

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи

КУЛИКОВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

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

14.03.09 – “Клиническая иммунология, аллергология”

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Д.м.н., профессор С.В.Сенников

Новосибирск

2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| Оглавление | 2 |
| Список сокращений | 3 |
| Введение..... | 5 |
| 1. Обзор литературы..... | 12 |
| 1.1. Механизмы противоопухолевого иммунитета и их нарушения..... | 13 |
| 1.2. Роль дендритных клеток в противоопухолевом иммунитете при колоректальном раке..... | 19 |
| 1.3. Способы доставки различных видов антигенов в дендритные клетки для индукции специфического противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке, их преимущества и недостатки. | 22 |
| 1.4. Опухоль-ассоциированные антигены колоректального рака..... | 29 |
| 2. Материалы и методы исследования | 34 |
| 3. Результаты собственных исследований..... | 44 |
| 3.1. Характеристика фенотипических и функциональных показателей дендритных клеток, полученных из адгезирующей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком..... | 44 |
| 3.2. Характеристика плазмидных конструкций, несущих последовательности эпитопов опухоль-ассоциированных антигенов..... | 47 |
| 3.3. Оценка эффективности доставки ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, в дендритные клетки методом магнитной трансфекции..... | 55 |
| 3.4. Модуляция эффекторных функций мононуклеарных клеток с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетическими конструкциями. | 57 |
| 4. Обсуждение полученных результатов | 68 |
| Заключение | 78 |
| Выводы | 80 |
| Список литературы | 82 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МНК – моноклеарные клетки неприлипшей фракции периферической крови человека

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОАА – опухоль-ассоциированный антиген

РНК – рибонуклеиновая кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

сАМР – циклический аденозинмонофосфат

СЕА – карциноэмбриональный антиген

СОХ – циклооксигеназа

CTL – цитотоксические Т-лимфоциты

EGF – эпидермальный фактор роста

ЕрСАМ – молекула адгезии эпителиальных клеток

ER – эндоплазматический ретикулум

FBP – фолатсвязывающий протеин

FCS – эмбриональная телячья сыворотка

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста

H₂O₂ – пероксид водорода

HLA – человеческие лейкоцитарные антигены

ICAM-1 – молекула клеточной адгезии 1

IFN – интерферон

IL – интерлейкин

LFA-3 – антиген, ассоциированный с функцией лимфоцитов
LMP – низкомолекулярный протеин (субъединица протеасомы)
LPS – липополисахарид
MAGE – антиген, ассоциированный с меланомой
MHC – главный комплекс гистосовместимости
MUC – муцин
NK – натуральные киллеры
NO – оксид азота
PBS – натрий-фосфатный буфер
PGE2 – простагландин E2
PMSA – простат-специфический мембранный антиген
rhIL – рекомбинантный человеческий интерлейкин
TAP – транспортер, ассоциированный с процессингом антигенов
TGF- β – трансформирующий ростовой фактор бета
Th – Т-хелперы
TNF- α – фактор некроза опухоли альфа
TRAIL – TNF-ассоциированный апоптоз-индуцирующий лиганд
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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 [189]. Классическими методами лечения больных колоректальным раком считается хирургическое вмешательство, химиотерапия и лучевая терапия, однако результаты применения этих методов в целом остаются не достаточно эффективными [123]. Показано, что выживают в течение 5 лет только 50% больных с опухолями как толстой, так и прямой кишки [56]. 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 [8, 56]. 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 [4, 14, 56, 135]. 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) [60, 77]. Поэтому зрелые ДК демонстрируют высокую способность презентировать опухоль-ассоциированные антигены *in vitro* [138] и *in vivo* [22]. Однако функциональная активность ДК у онкологических больных значительно снижена [1, 17]. Основной причиной этого считают нарушения в процессе созревания ДК до функционально-активных форм [18]. В связи с этим получение функционально-активных ДК *in vitro* и активация их опухоль-ассоциированными антигенами для индукции 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 [126, 133, 193]. 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.

В связи с обозначенной целью были поставлены следующие 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 дендритных 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-POLYEP1, кодирующая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака, для индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro*. Показано, что зрелые дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, 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-POLYEP1 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 СЕА, ЕрСАМ 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 рСІ-UB-POLYЕРІ, 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 опухолеассоциированных 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 дендритных 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 «Имунопатогенез 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).

По теме диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов

диссертационных работ. Получен 1 патент на изобретение № 2507265 «Рекомбинантная плазмидная ДНК pCI-UB-POLYEP1, содержащая эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов для колоректального рака, и способ ее применения для стимуляции специфического противоопухолевого иммунного ответа против клеток колоректального рака».

Самостоятельность выполненной работы

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии Федерального Государственного Бюджетного Научного Учреждения «Научно-Исследовательского Института Фундаментальной и Клинической Иммунологии».

Большую признательность автор выражает научному руководителю профессору, д.м.н. Сергею Витальевичу Сенникову за подробное, конструктивное обсуждение полученных результатов, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии за благожелательное отношение в ходе выполнения работы.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Ежегодно по всему миру регистрируется свыше 945 тыс. случаев заболевания колоректальным раком и примерно 492 тыс. смертельных исходов от этого злокачественного новообразования [189]. Согласно мировым исследованиям заболеваемость колоректальным раком составляет 9,4% от всех случаев рака у мужчин и 10,1% у женщин [35]. Выживаемость у больных колоректальным раком очень зависит от стадии заболевания, на которой оно диагностировано: 90% – 5-летняя выживаемость у онкобольных на стадии локального роста, 70% у пациентов с региональным разрастанием опухоли и до 10 % у пациентов, у которых диагностированы отдаленные метастазы [158]. Вспомогательные способы лечения, включающие в основном химиотерапию и радиотерапию, увеличивают эффект лечения и выживаемость пациентов с развитой формой заболевания [123]. Однако выживают в течение 5 лет только 50% больных с опухолями как толстой, так и прямой кишки [56]. Поэтому остро стоит проблема поиска новых взаимодополняющих методов терапии.

В настоящее время широко развивается иммунотерапия, как перспективное направление в области лечения онкологических заболеваний. По версии журнала Science за 2013 год иммунотерапия онкозаболеваний признана прогрессивным направлением науки [44]. Это направление связано с современными достижениями в иммунологии и молекулярной биологии, которые доказывают тот факт, что клетки колоректального рака имеют иммуногенные свойства [27, 167] и что от состояния иммунитета пациента зависит эффективность борьбы с опухолью и выживаемость [49, 172].

1.1. Механизмы противоопухолевого иммунитета и их нарушения

Как и любое другое онкологическое заболевание, колоректальный рак, появляясь в организме, вызывает ответную реакцию иммунной системы. Эту реакцию называют также противоопухолевым иммунитетом, основой которого служит клеточный иммунитет, ориентированный на элиминацию чужеродных клеток, в данном случае опухолевых. Однако иммунная система не всегда успешно справляется с удалением злокачественных клеток, за счет того, что опухоль способна избегать действия факторов надзора этой системы.

IFN- γ , TNF- α и IL-2 являются ключевыми компонентами клеточного иммунитета и секретируются Th1 CD4 Т-клетками [46]. Напротив, IL-4, IL-5 играют главную роль в гуморальном иммунитете [136] через Th2 CD4 лимфоциты. Активация Th1 клеток и, в свою очередь, активация цитотоксических Т-клеток, натуральных киллеров, макрофагов и моноцитов может привести к подавлению опухоли, тогда как активация Th2 клеток обуславливает противоположный эффект [95]. Помимо этого, антигенная стимуляция ведет к генерации небольшой популяции антиген-специфических Т-клеток памяти, которые остаются в ткани [166]. Большое количество инфильтрующих Т-клеток памяти связывают с ослаблением метастатического потенциала опухолевых клеток [147]. Было показано, что инфильтрация лимфоцитами не только ингибирует рост опухоли [26], но также увеличивает продолжительность жизни пациентов больных колоректальным раком [49, 65, 134]. У больных с более высокой выживаемостью было выявлено большое количество инфильтрующих опухоль CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих гранзим В [120]. Таким образом, иммунная система способна сформировать ответ на перерождающиеся клетки, возникающие в начале заболевания, но при этом она не всегда эффективна в поддержании этого ответа или в предотвращении прогресса

опухоли [39], за счет дефекта в одном или нескольких звеньях клеточного иммунитета.

Изменения в балансе цитокинов были показаны во многих работах [55, 79], и в настоящее время объясняются явлением иммуносупрессии в организме, как одного из обязательных факторов механизма избегания иммунного надзора клетками опухоли. Действительно, у пациентов с опухолями кишечника было обнаружено снижение количества Th1 CD4 клеток и концентрации связанных с ними цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-2), уровни которых коррелируют со стадией заболевания [135], тогда как количество Th2 CD4 клеток и концентрации цитокинов Th2 типа оставались на нормальном или даже повышенном уровне [79, 94, 142, 152], что свидетельствует об ослаблении клеточных иммунных реакций. С прогрессированием заболевания происходят еще более значительные изменения иммунного баланса [79, 94, 101, 142, 152]. Показано, что у пациентов с колоректальным раком соотношение популяций мононуклеарных клеток крови изменяется с течением заболевания. Так, на начальных стадиях болезни повышено процентное содержание CD8⁺ Т-клеток, а поздние стадии характеризуются снижением общего числа лимфоцитов, моноцитов и натуральных киллерных клеток, продукцией IL-4 и IL-6, а также низкими уровнями IFN- γ , TNF- α при сосудистой инвазии [55, 79].

Избегание иммунного надзора организма опухолевыми клетками является результатом слабой иммуногенности или проявлением иммуносупрессивных эффектов опухолевых клеток [14, 122, 191]. Механизм избегания иммунитета опухолевыми клетками колоректального рака имеет много факторов и в общем вовлекает уже упомянутые изменения в Th1/Th2 типах иммунного ответа, отсутствие или снижение процессинга HLA и презентации, дефективную функцию дендритных клеток, отсутствие сигнальных молекул в Т-клетках, избегание рецепторов смерти, экспрессию HLA G, нарушенную активность натуральных киллеров, регуляторных Т-

клеток, повышение экспрессии фактора разрушения комплемента CD55 [56]. В нескольких работах было описано восстановление противоопухолевой иммунной функции после резекции опухоли [79], что подтверждает тот факт, что клетки опухоли оказывают прямой иммуносупрессивный эффект на молекулярном и клеточном уровнях. Иммунная супрессия начинается с развития иммунологической толерантности к опухоли локально и постепенно, а затем прогрессирует и распространяется на весь организм [196]. Важными факторами иммунной супрессии являются медиаторы, которые выделяются непосредственно опухолевыми клетками, такие как циклооксигеназа (COX), гистамин, интерлейкин 10 (IL-10), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий фактор роста бета (TGF-beta).

Циклооксигеназа – это фермент, лимитирующий скорость синтеза эйкозаноидов, таких как простагландины, из арахидоновой кислоты. Повышенная экспрессия индуцибельной формы циклооксигеназы является главным событием генеза колоректального рака, которое встречается в 80% всех колоректальных опухолей [30]. Механизм действия циклооксигеназы заключается в ингибировании апоптоза, повышении васкуляризации опухоли и инвазивности клеток, конверсии прокарциногенов до карциногенов, модуляция воспаления или иммуносупрессии [48]. В присутствии COX-2 продуцируются цитокины Th2 пути, такие как IL-4 и IL-10, которые подавляют провоспалительный статус и ингибируют синтез цитокинов Th1 типа CD4⁺ Th лимфоцитами [171].

Синтез эндогенного гистамина в опухолевых тканях супрессирует локальный противоопухолевый иммунитет и способствует росту опухоли [178]. Гистамин нарушает баланс между Th1 и Th2 клетками, увеличивая секрецию цитокинов Th2 типа (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) [181] и ингибируя продукцию Th1 цитокинов IL-2, IFN- γ , IL-12 [54]. Это ингибирование опосредуется снижением внутриклеточного cAMP, который подавляет образование IL-2 в Т-клетках путем активации протеинкиназы А [19, 93],

кроме того, гистамин стимулирует дифференцировку дендритных клеток в Th2 эффекторные ДК, которые стимулируют Th2 ответ [155]. При колоректальном раке имеет место быть увеличение продукции гистамина и гистидиндекарбоксилазы (фермент, катализирующий декарбоксилирование гистидина до гистамина), которая коррелирует со стадией заболевания [118].

IL-10 – цитокин, ограничивающий воспалительные ответы путем подавления продукции цитокинов Th1 клетками [72], стимуляции продукции IFN- γ дендритными клетками [50], что приводит к резистентности опухолевых клеток к цитотоксическому воздействию [21, 119]. Опухолевые клетки при колоректальном раке способны секретировать IL-10 как самостоятельно, так и опосредованно, через другие клетки [78]. Повышенный уровень IL-10 в сыворотке больных рассматривают как негативный прогностический фактор успешного лечения и общей выживаемости пациентов с колоректальным раком [145].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) секретируется клетками многих опухолей [57], включая колоректальную карциному [100]. VEGF является преобладающим ангиогенным фактором при колоректальном раке у человека [73], который связывают с пролиферацией опухолевых клеток, стадией заболевания [58], метастазированием [97] и плохим прогнозом [73]. VEGF важен не только для опухолевой васкуляризации, но также для индукции иммунной супрессии, поскольку VEGF может ингибировать созревание [64, 146] и функцию ДК [102], что в свою очередь приводит к апоптозу ДК и изменению их иммунофенотипического профиля [47]. VEGF препятствует развитию Т-клеток из ранних гемопоэтических предшественников [143], содержание этого медиатора коррелирует со сниженным уровнем цитокина Th1-типа IL-12 и связано с увеличением продукции незрелых миелоидных клеток [64].

Трансформирующий фактор роста (TGF- β) представляет собой белковый фактор с плеiotропной активностью, который регулирует пролиферацию и дифференцировку клеток, адгезию, апоптоз, ангиогенез,

накопление внеклеточного матрикса и другие клеточные процессы [99]. В общем, TGF- β подавляет рост нормальных эпителиальных клеток кишечника, но может стать стимулятором опухолеобразования [75]. На более поздних стадиях развития заболевания TGF- β активно выделяется опухолевыми клетками или стромальными клетками и способствует клеточному росту, инвазии, метастазированию и снижению противоопухолевого ответа [92].

Основная цель иммуносупрессивного действия TGF- β - это ингибирование пролиферации, дифференцировки и созревания Т-лимфоцитов [84, 92]. Данный цитокин ингибирует опухоль-специфический CD8 иммунный ответ [28, 41] и киллерную способность опухоль-инфильтрующих лимфоцитов [84]. TGF- β также ингибирует экспрессию костимулирующих молекул на ДК [131] и меняет их распределение в организме [85], оказывает угнетающее действие на макрофаги, ингибирует продукцию TNF- α , H₂O₂ и NO, в то же время стимулирует образование IL-10 [92].

Активная и / или латентная экспрессия TGF- β может осуществляться раковыми клетками толстой кишки [71]. У пациентов с колоректальным раком показана более высокая концентрация TGF- β в плазме [137]. Уровни TGF- β коррелируют со стадиями развития опухоли по Дьюку [137] и связаны с опухолевой сосудистой инвазией, вовлечением в процесс лимфатических узлов и отдаленными метастазами [75]. Также важно отметить, что TGF- β подавляет действие иммунотерапии, в том числе действие противоопухолевых вакцин [16].

Таким образом, обобщая приведенные выше данные литературы, можно заключить, что одним из важных механизмов ускользания опухоли от иммунного надзора в организме является ее иммуносупрессивное действие на молекулярном и клеточном уровнях. Это действие обусловлено в том числе факторами, выделяемыми опухолевыми клетками, и вовлекает негативные изменения в функции многих важных клеток иммунной системы,

отвечающих за эффективный противоопухолевый иммунный ответ, в том числе дендритных клеток.

1.2. Роль дендритных клеток в противоопухолевом иммунитете при колоректальном раке

ДК являются профессиональными антиген-презентирующими клетками, которые захватывают антиген, процессируют его и представляют в комплексе с молекулами МНС I или II класса во вторичных лимфоидных органах для «ознакомления» (прайминга) наивных Т-клеток или активации Т-клеток со свойствами натуральных киллеров. ДК – очень важное связующее звено между врожденным и адаптивным иммунитетом, способны активировать первичный и вторичный иммунный ответ, индуцировать развитие иммунологической памяти [37, 60, 195]. В отличие от других антиген-презентирующих клеток, ДК обладают несколькими дополнительными механизмами, позволяющими им представлять антиген в комплексе не только с молекулами МНС II класса, но и МНС I класса, что является ключевым моментом для мощной генерации цитотоксических Т-лимфоцитов, способных инактивировать опухолевые клетки. Это так называемое перекрестное представление (cross-presentation), когда антигены, обычно представляемые молекулами МНС II класса, могут быть представлены также и молекулами I класса [77].

Одновременно с представлением антигена запускается цитокиновый каскад и включается второй активационный сигнал, опосредованный молекулами костимуляции B7 (CD80, CD86), которые экспрессируются в большом количестве на поверхности зрелых ДК. Два сигнала существуют для того, чтобы избежать ответа на свои антигены. В случае злокачественных новообразований именно отсутствие второго сигнала зачастую делает невозможным формирование противоопухолевого ответа клетками иммунной системы.

При колоректальном раке дендритные клетки образуют кластеры с Т-клетками в инвазивном крае стромы колоректального рака, что способствует распространению Т-клеточной активации и генерации опухоль-

специфического иммунитета [177]. Таким образом, инфильтрация опухоли дендритными клетками свидетельствует о наличии противоопухолевого иммунного ответа и коррелирует с хорошим прогнозом [45, 114].

Однако с другой стороны показано, что функциональная активность ДК у онкологических больных значительно снижена [17], и одной из причин данного явления служит неспособность ДК дифференцироваться в зрелые формы. Это может быть обусловлено как иммуносупрессивными факторами, секретируемыми как самой опухолью (IL-10, TGF- β , VEGF) [61, 62, 174], так и вырабатываемыми самим организмом (глюкокортикоиды) [162], в ответ на присутствие опухоли, которая является хроническим стрессорным фактором.

Исследования последних лет установили, что при наличии опухоли в организме на поверхности ДК снижена экспрессия адгезивных и костимулирующих молекул, в частности, экспрессия МНС молекул, особенно I класса. Предполагается, что уменьшение количества ДК и потеря ими ряда функций может быть одной из главных причин отсутствия полноценного иммунного ответа на развивающуюся опухоль. Эти данные находят подтверждение и у больных колоректальным раком, характеризующихся сокращением количества периферических ДК, у которых снижена способность к стимуляции Т-клеток, выявлены низкие уровни ДК-ассоциированных антигенов и ухудшена активация в опухоли [85]. Опухолевые клетки могут препятствовать дифференцировке дендритных клеток [63] со стадии увеличенных незрелых миелоидных клеток-предшественников, которые будучи иммуносупрессивными, ингибируют пролиферацию Т-клеток и опухоль-специфический Т-клеточный ответ [105].

Таким образом, дендритные клетки, являясь профессиональными антигенпрезентирующими клетками, играют важную роль в развитии иммунного ответа при злокачественных новообразованиях, в том числе при колоректальном раке. Однако функциональная активность дендритных клеток у больных онкологическими заболеваниями значительно снижена, что связано с неспособностью ДК к дифференцировке в зрелые формы и общим

снижением их количества в организме. Поэтому несостоятельность дендритных клеток как важного связующего звена между врожденным и адаптивным иммунитетом, может являться главной причиной отсутствия эффективного противоопухолевого иммунитета у онкологических больных.

1.3. Способы доставки различных видов антигенов в дендритные клетки для индукции специфического противоопухолевого иммунного ответа при колоректальном раке, их преимущества и недостатки

В связи с тем, что причиной отсутствия полноценного иммунного ответа на развивающуюся опухоль может быть уменьшение количества дендритных клеток, снижение их функциональной активности в организме, представляется возможным использовать данные клетки с восстановленной или модифицированной функцией, как основу вакцин для иммунотерапии рака. Антиген-презентирующие клетки играют важную роль в индукции антиген-специфического Т-клеточного ответа, поэтому, для того чтобы вызвать этот ответ, нужно доставлять опухолевые антигены с CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточными эпитопами дендритным клеткам. Для осуществления такой задачи существует множество способов, отличающихся по исполнению и эффективности.

В соответствии с механизмом МНС-опосредованной презентации антигена, ранние исследователи пытались непосредственно обрабатывать ДК опухоль-специфическими пептидами. Синтетические МНС I-связывающие пептиды использовались в ДК-вакцинации. Опухоль-ассоциированные антигены (ОАА), которые были получены из МНС I-связывающих белков, включающих меланомные антигены, карциноэмбриональный антиген (СЕА), фолат-связывающий протеин (FBR), простат-специфический мембранный антиген (PMSA), и муцин-1(MUC1), были впервые использованы для модификации ДК [42]. Эта стратегия была проста в исполнении и оказалась успешной в некоторых исследованиях на животных [24] и в клинических испытаниях. Дальнейшим развитием данной стратегии стало использование Тат пептида вируса иммунодефицита человека для доставки СЕА, что сделало ее более эффективной [24]. Однако так как этот способ в основном базируется на специфических МНС I-рестриктированных пептидах, важность

МНС II-рестриктированных Т-хелперных клеток в опосредовании и усилении иммунных ответов выяснена не полностью.

