

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

На правах рукописи

ХАНТАКОВА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

Влияние дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-  
конструкциями, на индукцию цитотоксического ответа культуры моноклеар-  
ных клеток больных раком молочной железы

14.03.09 – “Клиническая иммунология, аллергология”

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

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

Новосибирск

2016

## Оглавление

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Дендритные клетки и Т-лимфоциты .....	12
1.2. Основные опухоль-ассоциированные антигены при раке молочной железы .....	25
1.3. Преимущества и недостатки различных источников опухолевых антигенов для праймирования дендритных клеток.....	35
Глава 2. Материалы и методы.....	42
Глава 3. Результаты исследований .....	54
3.1 Оценка протокола получения зрелых дендритных клеток в группе условно-здоровых доноров .....	54
3.2 Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК конструкциями, на цитотоксический потенциал культуры мононуклеарных клеток условно- здоровых доноров.....	55
3.3 Оценка протокола получения зрелых дендритных клеток в группе больных раком молочной железы .....	59
3.4 Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01- специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток больных раком молочной железы .....	61
3.5 Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A*02:01- специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток больных раком молочной железы в зависимости от наличия генотипа HLA-A*02 .....	65

3.6 Влияние дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, на цитотоксический потенциал моноклеарных клеток больных раком молочной железы.....	71
Глава 4. Обсуждение.....	76
Глава 5. Заключение .....	90
Выводы.....	93
Список литературы .....	96
Приложение 1 Дизайн ДНК-конструкций.....	118

## Введение

Несмотря на развитие новых методов лечения рака молочной железы (РМЖ), смертность от данной патологии до сих пор занимает одно из ведущих мест в мире в структуре онкологических заболеваний среди женского населения [под ред. Давыдова]. Исследования в области клеточной и молекулярной биологии, иммунологии, развитие новых биотехнологий позволило выделить ряд патогенетических причин, которые, в конечном итоге, приводят к опухолевой трансформации нормальных клеток организма [Colotta F., 2009]. Успехи в онкоиммунологии, связанных с пониманием причин возникновения опухолевого перерождения и закономерностей патогенетических механизмов развития опухолевого процесса, а также открытие ряда опухолевых антигенов, распознающихся иммунокомпетентными клетками, позволило начать разрабатывать методы воздействия на эффекторные клетки иммунной системы для формирования эффективного противоопухолевого иммунного ответа [Coussens 2002; Anderson, 2009; Mantovani A., 2007].

Многочисленные исследования показали, что в организме больных различными онкологическими заболеваниями, и РМЖ в частности, возможно формирование слабого противоопухолевого иммунного ответа [Grivennikov S.I., 2010], который в некоторых случаях может способствовать «спонтанному» регрессу опухоли. [Shankaran V., 2001; Disis M.L., 2010]. Однако в большинстве исследований показано подавление развития противоопухолевых цитотоксических реакций, увеличивающееся по мере возрастания опухолевой нагрузки [Grivennikov S.I., 2010]. Такое ингибирование иммунного ответа может быть связано как с недостаточной иммуногенностью опухолевых клеток (связанная с недостаточной экспрессией опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА)), так и со способностью опухоли вызывать местную и системную иммунодепрессию, за счет секреции таких цитокинов, как интерлейкин-10 (ИЛ-10) и трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ ), а также ряда медиаторов, таких как простагландин E2 и IDO. [Nagorsen D., 2008]. Секретируемые опухолью факторы приводят к подавлению активности дендритных клеток (ДК), как основных антиген-презентирующих кле-

ток (АПК), нарушая в них экспрессию костимуляторных молекул (например, CD80, CD86, CD40), участвующих в процессе презентации ОАА наивным Т-клеткам. В конечном итоге, это приводит к снижению активации и противоопухолевой функции Т-лимфоцитов [Koski G.K., 2008].

Дендритные клетки являются привлекательным объектом исследований для коррекции нарушений презентации ОАА и стимуляции образования антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) благодаря их модулирующей активности в отношении иммунокомпетентных клеток [Шевченко Ю.А., 2009; Сенников С.В., 2009]. Они являются профессиональными АПК, которые способны распознавать, захватывать, обрабатывать и представлять антигены в комплексе с молекулами МНС I и II класса Т-лимфоцитам для запуска иммунологических механизмов элиминации опухоли. Это достигается также за счет экспрессии большого количества костимуляторных молекул (например, CD80, CD86) на поверхности ДК, необходимых для эффективной презентации ОАА в комплексе с молекулами МНС [Koski G.K., 2008]. Праймированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты секретируют такие цитокины, как интерферон гамма (ИФН- $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ), которые способствуют пролиферации ЦТЛ, разрушению опухолевой ткани и потенциальному контролю и даже элиминации опухолевых клеток [Dunn G.P., 2006].

В настоящее время, в мире активно разрабатываются различные способы доставки опухолевых антигенов в ДК, например с использованием антигенов лизата опухолевых клеток, пептидов, мРНК, ДНК-конструкций, кодирующих эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, что позволяет создавать на их основе как терапевтические, так и профилактические вакцины [Paluchka A.K., 2011a, Banchereau J., 2005]. Каждая опухоль имеет индивидуальные антигенные особенности, поэтому использование лизата опухолевых клеток позволяет сформировать клеточный иммунный ответ против конкретной опухолевой ткани. Использование в качестве антиген-несущих конструкций мРНК, выделенных из опухолевых клеток, позволяет повысить концентрацию опухоль-ассоциированных антигенов за счет многократного синтеза молекул пептидов после проникновения трансляци-

онно-активной мРНК в дендритные клетки. Известно, что антигенный профиль опухоли может меняться в ходе опухолевого процесса и при проведении химио- и лучевой терапии. В связи с этим, выделенные из самой ткани опухоли антигены будут характеризовать антигенный профиль опухолевых клеток на данном этапе развития, и не перекрывать его возможное изменения. В связи с этим, одним из перспективных подходов получения функционально-активных ДК для активации противоопухолевого иммунного ответа является использование в качестве источника антигенов ДНК-конструкций, кодирующих генетические последовательности опухолевых антигенов и/или их отдельных иммуногенных эпитопов. Благодаря возможности включения в состав ДНК-конструкций нескольких иммуногенных эпитопов различных ОАА, удастся достичь максимального перекрытия антигенного профиля опухолевых клеток, тем самым способствуя генерации наибольшего количества антиген-специфических клонов ЦТЛ, участвующих в элиминации трансформированных клеток. Также, такие полиэпитопные ДНК-конструкции позволяют преодолевать возможное изменение антигенного профиля опухолевых клеток в связи с их трансформацией в ходе канцерогенеза или в связи с проводимым терапевтическим воздействием. Используя методы компьютерного моделирования для создания ДНК-конструкций, удастся уменьшить риск развития аутоиммунных или иммуносупрессивных реакций, благодаря отбору только иммуностимулирующих эпитопов ОАА [Palucka K., 2011a]. В ходе разработки конструкций, происходит отбор эпитопов, которые наиболее эффективно могут быть представлены в комплексе с определенным МНС и, соответственно, разработка HLA-специфических генетических конструкций увеличивает шанс развития эффективного специфического CD8<sup>+</sup> и/или CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа. Кроме того, ДНК/РНК-конструкции обеспечивают более длительное представление иммуногенных эпитопов для процессинга и презентации зрелыми дендритными клетками.

Таким образом, возможность антиген-специфической активации дендритных клеток с формированием противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа на сегодняшний день рассматривается как один из перспективных методов

борьбы с онкологическими заболеваниями. Использование ДНК-конструкций, кодирующих различные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, в качестве источника целевых иммуногенов для трансфекции дендритных клеток, представляется актуальным и перспективным направлением по исследованию возможности стимуляции противоопухолевого иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток периферической крови больных раком молочной железы [Сенников С.В., 2015].

**Целью** данной работы является изучение эффективности индукции клеточного цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток периферической крови больных раком молочной железы с помощью зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими иммуногенные эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов.

**Задачи:**

1. Изучить влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-*neu* или кодирующими полноразмерный белок ErbB2, на цитотоксический потенциал (прямую цитотоксическую и перфорин-синтезирующую активность) мононуклеарных клеток HLA-A\*02-позитивных условно-здоровых доноров против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7.
2. Изучить эффективность индукции цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы с помощью дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов.
3. Оценить эффективность индукции цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток HLA-A\*02-позитивных и HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы с помощью дендритных

клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов.

4. Сравнить эффективность стимуляции цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы дендритными клетками, праймированными антигенами лизата опухолевых клеток или полиэпитопными ДНК-конструкциями.

#### **Научная новизна работы:**

Продемонстрировано, что дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-неу, по сравнению с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок ERBB2, более эффективно индуцируют способность мононуклеарных клеток здоровых доноров вызывать гибель опухолевых клеток линии MCF-7 связанное с увеличением перфорин-позитивных клеток как одних из возможных медиаторов цитотоксичности, что свидетельствует об эффективности использования отдельных иммуногенных эпитопов в составе ДНК-конструкции для презентации зрелыми дендритными клетками.

Также впервые показано, что зрелые дендритные клетки, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов, индуцируют способность мононуклеарных клеток вызывать гибель аутологичных опухолевых клеток при совместном культивировании, о чем свидетельствует повышение цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных раком молочной железы против аутологичных опухолевых клеток, а также увеличение количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах.



Установлено, что дендритные клетки, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов индуцируют цитотоксический иммунный ответ в культуре мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток рака молочной железы как при добавление, так и без ИЛ-12 и ИЛ-18, в отличие от дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, которые индуцируют цитотоксический ответ МНК только при добавление костимуляторных факторов ИЛ-12 и ИЛ-18.

