических характеристик после проведения трансфекции в данных условиях.
3. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEPI, в отличие от ДНК-конструкции pCI-Sec-POLYEPI, оказывают индуцирующее влияние на цитотоксическую активность мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток колоректального рака, что может говорить об эффективности использования в конструкции выбранных иммуногенных эпитопов и убиквитина для процессинга и презентации этих эпитопов в условиях данного клеточного протокола получения дендритных клеток.
4. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEPI, увеличивают процент клеток, несущих молекулы перфорина, как в общей популяции, так и в популяции $CD8^+$ лимфоцитов периферической крови больных колоректальным раком, что указывает на индукцию клеточного перфорин-опосредованного механизма цитотоксичности в данных условиях.
5. Дендритные клетки, нагруженные лизатом опухолевых клеток колоректального рака или трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEPI, кодирующей эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака, одинаково эффективно индуцируют противоопухолевую цитотоксическую способность мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Курилин В.В., Облеухова И.А., Куликова Е.В., Рябкова Ю.Н., Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Якушенко В.К., Сенников С.В. Использование дендритных клеток для стимуляции цитотоксического противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток // «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных

заболеваний человека: от эксперимента к клинике». Под ред. В.А.Козлова и С.В.Сенникова, Новосибирск. – 2011. – С. 77-80.

2. Курилин В.В., Облеухова И.А., Куликова Е.В., Якушенко Е.В., Якушенко В.К., Сенников С.В. Модуляция опухолеспецифичной цитотоксической иммунной реакции в совместной культуре мононуклеарных и дендритных клеток больных колоректальным раком // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 2/1 (35). – С. 164-165.

3. Куликова Е.В., Курилин В.В., Облеухова И.А., Шевченко Ю.А., Шорохов Р.В., Соколов А.В., Якушенко В.К., Сенников С.В. Влияние дендритных клеток, трансфецированных специфическими полиэпитопными ДНК-конструкциями, на модуляцию иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – №S1. – С. 87-88.

4. Хантакова Ю.Н., Лопатникова Ю.А., Шевченко Ю.А., Курилин В.В., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Куликова Е.В., Зайцев С.А., Максютов А.З., Сенников С.В. Влияние трансфекции дендритных клеток полиэпитопными конструкциями HER2/ERBB2 на стимуляцию цитотоксического ответа в культуре мононуклеарных клеток // Сибирский онкологический журнал. – 2012. – №S1. – С. 166-167.

5. Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В. Подходы стимуляции противоопухолевого иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных колоректальным раком // Российский иммунологический журнал. Материалы объединенного иммунологического форума, Нижний-Новгород, 30 июня-5 июля. – 2013. – Т.7(16) . – №2-3. – С. 343.

6. Курилин В.В., Куликова Е.В., Облеухова И.А., Хантакова Ю.Н., Шевченко Ю.А., Соколов А.В. Влияние различных способов доставки опухолевых антигенов на эффективность стимуляции цитотоксической клеточной реакции против аутологичных опухолевых клеток // Российский иммунологический журнал. Материалы объединенного иммунологического форума, Нижний-Новгород, 30 июня-5 июля. – 2013. – Т.7(16) . – №2-3. – С. 343.

7. Ekaterina Kulikova, Vasily Kurilin, Irina Obleuhova, Yulia Shevchenko, Vladimir Yakushenko, Andrey Sokolov and Sergey Sennikov. Development of the approach based on dendritic cells transfected with polyepitope DNA-construction for stimulation of antitumor cytotoxic response in colorectal cancer // Frontiers in Immunology. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). – 2013. doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00160.

8. Vasily Kurilin, Irina Obleuhova, Ekaterina Kulikova, Julia Khantakova, Julia Shevcenko, Vladimir Yakushenko, Andrey Sokolov, Sergey Sidorov. Receiving mature dendritic cells in vitro in patients with tumors of different localization // Frontiers in Immunology. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). – 2013. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00116.

9. Kulikova E.V., Kurilin V.V., Yakushenko V.K., Sokolov A.V., Sennikov S.V. The approaches of stimulation of the antitumor immune response by dendritic cells in the culture of mononuclear cells of patients with colorectal cancer // Сборник тезисов «18th NAT Conference. Common perspectives in transplant and tumor immunology». – 2013. – С. 33.

10. Kurilin V.V., Kulikova E.V., Obleuchova I.A., Khantakova J.N., Shevchenko J.A., Lopatnikova J.A., Sokolov A.V., Sidorov S.V., Sennikov S.V. Using different

approaches delivery of tumor antigens to dendritic cells to stimulate a cytotoxic cell response // Сборник тезисов «18th NAT Conference. Common perspectives in transplant and tumor immunology». – 2013. – С. 34.

11. Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Облеухова И.А., Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В., Сенников С.В. Стимуляция дендритными клетками in vitro противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных колоректальным раком // Медицинская иммунология. – 2013. – Т.15. – №.3. – С. 235-246.

12. Пат. 2507265 Российская Федерация, МПК C 12 N 15 / 63, 15 / 117, 5 / 0784, 5 / 10. Рекомбинантная плазмидная ДНК pCI-UB-POLYEPI, содержащая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака, и способ ее применения для стимуляции специфического противоопухолевого иммунного ответа против клеток колоректального рака / С.В. Сенников, М.Л. Филипенко, В.В. Курилин, Е.В. Куликова, Е.А. Храпов, Ю.А. Шевченко, Р.В. Шорохов, В.К. Якушенко. – № 2012119658/10, заявл. 12.05.12, опубл. 20.02.14, Бюл. № 5. – 10 с.

13. Kulikova E.V., Kurilin V.V., Shevchenko J.A., Obleukhova I.A., Khrapov E.A., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Shorokhov R.V., Yakushenko V.K., Sokolov A.V., Sennikov S.V. Dendritic Cells Transfected with a DNA Construct Encoding Tumour-associated Antigen Epitopes Induce a Cytotoxic Immune Response Against Autologous Tumour Cells in a Culture of Mononuclear Cells from Colorectal Cancer Patients // Scand J Immunol. – 2015. – Vol. 82(2). – P. 110-7.