По причине ограничений использования одного пептида ОАА для модификации ДК, исследователи начали разрабатывать вакцины на основе ДК, нагруженных полными опухолевыми лизатами. Поскольку лизаты опухолевых клеток содержат множество значимых антигенов, Т-клеткам презентруется широкий спектр ОАА и это индуцирует выраженный иммунный ответ. При использовании полных опухолевых лизатов в экспериментальных моделях и клинических испытаниях были продемонстрированы высокая эффективность и низкая токсичность при различных видах рака [2, 12, 59, 140, 168]. Позднее было показано, что ДК, нагруженные препаратом апоптотических опухолевых клеток, дают более выраженный эффект в активации Т-клеток [88]. В одной из работ [59] аутологичные дендритные клетки использовались как основа для противоопухолевых вакцин, и индуцировали опухоль-специфический иммунный ответ у пациентов с колоректальным раком. В другом исследовании аутологичные ДК были нагружены лизатом аллогенных опухолевых клеток, содержащих антигены рака семенника, и введены пациентам с развитой формой колоректального рака, что дало среднюю выживаемость 5,3 месяца со стабильным заболеванием у 24% пациентов, или просто безопасную и нетоксичную вакцину [38]. Ограничения метода заключаются в небольшом количестве опухолевых клеток пациента, что делает изготовление вакцины затруднительной. Другая проблема состоит в наличии множества иррелевантных антигенов в препарате опухолевых клеток, которые потенциально могут стать причиной аутоиммунных ответов.

Первые работы по трансфекции РНК в дендритные клетки показали сильный иммунный ответ против опухолевых клеток [20, 32]. Преимуществами такого метода являются специфичность, контроль, отсутствие риска встраивания в хозяйский геном [42]. При трансфекции с РНК ДК могут экспрессировать специфический и тотальный антиген на

своей поверхности и презентировать его Т-клеткам [188]. Дополнительно, использование мРНК может быть многообещающей терапией для пациентов с малым количеством доступных опухолевых клеток, так как мРНК может продуцироваться в достаточном количестве путем транскрипции плазмидных конструкций с целевым антигеном [139]. Недавние исследования показали, что мРНК может использоваться не только как источник антигена, но также как путь для стимуляции ДК продуцировать иммуностимуляторные молекулы [31]. Основные ограничения использования мРНК это сложность в манипуляциях, низкая эффективность трансфекции и короткая продолжительность жизни вследствие быстрой деградации РНК-азами [128].

В последние годы для увеличения противоопухолевой активности ДК применяются методы доставки ДНК, кодирующей ОАА, иммуностимуляторные молекулы, цитокины, хемокины и другие стимулы, а также ОАА в ассоциации с костимуляторными молекулами для усиления ответа. По сравнению с нагрузкой опухолевыми антигенами, генетическая модификация ДК имеет ряд преимуществ: достижение кросс-презентации для индукции сильного иммунного ответа, долгосрочная экспрессия антигена, относительное снижение аутоиммунного ответа, простота приготовления, стабильность в процессе трансдукции. Ограничения применения данного метода связаны с поиском оптимального метода доставки ДНК-конструкции в ДК. Использование вирусных векторов может индуцировать аутоиммунный ответ и мутацию, тогда как невирусная трансфекция имеет низкую эффективность. ДНК-стратегия также имеет проблему устойчивой экспрессии и риска встраивания в геном.

Большинство вакцин, применяемых в терапии колоректального рака, получают путем нагрузки дендритных клеток лизатом опухолевых клеток, путем трансфекции РНК или ДНК ОАА или путем слияния опухолевых и дендритных клеток [6, 157].

При колоректальном раке наиболее широко используемым антигеном для нагрузки ДК является СЕА [127]. Например, активный иммунный ответ

генерировался после того, как ДК были трансфицированы вирусом птичьей оспы, кодирующим СЕА, и введены пациентам с метастазами колоректального рака [126]. СЕА - специфический иммунный ответ также активировался через подобные вакцины, использующие ДК, нагруженные СЕА [108]. Иммунизация дендритными клетками, нагруженными НЛА-рестриктированными эпитопами СЕА приводила к повышению СЕА-специфических Т-клеток у 7 из 10 пациентов. ДК моноцитарного происхождения могут также быть трансфицированы РНК, кодирующей опухолевые антигены, например РНК СЕА для индукции Т-клеточной реактивности [133].

Отдельным пунктом в этом разделе можно обозначить создание ДК-вакцин путем введения пептидов, несущих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов. Данный способ является альтернативой опухолевым препаратам и индивидуальным антигенам. Основой для разработки данного типа вакцин послужили идентификация и молекулярное описание опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) [52]. Эти вакцины составлены из небольших пептидов, презентуемых Т-клеткам в контексте МНС [15]. Использование эпитопных вакцин, как более специфического метода для сенсibilизации Т-клеток к клеткам опухоли, сначала исследовали с помощью иммунизации пептидами. Этот подход позволил сформулировать несколько постулатов: (а) в пределах одного антигена Т-клетка распознает один эпитоп (пептид) связанный МНС рецептором; (b) рецепторы МНС I и II класса связывают короткие пептиды 8–10 и 13–20 аминокислот, соответственно; (с) $CD4^+$ и $CD8^+$ Т клетки активируются МНС I- и II-презентируемыми пептидами, соответственно; (d) ОАА пептиды должны быть представлены на клетках опухоли [124, 150].

Пептиды имеют синтетическое происхождение, биологически безопасны, легче поддаются стандартизации. Наиболее важным пунктом при дизайне таких вакцин является выбор эпитопов, которые вызывают максимальный иммунный ответ в наибольшей части популяции лимфоцитов.

В тоже время, димеризация и агрегация пептидов, низкая растворимость при физиологических рН являются обычными проблемами при дизайне и использовании пептидных вакцин [23]. Трансфекция клеток с помощью плазмидных и вирусных конструкций, несущих нуклеотидные последовательности, которые кодируют полные опухоль-ассоциированные антигены или иммуногенные эпитопы позволяет получать наиболее специфичную стимуляцию, делает процесс более стандартизованным, избавляет от вышеперечисленных проблем пептидных вакцин. Кроме того, плазида, несущая полиэпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, ввиду содержания в ней метилированных CG последовательностей, представляет собой естественный адьювант, который стимулирует врожденный иммунитет.

Важным преимуществом является использование одной ДНК-конструкции, кодирующей множественные эпитопы одного или нескольких ОАА, что позволяет индуцировать широкий спектр цитотоксических Т-лимфоцитов. Так, в одной из работ было показано, что трансфекция ДК универсальной и аллель-специфичной плазмидами, кодирующими иммуногенные эпитопы белка HER2, приводит к повышению цитотоксической активности мононуклеарных клеток против клеточной линии MCF-7 аденокарциномы человека. В то же время трансфекция ДК плазмидой, кодирующей полноразмерный белок HER2, не влияет на цитотоксический эффект [7]. Полиэпитопные ДНК вакцины сегодня признаются наиболее перспективным направлением, как для прямой вакцинации, так и для клеточной терапии, опосредованной дендритными клетками.

Антиген-презентирующий механизм эукариотической клетки подразумевает фрагментацию внутриклеточных белков до коротких пептидов. Такая фрагментация осуществляется протеосомой, состоящей из трех субъединиц: LMP2, LMP7 и LMP10, обладающих разными протеазными и пептидазными специфичностями. Некоторые из полученных пептидов

имеют нужную для связывания с МНС I рецептором длину. Транспорт таких пептидов в эндоплазматический ретикулум осуществляется АТР-зависимым транспортером ТАР [107, 113, 117], который является трансмембранным гетеродимером, состоящим из двух субъединиц - ТАР1 и ТАР2. ТАР белки различных организмов имеют разные предпочтения для структуры транспортируемого пептида, которые в наибольшей степени зависят от гидрофобности и заряда С-конца пептида. Для того, чтобы быть хорошим СТЛ-эпитопом, пептид должен быть правильно процессирован, перенесен в эндоплазматический ретикулум, а также должен иметь существенную аффинность к МНС I молекуле. Используемые в настоящий момент времени компьютерные алгоритмы выбора эпитопов базируются на вышеперечисленных принципах [67, 112, 185].

При дизайне синтетического гена возможно реализовать различные подходы для усиления иммуногенности или увеличения спектра Т-клеточных рецепторов для распознавания опухоли.

Для увеличения иммуногенности применяются следующие две стратегии. Первая направлена на увеличение аффинности связывания пептида с МНС, что ведет к более длительной экспозиции комплекса, увеличивая шанс развития СТЛ-ответа. Другая стратегия подразумевает попытки улучшить процессинг и продукцию эпитопов (пептидов). В настоящий момент времени наиболее исследовано влияние аминокислотных замен в «заякоривающей» пептид позиции, увеличивающее аффинность связывания в кармане рецептора [150]. Боковой остаток аминокислоты в «заякоривающей» пептид позиции скрыт, что дает возможность выбрать наиболее благоприятную аминокислоту, не меняя антигенной специфичности. Другие исследователи применяют введение ароматических аминокислот в позиции Р1, Р4 и Р5, различные модификации аминокислотных остатков [150], впрочем, последнее не актуально для ДНК-вакцин.

Каждый эпитоп требует протеолиза в специфическом сайте выше его

N-конца для эффективной транслокации, лишние аминокислоты могут удаляться аминопептидазами. Таким образом, в отсутствие рационального дизайна конструкции соседние эпитопы могут быть нарушены. Добавление аланиновых спейсеров отчасти позволяет решить эту проблему [29]. Добавление дополнительных последовательностей может также неспецифично повышать иммуногенность. Например, было показано, что 'PADRE' (универсальный CD4⁺ CTL эпитоп, AKFVAAWTLKAAA) способен усиливать CD8⁺ CTL ответы в составе полиэпитопной конструкции [89].

В тоже время, другой проблемой может быть неравный «вес» разных эпитопов при стимуляции Т-клеток. Например, ранее было показано, что иммунизация плазмидной конструкцией, содержащей четыре (HLA)-A2-специфичных эпитопа из белков СЕА, MAGE2 и MAGE3, с универсальным PADRE-эпитопом, индуцирует моноспецифичный ответ только против иммунодоминантного СЕА эпитопа [53]. Таким образом, наличие субдоминантных и доминантных эпитопов также должно учитываться.

Считается, что дальнейшие исследования перспективно сфокусировать на развитии стратегий увеличения экспрессии эпитопов, улучшения формирования комплекса эпитопов с МНС, выборе оптимальной комбинации для полиэпитопной конструкции. Лучшее понимание пути процессинга полиэпитопных белков (протеасома/ТАР/ER) позволит проводить более эффективный дизайн синтетических генов для вакцинации [182].

Таким образом, для создания эффективного противоопухолевого иммунного ответа, перспективно использовать аутологичные дендритные клетки, активированные опухолевыми антигенами или с помощью трансфекции полиэпитопными ДНК-конструкциями, содержащими антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов для стимуляции специфических Т хелперов 1 типа и цитотоксических лимфоцитов.

1.4. Опухоль-ассоциированные антигены колоректального рака

Чтобы иммунотерапия на основе дендритных клеток была эффективна в борьбе против конкретного онкологического заболевания, нужно подобрать такие опухолевые антигены, которые были бы наиболее характерны для данного заболевания. Опухолевые клетки вырабатывают большое количество молекул-антигенов, которые также называют опухоль-ассоциированными. Описаны по крайней мере 10 опухоль-ассоциированных антигенов и более чем 35 антигенных эпитопов МНС I класса для колоректального рака [157]. Среди них можно выделить три опухоль-ассоциированных антигена, которые потенциально можно использовать в создании полиэпитопных конструкций для стимуляции цитотоксического ответа: эпителиальная молекула клеточной адгезии, муцин 4, карциноэмбриональный антиген.

Молекула адгезии эпителиальных клеток (EрСАМ) изначально была обнаружена как доминантный антиген на опухолях толстой кишки [80], и в настоящее время считается мишенью для терапевтических антител. ЕрСАМ является трансмембранным гликопротеином I типа, состоящим из 314 аминокислот, образующих экто-, трансмембранный и цитоплазматический домены), при этом 26 аминокислотных остатков (цитоплазматический домен) находятся в цитоплазме [25]. ЕрСАМ обладает онкогенным потенциалом и активируется путем высвобождения своего внутриклеточного домена, который может передавать сигнал в ядро клетки, взаимодействуя с элементами Wnt сигнального пути [132].

У человека ЕрСАМ на низком уровне экспрессируется на клетках здорового эпителия, за исключением клеток чешуйчатого эпителия, и на клетках злокачественных опухолей [192]. Экспрессия данной молекулы часто коррелирует с более агрессивным поведением опухоли. Гиперэкспрессия ЕрСАМ наблюдается во многих опухолях человека (в зависимости от гистологического субтипа опухоли) [190], например в опухолях желудочно-кишечного и мочеполового тракта [175]. Большинство метастазов являются

ErCAM-положительными [175]. Специфичность белка ErCAM позволяет потенциально использовать его в качестве диагностического и прогностического маркера для многих типов карцином. Наблюдения, касающиеся гиперэкспрессии антигена на карциномах и его корреляции со сниженной выживаемостью, дали основание считать антиген ErCAM перспективной лекарственной мишенью для лечения рака. Сегодня эта молекула исследована и апробирована в качестве мишени для терапии на основе моноклональных антител, в частности, применяемый в медицинской практике трифункциональный биспецифичный препарат “Catumaxomab” обладает специфическим связыванием молекул ErCAM [169].

Значительная роль ErCAM в клеточной пролиферации, миграции и, возможно, инициации рака расширяет интерес для ее использования в качестве мишени не только для моноклональных антител, но и для эпигенетического сайленсинга. Для ряда различных типов опухолей, модуляция экспрессии данной молекулы адгезии является способом воздействия на онкогенный потенциал этих опухолевых клеток [175]. Недавно ErCAM был идентифицирован как дополнительный маркер для опухоль-иницирующих стволовых клеток при раке молочной железы, прямой и толстой кишки (колоректальный рак) и поджелудочной железы [116, 190], что делает его еще более привлекательной мишенью для онкотерапии. Раковые стволовые клетки, экспрессирующие ErCAM, являются более туморогенными, чем ErCAM-“отрицательные” стволовые клетки [68]. Поскольку раковые стволовые клетки обладают резистентностью к радиации и лекарственным препаратам, использование ErCAM в качестве лекарственной мишени может быть перспективным подходом для остановки опухолевой инициации и прогрессии.

Муцины – высокомолекулярные O-гликозилированные гликопротеины, которые можно разделить на три большие категории: гелеобразующий секретлируемый тип, который обеспечивает гелеобразующие свойства слизи, защищающей эпителиальные поверхности во внутренних трактах органов;

секретируемый негелеобразующий тип, и трансмембранные муцины [82, 160]. Гены муцинов высокополиморфны благодаря наличию в них разного числа протяженных tandemных повторов (VNTRs) [115]. Один из таких представителей – муцин 4 (Mucin 4, MUC4), ген которого имеет 208 tandemных повторяющихся единиц размером 48 п.н. Он является трансмембранным муцином, который функционирует как модулятор опухолевых клеток, влияющий на их фенотип, что делает данный белок онкомаркером и потенциальной мишенью для иммунотерапии [173]. MUC4 имеет муцин-подобную субъединицу Muc4 α , которая содержит гликозилированные tandemные повторы, и субъединицу Muc4 β , которая состоит из трех эпидермального фактора роста (EGF)-подобных доменов и короткого цитоплазматического хвоста [173].

MUC4 экспрессируется в норме в трахее, желудке, яичниках, слюнных железах, толстом кишечнике, легких, матке и простате. Экспрессия генов муцина относительно органоспецифична и дисрегуляция экспрессии генов муцина может происходить при злокачественных образованиях [91, 194]. Было показано, что повышенная экспрессия этого фактора является предиктором слабой выживаемости при колоректальных аденокарциномах, особенно для пациентов с опухолями на ранней стадии [170].

MUC4 вовлечен в индукцию ультраструктурных изменений при малигнизации нормального эпителия [125], причастен к снижению доступности поверхностного антигена опухолевых клеток для цитотоксических иммунных клеток, способствуя, таким образом, избеганию иммунного ответа [179]. Кроме того, гиперэкспрессия этой молекулы наделяет опухолевые клетки резистентностью к апоптозу [98]. Данные факты свидетельствуют о том, что MUC4 играет важную роль в развитии и прогрессии опухолей.

Карциноэмбриональный антиген (CEA) – гликопротеин размером 180 кДа, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Этот белок часто экспрессируется на высоком уровне в опухолевых клетках при

колоректальном раке, желудочно-кишечных и некоторых других эпителиальных опухолях, и на очень низком уровне в некоторых нормальных тканях взрослого организма – в здоровой эпителиальной ткани кишечника и желчного пузыря, в эпителиальных клетках медуллярной области тимуса [69, 70, 76]. Так же он экспрессируется в ходе развития плода [43]. СЕА относят к опухоль-ассоциированным антигенам и, таким образом, он является привлекательным объектом для клеточной иммунотерапии. Как дифференциально экспрессирующийся белок, СЕА был выбран в качестве потенциальной мишени для иммунотерапевтических подходов [148]. Таким образом, развитие Т-клеточной реактивности по отношению к этому белку подлежит обычным механизмам иммунологической толерантности [43].

Опухоль-ассоциированный СЕА отличается от нормального СЕА тем, что он аберрантно гликозилирован, утрачивает свою апикальную локализацию, а также активно освобождается фосфолипазами, в результате чего циркулирует в сыворотке на высоком уровне у пациентов, больных раком [96]. Повышенный уровень СЕА ассоциирован с увеличенным объемом опухоли и неблагоприятным прогнозом у больных колоректальным раком [106, 111, 156]. Было также показано, что ранняя интратректальная иммунизация рекомбинантным вирусом оспы, экспрессирующим СЕА, снижает вероятность образования аденом, предотвращает прогрессию инвазивного колоректального рака и вызывает местный и системный СЕА-специфический гуморальный и клеточный иммунитет [96]. Ввиду всего перечисленного, данные антигены перспективно использовать для создания полиэпитопных конструкций.

Обобщая приведенные выше данные литературы, можно заключить, что низкая выживаемость среди больных колоректальным раком остается важной проблемой здравоохранения, и методы терапии данного заболевания нуждаются в дальнейшем развитии и модернизации. 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, которых считают наиболее мощными стимуляторами иммунных реакций организма. Однако функциональная активность ДК у онкологических больных значительно снижена. Основной причиной данного явления считают нарушения в процессе созревания ДК до функционально-активных форм. В связи с этим получение функционально-активных ДК *in vitro* и активация их опухоль-специфичными антигенами для активации цитотоксического ответа являются перспективными при разработке противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток и позволяют мобилизовать защитные системы организма больного, используя естественные пути распознавания опухолевых антигенов и их последующую элиминацию. В частности, трансфекция ДК с помощью плазмидных или вирусных конструкций, несущих нуклеотидные последовательности, которые кодируют полные опухоль-ассоциированные антигены либо селективные иммуногенные эпитопы дает возможность обеспечить наиболее специфичную иммуностимуляцию и стандартизирует непосредственно сам процесс. В связи с этим, исследование по изучению эффективности стимуляции 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.

2. 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 ГKB №11 (г. Новосибирск), и на базе ГБУЗ НСО ГKB №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 ($\rho=1,077$) [36]. Для этого кровь разводили в 2 раза в среде RPMI-1640, 35 мл разведенной крови наслаивали на 15 мл

фиколл-урографина и центрифугировали 40 минут при 1500 об/мин. Клетки интерфейсного кольца собирали, дважды отмывали в среде RPMI-1640 и инкубировали 2 ч в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37⁰С, чтобы выделить клетки с повышенной адгезивной способностью. Среду с неприлипшими клетками удаляли, осаждали путем центрифугирования и культивировали в культуральном флаконе 75 см² (Greiner bio-one, Германия) для дальнейшего использования в концентрации 2млн/мл в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS (Hyclone, Австрия), 2 mM L-глутамина (ООО «Биолот», Санкт-Петербург), 10 mM буфера HEPES (Sigma, США), 5*10⁻⁴ M 2-меркаптоэтанола (Sigma, США), 40 мкг/мл гентамицина (KRKA, Словения), 200 ед/мл бензилпенициллина (ОАО «Биосинтез», Пенза), до проведения процедуры ссаживания. Поверхность культурального флакона ополаскивали средой 2 раза и собирали прилипшие клетки с помощью скребка для клеточных культур (BD, США). Прилипшую фракцию культивировали в 48-луночной планшете (Greiner bio-one, Германия) в концентрации 1 млн/мл, в объеме 0,5 мл полной среды RPMI-1640. К прилипшей фракции МНК добавлялись 50 нг/мл rhGM-CSF, 100 нг/мл rhIL-4 (Peprotech, США) на срок 48ч для получения незрелых ДК. Далее, 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 2000с (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 (рисунок 1).