### **Теоретическая и практическая значимости работы:**

Использование для трансфекции зрелых дендритных клеток ДНК-конструкций, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащая HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, является более эффективным способом активации мононуклеарных клеток больных раком молочной железы, чем использование ДНК-конструкций, кодирующих полноразмерный белок ERBB2. Использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов является эффективным способом стимуляции цитотоксического потенциала мононуклеарных клеток больных раком молочной железы. Полученные данные указывают на то, что уровень стимуляции мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от HLA-A-гаплотипа больного и от типа используемой ДНК-конструкции. В отсутствие иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 дендритные клетки, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов, индуцируют формирование эффективного цитотоксического ответа мононуклеарных клеток только при соответствующем гаплотипе HLA\*02:01 больных раком молочной железы. Дополнительное воздействие иммунорегуляторных цитокинов

ИЛ-12 и ИЛ-18 на совместные культуры дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными HLA-A\*02:01-специфичными ДНК-конструкциями, и мононуклеарных клеток позволяет формировать клеточно-опосредованный цитотоксический ответ культуры мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток также в группе HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы.

Полученные данные о цитотоксическом противоопухолевом эффекте дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, сокультивированных с мононуклеарными клетками периферической крови, позволяют рассматривать их в качестве перспективного подхода для разработки новых методов клеточной иммунотерапии больных раком молочной железы. На основании проведенного исследования получен патент №2521506 «Способ генерации антиген-специфических цитотоксических клеток с противоопухолевой активностью при раке молочной железы» и подана заявка №201313546 на получение патента.

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

Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты нескольких опухоль-ассоциированных антигенов рака молочной железы, способствуют формированию цитотоксического клеточно-опосредованного иммунного ответа *in vitro*.

Способность к индукции цитотоксического ответа мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, зависит от структуры подобранных иммуногенов, входящих в ДНК-конструкции, и от HLA-A-гаплотипа больного.

#### **Апробация материалов диссертации:**

Материалы диссертации доложены и обсуждены:

1. 8-й отчетная конференция НИИКИ СО РАМН «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике», Новосибирск, 2011

2. Региональная конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии», Томск, 2012
3. SACS Annual Meeting «Diversity and plasticity of dendritic cells», Париж, 2012
4. Всероссийской научной конференции «Дендритные клетки в норме и при патологии» в рамках Объединенного иммунологического форума, Нижний Новгород 2013
5. 18th NAT Conference «Common perspectives in transplant and tumor immunology», Милан, 2013
6. XII Конференции иммунологов Урала, Пермь, 2015г

**Публикации:**

По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК. Получен 1 патент и подана 1 заявка на патент.

**Самостоятельность выполненной работы:**

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

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

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Дендритные клетки и Т-лимфоциты

В развитии противоопухолевого иммунного ответа ведущую роль играют антиген-презентирующие клетки (АПК) и Т-лимфоциты. Эти клетки взаимодействуют между собой с помощью прямых контактов или через продукцию цитокинов или хемокинов, которые действуют ауто- или паракринно для контроля и моделирования процесса роста опухоли. Среди антиген-презентирующих клеток, именно дендритные клетки рассматриваются как наиболее мощные профессиональные клетки для захвата и презентации различных видов антигенов [Banchereau J., 2005]. Они могут стимулировать местный иммунный ответ в очагах инфекции, а также служить переносчиками антигенов в лимфоидные органы для праймирования специфических Т-клеток.

#### Иммунология дендритных клеток

Дендритные клетки – антиген-презентирующие клетки костномозгового происхождения, которые способны инициировать и регулировать как врожденный, так и приобретенный Т-клеточный ( $CD4^+$  и  $CD8^+$ ) и В-клеточный иммунные ответы [Steinman M.R., 1991;].

На сегодняшний день в крови человека выделяют 2 основные субпопуляции ДК: миелоидные (мДК) и плазмоцитоидные (пДК). С помощью данных проточной цитофлуориметрии удалось установить, что данные субпопуляции разделяются на основании экспрессии поверхностных рецепторов. Так, плазмоцитоидные ДК высоко экспрессируют рецептор к ИЛ-3 ( $CD123$  или ИЛ-3R $\alpha$  цепь), TLR (Toll-like receptor) 1,6,7,9,10 и не экспрессируют  $CD11c$ , в то время как миелоидные ДК, наоборот, высоко экспрессируют  $CD11c$ , TLR: 1,2,3,4,5,6,8 и 10, но слабо экспрессируют  $CD123$  [Ueno H., 2007; Jarrossay D., 2001].

Незрелые ДК характеризуются высокой организацией цитоскелета, низкой подвижностью, и небольшим количеством отростков [Banchereau J., 2000]. Они экспрессируют низкий уровень костимуляторных молекул (например, CD80, CD83, CD86), молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) I и II типа, высокий уровень рецепторов к хемокинам (например, CCR7), которые позволяют им мигрировать в лимфатические узлы. Незрелые ДК способны слабо стимулировать пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. При этом они обладают выраженной способностью поглощать и обрабатывать различные антигены (АГ) [Rosenblatt J., 2003]. Дендритные клетки используют рецептор-опосредованный механизм и макропиноцитоз для захвата и эффективной презентации растворимых антигенов Т-клеткам. [Sallusto F., 1995].

Зрелые ДК характеризуются низкой плотностью цитоплазмы, многочисленными выростами, которые облегчают подвижность и увеличивают площадь для контакта с Т-клетками. По мере созревания ДК наблюдается снижение уровня экспрессии эндоцитозных и фагоцитозных рецепторов, что приводит к снижению способности захватывать антиген. Одновременно происходит увеличение уровня экспрессии костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD83, CD86) и комплекса МНС-антигенный пептид, что позволяет эффективно праймировать Т-клетки для запуска специфического иммунного ответа [Banchereau J., 2000; Sabatte, 2007].

Праймирование Т-клеток обеспечивается 3 основными сигналами [Ruffell B., 2010], [Diebold S.S., 2008; Russell S.M., 2008]:

- **Первый сигнал** - взаимодействие комплекса МНС-пептид с Т-клеточным рецептором (TCR). В зависимости от происхождения АГ (внутриклеточный или внеклеточный), его презентация может происходить в комплексе с МНС I и II, соответственно. При взаимодействии ДК с Т-клеточным рецептором, в зависимости от экспрессии I или II класса молекул МНС на поверхности ДК будут активироваться CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клетки, соответственно [Ackerman A.L., 2004]. Однако, возможен механизм перекрестной презентации, когда внеклеточный АГ представляется в комплексе с МНС I класса CD8<sup>+</sup>- клеткам. Эта способность позволяет ДК

праймировать CD8<sup>+</sup>-клеточный ответ для защиты от патогенов, которые не поражают непосредственно ДК [Ackerman A.L., 2004; Groothuis T.A., 2005].

- **Второй сигнал** - взаимодействие костимуляторных молекул, экспрессирующихся на поверхности АПК, таких как В7-1 (CD80), В7-2 (CD86) и др., с CD28 - костимуляторной молекулой на поверхности Т-клеток для указанных рецепторов АПК. В отсутствии костимуляторного сигнала не происходит активации Т-клеток, и они становятся толерогенными или входят в состояние анергии [Steinman T.M., 2003].

- **Третий сигнал** - цитокины, содержащиеся в микроокружении взаимодействующих клеток. Они направляют дифференцировку Т-клеток к различным типам эффекторов [Sabatte, J., 2007; Rossi M.; De Jong E.C., 2004]. Зрелые ДК продуцируют такие цитокины, как ИЛ-12, ИЛ-18 и ИФН- $\alpha$ , и способствуют развитию клеточного адаптивного иммунного ответа. Они поляризуют дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов (Th) 1-го типа, которые, в свою очередь, продуцируя ИФН- $\gamma$ , способствуют дифференцировке и развитию CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, разрушению опухолевой ткани и потенциальному контролю или даже элиминации рака. [De Jong E.C., 2004; Dunn G.P. 2006].

В зависимости от набора данных сигналов, наивные Т-клетки при контакте с ДК могут дифференцироваться либо в CD8<sup>+</sup> цитотоксические лимфоциты либо в CD4<sup>+</sup>-хелперы, которые распознают антигенные пептиды, представленные в комплексе с МНС I или МНС II, соответственно.

Рядом авторов было отмечено, что в отсутствии цитокинов *in vivo* CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, очевидно, способны обнаруживать АГ, но не могут эффективно отвечать на его различные формы, включая растворимые пептиды или белковые АГ [Schmidt C.S., 2002; Le Bon A., 2006]. Исходя из того, что опухоли не имеют адьювантных свойств, Curtsinger J.M. с соавт. предположили, что при узнавании опухоли CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами, может складываться ситуация, когда они распознают опухолевые АГ, но в связи с недостаточностью продукции цитокинов, их распространение либо не увеличивается до необходимого уровня, либо не достигается достаточная эффекторная функция ЦТЛ, и они перестают контролировать рост опухоли

[Curtsinger J.M.,2007].

Помимо влияния на дифференцировку CD4<sup>+</sup> Th1 и CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, ДК также могут способствовать дифференцировке и развитию CD4<sup>+</sup> Т-хелперов 2-го типа, секретируя ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. Считается, что данные цитокины подавляют развитие Th1 типа иммунного ответа [Sabatte, J.,2007; Amsen D., 2004], блокируя активацию транскрипционных факторов Th1 клеток, вместо которых происходит активация транскрипционных факторов, контролирующих развитие Th2 лимфоцитов [Amsen D., 2004; Romagnani S., 2006].