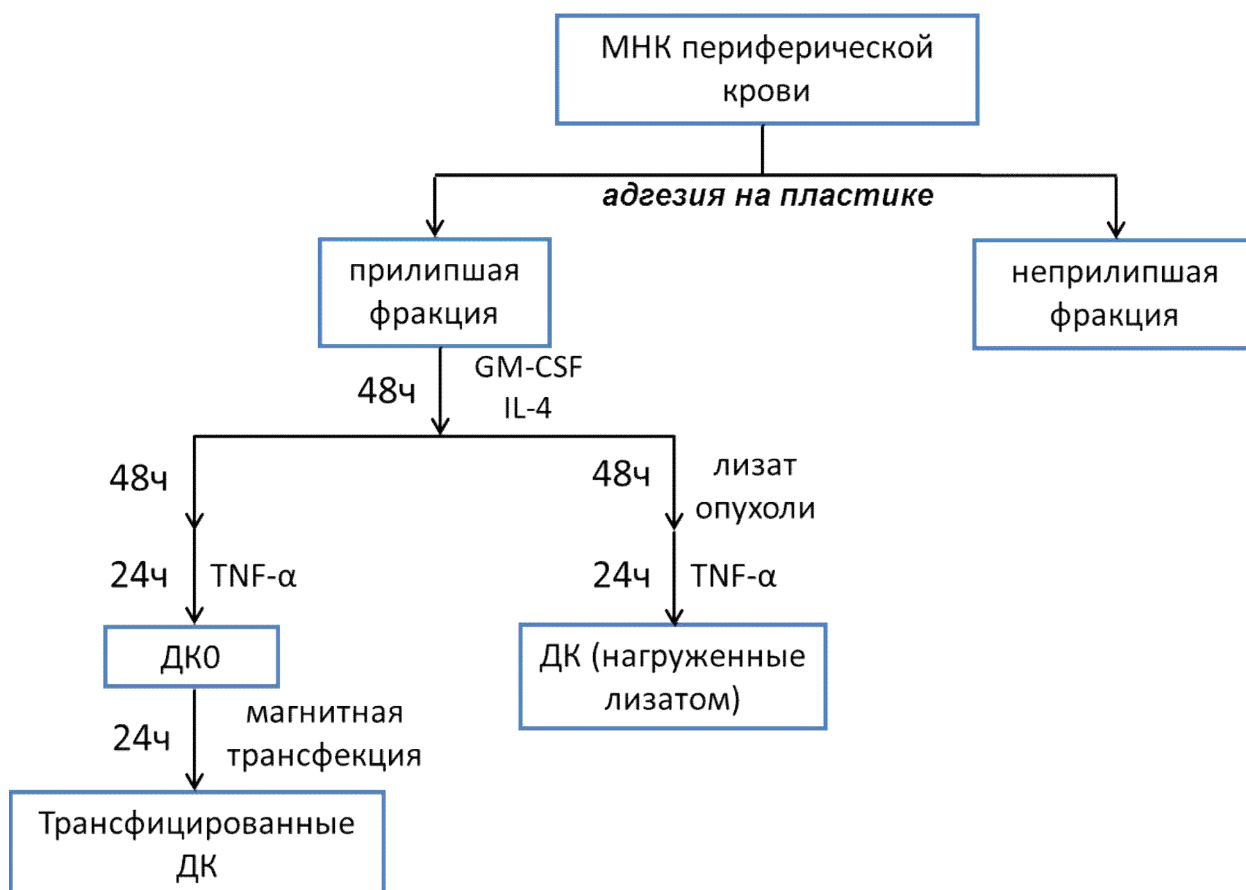


Рис. 1. Получение зрелых дендритных клеток, нагруженных лизатом опухолевых клеток или трансфицированных полиэпитопными конструкциями из мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком. Примечание: МНК – мононуклеарные клетки, ДКО – зрелые дендритные клетки, ДК – зрелые дендритные клетки, нагруженные лизатом аутологичных опухолевых клеток или трансфицированные полиэпитопными ДНК-конструкциями.

Получение аутологичных опухолевых клеток

Опухолевые клетки получали методом холодной трипсинизации образца опухоли, полученного от больного при оперативном вмешательстве. Образец опухоли разрезали на более мелкие фрагменты в среде RPMI-1640, содержащей 80 мкг/мл гентамицина, 400 ед/мл бензилпенициллина, 5 мкг/мл амфотерицина В (ООО «ПанЭко», Москва), их помещали в трипсин (ООО

«Биолот», Санкт-Петербург), измельчали ножницами в нем и оставляли на ночь при +4°C. Затем добавляли питательную среду RPMI-1640, содержащую 10% телячьей эмбриональной сыворотки, для ингибирования трипсина, хорошо перемешивали, суспензию без кусочков осаждали (1000 об/мин, 10 минут), оценивали количество полученных клеток в камере Горяева. 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

Для доставки плазмидной ДНК в дендритные клетки был выбран метод магнитной трансфекции. Принцип такой трансфекции заключается в том, что плазмидная ДНК, олигонуклеотиды или малые интерферирующие РНК на первом этапе связываются с магнитными частицами, образуя комплекс благодаря ионному взаимодействию между отрицательно заряженной молекулой нуклеиновой кислоты и положительно заряженной поверхностью магнитной частицы. За счет использования магнитных сил все количество нуклеиновой кислоты быстро доставляется к поверхности клеток-мишеней, что приводит к эффективной трансфекции. Путем клеточного захвата (фагоцитоза или пиноцитоза) ДНК попадает в цитоплазму. Магнитные частицы аккумулируются в эндосомах и/или вакуолях, через некоторое время они деградируются, и железо поступает в нормальный клеточный метаболизм. Для этого процесса клетки должны быть адгезированы к нижней поверхности культурального пластика.

Зрелые дендритные клетки, к которым не добавлялся лизат опухолевых клеток, в объеме 0,5 мл в 48-луночной планшете подвергались процедуре трансфекции. Для трансфекции были использованы плазмиды рСI-нео, рСI-

UB, pCI-Sec (контрольные), pCI-UB-POLYEP1, pCI-Sec-POLYEP1 (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. Плазмиды растворяли в питательной среде DMEM (ГНЦ ВБ «Вектор») в отдельных пробирках, добавляли MATra-A реагент в соотношении 0,3мкг плазмиды на 0,3мкл реагента, инкубировали 20 минут при комнатной температуре. За это время меняли среду в лунках с дендритными клетками: убирали среду RPMI-1640, и добавляли 250мкл среды DMEM. Далее добавляли комплекс плазида-MATra-A в лунки к клеткам в объеме 25мкл на лунку, помещали планшет на магнитную плату на 15 минут. Затем меняли среду в лунках после трансфекции: убирали среду DMEM, и добавляли 300 мкл полной среды RPMI-1640. Трансфицированные клетки инкубировали в течение суток в атмосфере 5% CO₂ при 37⁰С (рисунок 1).

Оценка эффективности трансфекции проводилась с помощью набора для ник-трансляции Promo-Fluor-500 Nick Translation Labeling Kit (Promokine, Германия) на стадии зрелых дендритных клеток. На одну реакционную смесь согласно протоколу производителя требовалось: 10 мкл буфера, 10 мкл микса (0,5 мМ dATP, 0,5 мМ dCTP, 0,5 мМ dGTP, 0,25 мМ dTTP, 0,25 мМ PF-500-dUTP, меченных флуорохромом Atto488 (максимум возбуждения 501 nm, максимум эмиссии 523 nm), pH 7.5), 15,3 мкл плазмидной ДНК (7,5 мкг), 10 мкл энзим микса (2 ед/мкл полимеразы I, 0,02 ед/мкл ДНК-азы I в буфере хранения). Полученную смесь доводили до 100 мкл бидистиллированной водой и помещали в термостат при 15⁰С на 90 минут. Полученные зонды замораживали при -20⁰С, часть смеси подвергалась электрофоретическому разделению в 1,5% агарозном геле с этидий бромидом с целью обнаружения целевого продукта ожидаемого размера. Затем зонды размораживали и добавляли 25 мкл стоп-буфера. После процедуры ник-трансляции полученные зонды подвергались стандартной очистке [9]. Для очистки к

смеси добавляли линейный полиакриламидный гель, раствор 3 М ацетата натрия, 96% раствор этанола и оставляли на ночь при -20°C. Затем смесь центрифугировали 20 минут на 12000 об/мин для осаждения ДНК. Полученный осадок промывали 4 раза 80% раствором этанола, сушили, растворяли в TE буфере, содержащем 1% Tris-HCl (pH=8) и измеряли концентрацию ДНК на приборе Nanodrop 2000с. Зонды хранили при +4°C. Гибридизация трансфицированных клеток проводилась по методу Flow-Fish, описанному в статье [163]. Клетки собирали, осаждали, добавляли 100 мкл гибридирующего раствора, содержащего 70% формамида, 1% БСА, 10мМ Tris HCl (pH=8), и зонды в общей концентрации 3мкг/мл. Далее клетки выдерживали 10 минут в термостате при 80°C и 3 часа при комнатной температуре при постоянном перемешивании на шейкере Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., США) на минимальной скорости. После этого клетки дважды отмывали путем центрифугирования в 70%-ном растворе формамида (2100 об/мин, 12 минут), и однократно PBS с 0,1 % БСА и 0,1 % Tween 20. Оценку процента клеток, содержащих плазмиду, проводили на проточном цитометре 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. Клетки в количестве $0,3 \cdot 10^6$ инкубировали с антителами в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте, затем отмывали PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1) и фиксировали в растворе 1 с 0,1 % параформальдегида.

Оценка функциональной активности дендритных клеток

Эндоцитозная способность полученных дендритных клеток оценивалась по захвату FITC-Dextran (Sigma). К $0,1 \cdot 10^6$ исследуемых клеток в 100 мкл среды добавляли по 5 мкл раствора FITC-dextran (0,5 мг/мл) и инкубировали в течение 1 часа, одна пробирка при $+37^{\circ}\text{C}$, другая, помещённая в емкость со льдом, при $+4^{\circ}\text{C}$. После инкубации во все пробирки с клетками добавлялось по 100 мкл раствора трипанового синего (0,5 мг/мл) для подавления поверхностной неспецифической флюоресценции, после этого проводилась инкубация в течение 5 минут при $+4^{\circ}\text{C}$ и клетки дважды отмывались путем центрифугирования в PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия [140]. 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-нео, pCI-UB, pCI-Sec, pCI-UB-POLYEP1, pCI-Sec-POLYEP1, 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) (рисунок 2).

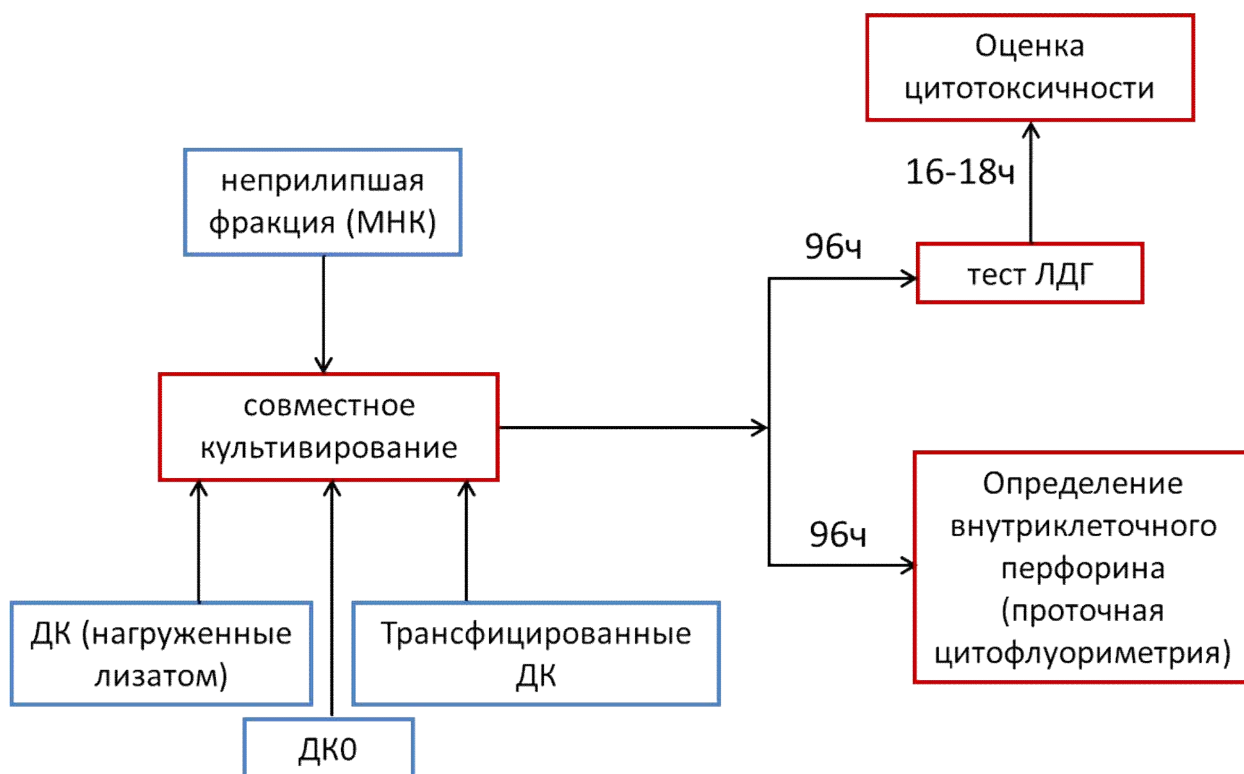


Рис. 2. Проведение совместного культивирования зрелых дендритных клеток, генерированных из прилипшей фракции мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком, и неприлипшей фракции мононуклеарных клеток, и определение эффективности индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro*. Примечание: МНК – мононуклеарные клетки, ДКО – зрелые дендритные клетки, ДК – зрелые дендритные клетки, нагруженные лизатом аутологичных опухолевых клеток или трансфицированные полиэпитопными ДНК-конструкциями.

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 лунки круглодонного планшета (TPP, Швейцария) 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 (рисунок 2). Схема рассадки клеток предложена фирмой-производителем используемого набора «CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay». За 45 минут до окончания культивирования в контрольные лунки для определения максимального лизиса опухолевых клеток вносили 10 мкл лизирующего раствора. После окончания культивирования клетки в планшете осаждались путем центрифугирования (1000 об/мин, 6 минут) и 50 мкл кондиционной среды переносили в лунки плоскодонного планшета для иммуноферментных реакций (ОАО «Медполимер», Санкт-Петербург) для проведения реакции с субстратом лактатдегидрогеназы (50 мкл восстановленного субстрата MIX) в темноте при комнатной температуре в течение 30 минут. Для остановки ферментативной реакции вносили по 50 мкл стоп-раствора и незамедлительно измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Anthos 2020 (Biochrom, Великобритания) в одноволновом режиме при длине волны 490 нм. Цитотоксический эффект рассчитывался по формуле, предложенной фирмой-производителем используемого набора, и выражался в процентах: % цитотоксичности =
$$\frac{((\text{ОП}(\text{экспериментальный лизис}) - \text{ОП}(\text{спонтанный лизис клеток-эффекторов}) - \text{ОП}(\text{спонтанный лизис опухолевых клеток})) / (\text{ОП}(\text{максимальный лизис опухолевых клеток}) - \text{ОП}(\text{спонтанный лизис опухолевых клеток}))) * 100\%.$$

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 (рисунок 2). Анализируемые клетки однократно отмывали PBS, содержащим 0,02% ЭДТА и 1% азида натрия (раствор 1), после чего инкубировали в темноте с моноклональными антителами anti-CD8-APC-H7 (BD Pharmingen, США) в течение 20 минут, после чего отмывали в растворе 1, фиксировали в растворе 1 с 0,1 % параформальдегида. Далее клетки центрифугировали, осадок ресуспендировали в 0,5 мл раствора 1, содержащего 0,2% Tween 20 и инкубировали для проведения пермеабелизации в течение 20 минут. Затем клетки отмывали и инкубировали в темноте с мечеными флуорохромом FITC антителами к внутриклеточному белку перфоруину (BD Pharmingen, США) в течение 20 минут, после чего снова отмывали в растворе 1. Количество перфорин-позитивных клеток определяли на проточном цитометре FACS Aria (BD, США) в лимфоцитарном регионе.

Статистическая обработка данных

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 диапазона значений (25% и 75%). В пояснениях к иллюстрациям количество лиц в группе обозначено n.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. 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 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. CD86 является костимуляторной молекулой, в результате экспрессии которой дендритные клетки приобретают способность наиболее эффективно стимулировать Т-клетки. CD83 – иммуноглобулиноподобная молекула – специфический маркер терминальной дифференцировки дендритных клеток с неустановленной функцией. Показано, что увеличение экспрессии CD83 происходит при культивировании ДК *in vitro* [104]. Селективная экспрессия и увеличение уровня экспрессии наряду с костимуляторными молекулами, такими как CD80 и CD86, предполагают важную роль CD83 в иммунном ответе.

Для созревания полученных незрелых дендритных клеток мы культивировали незрелые ДК в течение 24 часов в присутствии TNF- α в дозе 25 нг/мл. Добавление TNF- α приводит к индукции провоспалительных цитокинов [40], стимулирующих созревание дендритных клеток, а также индуцирует экспрессию костимуляторных, адгезивных и антигенпрезентирующих молекул на поверхности ДК и изменяет их способность к миграции [165]. На рисунке 3 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. Кроме того, 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. То есть, магнитная трансфекция в нашем протоколе получения дендритных клеток не оказывает влияния на их дифференцировку и созревание.

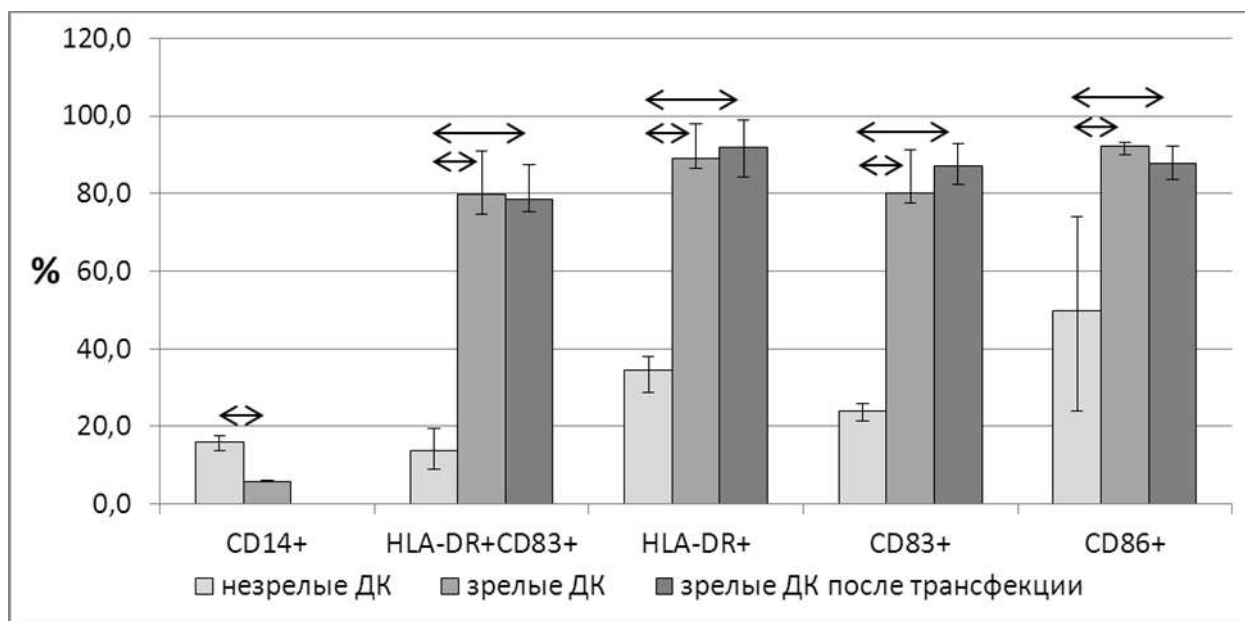


Рис. 3. Уровень экспрессии поверхностных маркеров на дендритных клетках больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=6. Стрелками указаны достоверные различия между группами ($p < 0,05$) (критерий Уилкоксона).

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°C и при +37°C. При +4°C происходит только неспецифическое связывание декстрана с поверхностными рецепторами, тогда как при +37°C связанный декстран проникает в клетку за счет эндоцитоза. Степень захвата FITC-декстрана дендритными клетками определялась по формуле:

$$\text{deltaMFI} = \text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}} - \text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}},$$

где $\text{MFI}_{37^{\circ}\text{C}}$ – интенсивность флюоресценции меченых клеток при +37°C, а $\text{MFI}_{4^{\circ}\text{C}}$ – интенсивность флюоресценции меченых клеток при +4°C.

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 4).

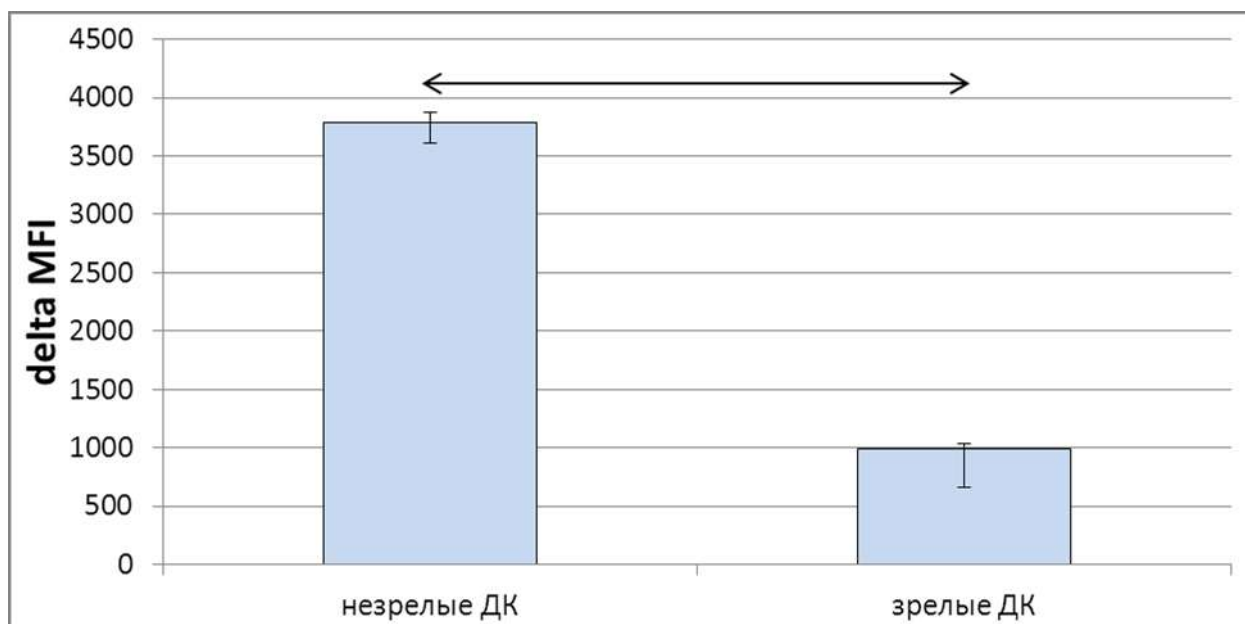


Рис. 4. Эндоцитозная активность дендритных клеток больных колоректальным раком в зависимости от степени зрелости. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=6. Стрелками

указаны достоверные различия между группами ($p < 0,05$) (критерий Уилкоксона).

Таким образом, незрелые дендритные клетки больных колоректальным раком, полученные при 96 часах дифференцировки моноцитов периферической крови, обладают высокой способностью к эндоцитозу на ранних этапах созревания. Через 24 часа созревания незрелые ДК приобретают фенотип зрелых дендритных клеток: увеличивается экспрессия маркеров CD83, CD86, HLA-DR, в то же время снижается их способность к эндоцитозу. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности генерации ДК из клеток-предшественников периферической крови пациентов при данной патологии в условиях культивирования *in vitro*.

3.2. Характеристика плазмидных конструкций, несущих последовательности эпитопов опухоль-ассоциированных антигенов

В работе были использованы плазмидные конструкции pCI-UB-POLYEP1 и pCI-Sec-POLYEP1. Разработка и синтез плазмидных конструкций были проведены совместно с группой фармакогеномики ИХБФМ СО РАН (руководитель Филипенко М.Л.). Плазмидные конструкции представляют собой плазмиды pCI-UB и pCI-Sec, в которые встроены последовательности, кодирующие эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов CEA, EpCAM, MUC4, а также несколько дополнительных последовательностей. К ним относятся: вспомогательный Т-клеточный эпитоп из дифтерийно-столбнячного анатоксина TT (QYIKANSKFIGITEL, 830–844 аминокислоты tetanustoxoid), ARY N-терминальные аминокислоты, AAY спейсерные последовательности, CTL-пептид из овальбумина. Т-клеточный эпитоп из дифтерийно-столбнячного анатоксина неспецифично усиливает цитотоксический ответ. ARY N-терминальные аминокислоты, фланкирующие каждый эпитоп, значительно увеличивают аффинность к TAP транспортеру, что стимулирует более выраженный CD8 цитотоксический

ответ. ААУ спейсерные последовательности включены для разделения эпитопов и служат мишенью для расщепления в протеасоме, что способствует эффективной транслокации эпитопа [83]. СТЛ-пептид из овалбумина (SIINFEKL) был введен для осуществления контроля иммунизации.

Продуктом наработки плазмидной конструкции является полиэпитопный белок. Для конструирования полиэпитопного белка проводили анализ аминокислотных последовательностей антигенов, ассоциированных с колоректальным раком (CEA, EpCAM, MUC4) (таблица 3), использовали компьютерное предсказание и анализ существующих экспериментальных данных. Для предсказания МНС I эпитопов использовали программы SYFPEITHI, ProPred1, NetMHC-3.0, для предсказания МНС II эпитопов - программу EpiTOP. Далее были отобраны эпитопы, имеющие максимальный рейтинг для аллелей HLA-A*02 в случае МНС I эпитопов и для аллелей DRB1-01, 04, 07, 13, 15 в случае МНС II, а также имеющие свидетельства экспериментальной валидации в литературе (если таковые имелись). При этом приоритет отдавался экспериментальным данным. Эпитопы, вошедшие в плазмидную конструкцию, приведены в таблице 2.

Структура и аминокислотная последовательность разработанного нами полиэпитопного белка приведена на рисунках 5 и 6, соответственно.

Рис. 5. Схематичная структура полиэпитопного белка.

MUC4-1 – EpCAM-1 –EpCAM-2-EpCAM-3 – CEA-1 –CEA-2 –CEA-3 - MUC1 – TT - OVA - MUC4-2 - EpCAM-4 - CEA-4

Рис. 6. Аминокислотная последовательность полиэпитопного белка. Жирным шрифтом обозначены опухоль-ассоциированные эпитопы. Подчеркиванием выделены вспомогательные мотивы для процессинга.

DYKDDDDK-**LLGVGTFVV**-ADRIW-**GLKAGVIAV**-AAAYARY-**VLAFLGLLA**-ADRIW-**YQLDPKFITSI**-
AAAYARY-**IMIGVLVGV**-ADRIW-**YLSGADLNL**-AAAYARY-**CGIQNSVSA**-AAAYARY-**LLLLTVLTV**-ADRIW-
 QYIKANSKFIGITEL-ANIY-SIINFEKL-ARY-**SASFDGWATVSVIAL**-ARY-**SERVRTYWIIIEKHKARE**-ARY-
IQNDTGFYTLHVIKSDLVNEE

Таблица 2. Описание эпитопов, вошедших в полиэпитопный белок.

| | Белок | Эпитоп | Экспериментальная валидация |
|----------------|---------|---------------------------|-----------------------------|
| МНС I эпитопы | | | |
| 1 | MUC4-1 | LLGVGTFVV | [66] |
| 2 | EpCAM-1 | GLKAGVIAV | [130]; [149] |
| 3 | EpCAM-2 | VLAFLGLLA | [130] |
| 4 | EpCAM-3 | YQLDPKFITSI | [130] |
| 5 | CEA-1 | IMIGVLVGV | [149] |
| 6 | CEA-2 | YLSGADLNL | [86]; [109]; [149] |
| 7 | CEA-3 | CGIQNSVSA | [34]; [154] |
| 8 | MUC1 | LLLLTVLTV | [74] |
| МНС II эпитопы | | | |
| 9 | MUC4-2 | SASFDGWATVSVI AL | Нет |
| 10 | EpCAM-4 | SERVRTYWIIIEK HKARE | Нет |
| 11 | CEA-4 | IQNDTGFYTLHVI KSDLVNEE | Нет |

Плазмидные конструкции pCI-UB и pCI-Sec различаются по типу процессинга белка и презентации пептидов. Это было достигнуто путем

добавления специализированных сигнальных последовательностей белков. Исходя из известных механизмов процессинга антигенов, можно было предположить, что направление белков в протеасому или эндоплазматический ретикулум будет способствовать их большей доступности для представления по МНС I пути и, следовательно, усилению клеточного ответа. Плазида pCI-UB предназначена для получения химер полиэпитопного белка, содержащих ковалентно связанный убиквитин (Ub), направляющий белок в протеасому, в сочетании с N -дестабилизирующим аминокислотным остатком аргинина [87, 159]. Плазида pCI-Sec содержит сигнальную последовательность легкой каппа-цепи иммуноглобулинов (secretory lider), которая направляет белок в эндоплазматический ретикулум. Плазмидные конструкции pCI-Sec-POLYEP1 и pCI-UB-POLYEP1 были получены путем переноса синтезированного фрагмента ДНК, кодирующего полиэпитопный белок, в плазмиды pCI-UB и pCI-Sec по сайтам EcoRI и XbaI (рисунки 7 и 8). Таким образом, плазмидная конструкция pCI-UB-POLYEP1 привлекает в своем механизме процессинга и презентации в первую очередь убиквитин-протеасомную систему деградации белков [10], а конструкция pCI-Sec-POLYEP1 эффективную доставку в эндоплазматический ретикулум.

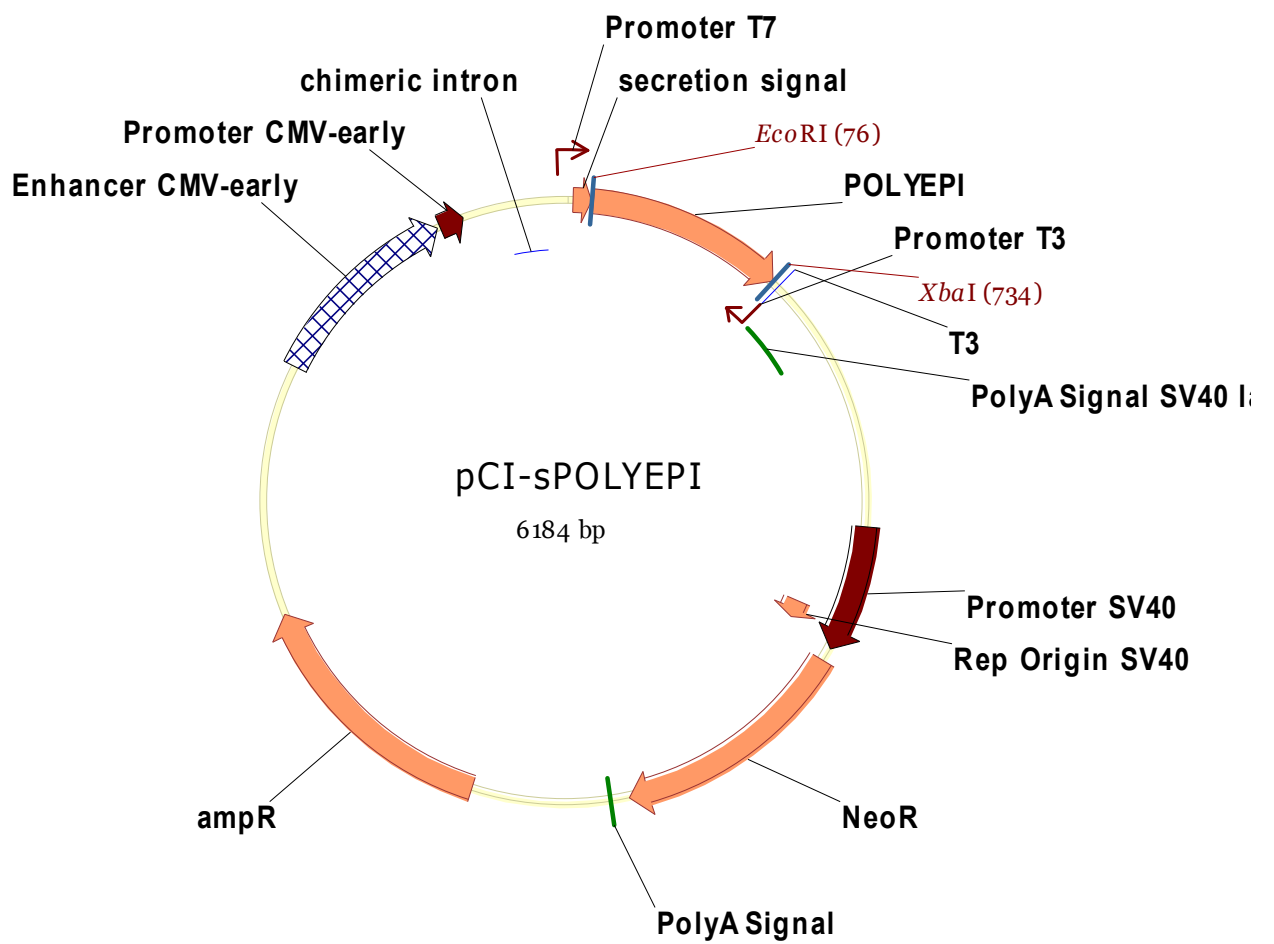


Рис. 7. Схематическое представление плазмиды pCI-Sec-POLYEPI

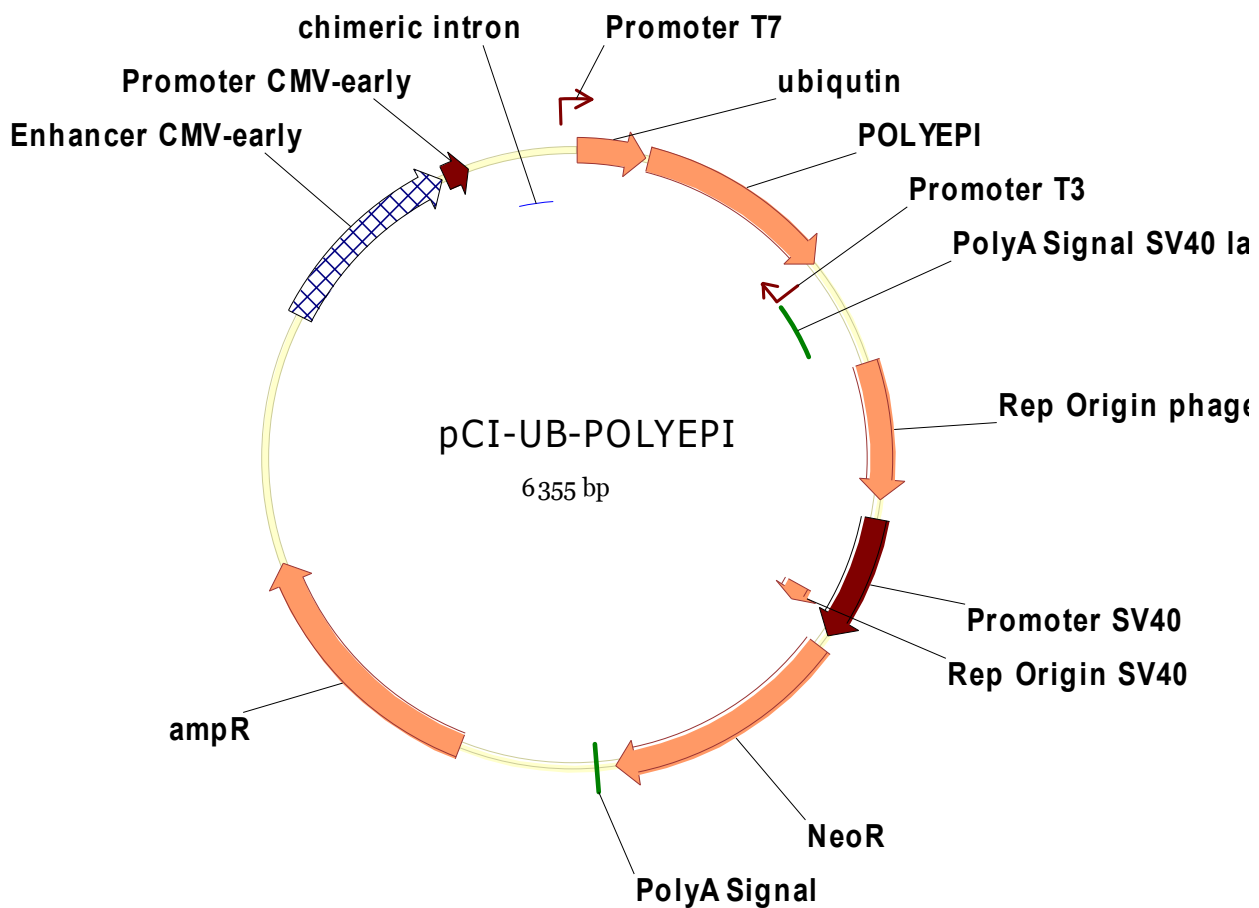


Рис. 8. Схематическое представление плазмиды pCI-UB-POLYEPI

Таблица 3. Аминокислотные последовательности опухоль-ассоциированных антигенов CEA, EpCAM, MUC4.

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5 (Carcinoembryonic antigen, CEA, Meconium antigen 100, CD66e), 651 aa

Ltiestpfvnaegkevlllvhnlpqhlfgyswykgervdgnrqiigyvigttqatpgpaysgreiiypnaslliqnii
qndtgfytlhviksdlnveeatgqfrvypelpkpsissnnskpvedkdavaftcepetqdatylwwvnnqslpvs
prlqlsngnrlltlnvtrndtasykcetqnpvsarrsdsvilnvlygpdaptisplntsyrgenlnlschaasnpaqa
yswfvngtfqqstqelfipnitvnnsqsytcqahnsdtglnrtvtitvyaepkpfitsnnsnpvededavaltcep
eiqnttylwwvnnqslpvsprlqlsndnrlltlnsvtrndvgyecgiqnklsvdhsdpvilnvlygpddptispsyt
yyrpgvnlschaasnpaqaqyswldgniqqhtqelfisniteknsglytcqannsaghstrttvktitvsaelpkps
issnnskpvedkdavaftcepeaqnttylwwvngqslpvsprlqlsngnrlltlnvtrndarayvcgiqnsvsanr
sdpvtldvlygpdtpiisppdssylsganlnlschsasnpqyswringipqqhtqvlfiakitpnnngtyacfvsn
latgrnnsivksitvsasgtspglsa

Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM, Major gastrointestinal tumor-associated protein GA733-2, CD326), 291 aa

qeevcenyklavncfvnnnrqcqctsvgaqntvicsklaakclvmkaemngsklgrrakpegalqndglyd
pdcdesglfkakqcngtmcwcvntagvrrtdkdteitcservrtywiielkhkarekpydskslrtalqkeitry
qldpkfitsilyennvitidlvqnsqktqndvdiadvayyfekdvkgeslfhskkmdltvngeqlldlpgqqliyy
vdekapefsmqgl

Mucin-4 (MUC-4, Ascites sialoglycoprotein, Pancreatic adenocarcinoma mucin), 2141 aa А- и В-цепи.

ttedtlitgsktpapvtstgstatlegqstaassrtsnqdisassqnhqtkstettskaqtdltqmmtstlfsspsvhnv
metvtqetappdemttsfpssvntlmmtsktitmttstdstlgnteetstagtesstpvtsavsitagqegqsrtswr
siqdtassqnhwtrstqttresqstlthrttstpsfsvhnvtgvtvsqktspsgetatsslsvtntsmmtsekitvts
tgstlgnpgetssvpvtgslmpvttaalvtvdpegqspatfsrtstqdttafsknhqtsvettrvsqintlntltpvtst