### **CD8<sup>+</sup> цитотоксические лимфоциты**

Многочисленные исследования показали, что по продукции ИФН- $\gamma$  и прямой гибели клеток-мишеней, CD8<sup>+</sup> ЦТЛ являются критическими эффекторами адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. Они осуществляют свою цитотоксическую функцию двумя основными механизмами: либо через высвобождение набора протеаз, так называемый гранулоопосредованный механизм (перфорин/гранзим), либо через семейство ФНО рецепторов (Fas- или TRAIL-рецепторы), так называемый ФНО-зависимый, или гранулoneзависимый/рецепторный путь гибели клеток [Liu K., 2006; Cullen S.P., 2010].

#### ***Гранулоопосредованный путь апоптоза***

Гранулоопосредованный механизм клеточной гибели традиционно рассматривается как основной механизм, который используют ЦТЛ для элиминации клеток-мишеней, в том числе и опухолевых [Rousalova I., 2010]. Он не требует от CD8<sup>+</sup> ЦТЛ синтеза белков de novo, вместо этого они используют предсинтезированные литические гранулы, расположенные в цитоплазме [Trapani, J.A., 2002b].

Литические гранулы – это мембран-связанные секреторные лизосомы, которые содержат плотное ядро, состоящее из различных белков, включая перфорин и гранзимы. Ядро окружено билипидным слоем, содержащим лизосом-ассоциированные мембранные гликопротеины (LAMPs), включая CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) и CD63 (LAMP-3). Функцией данных рецепторов считается предупреждение выхода ферментов из литических гранул и защита самих ЦТЛ от литического действия содержимого гранул [Peters, P.J., 1991].

Дегрануляция CD8<sup>+</sup> цитотоксических лимфоцитов происходит незамедлительно после активации TCR [Barry, M., 2002]. В результате полимеризации микротрубочек происходит транспорт литических гранул к иммунологическому синапсу, сформированному между ЦТЛ и клеткой-мишенью [Betts M.R., 2003], слияние мембраны литических гранул с клеточной мембраной и выход активных веществ в иммунологический синапс [Peters, P.J., 1991], что в конечном итоге приводит к гибели клеток-мишеней.

Цитотоксичность проявляется при совместных усилиях всех компонентов гранул [Barry, M., 2002], основными из которых являются перфорин и семейство гранзимов. Перфорин был выделен в чистом виде в 1984 году как кальций-зависимый порообразующий белок, секретирующийся ЦТЛ, размером около 67kDa. По структурным и функциональным характеристикам данный белок близок к C9 компоненту комплемента. Его экспрессия регулируется в ходе дифференцировки Т-лимфоцитов с помощью рецепторных активационных сигналов (например, через Т-клеточный рецептор) и цитокинами (например, ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21). Находясь внутри гранулы, перфорин остается неактивным благодаря кислоте значению pH, а также связывающему кальций белку – кальретикулину. При выходе в иммунологический синапс, при своей высокой концентрации, наличии свободных ионов Ca<sup>2+</sup> и нейтральном значении pH, перфорин встраивается в мембрану таргетной клетки, образуя трансмембранные поры 5-20 нм в диаметре, обеспечивая проникновения других сериновых протеаз – гранзимов – внутрь клетки.

Хотя в последние годы были обнаружены альтернативные механизмы доставки гранзима внутрь клеток (через маннозо-6-фосфатные рецепторы, прямой захват гранзима или в ходе обменно-абсорбционного процесса [Bolitho P., 2007]), исследования на нокаутированных мышях показали ключевую роль перфорины в гранзимопосредованной цитотоксичности [Bolitho P., 2007]. При недостатке перфорины становится невозможной доставка гранзимов внутрь таргетной клетки, иначе говоря, ЦТЛ теряют свою цитотоксическую функцию.



Гранзимы – семейство сериновых протеаз, которые содержатся в секреторных гранулах ЦТЛ. У человека на сегодняшний день выделено 5 типов протеаз, различающихся по типу лизируемого субстрата: гранзим А, К, В, Н, и М [Trapani, J.A., 2001]. Однако определенная клетка обычно экспрессирует только один-два вида этих протеаз, находясь в макромолекулярном комплексе с молекулой-переносчиком серглицином [Синцов А.В., 2008]. Гранзимы отличаются друг от друга своей литической способностью, что связано с различием в их структуре и молекулярных механизмах действия [Fan Z., 2005]. При этом гранзим В является главным эффектором ЦТЛ, особенно в отношении опухолевых клеток. Его наибольшая протеолитическая активность связана, в первую очередь, со способностью непосредственно активировать прокаспазы – цистеиновые протеиназы, находящиеся в нормальной клетке в неактивной форме. Помимо этого, гранзим В участвует в расщеплении ядерных белков, что указывает на многообразие его функций, поэтому в случае удаления одного из пути развития апоптоза эндогенным или вирусным блокатором, функция гранзима В не будет нарушена [Trapani, J.A., 2001].

У человека дефицит секреторных литических гранул критически сказывается на выживаемости организма, особенно при внутриклеточной инфекции: в зависимости от степени поражения данного механизма возможно либо снижение устойчивости к внутриклеточным патогенам, либо развитие иммунной дисрегуляции, известной как лимфогистиоцитоз [Voskoboinik I., 2010]. В экспериментах на мышах, с нокаутом генов перфорины и гранзима, была показана предрасположенность животных к развитию лимфоидных опухолей, а также меланомы, раку простаты и молочной железы [Trapani, J.A., 2001; Voskoboinik I., 2010].

Однако, несмотря на тот факт, что гранулоопосредованный механизм цитотоксичности является доминантным при функционировании ЦТЛ, результаты последних исследований доказывают важность других механизмов запуска апоптоза при опухоль-специфической цитотоксичности CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Например, было показано, что гранулоопосредованный цитолиз лучше действует при минимальной опухолевой нагрузке и становится менее эффективным при ее увеличе-

нии. При увеличении опухолевой нагрузки значение приобретает Fas-опосредованный механизм апоптоза [Phoelein С.Н., 2003].

### ***Семейство ФНО рецепторов и их роль в запуске апоптоза***

Fas-рецептор (FasR) относится к семейству ФНО рецепторов и экспрессируется на неизмененных эпителиальных клетках кишечника, молочной железы и других органов. Опухоль-специфичные активированные ЦТЛ используют Fas-лиганд (FasL) на своей поверхности и соединяются с Fas-рецептором на поверхности опухолевой клетки, запуская внутриклеточный каскад каспаз, приводящий к ее гибели [Phoelein С.Н., 2003].

Помимо активированных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, FasL также был обнаружен на различных клетках, включая клетки рака молочной железы. В 2000 году Mullauer L. с соавт. показали, что при злокачественном росте происходит увеличение экспрессии FasL клетками молочной железы, по сравнению с окружающими неизмененными клетками. Они предположили, что данное увеличение экспрессии обеспечивает малигнизированные клетки преимуществом, вызывая гибель иммунных и/или стромальных клеток, экспрессирующих FasR, тем самым позволяя избежать опухоли иммунного контроля [Mullauer L., 2000]. Fersching D.M.I. с соавт. показали, что уровень свободного Fas-лиганда в плазме крови больных раком молочной железы значительно превышает его уровень у здоровых доноров. Авторы делают предположение, что по уровню FasL можно различать здоровых доноров и людей с метастазирующими формами рака молочной железы, а также возможную его прогностическую ценность [Fersching D.M.I., 2012].

Кроме того, в последних исследованиях было отмечена связь Fas-рецептора, клеточной пролиферации и развития опухоли [Liu K., 2006]. В ряде исследований колоректального рака было показано, что в первичной клеточной популяции существуют разные подтипы раковых клеток, и при взаимодействии между FasL на иммунных клетках и Fas-рецепторов на опухолевых клетках происходит появление Fas-устойчивых форм опухоли с большим потенциалом к метастазированию [Liu K., 2006; Liu K., 2003]. Следует отметить, что потеря экспрессии Fas-рецептора на опухолевых клетках ряд авторов связывает с повышенным риском

метастазирования, связанной с утратой Fas-зависимого пути апоптоза [Liu K., 2006].

Еще одним представителем суперсемейства рецепторов ФНО являются TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) рецепторы. При их активации, аналогично Fas- опосредованному механизму, запускается внутриклеточный каскад реакций, приводящий к апоптозу клеток. У человека описано 4 разных типа TRAIL рецепторов, однако к рецепторам «смерти» относятся только 1 и 2 тип рецепторов (TRAIL-1R, или DR4, TRAIL-2R, или DR5). В отличие от нормальных клеток организма, опухолевые клетки, в том числе и клетки рака молочной железы, более чувствительные к TRAIL-опосредованному апоптозу [Rahman M., 2009]. Согласно экспериментальным данным, TRAIL- TRAILR- опосредованный механизм апоптоза играет непосредственную роль в регуляции возникновения опухоли и ее роста. Потеря функции TRAIL в результате мутации или снижения экспрессии, а также изменения в ключевых медиаторах сигнальных путей, могут служить причиной устойчивости опухоли к TRAIL- опосредованному механизму апоптоза [Johnstone R.W., 2008].

Если роль  $CD8^+$ -лимфоцитов в уничтожении опухолевого процесса давно известна, то только в последние годы наблюдается более глубокое понимание роли  $CD4^+$ -клеток в противоопухолевом иммунитете. Можно выделить несколько причин для этого. Во-первых, концептуально более просто представить цитотоксические лимфоциты, запускающими апоптоз инфицированных, поврежденных или опухолевых клеток. Во-вторых, солидные опухоли редко экспрессируют молекулы HLA II класса, в отличие от молекул HLA I класса, которые делают опухолевые клетки видимыми для прямого поражения  $CD8^+$ -клетками. И последнее, более выраженная зависимость резекции опухоли от ЦТЛ, и относительная легкость получения  $CD8^+$ - клеток из опухоли укрепили репутацию ЦТЛ как первичных эффекторов противоопухолевого иммунитета [Koski G.K., 2008].