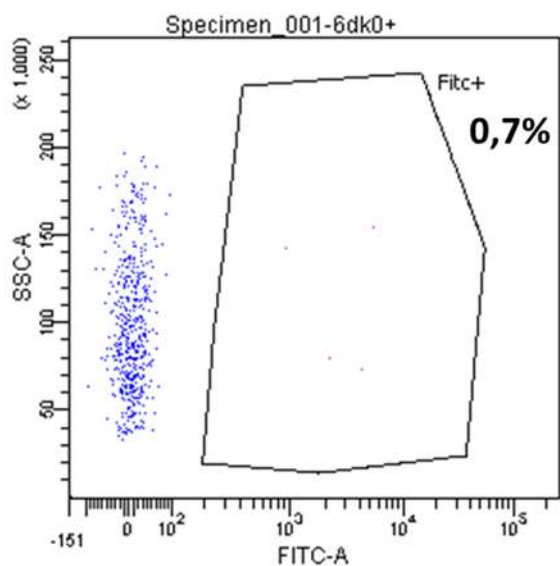
vlsspsgfnpsgtvsqetfypsgettisspssvsntflvtskvfrmpisrdstlgnteetslsvsgtisaitskvstiwwsdt
lsta lssplppkista fhtqqsegaettgrpherssfspgvsqei flhetttwpsssfsskghttwsqtelpststgaatrl
vtgnpstraagtivrpskvsaigepgeptysshsttlpkttgagaqtqwtqetgttgeallsspsysviqmiktatsp
ssspmldrhtsqqittapstnhstihststspqespavsqrghttrapqttesqttrsvspmtdkvtvtpgssftasghs
pseivpqdaptisaattfapaptgnghttaaptalqaapsshdatlgpssgtslsktgaltlansvvstpggpegqwt
sasastspdtaaamththqaesteasgqtqsepassgsrstsagatpsssgasgttspgsegistsgettrfssnpsrds
httqsttellsasashgaipvstgmassivpgtfhptlseastagrptqssptspsaspqetaaisrmaqtrtgtsrgs
dtislasqatdtfstvpptppsitssgltsptqthtlspsgsgkfttalisanatplpvtstssastghatplavssatsastv
ssdsplkmetsgmttspktdggrrtatspppttsqtiistipstamhtrstaapipilpergvs lfp ygagagdlefvrr
tvdfstplfkpatgfp l gsslrdslyftdngqii f pesdyqifsy p nplptgftgrdpvalvapfwddadfstgrgttffy
qeyetfygehsl lvqqaesw irkmt nnggykarwalkvtwv nahaypaqwtlgsntyqailstdgsrsyal flyq
sggmqwdvaqrs gnpv lmgfssgdgyfensplmsqpvweryrpd rfn snsglqglqfyr l hreerpn yrlecl
qwlksqprwpswgwnqvscpcswqqgrrdlrfqpv sigrwglgsrqlesftswrggvccsygpwgefregw
hvqrpwqlaqelepqs wccrwndkpylcalyqrrphvgcatyrppqpawmfgdphittldgvsytfnglgdfl
lvgaqdg nssfl lqgrtaqtgsaqatnfiafaaqrssslgpvtvqw llephdairvll dnqvtvfqpdhedgggqetf
natgvlls rngsevsasfdgwatvs vialsnilhasaslppeyqnrtegl lgvwnnnpeddfrmpngstippgspe
emlfhfgmtwqingtgl l gkrndqlpsnftpvfysqlqknsswaehlisncdgdssciydtlalrnasiglhtrevsk
nyeqanatlnqyppsinggrvieaykgqtliqytsnaedanftlrdsctdlelfengtllwtpkslepftleilarsaki
glasalqprt vvhcnaesqcl ynqtsrvgnsslevagckcdggtfgr ycegsedaceepcfpsvhcvpgkgcea
cppnltdgrhcaalgssflcq nqscpvny cynqghcyisqtlgcqpmctcppaftdsrflagnnfsptvnlelpl
rviqlll seenasmaevnasvayrlgtldmraflrnsqveridsaapasgs piqhw mvisefqyrprgpvidflnn
qllaavveaflyhvprreep rndvfvqpisgedvrdvtalnvstlkayfrcdgykgydlvyspqsgftcvspcsrg
ycdhggqcqhlp sgprscvsvsiytawgehcehsmkldaffgiffgalgllllgvgtfvvlrfwgcsgarfsyfl
nsaealp

3.3. Оценка эффективности доставки ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, в дендритные клетки методом магнитной трансфекции

Трансфекцию дендритных клеток целевыми плазмидами проводили с помощью коммерческого набора реактивов фирмы Promokine через 24 часа после добавления TNF- α по протоколу, рекомендованному производителем. Количество вносимых клеток в лунки было уменьшено до 500 тысяч, что было обусловлено тем, что при большей концентрации клетки могут наползать друг на друга и препятствовать образованию монослоя на поверхности культурального пластика, необходимого для успешного проведения трансфекции с использованием магнитных частиц.

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 [33]. Предварительными исследованиями нашей лаборатории было показано, что магнитная трансфекция зрелых дендритных клеток полиэпитопной ДНК-конструкцией эффективна для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* [7]. 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 цитометрии. 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 9 представлены данные от 1-го донора).

Контроль



Опыт

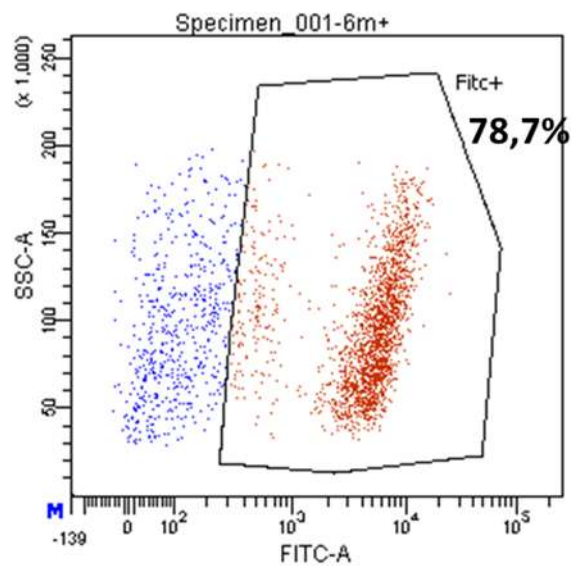


Рис. 9. Типичные точечные диаграммы при оценке эффективности трансфекции зрелых дендритных клеток плазмидой pCI-UB-POLYEP1 с реагентом MaTra-A, с использованием зонда, полученного из этой же плазмиды, методом гибридизации Flow-Fish. По оси Y – боковое светорассеяние клеток, по оси X – флуоресценция Atto488 по каналу FITC. Примечание: контроль – проба без трансфекции, опыт – проба с трансфекцией. В каждую пробу был добавлен зонд в концентрации 3 мкг/мл.

Таким образом, с помощью протокола магнитной трансфекции мы добились высокой эффективности доставки ДНК-конструкции в зрелые дендритные клетки методом магнитной трансфекции, определяемую по количеству внесенной плазмидной ДНК в клетки.

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.

3.4. Модуляция эффекторных функций моноклеарных клеток с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетическими конструкциями

3.4.1. Влияние зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетическими конструкциями, на цитотоксическую активность моноклеарных 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 10 представлены данные по цитотоксическому тесту моноклеарных клеток, сокультивированных с ДК, трансфицированными первой плазмидной конструкцией pCI-UB-POLYEP1, в отношении аутологичных опухолевых клеток. Показано, что трансфицированные конструкцией дендритные клетки достоверно повышают цитотоксическую активность моноклеарных клеток, что может свидетельствовать об активной транскрипции конструкции, трансляции полиэпитопного белка в дендритных клетках и об эффективном представлении эпитопов опухолеассоциированных антигенов в комплексе с молекулами МНС на поверхности клеток.

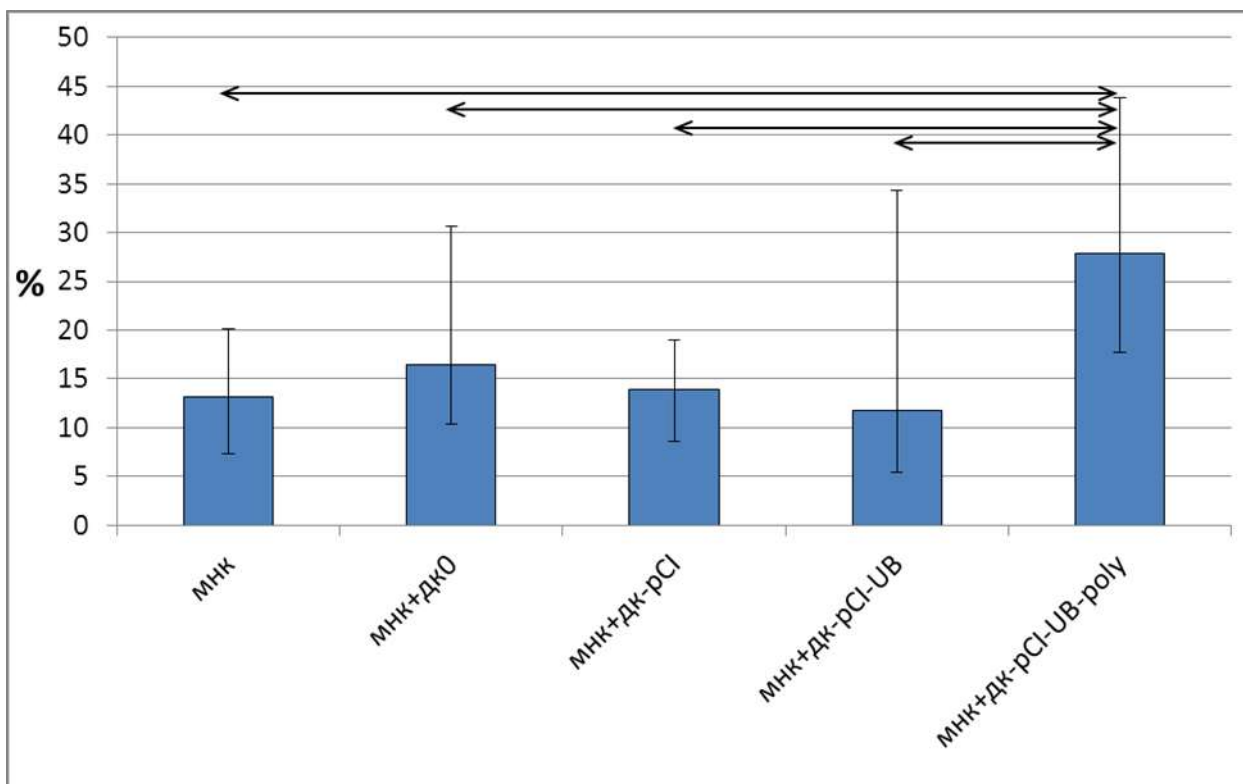


Рис. 10. Цитотоксическая активность МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК, против аутологичных опухолевых клеток больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=34. Стрелками указаны достоверные различия между группами ($p < 0,05$) (критерий Манна-Уитни).

Примечание: МНК – моноклеарные 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-POLYER1.

При применении для трансфекции ДК второй плазмидной конструкции pCI-Sec-POLYEP1 было установлено, что дендритные клетки, трансфицированные этой конструкцией, отличались по эффекту на МНК от дендритных клеток, трансфицированных первой плазмидной конструкцией. На рисунке 11 показано, что группа МНК, сокультивированных с дендритными клетками, трансфицированными pCI-Sec-POLYEP1, 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.

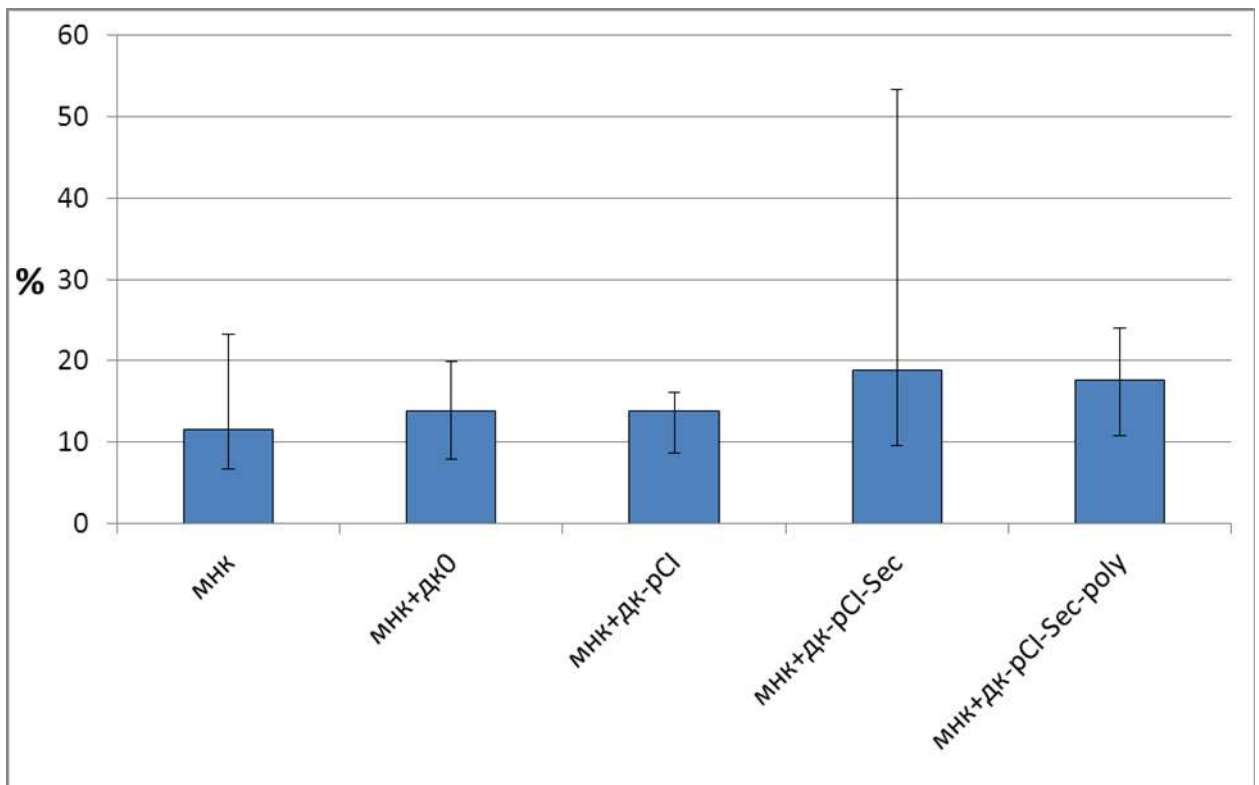


Рис.11. Цитотоксическая активность МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК, против аутологичных опухолевых клеток больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=15 (группы МНК+ДК-pCI-Sec и МНК+ДК-pCI-Sec-poly, n=7). Стрелками указаны достоверные различия между группами ($p < 0,05$) (критерий Манна-Уитни).

Примечание: МНК – моноклеарные 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-POLYEP1.

Классическим способом доставки антигена в дендритные клетки для индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* является нагрузка дендритных клеток лизатом опухолевых клеток [59]. 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-POLYEP1 (рисунок 12). Таким образом, рассмотренные способы индукции противоопухолевого иммунного ответа в культуре МНК оказались сходными по эффективности.

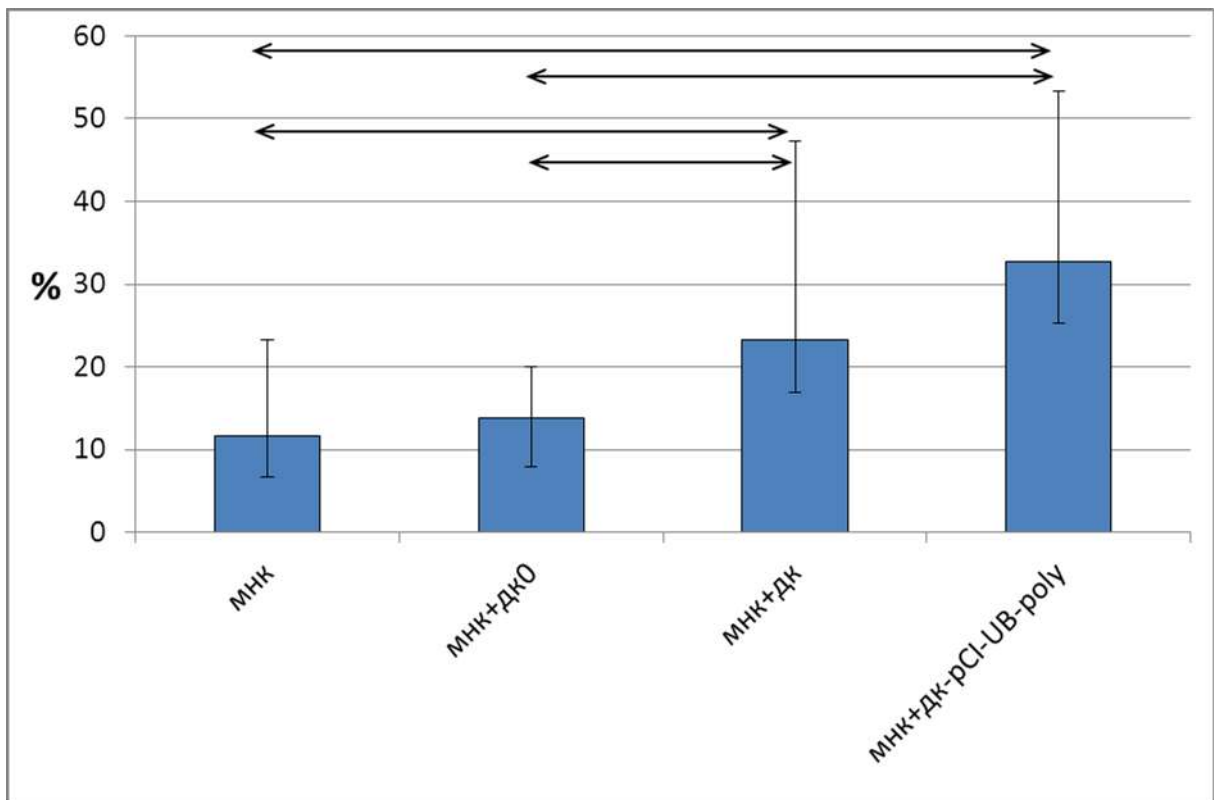


Рис. 12. Цитотоксическая активность МНК, сокультивированных с трансфицированными или нагруженными лизатом опухолевых клеток ДК, против аутологичных опухолевых клеток больных колоректальным раком. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, n=15. Стрелками указаны достоверные различия 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-POLYEP1.

Поскольку индукция цитотоксичности была выявлена у первой плазмидной конструкции pCI-UB-POLYEP1, представлялось интересным исследовать механизмы, приводящие к развитию цитотоксического потенциала у моноклеарных клеток под действием дендритных клеток, трансфицированных этой конструкцией, *in vitro*. А именно, изучить оказываемое ДК влияние на экспрессию перфорина МНК.

3.4.2. Влияние зрелых дендритных клеток, трансфицированных генетической конструкцией, на экспрессию перфорина моноклеарными 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 грануло-зависимый 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 [161]. 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-POLYEP1 ДК, по сравнению с контрольными группами (рисунок 13).

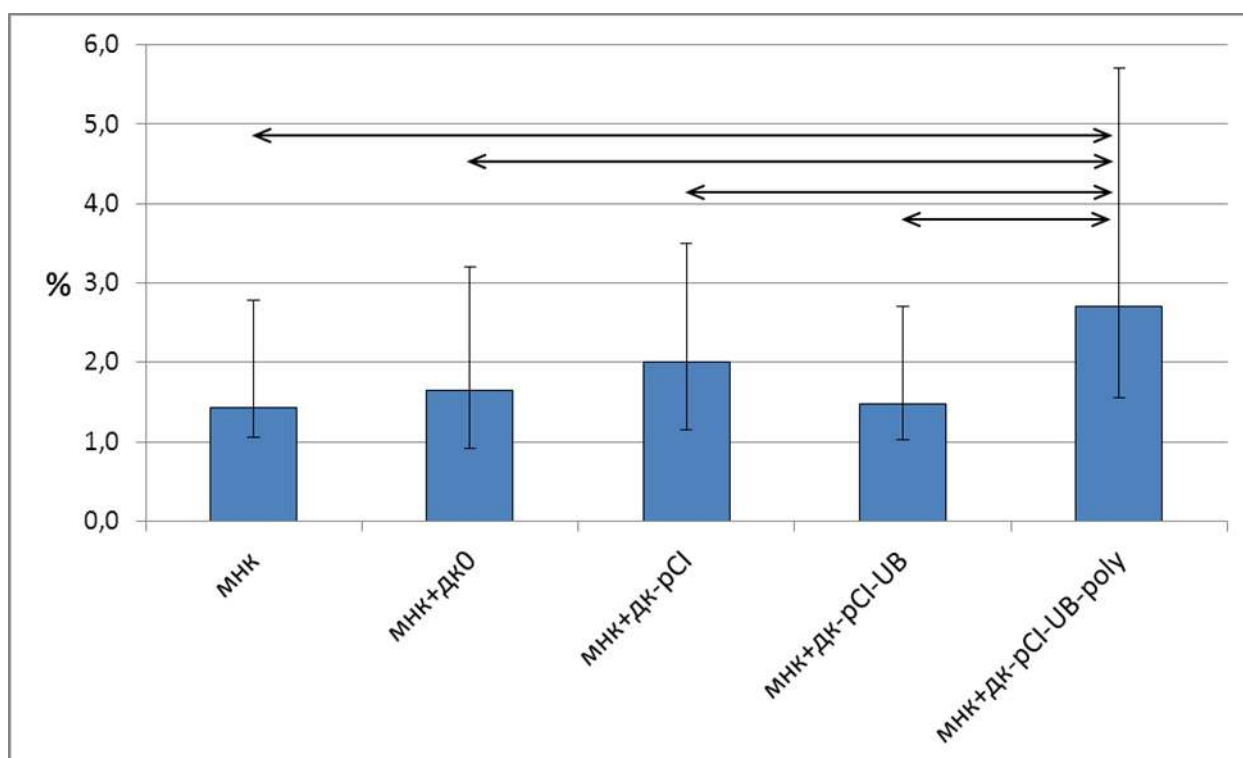


Рис. 13. Относительное содержание перфорин-позитивных клеток в популяции лимфоцитов культуры МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, $n=12$. Стрелками указаны достоверные различия между группами ($p < 0,05$) (критерий Уилкоксона).

Примечание: МНК – моноклеарные 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-POLYERI.

По данным литературы, при колоректальном раке $CD8^+$ Т-клетки играют основную роль в формировании противоопухолевого иммунного ответа, главным образом, в цитотоксичности [121, 153], поэтому в этом исследовании также изучался эффект трансфицированных ДК на экспрессию перфорины $CD8^+$ 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-POLYEP1, по сравнению со всеми остальными группами (рисунок 14). Таким образом, можно говорить о стимулирующем влиянии дендритных клеток, трансфицированных плазмидной конструкцией pCI-UB-POLYEP1, на количество лимфоцитов, несущих гранулы перфорины.

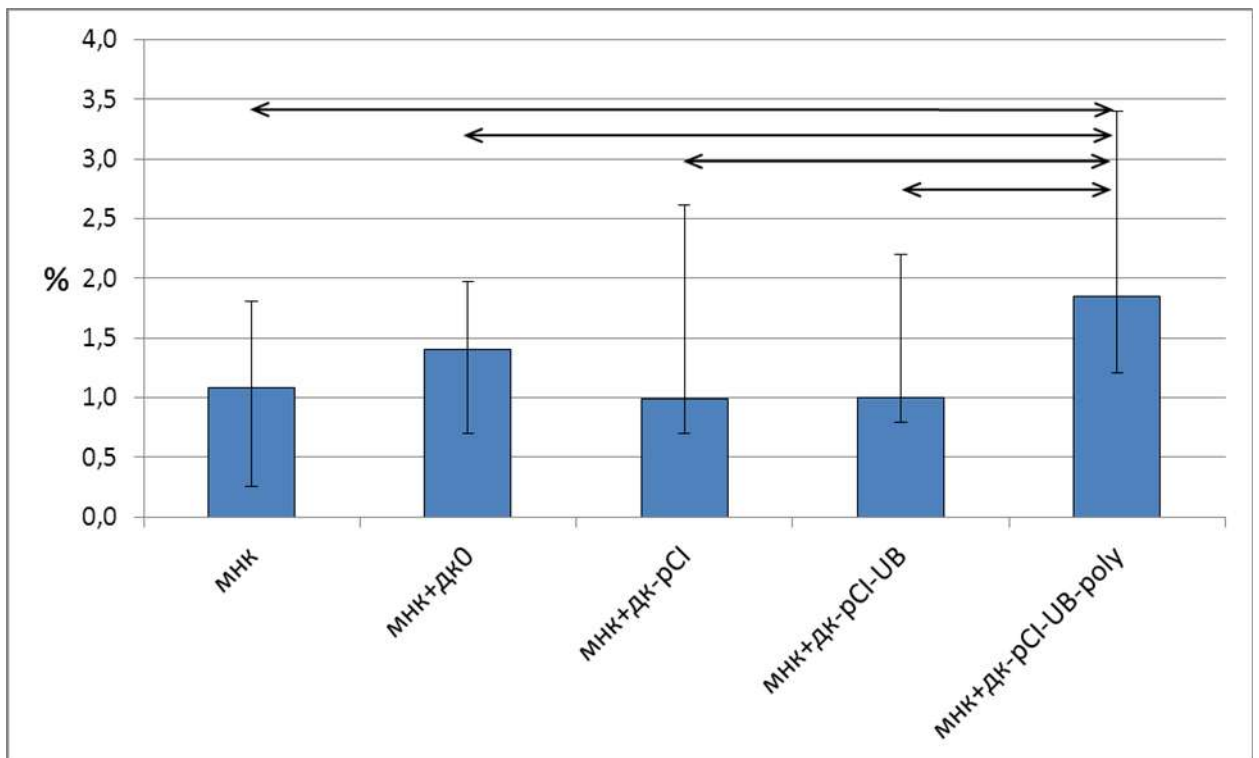


Рис. 14. Относительное содержание перфорин-позитивных клеток среди $CD8^+$ Т-лимфоцитов в популяции МНК, сокультивированных с трансфицированными ДК. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, $n=9$. Стрелками указаны достоверные различия между группами ($p < 0,05$) (критерий Уилкоксона).

Примечание: МНК – мононуклеарные клетки, не подвергшиеся совместному культивированию с дендритными клетками; МНК+ДК0 – совместная культура МНК и нетрансфицированных ДК; МНК+ДК-рСІ - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией рСІ; МНК+ДК-рСІ-UB – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией рСІ-UB; МНК+ДК-рСІ-UB-poly - совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидной конструкцией рСІ-UB-POLYER1.

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 моноклеарных клеток *in vitro*. Совместное культивирование аутологичных ДК, трансфицированных конструкцией pCI-UB-POLYEP1, и МНК больных колоректальным раком стимулирует цитотоксическую активность МНК против аутологичных опухолевых клеток и способствует формированию пула цитотоксических перфорин-позитивных клеток.

4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из способов индукции противоопухолевого иммунного ответа у больных онкологическими заболеваниями является праймирование Т-клеток с помощью аутологичных дендритных клеток, презентующих на своей поверхности опухолевые антигены. Антигены могут быть доставлены в ДК различными способами, и источники антигенов включают в себя лизаты опухолевых клеток, пептиды, рекомбинантные ОАА, мРНК или ДНК, кодирующие ОАА [1]. В нашем исследовании мы использовали ДНК-конструкции, содержащие последовательности эпитопов опухолеассоциированных антигенов колоректального рака, для индукции противоопухолевого Т-клеточного ответа после трансфекции в ДК.

На первом этапе исследования необходимо было получить зрелые дендритные клетки из моноцитов периферической крови пациентов, больных колоректальным раком и оценить их фенотипические и функциональные характеристики. Для генерации дендритных клеток из предшественников периферической крови, использовали клеточный протокол, заключающийся в 96-часовом культивировании прилипающей фракции МНК периферической крови пациентов больных колоректальным раком и терминальной дифференцировки полученных дендритных клеток в течение последующих 24 часов с применением TNF- α . В одном из последних исследований [104] проводилось сравнение нескольких распространенных стратегий получения зрелых дендритных клеток, методика которых подразумевала добавление на срок 24 часа к незрелым ДК различных стимуляторов созревания, таких как CD40L, LPS, TNF- α и часто применяемого в исследованиях «коктейля», содержащего TNF- α , IL-6, IL-1 β и PGE2. Незрелые дендритные клетки культивировались из прилипшей фракции МНК периферической крови здоровых доноров в присутствии цитокинов GM-CSF и IL-4 в течение 6 дней. По результатам данной работы авторы пришли к выводу, что все стратегии достигли результата, но самой эффективной для получения зрелых ДК

оказалось добавление «коктейля» TNF- α +IL-6+IL-1 β +PGE2, что отразилось на экспрессии маркеров созревания и продукции IL-12. В нашей работе незрелые ДК были получены в течение всего 4 дней, а зрелые путем добавления только TNF- α на срок 24 часа, что подтверждается повышением и достижением высокого уровня экспрессии маркеров дифференцировки и костимуляции CD83, CD86 и HLA-DR. Таким образом, полученные результаты по созреванию дендритных клеток, генерированных из предшественников периферической крови больных колоректальным раком, свидетельствует о возможности генерации зрелых ДК при применении данного клеточного протокола.

Известно, что незрелые дендритные клетки обладают высокой способностью к захвату антигена. Учитывая это, для характеристики функциональных свойств полученных в работе дендритных клеток исследовали их способность к захвату FITC-меченого декстрана. Одним из механизмов захвата декстрана является рецептор-опосредованный эндоцитоз через лектиновые рецепторы, такие как DEC 205/CD 205 [90], которые имеют значение в презентации маннозилированных белковых антигенов опухолевого происхождения. В процессе созревания ДК теряют свою способность к эндоцитозу из-за снижения экспрессии большинства рецепторов, распознающих антигены, и уменьшения активности процессов фаго-и пиноцитоза [5, 165]. В нашей работе исследование эффективности захвата антигена, определяемое по отношению интенсивностей флюоресценции при + 37°C и +4°C, показало, что незрелые ДК, полученные из моноцитов пациентов больных колоректальным раком, обладают способностью к захвату антигена, которая снижается по мере созревания ДК, что свидетельствует о возможности захвата антигенов и их эффективной кросс-презентации дендритными клетками с последующим снижением этой функции по мере их дифференцировки.

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.

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 [144, 187]. Нами было показано, что при проведении трансфекции зрелых ДК исследуемые маркеры созревания CD83, CD86 и HLA-DR остаются на том же уровне, что и у зрелых ДК, не подвергшихся 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.

В нашей работе для трансфекции дендритных клеток были сконструированы и использованы плазмидные конструкции pCI-UB-POLYEP1 и pCI-Sec-POLYEP1, несущие последовательности, кодирующие эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов CEA, EpCAM, 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. 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

полиэпиптопного белка на отдельные эпитопы и их эффективную транслокацию. 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-POLYEP1 и pCI-Sec-POLYEP1. 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 [87]. Этот эффект отчетливо зависел в том числе от убиквитина.

Чтобы в дальнейшем изучать влияние трансфицированных зрелых дендритных клеток на противоопухолевый иммунный ответ *in vitro*, прежде необходимо было удостовериться, что плазмидная конструкция при трансфекции проникает в большинство дендритных клеток. Поэтому на следующем этапе нашей работы мы исследовали эффективность проведения процедуры магнитной трансфекции. Результаты показали среднюю эффективность трансфекции в пределах 70% для популяции моноцитов в культуре зрелых дендритных клеток. Тем не менее, нужно отметить, что данный показатель говорит лишь о проникновении плазмиды в клетку, а не об эффективном считывании и наработке белка. 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 [42]. 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.

Свойственная ДК способность захватывать и кросс-презентировать антиген, делает их привлекательными для использования при иммунотерапии онкологических заболеваний. На сегодняшний день проведены единичные клинические испытания по использованию ДК, трансфицированных последовательностями опухоль-ассоциированных антигенов, при иммунотерапии онкологических заболеваний [81, 151, 176], и колоректального рака в частности [103, 129, 133]. Поэтому необходимость исследования *in vitro* влияния трансфицированных ДК на модуляцию противоопухолевого иммунного ответа не вызывает сомнения. Однако существуют определенные трудности при иммунотерапии с использованием только дендритных клеток: при их введении в организм онкологического больного возникает большая вероятность того, что они могут подвергнуться влиянию супрессивных агентов, наличие которых в организме характерно для неопластического процесса [164]. Исходя из этой возможности, возникло предположение, что для формирования направленного специфического иммунного ответа целесообразно применять именно мононуклеарные клетки, предварительно праймированные дендритными клетками, трансфицированными плазмидными конструкциями, кодирующими эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов.

Для определения эффективности модуляции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* с помощью полученных ДК в нашей работе оценивались цитотоксическая активность и экспрессия перфорина мононуклеарными клетками неприлипшей фракции, которые предварительно культивировали с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями с последовательностями эпитопов опухоль-ассоциированных антигенов. Такой подход позволил смоделировать ситуацию при введении в организм больного колоректальным раком мононуклеарных клеток,

стимулированных трансфицированными дендритными клетками. При осуществлении трансфекции зрелых дендритных клеток полиэпитопными ДНК-конструкциями *in vitro* предполагалось, что процессы процессинга полиэпитопного белка и презентации эпитопов протекали без отклонений, а совместное культивирование клеток неприлипшей фракции МНК и ДК способствовало формированию клонов специфических реактивных клеток.

Из данных антигенов, эпитопы которых вошли в конструкцию, для трансфекции дендритных клеток по литературным данным использовались нуклеотидные последовательности антигенов СЕА и MUC4, последовательности ЕрСАМ, насколько нам известно, не использовались. При колоректальном раке наиболее широко используемым антигеном для нагрузки ДК является СЕА [127]. В одной из работ было показано, что человеческие ДК, инфицированные вектором, экспрессирующим СЕА, MUC1, TRICOM (TRICOM – три костимулирующих молекулы CD80, ICAM-1, и LFA-3) генерировали как MUC-1, так и СЕА-специфические Т-клеточные линии; которые, в свою очередь, были способны лизировать человеческие опухолевые клетки, эндогенно экспрессирующие MUC1 и/или СЕА [184]. В другой работе иммунизация мышей дендритными клетками, трансдуцированными вектором, экспрессирующим СЕА, повышала цитотоксическую активность клеток селезенки против клеток опухоли, экспрессирующих СЕА [144]. В одном из исследований [187] было установлено, что праймирование лимфоцитов дендритными клетками, трансдуцированными универсальным эпитопом PADRE в комбинации с антигеном HLA-A1 и с HLA-A2-рестриктированными эпитопами MUC4 привело к генерации выраженного цитотоксического ответа. В нашей работе также было показано, что применение ДК, трансфицированных полиэпитопной ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, кодирующей эпитопы трех ОАА колоректального рака, а также вспомогательный Т-клеточный эпитоп столбнячного анатоксина и CTL-пептид овальбумина, способствует усилению цитотоксической активности МНК. Использование

костимулирующих молекул в составе конструкций усиливает эффективность ответа, как было показано в исследовании [184], однако в нашей работе мы не применяли этот метод повышения иммуногенности. В работе [187], в отличие от нашего исследования, не были использованы фланкирующие последовательности для разделения эпитопов.

В то же время при исследовании влияния дендритных клеток, трансфицированных второй плазмидной конструкцией pCI-Sec-POLYEP1, на цитотоксичность мононуклеарных клеток больных колоректальным раком не было обнаружено эффекта. Так как плазмидная конструкция pCI-UB-POLYEP1 привлекает в своем механизме процессинга и презентации в первую очередь убиквитин-протеасомную систему деградации белков, а конструкция pCI-Sec-POLYEP1 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-POLYEP1 расщепление наработанного полиэпитопного белка, и, соответственно, представление эпитопов на поверхности клеток происходит медленнее и требует более длительного по времени протокола, и в рамках протокола в данной работе этот механизм полностью не реализуется. Таким образом, ДК, трансфицированные конструкцией pCI-UB-POLYEP1, повышают цитотоксическую активность МНК против клеток колоректального рака, как мы предполагаем, за счет более эффективной деградации синтезированного полиэпитопного белка.

Вакцины на основе ДК, нагруженных полными опухолевыми лизатами, начали разрабатываться и применяться гораздо раньше ДНК-вакцин. Поскольку лизаты опухолевых клеток содержат множество значимых антигенов, Т-клеткам презентруется широкий спектр ОАА и это индуцирует выраженный иммунный ответ. При использовании полных опухолевых

лизатов в экспериментальных моделях и клинических испытаниях были продемонстрированы высокая эффективность и низкая токсичность при различных видах рака, в том числе и при колоректальном [38, 59, 168, 193]. Тем не менее, лизат может содержать белки, подавляющие иммунный ответ [51], а остаточные опухолевые клетки в организме пациента могут изменять свой антигенный профиль в ходе лечения, что может затруднить использование лизата [11]. 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. В данной работе мы обнаружили, что МНК, культивированные с ДК, трансфицированными ДНК-конструкцией, индуцируют эффективный цитотоксический ответ против аутологичных опухолевых клеток, который сопоставим с ответом, вызванным МНК, культивированных с ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток. Использование опухолевых лизатов возможно в случаях резекции опухоли или метастазов и получения достаточного количества опухолевого материала для приготовления лизата. Применение полиэпитопных ДНК-конструкций будет не менее эффективным в данных случаях, чем использование ДК, нагруженных лизатом опухолевых клеток, а также в случаях, когда невозможно получить необходимое количество лизата. Еще одним перспективным аспектом такого подхода является профилактическая вакцинация пациентов, предрасположенных к колоректальному раку на основе семейного анамнеза или генетического скрининга.

Т-лимфоциты, NK- и NKT-клетки опосредуют преимущественно клеточную гибель опухолевых клеток по типу апоптоза за счет экспрессии ряда молекул. Поэтому показателем потенциала цитотоксической активности мононуклеарных клеток может выступать накопление перфорина

цитотоксическими гранулами лимфоцитов, в частности CD8⁺ лимфоцитов [3, 180]. Перфорины представляют собой растворимые, порообразующие белки, секретируемые цитолитическими лимфоцитами (CTL и NK), они принимают непосредственное участие в процессе апоптоза [161]. Исследования показали, что человеческий перфорин синтезируется в форме предшественника с молекулярной массой ~67 кДа (555 аминокислотных остатков), который имеет N-концевой сигнальный пептид из 21 аминокислоты. Белок становится активным только после удаления сигнального пептида и дополнительного отщепления гликозилированного С-концевого участка цистеиновой протеазой. Перфорин в высоких концентрациях при наличии свободных ионов Ca²⁺ способен вызывать осмотический лизис за счет образования пор диаметром 5-20 нм в мембране клетки-мишени [183]. С одной стороны установлено, что при колоректальном раке содержание перфорины в CD8⁺ опухоль-инфильтрующих лимфоцитах значительно снижается по сравнению с CD8⁺ лимфоцитами периферической крови [110]. С другой стороны, в исследовании, выполненном на мышинной модели колит-ассоциированной опухоли кишечника, показано, что у дефицитных по перфориноу мышей снижалась выраженность неопластического процесса по сравнению с мышами дикого типа [186]. Данные результаты противоречат полученным ранее [3], и авторы объясняют их непредсказуемой ролью перфорины в данной модели.

Согласно нашим данным ДК, трансфицированные конструкцией pCI-UB-POLYEP1, обладают стимулирующим влиянием на накопление перфорины как популяцией лимфоцитов, так и популяцией CD8⁺ лимфоцитов периферической крови больных колоректальным раком. Следовательно, мы можем говорить об активации цитотоксического статуса эффекторных клеток, определяемого по количеству перфорин-позитивных клеток. 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 [130].

Таким образом, при совместном культивировании зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, и мононуклеарных клеток пациентов, больных колоректальным раком, происходит активация МНК, что проявляется в цитотоксической активности против аутологичных опухолевых клеток и экспрессии перфорина мононуклеарными клетками. Использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией pCI-Sec-POLYEP1, в совместном культивировании с МНК больных колоректальным раком не повлияло на цитотоксическую активность последних. Совместное культивирование зрелых дендритных клеток, нагруженных лизатом аутологичных опухолевых клеток, и МНК больных колоректальным раком вызывает стимуляцию цитотоксической активности МНК, сопоставимую по эффективности со стимуляцией МНК, культивированных с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1. Обобщая полученные результаты можно заключить что, аутологичные ДК, трансфицированные полиэпитопной ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, оказывают индуцирующее влияние на противоопухолевый иммунный ответ *in vitro* при колоректальном раке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные данные можно заключить, что дендритные клетки, культивированные в течение 5 дней с применением факторов дифференцировки рекомбинантных цитокинов GM-CSF и IL-4, а также фактора созревания TNF- α из прилипающей фракции моноклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком, обладают фенотипическими и функциональными характеристиками, присущими зрелым антигенпрезентирующим клеткам.

Разработанные для трансфекции дендритных клеток ДНК-конструкции pCI-UB-POLYEP1 и pCI-Sec-POLYEP1, кодирующие эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов CEA, EpCAM, MUC4, отличаются тем, что в своем составе содержат разные специализированные сигнальные последовательности белков, которые отвечают за различные механизмы процессинга белка и презентации пептидов. При проведении магнитной трансфекции ДНК-конструкций в дендритные клетки наблюдается эффективный перенос генетического материала в дендритные клетки и сохранение клетками фенотипических характеристик после процедуры трансфекции в данных условиях, что выразилось в неизменно высокой экспрессии маркеров созревания дендритных клеток и в увеличении процента клеток, несущих плазмидную конструкцию, кодирующую эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов.

При исследовании эффективности индукции противоопухолевого иммунного ответа *in vitro* с помощью полученных зрелых дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, было обнаружено, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, оказывают индуцирующее влияние на цитотоксическую активность моноклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток колоректального рака, а дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-Sec-POLYEP1 не оказывают. Данный результат может

говорить об эффективности использования в конструкции pCI-UB-POLYEP1 последовательностей выбранных иммуногенных эпитопов антигенов СЕА, ЕрСАМ, MUC 4 и убиквитина для процессинга и презентации этих эпитопов и свидетельствует о факте эффективной индукции и костимуляции Т-клеток ДК, полученными в условиях данного клеточного протокола. Механизмом цитотоксического эффекта в данных условиях явился клеточный лизис, опосредуемый перфорином, что доказано установленной способностью ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, повышать процент клеток, несущих молекулы перфорина, в популяции лимфоцитов, в том числе в популяции эффекторных CD8⁺ лимфоцитов периферической крови больных колоректальным раком.