Однако, опухоль-специфичные  $CD4^+$ -клетки могут развивать цитотоксическую активность и опосредовать резекцию опухоли через MHC-II опосредованное уз-

навание опухолевых клеток, тем самым предполагая, что  $CD4^+$ -клетки тоже могут быть эффекторами противоопухолевого иммунного ответа.

### **$CD4^+$ Т-лимфоциты**

При взаимодействии TCR с комплексом МНС II-пептид на поверхности дендритных клеток происходит активация  $CD4^+$ -лимфоцитов. В отличие от  $CD8^+$  ЦТЛ, которые представлены в организме человека одним фенотипом, выделяют несколько фенотипов  $CD4^+$  Т-клеток-хелперов, отличающихся по выполняемой ими функции и секреции цитокинов [Sallusto A., 2009; Wilson S.B., 2009]: Th1-клетки секретируют цитокины, такие как ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ГМ-КСФ и ИЛ-2, и поддерживают функционирование ЦТЛ, участвуя в удалении вирусов, внутриклеточных бактерий и разрушение опухолевых клеток; Th2-клетки секретируют цитокины, такие как ИЛ-10, ИЛ-4 и ИЛ-5, обеспечивая элиминацию внеклеточных паразитов, а также ограничивают пролиферацию ЦТЛ; Th17-клетки секретируют ИЛ-17 и действуют при аутоиммунных заболеваниях; Трег-клетки секретируют ИЛ-10 и TGF- $\beta$ , которые подавляют иммунный ответ.

На сегодняшний день известно, что Т-хелперы 1 типа способствуют активации ЦТЛ посредством нескольких основных механизмов:

- Классический механизм – Th1-клетки участвуют в аутокринной/паракринной секреции Т-клеточных ростовых и дифференцировочных факторов, например ИЛ-2, который в большинстве случаев требуется для роста и дифференцировки ЦТЛ, но ими не секретируется;
- Одновременный контакт 3 клеток – АПК (ДК), ЦТЛ и Th1 клетки - обеспечивает специфическую активацию Th1-клеток, которые стимулируют увеличение экспрессии CD40L, вызывая дальнейшую активацию ДК, и уже только потом активируют ЦТЛ;
- Оптимальный  $CD4^+$ Т-клеточный ответ может увеличить накопление  $CD8^+$  ЦТЛ в опухоли, способствуя распространению, миграции и дифференцировке опухоль-специфичных  $CD8^+$  Т-лимфоцитов [Behrens G., 2004; Marzo A.L., 2000]. Было показано, что количество опухоль-инфильтрирующих  $CD4^+$  Т-лимфоцитов

коррелирует с эффективностью противоопухолевого ответа  $CD8^+$  цитотоксических лимфоцитов [Lai Y.-P., 2011].

Однако постепенно накопленные данные указывают, что  $CD4^+$ -клетки не только важны для противоопухолевой активности ЦТЛ, но также, иногда способны опосредовать резекцию опухоли без видимого участия  $CD8^+$  ЦТЛ [Hung K., 1998; Daniel D., 2005]. Th1-лимфоциты сами непосредственно могут запускать апоптоз опухолевых клеток через Fas/FasL или TRAIL-опосредованный механизм апоптоза [Schattner EJ, 1996; Thomas WD, 1998]. Считается, что секретируемые активированными  $CD4^+$  Т-клетками цитокины способны вызывать гибель части опухолевых клеток. Например, при активации  $CD4^+$  Т-лимфоцитов гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) происходит секреция Th1 и Th2 типа цитокинов, которые активируют в свою очередь эозинофилы и макрофаги, вызывающие лизис опухолевых клеток путем секреции активных форм кислорода и оксида азота [Hung K., 1998]. Было показано, что  $CD4^+$  Т-клетки подавляют опухолевый ангиогенез посредством секреции цитокинов группы ИФН [Ostrand-Rosenberg S., 2005]. Кроме того,  $CD4^+$  Т-лимфоциты могут вызывать «спячку» опухоли, не позволяя ей ускользать от иммунного надзора [Denardo D.G., 2009].

### **Состояние клеток адаптивного иммунного ответа в процессе опухолевой инвазии**

Несмотря на реализацию функций адаптивного иммунитета, со временем, опухолевые клетки в процессе иммуноредактирования становятся устойчивыми к воздействию клеток первой линии защиты и развивают фенотип, способный воздействовать на иммунные клетки через секрецию хемокинов и цитокинов [Chow M.T., 2012; Mantovani A., 2008].

Исследования последних двух десятилетий указывают, что неадекватная презентация опухолевых антигенов дендритными клетками организма является одним из потенциальных механизмов опухоль-опосредованного подавления функции ДК как антиген-презентирующих клеток. Так как общепринято считать ДК первичной популяцией клеток, ответственных за запуск противоопухолевого им-

мунитета, неудивительно, что опухоли развивают механизмы для ингибирования функции и выживаемости ДК. Becker с соавт. предположили, а Chauх доказал роль ИЛ-10, секретлируемого раковыми клетками, в подавлении противоопухолевой функции ДК [Becker Y., 1992; Chauх P., 1995]. В 1996 году Gabrilovich с соавторами в серии *in vivo* и *in vitro* испытаний на мышах-опухоленосителях показали, что ДК обладают сниженной способностью захватывать и представлять АГ, недостаточной для активации Т-клеточной пролиферации [Gabrilovich D. I., 1996a; Gabrilovich D. I., 1996b.]. Тогда же была показана сниженная экспрессия основных костимуляторных молекул дендритных клеток – CD80/CD86 [Chauх P., 1996.]. Было показано, что клетки меланомы способны продуцировать факторы, которые изменяют антиген-презентирующую активность ДК на индукцию толерантности против опухолевой ткани, изменяя противоопухолевую роль ДК на «молчащий» иммунный ответ [Enk A.H., 1997]. Также, было показано, что опухоль может секретировать вещества, подавляющие пролиферацию и дифференцировку ДК [Gabrilovich D.I., 1996a], что приводит к резкому снижению пула активных ДК, способных стимулировать противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли. Помимо этого, опухоль способна вызывать апоптоз ДК и их предшественников, как *in vivo*, так и *in vitro* [Esche C., 1999; Katsenelson N.S., 2001; Pinzon-Charry A., 2006]. Таким образом, такое опухоль-опосредованное вмешательство в генерацию, функционирование и выживаемость ДК, являются одним из возможных путей, с помощью которых опухоль избегает иммунного ответа, подавляя активность ДК.

Помимо ингибирования ДК, опухолевые клетки способны перепрограммировать или реполяризовать дифференцировку гематопоэтических клеток-предшественников ДК от традиционной линии дендритных клеток к регуляторным или толерогенным субпопуляциям ДК, проонкогенным эндотелиально-подобным ДК, или миелоидным супрессорным ДК (MDSC) и моноцитам/макрофагам [Shurin et al. 2006]. В асцитической жидкости больных раком яичника и меланомой были обнаружены иммуносупрессивные дендритные клетки [Wertel F., 2006; McCarter M.D., 2007]. Дендритные клетки, образованные в присут-

ствии растворимых факторов, продуцированных мелкоклеточным раком легкого и аденокарциномы, фенотипически и функционально больше похожи на макрофаги, чем на обычные ДК [Avila-Moreno et al. 2006].

Третьим механизмом опухолевой инвазии считается так называемое избегание (*avoidance*), которое связано с потерей экспрессии хемокинов опухолевыми клетками, в результате чего не образуется необходимый градиент для направленной миграции ДК к очагу малигнизации. Хемоаттрактанты для ДК продуцируются всеми нормальными тканями, однако их экспрессия может быть подавлена в ходе малигнизации. Экспрессия CXCL14 коррелирует с привлечением и хоумингом ДК, активируя их созревание. Отсутствие хемокина является наиболее изученным фактором, который способствует избеганию иммунного надзора [Frederick et al., 2000] и должно рассматриваться как дополнительный механизм, способствующий росту опухоли [Shurin et al. 2005a].

Было обнаружено, что уменьшение количества ДК в лимфатических узлах при РМЖ непосредственно коррелирует с увеличением количества метастазов в лимфатические узлы и плохим прогнозом выживания [Coventry VJ, 2003; Georgiannos SN, 2003; Iwamoto M, 2003 Kohrt H.E., 2005; Liyanage UK, 2002, Стахеева М.Н., 2011]. Было показано, что в 90% образцов РМЖ в опухолевом окружении присутствуют незрелые ДК, в то время как зрелые ДК обнаруживались только в 60% образцов. В некоторых случаях, Т-клетки образуют кластер вокруг ДК, аналогично кластеру Т-клетки-ДК во вторичных лимфоидных органах, что указывает на проходящие иммунные реакции в опухолевом микроокружении [Bell D., 1999].

Помимо ДК, в опухолевом микроокружении, а также в дренирующих лимфатических узлах, представлены все субпопуляции Т-клеток [Grivennikov S.I., 2010]. При этом известно, что они способны проявлять как опухоль-ингибирующие, так и опухоль-стимулирующие эффекты [DeNardo D.G., 2009; Smyth M.J., 2006]. Увеличенное количество Т-клеток, особенно активированных ЦТЛ и Th1-лимфоцитов, коррелирует с лучшей выживаемостью при некоторых формах рака, включая инвазивные формы колоректального рака, меланому, множественную миелому и рак поджелудочной железы [Grivennikov S.I., 2010; Swann J.B., 2007].