В то же время дендритные клетки, нагруженные лизатом опухолевых клеток колоректального рака, так же эффективно индуцируют противоопухолевую цитотоксическую способность мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком, как и трансфицированные ДНК-конструкцией pCI-UB-POLYEP1, кодирующей эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака.

Применяемый подход по получению дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, которые кодируют эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, позволяет модулировать противоопухолевый иммунный ответ *in vitro* при колоректальном раке. Преимуществами такого подхода по сравнению с использованием дендритных клеток, нагруженных лизатом опухолевых клеток, являются отсутствие иммуносупрессии и риска аутоиммунного ответа, возможность использования трансфицированных ДК в тех случаях, при которых резекция опухоли и, соответственно, приготовление лизата опухолевых клеток не осуществимы, а также профилактическая вакцинация пациентов, предрасположенных к колоректальному раку на основе семейного анамнеза или генетического скрининга.

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-POLYEP1, в отличие от ДНК-конструкции pCI-Sec-POLYEP1, 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-POLYEP1, увеличивают процент клеток, несущих молекулы перфорины, 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-POLYEP1, кодирующей эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов колоректального рака, одинаково эффективно индуцируют противоопухолевую цитотоксическую способность мононуклеарных клеток периферической крови больных колоректальным раком.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4. - № 3. – С. 157-166.
2. Балдуева И.А., Новик А.В., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Проценко С.А., Петрова Т.Ю., Улейская Г.И., Щёкина Л.А., Семёнова А.И., Михайличенко Т.Д., Телетаева Г.М., Жабина А.С., Волков Н.В., Комаров Ю.И. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адъювантом у больных с меланомой кожи // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. – № 2. – С. 212-221.
3. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Перфориновый потенциал эффекторных клеток у онкологических больных // Вестник Российского онкологического научного центра имени Н. Н. Блохина РАМН. – 2005. – Т. 16. – № 3-4. – С. 7-9.
4. Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л., Балдуева И.А., Моисеенко В.М. Лабораторная оценка содержания TGF1, интерлейкина-10, VGEF in vitro и in vivo у больных солидными опухолями // Вопросы онкологии. – 2011. – Т. 57. – № 6. – С. 759-766.
5. Каралкин П.А., Лупатов А.Ю., Ярыгин К.Н. Эндоцитоз микро-и наноразмерных частиц дендритными клетками человека в культуре // Биологические мембраны. – 2009. – № 5. – С. 394-400.
6. Лукашина М.И., Смирнова А.В., Алиев В.А., Самойленко И.В., Семенов Н.В., Вейко В.П., Михайлова И.Н., Барсуков Ю.А., Барышников А.Ю. Дендритные вакцины в терапии колоректального рака // Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН. – 2008. – Т.19. – № 3. – С.35-41.
7. Максюттов А.З., Лопатникова Ю.А., Курилин В.В. Шевченко Ю.А., Хантакова Ю.Н., Гаврилова Е.Д., Максюттов Р.А., Перегудов А.Г., Зайцев С.А., Козлов В.А., Сенников С.В. Исследование

- эффективности индукции цитотоксического иммунного ответа мононуклеарными клетками с помощью дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными конструкциями HER2/ErbB2 // Медицинская иммунология. – 2014. – Т. 16. – № 5. – С. 417-424.
8. Москалева Е.Ю., Северин С.Е.. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека // Иммунология. – 2002. – № 1. – С. 8-15.
 9. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М: Мир, 1991. – 558с.
 10. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах // Цитология. – 2010. – Т. 52. – № 4. – С. 277-300.
 11. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Денисов Е.В. Основные достижения в фундаментальной онкологии в 2012 году // Практическая онкология. – 2013. – Т. 14. – № 1. – С.1-12.
 12. Шевченко Ю.А., Хантакова Ю.Н., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Сидоров С.В., Козлов В.А., Сенников С.В. Стимуляция цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток у больных раком молочной железы дендритными клетками, нагруженными антигенами опухолевых лизатов // Иммунология. – 2013. – Т. 34. – № 6. – С. 327-30.
 13. Ackerman A.I., Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens // Nat Immun. – 2004. – Vol. 5(7). – P. 678-84.
 14. Agrawal B., Krantz M.J., Reddish M.A., Longenecker B.M. Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2 // Nat Med. – 1998. – Vol. 4. – P. 43-9.
 15. Agudelo W.A., Patarroyo M.E. Quantum chemical analysis of MHC-peptide interactions for vaccine design // Mini Rev Med Chem. – 2010. – Vol. 10. – P. 746–58.

16. Ahmadzadeh M., Rosenberg S.A. TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells // *J Immunol.* – 2005. – Vol. 174. – P. 5215-23.
17. Almand B., Clark J.I., Nikitina E., van Beynen J., English N.R., Knight S.C., Carbone D.P., Gabilovich D.I. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 166. – P. 678-689.
18. Almand B., Resser J.R., Lindman B., Nadaf S., Clark J.I., Kwon E.D., Carbone D.P., Gabilovich D.I. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer // *Clin Cancer Res.* – 2000. – Vol. 6. – P. 1755-66.
19. Arad G., Nussinovich R., Na'amad M., Kaempfer R. Dual control of human interleukin-2 and interferon-gamma gene expression by histamine: activation and suppression // *Cell Immunol.* – 1996. – Vol. 170. – P. 149-55.
20. Ashley D.M., Faiola B., Nair S., Hale L.P., Bigner D.D., Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors // *J Exp Med.* – 1997. – Vol. 186. – P. 1177-82.
21. Asselin-Paturel C., Megherat S., Vergnon I., Echchakir H., Dorothée G., Blesson S., Gay F., Mami-Chouaib F., Chouaib S. Differential effect of high doses versus low doses of interleukin-12 on the adoptive transfer of human specific cytotoxic T lymphocyte in autologous lung tumors engrafted into severe combined immunodeficiency disease-nonobese diabetic mice: relation with interleukin-10 induction // *Cancer.* – 2001. – Vol. 91(1). – P. 113–22.
22. Avigan D., Vasir B., Gong J., Borges V., Wu Z., Uhl L., Atkins M., Mier J., McDermott D., Smith T., Giallambardo N., Stone C., Schadt K., Dolgoff J., Tetreault J.C., Villarroel M., Kufe D. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological

- and clinical responses // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 4699-708.
23. Azizi A., Diaz-Mitoma F. Viral peptide immunogens: current challenges and opportunities // *J Pept Sci.* – 2007. – Vol. 13. – P. 776-86.
 24. Bae M.Y., Cho N.H., Seong S.Y. Protective anti-tumour immune responses by murine dendritic cells pulsed with recombinant Tat-carcinoembryonic antigen derived from *Escherichia coli* // *Clin Exp Immunol.* – 2009. – Vol. 157. – P. 128-38.
 25. Baeuerle P.A., Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer // *Br J Cancer.* – 2007. – Vol. 96. – P. 17-423.
 26. Baier P.K., Wimmenauer S., Hirsch T., von Specht B.U., von Kleist S., Keller H., Farthmann E.H. Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas // *Tumour Biol.* – 1998. – Vol. 19. – P. 205-12.
 27. Banerjea A., Bustin S.A., Dorudi S. The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability // *World J Surg Oncol.* – 2005. – Vol. 3:26.
 28. Beck C, Schreiber H, Rowley D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer // *Microsc Res Tech.* – 2001. – Vol. 52. – P. 387-95.
 29. Bergmann C.C., Yao Q., Ho C.-K., Buckwold S. Lanking residues alter antigenicity and immunogenicity of multi-unit CTL epitopes.// *J Immun.* – 1996. – Vol. 157(8). – P. 3242-249.
 30. Bernardeau-Mozer M., Chaussade S. Cyclooxygenase 2 inhibitors and colorectal cancer // *Bull Cancer.* – 2004. – Vol. 91. – P. 89–98.
 31. Boczkowski D., Nair S. RNA as performance-enhancers for dendritic cells // *Expert Opin Biol Ther.* – 2010. – Vol. 10. – P. 563-74.
 32. Boczkowski D., Nair S.K., Snyder D., Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo // *J Exp Med.* – 1996. – Vol. 184. – P. 465-72.

33. Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S., Michiels A., Breckpot K., Brasseur F., Zhang Y., Van Der Bruggen P., Thielemans K. MessengerRNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 6649-57.
34. Bos R., van Duikeren S., van Hall T., Lauwen M.M., Parrington M., Berinstein N.L., McNeil B., Melief C.J., Verbeek J.S., van der Burg S.H., Offringa R. Characterization of antigen-specific immune responses induced by canarypox virus vaccines // *J Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 6115-22.
35. Boyle P., Langman J.S. ABC of colorectal cancer: Epidemiology // *BMJ.* – 2000. – Vol. 321. – P. 805-8.
36. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // *Scand J Clin Lab Invest.* – 1968. – Vol. 21. – P. 97.
37. Broeke L.T., Daschbach E., Thomas E.K., Andringa G., Berzofsky J.A. Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 5842-5852.
38. Burgdorf S.K., Fischer A., Myschetzky P.S., Munksgaard S.B., Zocca M.B., Claesson M.H., Rosenberg J. Clinical responses in patients with advanced colorectal cancer to a dendritic cell based vaccine // *Oncol Rep.* – 2008. – Vol. 20. – P. 1305-11.
39. Camus M., Tosolini M., Mlecnik B., Pagès F., Kirilovsky A., Berger A., Costes A., Bindea G., Charoentong P., Bruneval P., Trajanoski Z., Fridman W.H., Galon J. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69. – P. 2685-93.
40. Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I., Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking // *J Exp Med.* – 1994. – Vol. 180. – P. 1263-72.

41. Chen M.L., Pittet M.J., Gorelik L., Flavell R.A., Weissleder R., von Boehmer H., Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – Vol. 102. – P. 419-24.
42. Chen Y.Z., Yao X.L., Tabata Y., Nakagawa S., Gao J.Q. Gene carriers and transfection systems used in the recombination of dendritic cells for effective cancer immunotherapy // Clin Dev Immunol. – 2010. – Vol. 565643.
43. Cloosen S., Arnold J., Thio M., Bos G.M., Kyewski B., Germeraad W.T. Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: implications for selftolerance and tumor therapy // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67. – P. 3919-26.
44. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy // Science. – 2013. – Vol. 342. – P. 1432-3.
45. Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn C, Ensink NG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells // Cancer Immunol Immunother. – 2004. – Vol. 53. – P. 978-86.
46. Dalglish A.G., O'Byrne K.J. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer // Adv Cancer Res. – 2002. – Vol. 84. – P. 231-76.
47. Della Porta M., Danova M., Rigolin G.M., Brugnattelli S., Rovati B., Tronconi C., Fraulini C., Russo Rossi A., Riccardi A., Castoldi G. Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings // Oncology. – 2005. – Vol. 68. – P. 276-84.
48. Dempke W., Rie C., Grothey A., Schmoll H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? // J Cancer Res Clin Oncol. – 2001. – Vol. 127. – P. 411–7.

49. Diederichsen A.C., Hjelmberg J.B., Christensen P.B., Zeuthen J., Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cell // *Cancer Immunol Immunother.* – 2003. – Vol. 52. – P. 423-8.
50. Ding Y.H., Fu S., Zamarin D., Bromberg J. Interleukin-10 / Thompson A.W., Lotze M.T. (Eds.). *The Cytokine Handbook*. 4th Ed. – L.: Elsevier Science, 2003. – P. 603–25.
51. Dong B., Dai G., Xu L., Zhang Y., Ling L., Sun L., Lv J. Tumor cell lysate induces the immunosuppression and apoptosis of mouse immunocytes // *Mol Med Rep.* – 2014. – Vol. 10. – P. 2827-34.
52. Dranoff G. Targets of protective tumor immunity // *Ann NY Acad Sci.* – 2009. – Vol. 1174. – P. 74-80.
53. Durantez M., Lopez-Vazquez A.B., De Cerio A.L.-D. Induction of multiepitopic and long-lasting immune responses against tumour antigens by immunization with peptides, DNA and recombinant adenoviruses expressing minigenes.// *Scand J Immunol.* – 2009. – Vol. 69. – P. 80-89.
54. Elenkov I.J., Webster E., Papanicolaou D.A., Fleisher T.A., Chrousos G.P., Wilder R.L. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 2586–93.
55. Elsässer-Beile U., von Kleist S., Fischer R., Mönning J.S. Impaired cytokine production in whole blood cell cultures from patients with colorectal carcinomas as compared to benign colorectal tumors and controls // *J Clin Lab Anal.* – 1992. – Vol. 6. – P. 311-4.
56. Evans C., Dalglish A.G., Kumar D. Review article: immune suppression and colorectal cancer // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2006. – Vol. 24. – P. 1163-77.
57. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress // *Endocr Rev.* – 2004. – Vol. 25. – P. 581-611.

58. Ferroni P., Spila A., Martini F., D'Alessandro R., Mariotti S., Del Monte G., Graziano P., Buonomo O., Guadagni F., Roselli M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor tumor tissue content of colorectal cancer // *Oncology*. – 2005. – Vol. 69. – P. 145-53.
59. Figdor C.G., de Vries I.J., Lesterhuis W.J., Melief C.J. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way // *Nat Med*. – 2004. – Vol. 10. – P. 475-80.
60. Fujii S., Liu K., Smith C., Bonito A.J., Steinman R.M. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation // *J Experim Med*. – 2004. – Vol. 199. – P. 1607-18.
61. Gajrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic cell defects // *Nat Rev Immunol*. – 2004. – Vol. 4. – P. 941-52.
62. Gajrilovich D., Ishida T., Oyama T., Ran S., Kravtsov V., Nadaf S., Carbone D.P. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – P. 4150-66.
63. Gajrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R., Cunningham H.T., Meny G.M., Nadaf S., Kavanaugh D., Carbone D.P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells // *Nat Med*. – 1996. – Vol. 2. – P. 1096-103.
64. Gajrilovich D.I., Ishida T., Nadaf S., Ohm J.E., Carbone D.P. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function // *Clin Cancer Res*. – 1999. – Vol. 5. – P. 2963-70.
65. Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F., Kirilovsky A., Mlecnik B., Lagorce-Pagès C., Tosolini M., Camus M., Berger A., Wind P., Zinzindohoué F., Bruneval P., Cugnenc P.H., Trajanoski Z., Fridman W.H., Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – P. 1960-4.

66. Gao W.T., Zhang J.J., Zhu Y., Wei J.S., Meng K., Chen J.M., Wu J.L., Miao Y. Pentamer guided HLA-restricted epitope identification for mucoprotein 4 antigen of pancreatic ductal adenocarcinoma // *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. – 2010. – Vol. 48. – P. 1416-24.
67. Ginodi I., Vider-Shalit T., Tsaban L., Louzoun Y. Precise score for the prediction of peptides cleaved by the proteasome // *Bioinformatics*. – 2008. – Vol. 24. – P. 477-83.
68. Gires O., Klein C.A., Baeuerle P.A. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells // *Nat Rev Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – P. 143.
69. Gold P., Freedman S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system // *J Exp Med*. – 1965. – Vol. 122. – P. 467-81.
70. Gold P., Goldenberg N.A. The carcinoembryonic antigen (CEA): past, present, and future // *McGill J Med*. – 1997. – Vol. 3. – P. 46-66.
71. Grégoire M., Garrigue L., Blottière H.M., Denis M.G., Meflah K. Possible involvement of TGF beta 1 in the distinct tumorigenic properties of two rat colon carcinoma clones // *Invasion Metastasis*. – 1992. – Vol. 12. – P. 185-96.
72. Groux H., Bigler M., de Vries J.E., Roncarolo M.G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells // *J Exp Med*. – 1996. – Vol. 184. – P. 19–29.
73. Guba M., Seeliger H., Kleespies A., Jauch K.W., Bruns C. Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer // *Int J Colorectal Dis*. – 2004. – Vol. 19. – P. 510-7.
74. Gückel B., Rentzsch C., Nastke M.D., Marmé A., Gruber I., Stevanović S., Kayser S., Wallwiener D. Pre-existing T-cell immunity against mucin-1 in breast cancer patients and healthy volunteers // *J Cancer Res Clin Oncol*. – 2006. – V. 132. – P. 265-74.
75. Guzinska-Ustymowicz K., Kemon A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer // *World J Gastroenterol*. – 2005. – Vol. 11. – P. 1193-5.

76. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues // *Semin Cancer Biol.* – 1999. – Vol. 9. – P. 67-81.
77. Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M.N., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens // *Immun Rev.* – 2004. – Vol. 199. – P. 9-26.
78. Herbeuval J.P., Lelievre E., Lambert C., Dy M., Genin C. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage derived IL-6 // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 4630–6.
79. Heriot A.G., Marriott J.B., Cookson S., Kumar D., Dalglish A.G. Reduction in cytokine production in colorectal cancer patients: association with stage and reversal by resection // *Br J Cancer.* – 2000. – Vol. 82. – P. 1009-12.
80. Herlyn M., Stepkowski Z., Herlyn D., Koprowski H. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1979. – Vol. 76. – P. 1438-42.
81. Hobo W., Strobbe L., Maas F., Fredrix H., Greupink-Draaisma A., Esendam B., de Witte T., Preijers F., Levenga H., van Rees B., Raymakers R., Schaap N., Dolstra H. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with MAGE3, Survivin and B-cell maturation antigen mRNA for vaccination of multiple myeloma patients // *Cancer Immunol Immunother.* – 2013. – Vol. 62. – P. 1381-92.
82. Hollingsworth M.A., Swanson B.J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface // *Nat Rev Cancer.* – 2004. – Vol. 4. – P. 45-60.
83. Holzthutter H.G., Frommel C., Kloetzel P.M. A theoretical approach towards the identification of cleavage-determining amino acid motifs of the 20S proteasome // *J Mol Biol.* – 1999. – Vol. 286. – P. 1251–65.
84. Hsiao Y.W., Liao K.W., Hung S.W., Chu R.M. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and

- restores the lymphokine-activated killing activity // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 1508-14.
85. Huang A., Gilmour J.W., Imami N., Amjadi P., Henderson D.C., Allen-Mersh T.G. Increased serum transforming growth factor-beta1 in human colorectal cancer correlates with reduced circulating dendritic cells and increased colonic Langerhans cell infiltration // *Clin Exp Immunol.* – 2003. – Vol. 134. – P. 270-8.
86. Huang Y., Fayad R., Smock A., Ullrich A.M., Qiao L. Induction of mucosal and systemic immune responses against human carcinoembryonic antigen by an oral vaccine // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 6990-9.
87. Huebener N., Fest S., Strandsby A., Michalsky E., Preissner R., Zeng Y., Gaedicke G., Lode H.N. A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity // *Mol Cancer Ther.* – 2008. – Vol. 7. – P. 2241-51.
88. Inzkirweli N., Gückel B., Sohn C., Wallwiener D., Bastert G., Lindner M. Antigen loading of dendritic cells with apoptotic tumor cell-preparations is superior to that using necrotic cells or tumor lysates // *Anticancer Res.* – 2007. – Vol. 27. – P. 2121-9.
89. Ishioka G.Y., Fikes J., Hermanson G., Livingston B., Crimi C., Qin M., del Guercio M.F., Oseroff C., Dahlberg C., Alexander J., Chesnut R.W., Sette A. Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes // *J Immunol.* – 1999. - Vol. 62. – P. 3915-25.
90. Jiang W., Swiggard W.J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing // *Nature.* – 1995. – Vol. 375. – P.151–55.
91. Jonckheere N., Vincent A., Perrais M., Ducourouble M.P., Male A.K., Aubert J.P., Pigny P., Carraway K.L., Freund J.N., Renes I.B., Van Seuningen I. The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by

- caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 22638-50.
92. Kaminska B., Wesolowska A., Danilkiewicz M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis // *Acta Biochim Pol.* – 2005. – Vol. 52. – P. 329-37.
93. Kammer G.M. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response // *Immunol Today.* – 1988. – Vol. 9. – P. 222-9.
94. Kanazawa M., Yoshihara K., Abe H., Iwadate M., Watanabe K., Suzuki S., Endoh Y., Takita K., Sekikawa K., Takenoshita S., Ogata T., Ohto H. Effects of PSK on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients // *Anticancer Res.* – 2005. – Vol. 25. – P. 443-9.
95. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease // *Altern Med Rev.* – 2003. – Vol. 8. – P. 223-46.
96. Kim-Schulze S., Kim H.S., Wainstein A., Kim D.W., Yang W.C., Moroziewicz D., Mong P.Y., Bereta M., Taback B., Wang Q, Kaufman H.L. Intrarectal vaccination with recombinant vaccinia virus expressing carcinoembryonic antigen induces mucosal and systemic immunity and prevents progression of colorectal cancer // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 8112-19.
97. Kojima M., Shiokawa A., Ohike N., Ohta Y., Kato H., Iwaku K., Hayasi R., Morohoshi T. Clinical significance of nuclear morphometry at the invasive front of T1 colorectal cancer and relation to expression of VEGF-A and VEGF-C // *Oncology.* – 2005. – Vol. 68. – P. 230-8.
98. Komatsu M., Jepson S., Arango M.E., Carothers Carraway C.A., Carraway K.L. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 461-70.