При раке молочной железы, наличие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов с высокими показателями соотношения  $CD4^+/CD8^+$  и Th2/Th1 указывает на плохой прогноз [Kohrt H.E., 2005]. Th2-лимфоциты стимулируют прогрессию рака молочной железы, а также метастазирование опухоли путем «обучения» опухоль-ассоциированных макрофагов продукции проангиогенных и прометастатических факторов [DeNardo D.G., 2009]. Kohrt H.E. с соавторами показали, что в пораженных метастазами лимфатических узлах (ЛУ) больных РМЖ снижено содержание  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-клеток, и CD1a ДК при сравнении со здоровой группой доноров. Однако в непораженных ЛУ наблюдается повышенное содержание CD1a ДК [Kohrt H.E., 2005]. Авторы показывают, что наличие  $CD4^+$  Т-лимфоцитов и ДК в подмышечных ЛУ имеет высокую положительную корреляцию с прогнозом выживаемости, независимо от наличия метастазов в данных ЛУ.

Различные цитокины также могут либо стимулировать (ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-23), либо ингибировать (ИЛ-12, TRAIL, ИФН- $\gamma$ ) развитие и прогрессию опухоли, безотносительно их источника, а также оказывать прямые эффекты на рост и выживаемость раковых клеток (TRAIL, FasL, ФНО- $\alpha$ , EGFR лиганд, TGF $\beta$ , ИЛ-6) [Grivennikov S.I., 2010]. На мышинных моделях было показано, что эффект макрофагов и Т-клеток на развитие колит-ассоциированного рака опосредуется ИЛ-6, ИЛ-11, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , а также ИЛ-23. При раке желудка ИЛ-1 $\beta$  выступает в качестве опухолевого промотора. У людей высокий уровень циркулирующего ИЛ-6 связывают с фактором риска гепатоцеллюлярной карциномы, и он является лучшим предиктором быстрой прогрессии патологии от вирусного гепатита до гепатоцеллюлярной карциномы. ИЛ-23 имеет двоякое действие на опухолевый рост. Его про-опухолевые эффекты опосредованы ИЛ-17 и ИЛ-22, которые секретируются Th17 [Grivennikov S.I., 2010].

Таким образом, описанные данные о роли иммунных эффекторных механизмов указывают на возможность системы иммунитета эффективно контролировать рост опухоли. Клетки адаптивного иммунного ответа, а также продуцируемые ими цитокины, могут оказывать воздействие на все аспекты развития опухоли, тем самым показывая возможности иммунной системы подавлять рост опухоле-



вых клеток [Моисеенко В.М., 2007]. На сегодняшний день общепринятым считается, что иммунная система способна контролировать опухолевый процесс [Finn O.J., 2008]. Подтверждение наличия предсуществующего противоопухолевого иммунного ответа, как клеточного (цитотоксический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный и CD4<sup>+</sup> Th1 ответы), так и гуморального (наличие антител) против опухолевых клеток [Viehl C.T., 2005; Grube M., 2007], а также открытие опухолевых антигенов стало основными предпосылками для начала обширных исследований в области модуляции иммунного ответа как *in vitro*, так и *in vivo*, с целью создания различных иммунотерапевтических антиген-специфических подходов для борьбы с онкологическими заболеваниями.

## **1.2. Основные опухоль-ассоциированные антигены при раке молочной железы**

Любая опухоль экспрессирует разнообразные белковые АГ, узнаваемые иммунной системой, которые являются потенциальными целями для модуляции иммунного ответа. Опухоль-ассоциированными антигенами (ОАА) называют антигены, свойственные опухолевым клеткам, которые в норме отсутствуют или слабо экспрессируются на нормальных тканях взрослого организма [Finn O.J., 2009]. Экспрессия ОАА клетками опухоли – спонтанный процесс, хотя в низких титрах экспрессия ОАА может происходить и в нормальных клетках [Grazino D.F.].

Используя доступные современные методы для молекулярной идентификации и характеристики опухолевых антигенов, можно выделить следующие подклассы опухоль-ассоциированных антигенов [Finn O.J., 2009; Novellino L., 2005]:

1. **Онкофетальные антигены** – молекулы, которые высоко экспрессируются в течение эмбрионального развития, экспрессия которых подавляется после рож-

дения. На опухолях обнаружено восстановление экспрессии данных молекул, в то время как нормальные клетки продолжают быть негативными по данным антигенам. К этой группе относятся: онкофетальный антиген, незрелый рецептор ламинина (OFA/iLRP), глипикан 3, альфа-фетопротеин (АФП) и раково-эмбриональный антиген (СЕА).

2. **Дифференцировочные антигены** – тканеспецифические белки или гликопротеины, синтезируемые нормальной тканью данного гистогенеза на определенных этапах своего развития: тирозиназа, гликопротеин-100, Мелан-А/меланомный антиген, распознаваемый Т-клетками (Melan-A/MART-1), простат-специфический антиген (ПСА), простат-специфический мембранный антиген (ПСМА).

3. **Раково-яичковые антигены** – данные молекулы экспрессируются многими гистологическими типами опухолей, но не нормальными тканями за исключением яичек (сперматогониев и первичных сперматоцитов). Так как мужские герминативные клетки не экспрессируют HLA молекул, они не могут презентировать цитотоксические эпитопы Т-клеткам и не могут служить мишенью для CD8<sup>+</sup> противоопухолевого иммунного ответа. К ним относятся MAGE, GAGE, BAGE и другие.

4. **Гиперэкспрессируемые генные продукты и универсальные опухолевые антигены** – антигены, выявляемые благодаря гиперэкспрессии соответствующих генов. В нормальных тканях данные гены экспрессируются обычно на низком уровне. К ним можно отнести p53, Her-2, СЕА и MUC-1.

5. **Онкогенные вирусные антигены** – из них, наиболее часто ассоциируются с раковой трансформацией антигены вируса папилломы человека 16 и 18 серотипов Е6 и Е7 для рака шейки матки, вирус Эпштейн-Барр для лимфомы Бюркитта, вирусы гепатита В и С.

6. **Уникальные антигены** – являются продуктами мутаций и реаранжировки экспрессирующихся антигенов.

Таким образом, опухолевые антигены можно отнести к двум группам антигенов по своему происхождению: уникальные (мутантные) антигены и общие немутантные собственные антигены. Выбор между данными двумя антигенами можно

рассматривать как выбор между стимуляцией иммунитета (мутантные антигены), или преодолением толерантности и стимуляцией аутоиммунного процесса (собственные антигены) [Palucka K., 2011b]. Следует отметить, что антигенный профиль опухоли не является стабильным ни качественно, ни количественно на различных этапах опухолевого процесса, и метастазы могут иметь отличающийся от первичной опухоли набор опухолевых антигенов. Это является серьезной проблемой для модуляции иммунного ответа. Тем не менее, если рассматривать онкологию в целом, было выделено более 100 белков, которые являются кандидатами для создания противоопухолевых вакцин [Тюряева И.И., 2008].

Наиболее перспективным и активно изучаемым антигеном при раке молочной железы является рецептор Her-2/neu. Однако в связи с наличием негативных по экспрессии Her2 форм рака, изменением уровня экспрессии маркера в зависимости от проводимой терапии и стадии заболевания в мире активно ведутся исследования иммунотерапевтического потенциала других опухолеассоциированных антигенов, причем как в моноспецифичных, так и полиспецифичных вакцинах.

**Белок HER-2** (HER-2/neu, или ErbB2) является трансмембранным тирозинкиназным рецептором. Относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста с молекулярной массой 185 кДа и не имеет собственного лиганда. Свои функции осуществляет при формировании димерных форм (гетеродимеров с другими представителями класса рецепторов HER, или гомодимеров). В норме, белок HER2 экспрессируется в период формирования организма, и небольшой уровень экспрессии наблюдается на эпителиальных клетках во взрослом организме.

Белки семейства HER играют важную роль в дифференцировке и росте клеток. Рецептор HER-2 наиболее широко экспрессируется в организме, находясь на клетках желудочно-кишечного тракта, легких, молочной и поджелудочной желез, яичника, кожи, центральной нервной системы и мочевыводящей системы эмбриональных и взрослых тканей [Gutierrez C., 2011]. На мышах с нокаутом гена HER2/neu было показано, что отсутствие рецептора приводит к гибели особей на

11 день эмбрионального развития в связи с пороками развития сердца и отсутствием нервной системы [Morris J.K., 1999].

Считается, что на нормальных клетках может наблюдаться не значительная экспрессия рецепторов HER2/neu, при этом она не оказывает никакого влияния на функционирование этих клеток. Однако при гиперэкспрессии рецептора возрастает клеточная пролиферация, бесконтрольный рост клеток, туморогенность и метастатический потенциал в сравнении с клетками, экспрессирующими базальный уровень рецептора [Gutierrez C., 2011].

Гиперэкспрессия рецептора HER-2/neu наблюдается в 20% всех случаев инвазивных форм рака молочной железы, в 50% случаев отечно-инфильтративных форм рака и в 60-70% случаев внутрипротоковой карциномы *in situ*, и ассоциируется с клинически агрессивными формами заболевания. Различия в уровне экспрессии рецептора на опухолевых и нормальных клетках позволяет использовать HER-2 как потенциально возможную мишень для иммунотерапии. Амплификация рецептора считается относительно ранним событием туморогенеза, происходящим примерно в 60-70% случаев карциномы *in situ*. HER2-позитивный статус поддерживается в течение прогрессии заболевания до инвазивной формы и при метастазировании [Carlsson J., 2004]. Однако в связи с тем, что только 20% инвазивных форм рака экспрессируют HER2, ряд авторов предполагает, что многие HER2-амплифицированные формы не прогрессируют в инвазивную стадию [Gutierrez C., 2011]. При лечении Трастузумабом (моноклональные антитела к рецептору HER2/neu) некоторые опухоли теряют экспрессию рецептора, предположительно в ходе селекции HER2 негативных клонов, которые не погибли при воздействии антителами [Mittendorf E.A., 2009]. И наоборот, первоначально отрицательные опухоли могут начинать экспрессировать рецептор HER2, особенно после гормональной терапии, направленной на эстрогеновые рецепторы [Lopez-Tarruella S., 2007].

Начиная с 1994 года, в различных исследованиях было показано наличие клеточного и/или гуморального иммунных ответов против рецептора HER2 у пациентов с HER2 гиперэкспрессированными опухолями. Как показано на преклини-

ческих моделях, наличие иммунного ответа может способствовать медленному развитию опухоли на ранних стадиях заболевания [Ladjemi M.Z., 2010]. Данные наблюдения совместно с сообщениями об эффективности трастузумаб-основанной анти-HER2 пассивной иммунотерапии стали толчком к началу исследования различных стратегий модуляции анти-HER2 иммунного ответа *in vitro* и *in vivo*.

В экспериментальных работах было показано, что иммунизация с использованием ДК, трансфицированных аденовирусным вектором, кодирующим HER2 белок, сдерживала возникновение HER2/neu-позитивного рака молочной железы у BALB/c трансгенных мышей [Sakai Y, 2004]. Chen Y. с соавт. продемонстрировали, что введение ДК, которые были трансфицированы аденовирусом, кодирующим HER2 и ИЛ-12, может стимулировать опухолевую защиту у FVB мышей с сингенными HER2 гиперэкспрессированными опухолями, и что обе популяции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов необходимы для вызова данного ответа [Chen Y., 2001]. Аналогичные результаты были показаны с ДК, которые были трансфицированы аденовирусными векторами, кодирующими HER2 и ФНО- $\alpha$  [Chen Z., 2002].

В одном клиническом испытании исследовали ДК, нагруженные различными иммуногенными пептидами белка ErbB2/HER2-neu, специфичными по HLA I и II типа. Авторами показано развитие пептид-специфичного цитотоксического ответа, наличие CD4<sup>+</sup>Т-клеток, продуцирующих большое количество ИФН- $\gamma$ , а также стабилизация процесса до 8 месяцев [Brossart P., 2000; Czerniecki B.J., 2007]. Недавние исследования показали иммуногенность HER2/neu вакцин особенно в сочетании с адьювантом ГМ-КСФ [Florescu A., 2011]. Рядом других авторов было показано увеличение безрецидивного периода течения рака молочной железы с вовлечением лимфатических узлов по сравнению с контрольными группами [Peoples G.E., 2005].

Однако в связи с высокой экспрессией рецептора HER2 в эмбриональный период при изолированной стимуляции HER2-специфичного иммунного ответа возможно развитие Т-клеточной толерантности, которая в совокупности с использо-

ванием HLA-специфичных последовательностей пептидов ограничивает возможный репертуар высокоавидных Т-клеток для предотвращения развития аутоиммунного процесса. В связи с этим исследования других опухолевых антигенов, которые экспрессируются клетками рака молочной железы, но имеют ограниченное распространение на неизмененных клетках организма способны привести к более эффективной стимуляции цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа. Наиболее изученными антигенами являются маммаглобин А, NY-BR-1 и hMENA, которые достаточно часто встречаются именно при опухолях молочной железы, а также ряд более универсальных антигенов, экспрессия которых встречается при разных типах опухолей:

- **Маммаглобин А** – секреторный белок с молекулярной массой 10 кДа [O'Brien N, 2002]. Гиперэкспрессия данного антигена наблюдается в 70-80% случаев РМЖ [Zehentner В.К., 2004]. Он отличается высокой специфичностью к клеткам молочной железы, гиперэкспрессируясь при разных стадиях РМЖ (неинвазивная, инвазивная, метастатическая), что делает его привлекательной мишенью для таргетной иммунотерапии заболевания. Viehl С.Т. с соавторами показали возможность генерации *in vitro* маммаглобин-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1 типа, которые продуцируют ИФН-γ, однако продукция ИЛ-4 Т-хелперами 2 типа отсутствовала [Viehl С.Т., 2005; Jaramillo А., 2004]. Также было определено несколько HLA I-специфичных эпитопов белка маммаглобина, которые распознаются CD8<sup>+</sup>-цитотоксическими Т-лимфоцитами [Jaramillo А., 2004].

- **NY-BR-1** – ген, который кодирует полипептид с предполагаемой массой 150-160 кДа. мРНК NY-BR-1 экспрессируется в 80% образцов рака молочной железы и очень редко при других формах рака [Jager D., 2001] и никогда в нормальных тканях, исключая яички. У больных с РМЖ обнаруживается гуморальный NY-BR-1-специфичный иммунный ответ, что указывает на иммуногенность данного белка [Wang W., 2006]. Wang W. с соавт. в 2006 году изолировали 3 CD8<sup>+</sup>-цитотоксических HLA-A\*02:01-специфичных эпитопа, которые способны презентироваться дендритными клетками для запуска NY-BR-1-специфичного иммунного ответа *in vitro* [Wang W., 2006].

- **Рецептор hMena (ЕНАН)** - человеческий ортолог мышинного Mena [Di Modugno F., 2004], член семейства белков Eна/VASP. Эта ключевая актиновая регуляторная молекула контролирует форму клеток, их адгезию и миграцию [Krause M., 2003]. Di Modugno F. С соавторами показали, что гиперэкспрессия hMena служит ранним маркером опухолевой трансформации молочной железы: он не обнаруживается на нормальном эпителии железы, и начинает гиперэкспрессироваться при доброкачественном ее повреждении с повышенным риском трансформации, особенно при опухолях с HER2+, ER/PgR- и Ki67<sup>high</sup> фенотипом [Di Modugno F., 2006]. В испытаниях *ex vivo* было выявлена способность к секреции ИФН- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами у больных раком молочной железы, что подтверждает иммуногенность отдельных эпитопов белка hMena [Di Modugno F., 2004].

- **Ген WT1** играет важную роль в росте и дифференцировке клеток. Впервые он был выделен при исследовании гистологического материала рака почек у детей, однако в последующем был обнаружен при лейкемии и некоторых солидных опухолях. При РМЖ наблюдается гиперэкспрессия маркера более чем в 90% случаев [Sugiyama H., 2010]. Предполагается, что белок WT1 играет роль в поддержании пролиферации раковых клеток при раке молочной железы. Было показано, что воздействие липосом, с включенными олигодезоксинуклеотидными антагонистами WT1, на клеточные линии рака молочной железы приводит к подавлению пролиферации и дифференцировки данных линий [Zapata-Benavides P., 2002]. Gillmore R. с соавторами показали, что в организме больных раком молочной железы WT1-специфические ЦТЛ обнаруживаются исключительно в дренирующих лимфатических узлах. При этом они способны вызывать лизис только предварительно обработанных ИФН- $\gamma$  клеток РМЖ с высоким уровнем экспрессии HLA-A\*02 молекул [Gillmore R., 2006]. Эти данные показывают, что изолированный WT1-специфический цитотоксический ответ может служить для защиты от ограниченного типа опухолей, однако для его использования может потребоваться высокий уровень экспрессии комплекса WT1-МНС I на опухолевой клетке и дополнительная активация эффекторной функции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

- **Мембран-ассоциированный гликопротеин MUC 1** – белок, который играет важную роль в формировании слизистых барьеров на поверхности эпителиальных клеток, принимает участие при внутриклеточной передаче сигнала. Гиперэкспрессия белка, «неправильная» (аберантная) внутриклеточная локализация, а также O-гликозилирование связывают с различными формами рака, включая рак легкого, рак поджелудочной железы и рак молочной железы [Hanisch F.G., 2001]. На стадии преклинических испытаний было показано, что Muc1 может стимулировать гуморальный, а не клеточный иммунный ответ [Apostolopoulos V., 1994]. В целом, в клинических испытаниях показаны различные и неубедительные данные об эффективности применения данных вакцин [Florescu A., 2010; Musselli C., 2002]. На начальной стадии испытаний вакцин было показано формирование слабого анти-MUC 1 иммунного ответа, что привело к развитию различных модификаций и адъювантов для повышения ее иммуногенности [Florescu A., 2010; Musselli C., 2002].

- **Сурвивин** - антиген, экспрессирующийся на различных типах опухолей, включая рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, и ряд других, при этом отсутствующий на нормальных дифференцированных тканях. Он является бифункциональным белком, который участвует в защите клеток от апоптоза и регуляции митоза [Andersen M.H., 2007]. Гиперэкспрессия сурвивина в раковых клетках ассоциируется с уменьшением продолжительности жизни, увеличением уровня рецидивов и уменьшением апоптотического индекса опухолевых клеток *in vivo* [Andersen M.H., 2007]. Высказывается мнение, что он может служить в качестве универсальной мишени противоопухолевой иммунотерапии [Sorensen R.B., 2008]. Рядом авторов был описан спонтанный анти-сурвивин Т-клеточный иммунный ответ при раке молочной железы, колоректальном раке, миеломе, лимфоме и меланоме. Сурвивин-специфические цитотоксические лимфоциты обнаруживаются как в крови больных онкологией, так и в опухолевом микроокружении [Grube M., 2007; Andersen M.H., 2001]. Schmidt с соавторами показали, что сурвивин-специфические цитотоксические лимфоциты, полученные от здоровых доно-



ров или больных лейкемией, вызывают цитолитическую активность против опухолевых клеток, экспрессирующих сурвивин [Schmidt S.M., 2003].

- **hTERT** (human telomerase reverse transcriptase) - универсальный опухолевый антиген, который играет важную функциональную роль в росте и развитии опухоли, и отсутствует в нормальных клетках организма. Он стимулирует активацию Т-лимфоцитов против клеток различных опухолей [Schultze J.L., 2001]. hTERT-специфические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты были получены в образцах крови больных онкологическими заболеваниями в стадии ремиссии после стандартной терапии [Filaci G., 2006]. При вакцинации больных раком молочной железы пептидами hTERT была показана индукция образования hTERT-специфических Т-лимфоцитов, которые обнаруживаются как в ткани опухоли, вызывая развитие некроза, так и в периферической крови. Данные hTERT специфические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты способны продуцировать ИФН- $\gamma$  и вызывать лизис опухолевых клеток *in vitro*. У вакцинированных больных показана большая медиана выживаемости по сравнению с контрольной группой [Domchek S.M., 2007].