99. Kondo M., Suzuki H., Takehara K., Miyazono K., Kato M. Transforming growth factor-beta signaling is differentially inhibited by Smad2D450E and Smad3D407E // *Cancer Sci.* – 2004. – Vol. 95. – P. 12-7.
100. Kondo Y., Arai S., Mori A., Furutani M., Chiba T., Imamura M. Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line // *Clin Cancer Res.* – 2000. – Vol. 6. – P. 622-30.
101. Lahm H., Schindel M., Frikart L., Cerottini J.P., Yilmaz A., Givel J.C., Fischer J.R. Selective suppression of cytokine secretion in whole blood cell cultures of patients with colorectal cancer // *Br J Cancer.* – 1998. – Vol. 78. – P. 1018-23.
102. Laxmanan S., Robertson S.W., Wang E., Lau J.S., Briscoe D.M., Mukhopadhyay D. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 334. – P. 193-8.
103. Lesterhuis W.J., De Vries I.J., Schreiber G., Schuurhuis D.H., Aarntzen E.H., De Boer A., Scharenborg N.M., Van De Rakt M., Hesselink E.J., Figdor C.G., Adema G.J., Punt C.J. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients // *Anticancer Res.* – 2010. – Vol. 30. – P. 5091-7.
104. Li D.Y., Gu C., Min J., Chu Z.H., Ou Q.J. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells // *Exp Ther Med.* – 2012. – Vol. 4. – P. 131-134.
105. Li Q., Pan P.Y., Gu P., Xu D., Chen S.H. Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64. – P. 1130-9.
106. Lindmark G., Bergström R., Pählman L., Glimelius B. The association of preoperative serum tumour markers with Dukes' stage and survival in colorectal cancer // *Br J Cancer.* – Vol. 71. – P. 1090–4.

107. Lindquist J.A., Jensen O.N., Mann M., Hämmerling G.J. ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – P. 2186-95.
108. Liu K.J., Wang C.C., Chen L.T., Cheng A.L., Lin D.T., Wu Y.C., Yu W.L., Hung Y.M., Yang H.Y., Juang S.H., Whang-Peng J. Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A*0201 and HLA-A*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides // Clin Cancer Res. – 2004. – Vol. 10. – P. 2645-51.
109. Liu K.J., Wang C.C., Chen L.T., Cheng A.L., Lin D.T., Wu Y.C., Yu W.L., Hung Y.M., Yang H.Y., Juang S.H., Whang-Peng J. Generation of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific T-cell responses in HLA-A*0201 and HLA-A*2402 late-stage colorectal cancer patients after vaccination with dendritic cells loaded with CEA peptides // Clin Cancer Res. – 2004. – Vol. 10. – P. 2645-51.
110. Lönnroth C., Andersson M., Arvidsson A., Nordgren S., Brevinge H., Lagerstedt K., Lundholm K. Preoperative treatment with a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) increases tumor tissue infiltration of seemingly activated immune cells in colorectal cancer // Cancer Immun. – 2008. – Vol. 8. – P. 5-14.
111. Louhimo J., Carpelan-Holmström M., Alfthan H., Stenman U.H., Järvinen H.J., Haglund C. Serum HCG β , CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer // Int J Cancer. – 2002. – Vol. 101. – P. 545-8.
112. Louzoun Y., Vider T., Weigert M. T-cell epitope repertoire as predicted from human and viral genomes // Mol. Immunol. – 2006. – Vol. 43. – P. 559–569.
113. Lyko F., Martoglio B., Jungnickel B., Rapoport T.A., Dobberstein B. Signal sequence processing in rough microsomes // J Biol Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 19873–8.

114. Mailliard R.B., Lotze M.T. Dendritic cells prolong tumor-specific T-cell survival and effector function after interaction with tumor targets // *Clin Cancer Res.* – 2001. – Vol. 7. – P. 980-8.
115. Mall A.S., Tyler M.G., Ho S.B., Krige J.E., Kahn D., Spearman W., Myer L., Govender D. The expression of MUC mucin in cholangiocarcinoma // *Pathol Res Pract.* – 2010. – Vol. 206. – P. 805-9.
116. Marhaba R., Klingbeil P., Nuebel T., Nazarenko I., Buechler M.W., Zoeller M. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers // *Curr Mol Med.* – 2008. – Vol. 8. – P. 784-804.
117. Martoglio B., Dobberstein B. Signal sequences: more than just greasy peptides // *Trends Cell Biol.* – 1998. – Vol.8. – P. 410-5.
118. Masini E., Fabbroni V., Giannini L., Vannacci A., Messerini L., Perna F., Cortesini C., Cianchi F. Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage // *Inflamm Res.* – 2005. – Vol. 54. – P. 80–1.
119. Matsuda M., Salazar F., Petersson M., Masucci G., Hansson J., Pisa P., Zhang Q.J., Masucci M.G., Kiessling R. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression // *J Exp Med.* – 1994. – Vol. 180. – P. 2371–6.
120. Merika E., Saif M.W., Katz A., Syrigos K., Morse M. Review. Colon cancer vaccines: an update // *In Vivo.* – 2010. – Vol. 24. – P. 607-28.
121. Merika E., Saif M.W., Katz A., Syrigos K., Morse M. Review. Colon cancer vaccines: an update // *In Vivo.* – 2010. – Vol. 24. – P. 607-28.
122. Merogi A.J., Marrogi A.J., Ramesh R., Robinson W.R., Fermin C.D., Freeman S.M. Tumor-host interaction: analysis of cytokines, growth factors, and tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinomas // *Hum Pathol.* – 1997. – Vol. 28. – P. 321-31.
123. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol. 352. - P. 476-87.

124. Mocellin S., Pilati P., Nitti D. Peptide-based anticancer vaccines: recent advances and future perspectives // *Curr Med Chem.* – 2009. – Vol. 16. – P. 4779-96.
125. Moniaux N., Chaturvedi P., Varshney G.C., Meza J.L., Rodriguez-Sierra J.F., Aubert J.P., Batra S.K. Human MUC4 mucin induces ultra-structural changes and tumorigenicity in pancreatic cancer cells // *Br J Cancer.* – 2007. – Vol. 97. – P. 345-57.
126. Morse M.A., Clay T.M., Hobeika A.C., Osada T., Khan S., Chui S., Niedzwiecki D., Panicali D., Schlom J., Lyerly H.K. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 3017-24.
127. Morse M.A., Deng Y., Coleman D., Hull S., Kitrell-Fisher E., Nair S., Schlom J., Ryback M.E., Lyerly H.K. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen // *Clin Cancer Res.* – 1999. – Vol. 5. – P. 1331-8.
128. Morse M.A., Lyerly H.K. DNA and RNA modified dendritic cell vaccines // *World J Surg.* – 2002. – Vol. 26. – P. 819-25.
129. Morse M.A., Nair S.K., Mosca P.J., Hobeika A.C., Clay T.M., Deng Y., Boczkowski D., Proia A., Niedzwiecki D., Clavien P.A., Hurwitz H.I., Schlom J., Gilboa E., Lyerly H.K. Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA // *Cancer Invest.* – 2003. – Vol. 21. – P. 341-9.
130. Mosolits S., Markovic K., Frödin J.E., Virving L., Magnusson C.G., Steinitz M., Fagerberg J., Mellstedt H. Vaccination with Ep-CAM protein or anti-idiotypic antibody induces Th1-biased response against MHC class I- and II-restricted Ep-CAM epitopes in colorectal carcinoma patients // *Clin Cancer Res.* – 2004. – Vol. 10. – P. 5391-402.

131. Mou H.B., Lin M.F., Cen H., Yu J., Meng X.J. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression // *J Zhejiang Univ Sci.* – 2004. – Vol. 5. – P. 1239-44.
132. Munz M., Baeuerle P.A., Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling // *Cancer Res.* – 2009. – Vol.69. – P. 5627-9.
133. Nair S.K., Morse M., Boczkowski D., Cumming R.I., Vasovic L., Gilboa E., Lyerly H.K. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells // *Ann Surg.* – 2002. – Vol. 235. – P. 540-9.
134. Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A., Saigenji K., Nagura H., Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 3491-4.
135. Nakayama H., Kitayama J., Muto T., Nagawa H. Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer // *Jpn J Clin Oncol.* – 2000. – Vol. 30. – P. 301-5.
136. Nakayama T., Yamashita M. Initiation and maintenance of Th2 cell identity // *Curr Opin Immunol.* – 2008. – Vol. 20. – P. 265-71.
137. Narai S., Watanabe M., Hasegawa H., Nishibori H., Endo T., Kubota T., Kitajima M. Significance of transforming growth factor beta1 as a new tumor marker for colorectal cancer // *Int J Cancer.* – 2002. – Vol. 97. – P. 508-11.
138. Nersting J., Svenson M., Andersen V., Bendtzen K. Maturation of human dendritic cells by monocyte-conditioned medium is dependent upon trace amounts of lipopolysaccharide inducing tumour necrosis factor alpha // *Immunol Lett.* – 2003. – Vol. 89. – P. 59-65.
139. Nicolette C.A., Healey D., Tcherepanova I., Whelton P., Monesmith T., Coombs L., Finke L.H., Whiteside T., Miesowicz F. Dendritic cells for active immunotherapy: optimizing design and manufacture in order to

- develop commercially and clinically viable products // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – P. 47-60.
140. Obermaier B., Dauer M., Herten J., Schad K., Endres S., Eigler A. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes // *Biol Proced Online*. – 2003. – Vol. 5. – P. 197-203.
141. Obleukhova I.A., Kurilin V.V., Goncharov M.A., Tarkhov A.V., Krasil'nikov S.E., Sennikov S.V. Effect of mature dendritic cells primed with autologous tumor antigens from patients with epithelial ovarian cancer on stimulation of the cytotoxic immune response in culture of mononuclear cells // *Bull Exp Biol Med*. – 2013. – Vol. 156(1). – P. 161-4.
142. O'Hara R.J., Greenman J., MacDonald A.W., Gaskell K.M., Topping K.P., Duthie G.S., Kerin M.J., Lee P.W., Monson J.R. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production // *Clin Cancer Res*. – 1998. – Vol. 4. – P. 1943-8.
143. Ohm J.E., Gabrilovich D.I., Sempowski G.D., Kisseleva E., Parman K.S., Nadaf S., Carbone D.P. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 4878-86.
144. Ojima T., Iwahashi M., Nakamura M., Matsuda K., Nakamori M., Ueda K., Naka T., Ishida K., Primus F.J., Yamaue H. Successful cancer vaccine therapy for carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing colon cancer using genetically modified dendritic cells that express CEA and T helper-type 1 cytokines in CEA transgenic mice // *Int J Cancer*. – 2007. – Vol. 120. – P. 585-93.
145. Ordemann J., Jacobi C.A., Braumann C., Schwenk W., Volk H.D., Muller J.M. Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer // *Int J Colorectal Dis*. – 2002. – Vol. 17. – P. 37–41.
146. Oyama T., Ran S., Ishida T., Nadaf S., Kerr L., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation

- through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 1224-32.
147. Pagès F., Berger A., Camus M., Sanchez-Cabo F., Costes A., Molidor R., Mlecnik B., Kirilovsky A., Nilsson M., Damotte D., Meatchi T., Bruneval P., Cugnenc P.H., Trajanoski Z., Fridman W.H, Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer // *N Engl J Med.* – 2005. – Vol. 353. – P. 2654-66.
148. Palmer D.H., Chen M.J., Kerr D.J. Gene therapy for colorectal cancer // *Br Med Bull.* – 2002. – Vol. 64. – P. 201-25.
149. Parkhurst M.R., Joo J., Riley J.P., Yu Z., Li Y., Robbins P.F., Rosenberg S.A. Characterization of genetically modified T-cell receptors that recognize the CEA:691-699 peptide in the context of HLA-A2.1 on human colorectal cancer cells // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol. 15. – P. 169-80.
150. Parmiani G., Castelli C., Dalerba P., Mortarini R., Rivoltini L., Marincola F.M., Anichini A. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? // *J Natl Cancer Inst.* – 2002. – Vol. 94. – P. 805-18.
151. Pecher G., Häring A., Kaiser L., Thiel E. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial // *Cancer Immunol Immunother.* – 2002. – Vol. 51. – P. 669-73.
152. Pellegrini P., Berghella A.M., Del Beato T., Cicia S., Adorno D., Casciani C.U. Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression // *Cancer Immunol Immunother.* – 1996. – Vol. 42. – P. 1-8.
153. Pernot S., Terme M., Voron T., Colussi O., Marcheteau E., Tartour E., Taieb J. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – P. 3738-50.
154. Pietersz G.A. Enhanced immune responses to an adenovirus CEA vaccine in CD4+CD25+ regulatory T-cell inactivated mice // *Expert Rev Vaccines.*

- 2007. – Vol. 6(1). – P. 21-3.
155. Rafi A., Castle S.C., Uyemura K., Makinodan T. Immune dysfunction in the elderly and its reversal by antihistamines // *Biomed Pharmacother.* – 2003. – Vol. 57. – P. 246–50.
156. Reiter W., Stieber P., Reuter C., Nagel D., Lau-Werner U., Lamerz R. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer // *Anticancer Res.* – 2000. – Vol. 20. – P. 5195-8.
157. Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccines // *Cancer Invest.* – 2003. – Vol. 21. – P. 873-86.
158. Ries L.A.G., Melbert D., Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review 1975-2005 // Bethesda, MD. – 2008. - P. 328.
159. Rodriguez F., Zhang J., Whitton J.L. DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction // *J Virol.* – 1997. – Vol. 71. – P. 8497–503.
160. Rose M.C., Voynow J.A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease // *Physiol Rev.* – 2006. – Vol. 86. – P. 245-78.
161. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (review) // *Int J Oncol.* – 2010. – Vol. 37. – P. 1361-78.
162. Rozkova D., Horvath R., Bartunkova J., Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors // *Clin Immunol.* – 2006. – Vol. 120(3). – P. 260-71.
163. Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood // *J Exp Med.* – 1999. – Vol. 190. – P. 157-67.

164. Sabado R.L., Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment // *Immunotherapy*. – 2010. – Vol. 2(1). – P. 37–56.
165. Sallusto F., Cella M., Danieli C., Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products // *J Exp Med*. – 1995. – Vol. 182. – P. 389-400.
166. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance // *Annu Rev Immunol*. – 2004. – Vol. 22. – P. 745-63.
167. Schmitt E., Parcellier A., Ghiringhelli F., Casares N., Gurbuxani S., Droin N., Hamai A., Pequignot M., Hammann A., Moutet M., Fromentin A., Kroemer G., Solary E., Garrido C. Increased immunogenicity of colon cancer cells by selective depletion of cytochrome C // *Cancer Res*. – 2004. – Vol. 64. – P. 2705-11.
168. Schnurr M., Galambos P., Scholz C., Then F., Dauer M., Endres S., Eigler A. Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61. – P. 6445-50.
169. Sebastian M. Review of catumaxomab in the treatment of malignant ascites // *Cancer Manag Res*. – 2010. – Vol. 2. – P. 283-6.
170. Shanmugam C., Jhala N.C., Katkoori V.R., Wan W., Meleth S., Grizzle W.E., Manne U. Prognostic value of mucin 4 expression in colorectal adenocarcinomas // *Cancer*. – 2010. – Vol. 116. – P. 3577-3586.
171. Sharma R.A., Dalglish A.G., Steward W.P., O’Byrne K.J. Angiogenesis and the immune response as targets for the prevention and treatment of colorectal cancer (review) // *Oncol Rep*. – 2003. – Vol. 10. – P. 1625–31.

172. Shunyakov L., Ryan C.K., Sahasrabudhe D.M., Khorana A.A. The influence of host response on colorectal cancer prognosis // *Clin Colorectal Cancer*. – 2004. – Vol. 4. – P. 38-45.
173. Singh A.P., Chaturvedi P., Batra S.K. Emerging roles of MUC4 in cancer: a novel target for diagnosis and therapy // *Cancer Res*. – 2007. – Vol. 67. – P. 433-6.
174. Small E.J., Fratesi P., Reese D.M., Strang G., Laus R., Peshwa M.V., Valone F.H. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells // *J Clin Oncol*. – 2000. – Vol. 18. – P. 3894-903.
175. Spizzo G., Fong D., Wurm M., Ensinger C., Obrist P., Hofer C., Mazzoleni G., Gastl G., Went P. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis // *J Clin Pathol*. – 2011. – Vol. 64. – P. 415-20.
176. Steele J.C., Rao A., Marsden J.R., Armstrong C.J., Berhane S., Billingham L.J., Graham N., Roberts C., Ryan G., Uppal H., Walker C., Young L.S., Steven N.M. Phase I/II trial of a dendritic cell vaccine transfected with DNA encoding melan A and gp100 for patients with metastatic melanoma // *Gene Ther*. – 2011. – Vol. 18. – P. 584-93.
177. Suzuki A., Masuda A., Nagata H., Kameoka S., Kikawada Y., Yamakawa M., Kasajima T. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma // *J Pathol*. – 2002. – Vol. 196. – P. 37-43.
178. Takahashi K., Tanaka S., Furuta K., Ichikawa A. Histamine H(2) receptor-mediated modulation of local cytokine expression in a mouse experimental tumor model // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2002. – Vol. 297. – P. 1205-10.
179. Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., Plunkett T., Graham R., Correa I., Miles D., Smith M. MUC1 and the immunobiology of cancer // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. – 2002. – Vol. 7. – P. 209-221.

180. Titu L.V., Monson J.R., Greenman J. The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer // *Cancer Immunol Immunother.* – 2002. – Vol. 51. – P. 235-47.
181. Tomita K., Okabe S. Exogenous histamine stimulates colorectal cancer implant growth via immunosuppression in mice // *J Pharmacol Sci.* – 2005. – Vol. 97. – P. 116–23.
182. Tourdot S., Scardino A., Saloustrou E., Gross D.A., Pascolo S., Cordopatis P., Lemonnier F.A., Kosmatopoulos K. A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes // *European Journal of Immunology.* – 2000. – Vol. 30. – P. 3411–21.
183. Trambas C.M., Griffiths G.M. Delivering the kiss of death. Review // *Nat Immunol.* – 2003. – Vol. 4. – P. 399-403.
184. Tsang K.Y., Palena C., Yokokawa J., Arlen P.M., Gulley J.L., Mazzara G.P., Gritz L., Yafal A.G., Ogueta S., Greenhalgh P., Manson K., Panicali D., Schlom J. Analyses of recombinant vaccinia and fowlpox vaccine vectors expressing transgenes for two human tumor antigens and three human costimulatory molecules // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1597-607.
185. Vider-Shalit T., Fishbain V., Raffaelli S., Louzoun Y. Phase-dependent immune evasion of herpesviruses // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81. –P. 9536–45.
186. Waldner M.J., Wirtz S., Becker C., Seidel D., Tubbe I., Cappel K., Hähnel P.S., Galle P.R., Schuler M., Neurath M.F. Perforin deficiency attenuates inflammation and tumor growth in colitis-associated cancer // *Inflamm Bowel Dis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 559-67.
187. Wei J., Gao W., Wu J., Meng K., Zhang J., Chen J., Miao Y. Dendritic cells expressing a combined PADRE/MUC4-derived polyepitope DNA vaccine induce multiple cytotoxic T-cell responses // *Cancer Biother Radiopharm.* – 2008. – Vol. 23. – P. 121-8.

188. Weissman D., Ni H., Scales D., Dude A., Capodici J., McGibney K., Abdool A., Isaacs S.N., Cannon G., Karikó K. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 4710-7.
189. Weitz J., Koch M., Debus J., Höhler T., Galle P.R., Büchler M.W. Colorectal cancer // *Lancet.* – 2005. – Vol. 365. – P. 153-65.
190. Went P.T., Lugli A., Meier S., Bindi M., Mirlacher M., Sauter G., Dirnhofer S. Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas // *Hum Pathol.* – 2002. – Vol. 35. – P. 122-8.
191. Willimsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance // *Nature.* – 2005. – Vol. 437. – P. 141-6.
192. Winter M.J., Nagtegaal I.D., van Krieken J.H., Litvinov S.V. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology // *Am J Pathol.* – 2003. – Vol. 163. – P. 2139-2148.
193. Wu Y.G., Wu G.Z., Wang L., Zhang Y.Y., Li Z., Li D.C. Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce a T cell response against colon cancer in vitro and in vivo // *Med Oncol.* – 2010. – Vol. 27. – P. 736-42.
194. Xing P.X., Prenzoska J., Layton G.T., Devine P.L., McKenzie I.F. Second generation monoclonal antibodies to intestinal MUC2 peptide reactive with colon cancer // *J Natl Cancer Inst.* – 1992. – Vol. 84. – P. 699-703.
195. Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity // *J Experim Med.* – 2002. – Vol. 195. – P. 9-14.
196. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance // *Nat Rev Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – P. 263-74.