- **Белок 53** (p53) является транскрипционным фактором, который регулирует клеточный цикл и выполняет функции супрессора образования злокачественных опухолей. Мутации гена p53, основанные на замене 1 аминокислоты, часто приводят к развитию рака. Накопленный мутантный белок p53 способен вызывать активацию антиген-презентирующих клеток и развитие анти-p53 иммунного ответа даже против p53 дикого типа [Soussi T., 2000]. У человека обнаружены спонтанные МНС I-рестриктированные p53-специфические цитотоксические лимфоциты [Asai T., 2002], МНС II-рестриктированная p53-специфическая пролиферация Т-хелперов [Chikamatsu K., 2003] и гуморальный иммунный ответ против p53 [Pedersen A.E., 2011]. В испытаниях *in vivo* показана способность p53-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов опосредовать иммунный ответ против p53-экспрессирующих опухолей [Met O., 2011; Svane I.M., 2011].

Открытия опухолевых антигенов, а также предсуществующего противоопухолевого иммунного ответа [Viehl C.T., 2005; Grube M., 2007], стали основными предпосылками для начала активных исследований в области возможности моду-

ляции иммунного ответа *in vitro* с целью создания различных иммунотерапевтических антиген-специфических подходов для борьбы с онкологическими заболеваниями. Одновременное использование нескольких антигенов, а также большая концентрация иммуногенных эпитопов ОАА возможно позволит преодолеть иммунную толерантность к опухолевым клеткам. Развитие толерантности может быть объяснено физиологическими механизмами формирования иммунологической толерантности к «своему», которая предотвращает развитие иммунного ответа к аутоантигенам. Считается, что преимущественно обрабатываемые собственные детерминанты антигенов являются эффективными в стимуляции толерантности. Однако для каждого аутоантигена существуют изолированные детерминанты, которые не способны вызвать развитие толерантности и по этой причине они могут обладать иммуногенными свойствами. С одной стороны, если опухолевый антиген представлен в достаточном количестве, это приводит к тому, что субдоминантные пептиды антигена могут быть представлены в высокой концентрации МНС I класса на поверхности опухолевой клетки, тем самым они преодолевают порог Т-клеточной активации и способны узнаваться иммунной системой. С другой стороны, избытие субдоминантных эпитопов, представленных в комплексе с МНС, может приводить к высокой экспрессии ауто-белков, приводя к развитию аутоиммунного процесса при запуске Т-клеточного ответа [Bernhard H., 2002]. Текущей задачей исследователей является поиск таких условий, которые позволят сломать данную иммунную толерантность без стимуляции аутоиммунного процесса.

Стратегии противоопухолевых вакцин имеют множество направлений, включая использование свободных пептидов, дендритных клеток, нагруженных пептидами или опухолевым лизатом, и ДНК-вакцины [Моисеенко В.М., 2007]. Все стратегии активной иммунотерапии ставят своей целью получение специфического Т-клеточного иммунного ответа

Если рассмотреть основные способы доставки опухолевых антигенов иммунокомпетентным клеткам для модуляции иммунного ответа, которые применяются в исследованиях, то главным их недостатком будет невозможность предугадывания

степени захвата АГ клетками иммунной системы для запуска противоопухолевого ответа. В первую очередь, это относится к изолированному использованию рекомбинантных пептидов и белков, лизата опухолевых клеток, а также ДНК/РНК конструкций. Известно, что сила иммунного ответа зависит от захвата антигена, его обработки, доставки в лимфатические узлы и презентации эффекторным клеткам адаптивной иммунной системы. В связи с этим является актуальным использование способа доставки, который позволит контролировать данные процессы и, тем самым, контролировать иммунный ответ. Предполагается, что именно ДК, обладая способностью к стимуляции иммунного ответа, будут отвечать всем поставленным задачам и будут эффективно стимулировать опухоль-специфичные эффекторные Т-клетки, которые не только будут способны уменьшать опухолевую массу, но и будут формировать иммунологическую память, контролирующую возможное возникновение рецидива опухоли.

### **1.3. Преимущества и недостатки различных источников опухолевых антигенов для праймирования дендритных клеток**

ДК способны доставлять опухолевые АГ, полученные из различных источников, что позволяет им эффективно стимулировать опухоль-специфичные эффекторные Т-клетки [Барышников А.Ю., 2007, Нехаева Т.Л., 2014; Курилин В.В., 2015]. В данном процессе, первым шагом является обеспечение ДК опухоль-специфичными антигенами. В исследовательских моделях используют различные источники ОАА для *ex vivo* нагрузки ДК опухолевыми антигенами [Markiewicz M.A., 2004].

#### **Опухолевый лизат**

Так как опухоли имеют гетерогенную природу, то они способны экспрессировать широкий набор ОАА. Использование опухолевого лизата как источника опу-

холевых иммуногенов, обладает потенциальным преимуществом в стимуляции ответа против различных известных и неизвестных ОАА. Данный метод позволяет вызвать поликлональный иммунный ответ, стимулируя как  $CD4^+$ , так и цитотоксический  $CD8^+$  тип иммунного ответа, тем самым снижая возможность опухоли избежать иммунного ответа. Использование опухолевого лизата уменьшает время и усилия, направленные на выявление и синтез отдельных иммунодоминантных пептидных эпитопов, позволяя ДК естественно процессировать опухолевые антигены. Недостатком данного метода является ограниченный объем опухолевого материала, использующийся для изготовления лизата, а также ограниченная пригодность опухолевых клеток, полученных от пациентов [Liu L.N., 2008]. Эффективность вакцины будет зависеть от концентрации иммуногенных и иммуносупрессивных АГ в материале опухоли [Dong H., 2014]. Кроме того, использование антигенов лизата опухолевых клеток не перекрывает изменяющийся репертуар опухолевых антигенов, который возникает в ходе метастазирования, а также при проведении специфической химио- и/или лучевой терапии. Также, при данном способе активации существует риск развития аутоиммунных реакций, т.к. в материале опухоли могут присутствовать клетки нормальных тканей. Однако показано, что опухолевый АГ, представленный дендритными клетками, стимулирует специфический ЦТЛ ответ [Bohnenkamp H.R., 2004; Kass R., 2003; Delirez N., 2009].

### **Нативные белки**

При непосредственном культивировании полноразмерного белка с ДК, становится неактуальным вопрос выбора белка по гаплотипу МНС/HLA, тем самым обходится вопрос о необходимости идентификации отдельных эпитопов. Данный метод успешно используется в клинических исследованиях клеточных вакцин при раке легкого, почки, лимфоме и миеломе, показывая формирование АГ-специфического ЦТЛ ответа [Berzofsky J.A., 2004; Landjemi, 2011]. Однако стоит отметить, что при загрузке ДК внеклеточным антигеном не осуществляется эффективная презентация его эпитопов в комплексе с МНС I класса и стимуляция  $CD8^+$  ЦТЛ. Поэтому, в дополнение к использованию нативных белков, сейчас ис-

пользуют так называемые fusion-белки, которые могут способствовать более эффективной обработке и даже увеличивать иммуногенность белка. Например, fusion-белки могут содержать ТАТ-белок вируса иммунодефицита человека, который улучшает проникновение в клетку [Viehl С.Т., 2005; Yang Н., 2009].

### Пептиды

Благодаря созданию синтетических пептидов стало возможным улучшение иммунного ответа против опухолевой ткани. Использование синтетических пептидов позволяет прямо загружать АГ в комплексы МНС I или II класса, в зависимости от эпитопа, и индуцировать эпитоп-специфический Т-клеточный ответ [Zhou Y., 2002]. Также данный способ уменьшает риск возникновения аутоиммунных реакций так как используется только эпитоп опухолевого белка и не развивается кросс-реакция на собственные ткани. Существенным минусом данного метода является обязательное знание эпитопов антигена, HLA типа человека и последовательность аминокислот в данном пептиде. Использование пептида не позволяет точно предугадать происходящие процессы обработки данных молекул, в результате чего не всегда удается осуществить презентацию необходимых антигенов в нативной форме. Кроме того, использование пептидов в качестве источника антигенов ограничивается размером молекул, способных проникнуть в клетку или способных связаться с МНС на поверхности АПК [Pol, 2015]. На сегодняшний день, терапия пептид-ДК ограничена стимуляцией исключительно CD8<sup>+</sup> цитотоксического ответа и при этом остается нерешенным вопрос о стимуляции CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа, также необходимого для борьбы с опухолью [Knutson KL, 2002; Mittendorf EA, 2009].

Таким образом, при использовании пептид/лизат-нагруженных ДК длительность экспрессии ограничивается не только аффинностью пептида к молекуле МНС, но и временем полужизни комплекса пептид-МНС, временем обновления МНС молекул [Kirk С.Ј., 2000]. При приготовлении вакцин с использованием опухолевых клеток исследователи сталкиваются с проблемами, связанными со стандартизацией ОАА и доступностью опухолевых клеток. В этом случае удобен способ загрузки ДК РНК самой опухоли, так как даже при невозможности выде-

лить достаточное количество опухолевых клеток, РНК получить из них всегда возможно. Этот метод также удобен при ситуации, когда не удается определить опухоль-специфический АГ на поверхности опухолевых клеток.

### **ДНК/РНК конструкции**

Введение ДНК/РНК-конструкций в ДК обладает рядом преимуществ, в сравнении с *ex vivo* пептид/лизат-нагруженными клетками и опухолевыми клетками [Nakamura M., 2005]. Благодаря наличию программного обеспечения, в состав ДНК-конструкций включаются только наиболее иммуногенные эпитопы исследуемого белка, при этом происходит исключение аутоиммунных и иммуносупрессивных эпитопов. Использование ДНК-конструкций позволяет прицельно модулировать иммунный ответ против опухолевых клеток, экспрессирующих данный антиген, при этом в одну плазмиду ДНК возможно включение нескольких генов (в том числе, отличающихся по специфичности к гаплотипу HLA), кодирующих различные антигены [Marchini, 2013]. При трансфекции ДК с помощью ДНК-конструкций происходит длительная экспрессия опухолевого АГ, что обеспечивает ДК доступным АГ для прологнированной презентации. При введении генетического материала в дендритные клетки АГ обрабатываются эндогенно для презентации в комплексе с молекулами МНС I класса, который приводит к эффективной стимуляции цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа. После обработки в клетке осуществляется экспрессия антигенов в их нативной форме, что облегчает процессинг и презентацию их иммунной системе. Использование полиэпитопных конструкций позволяет запускать реакцию нескольких клонов Т-клеток, обеспечивающих запуск более мощного иммунного ответа против различных раковых клеток, составляющих опухоль, а кроме того, позволяет преодолевать возможную потерю экспрессии данного ОАА в опухолевых клетках. Дополнительное проведение HLA-типирования позволяет выбирать только те эпитопы, которые увеличивают шанс развития специфического CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-клеточного ответа, или обоих одновременно [Palucka K., 2011a].

Помимо использования последовательности определенных иммуногенных эпитопов опухолевых антигенов, в плазмидную ДНК/РНК могут быть добавлены конструкции, которые оказывают влияние на различные этапы передачи сигнала между ДК и Т-клетками, что включает в себя:

- Генетические модификации, обеспечивающие доставку антигена для стимуляции Т-клеточного рецептора. Это достигается при использовании НЛA-специфичных последовательностей эпитопа, усилении эндогенной экспрессии антигена дендритной клеткой, достаточной и непрерывной доставкой естественно обработанного антигена;
- Генетические модификации для усиления костимуляторного сигнала. Это достигается либо за счет усиления костимуляторных сигналов, либо за счет подавления экспрессии ингибиторных молекул;
- Генетические модификации, направленные на улучшение иммунного микроокружения, например стимуляция секреции Th1 цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, и ИЛ-18), подавление активности регуляторных цитокинов (TGF- $\beta$ , ИЛ-10), изменение секреции хемокинов [Boundreau J.E., 2011].

Перенос нуклеиновых кислот, кодирующих опухолевые антигены, внутрь ДК осуществляется методами трансфекции плазмид (липосом-опосредованная трансфекция, магнитная трансфекция и другие виды трансфекций), с использованием вирусных векторов, или методом электропорации [Bolhassani A., 2011]. Основным недостатком использования генетических конструкций является малая эффективность (около 5-20%) их прямого захвата дендритными клетками [Markov, 2015b]. Предполагается, что способ доставки, используемый для переноса генов, оказывает большое воздействие на эффективность трансфекции [Kirk C.J., 2000]. Слабая эффективность трансфекции может быть связана с ограниченной способностью молекул ДНК достигать ядра, где осуществляется транскрипция [Luo D., 2000]. Кроме того, физические методы могут нарушать и изменять функцию и фенотип ДК, или даже оказываются токсичными для клеток [Lundqvist A., 2002]. С другой стороны, использование электропорации показало увеличение эффективности трансфекции и клеточную жизнеспособность [Lundqvist A., 2002;

Grunebach F., 2005]. Хотя вирусные векторы обладают гораздо большей эффективностью, для проникновения в ДК (около 90-100%), их применение в испытаниях ДК-вакцин ограничено в связи с возможным вирусным поражением клеток.

Исходя из представленного выше материала, для рационального выбора источника опухолевого антигена для нагрузки дендритных клеток необходимо учитывать ряд факторов, а именно:

1. определенные пептидные/ДНК/РНК молекулы содержат эпитопы, специфичные к определенному HLA типу, и соответственно их применение приводит к ограничению развития эффективного иммунного ответа в зависимости от типа HLA человека;
2. наличие ограниченного набора хорошо охарактеризованных опухолеассоциированных антигенов;
3. при использовании определенных пептидных/ДНК/РНК молекул происходит ограничение репертуара Т-клеточных клонов, и, соответственно, ограничение возможности иммунной системы развивать сильный полиспецифический противоопухолевый ответ.

ДК-вакцины показали хорошие результаты на стадии преклинических испытаний [Markov, 2015a]. Использование дендритных клеток достаточно для активации Т-клеточного ответа, но они не всегда способны обеспечивать адекватную дальнейшую поддержку иммунного ответа. Как уже говорилось выше, существующая опухоль создает иммуносупрессивное иммунное окружение, в связи с чем, успешные ДК-вакцины должны быть подготовлены для праймирования сильного и персистирующего иммунного ответа. Генетические модификации дендритных клеток должны позволить осуществлять непрерывную подачу естественно обрабатываемого антигена и иммуностимуляторных молекул, и, возможно, кроме этого, обеспечивать более сильный и постоянный иммунный ответ. Создание высокоспецифичных конструкций, кодирующих эпитопы опухолеассоциированных антигенов, которые будут распознаваться иммунокомпетентными клетками человека, является важным шагом на пути развития ДК-вакцин.



В последние годы разработка возможных методов лечения онкозаболеваний сосредоточена на развитии специфических противоопухолевых вакцин, способных модулировать собственный иммунный ответ против специфических опухолевых антигенов. Все подходы различаются по природе антигенов и тому, как происходит доставка опухолевых АГ эффекторным клеткам иммунной системы. Одним из таких источников антигенов являются ДНК-конструкции, которые способны кодировать несколько иммуногенных эпитопов разных опухоль-ассоциированных антигенов. Трансфекция такими ДНК-конструкциями дендритных клеток позволяет максимально приблизить условия обработки и презентации опухолевых антигенов эффекторным клеткам иммунной системы. Исходя из этого, представлялось интересным исследовать индукцию противоопухолевого иммунного ответа мононуклеарных клеток зрелыми дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, содержащими эпитопы опухоль-ассоциированных антигенов, а также сравнить уровень цитотоксического иммунного ответа при использовании дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами различной природы.

## Глава 2. Материалы и методы

### Среды и реагенты

Культуральные среды RPMI-1640 («Биолот»), EMEM («Вектор»), DMEM («Биолот Россия»), физиологический раствор, забуференный фосфатным буфером pH=7,4 (ЗФР), эмбриональная сыворотка телят (ЭТС) («HyClone»), 2-меркаптоэтанол («Sigma»), L-глутамин («Биолот»), инсулин бычий («Пан-Эко»), гентамицин (KRKA, Словения), ампициллин (ЗАО «Синтез» Курган), бензилпенициллин («ЗАО «Синтез» Курган»), буфер HEPES («Sigma»), TWEEN 20%, трипсин. Рекомбинантные человеческие (рч) цитокины: рчИЛ-4, рчГМ-КСФ, рчФНО- $\alpha$ , рчИЛ-12, рчИЛ-18 («Reprotech»). Моноклональные антитела для проточной цитофлуорометрии: anti-human CD14-PE, anti-human CD83-FITC, anti-human CD86-PE, anti-human HLA-DR-FITC, anti-human CD209-PerCP-Cy, anti-human CD205 (DEC205)-PE, anti-human CD80-PE, anti-human perforin-FITC, anti-human granzyme B – PE, anti-human CD8 – APC (APC-H7) (все – «BD Pharmigen»). Скребок для снятия клеточных культур («TRP», Швейцария), контейнеры «Гемасин» 250/200 с гемоконсервантом Фаглюцидом («Синтез», г. Курган), культуральные флаконы («TRP», Швейцария), 96-луночные круглодонные планшеты («TRP»), 96-луночные плоскодонные планшеты («Costar»), 48-луночные планшеты (Cellstar, США), чашки Петри («Nunc»), пробирки «Falcon», фильтр 0,45мкм (TRP, Швейцария), цитотоксический тест CytoTox96 (Promega, США), набор Allset™ Gold HLA A Low Res SSP («Invitrogen», США), набор для трансфекции MATRa-A (Promokine).

### ДНК-конструкции

Плазмидные вектора, используемые для трансфекции дендритных клеток, были разработаны и любезно предоставлены к.б.н. Максютковым А.З. (ООО «АваксисБиотерапевтикс»):

- Плазмида E – плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-E**, кодирующая полный ген ErbB2;
- Плазмида A<sub>HER</sub> – плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-A1**, кодирующая поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты белка ErbB2/HER2-neu;
- Плазмида A – эквимольная смесь трех плазмидных ДНК-конструкций, **pDNA5-BC-A1**, **pDNA5-BC-A2** и **pDNA5-BC-A3**. Плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-A2** кодирует поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий 73 HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов HER2, mammaglobin, NY-BR-1, и hMena. Плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-A3** кодирует поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий 74 HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов WT1, hTERT, survivin, p53 и Muc1;
- Плазмида p5 – контрольная плазмидная ДНК-конструкция **pDNA5-BC-C**, кодирующая белок Ag51, не являющийся опухолевым антигеном.

Описание способа получения ДНК-конструкций, а также структуры иммуногенных эпитопов представлено в Приложении 1.

#### **Объект исследования**

В работе использовалась венозная кровь от 40 пациенток с первично-верифицированным диагнозом «рак молочной железы», IA, IIA и IIb стадий, не проходившие химио- и/или лучевую терапию в неoadьювантном режиме, поступившие на хирургическое лечение в онкологическом отделении №3 ГКБ №1 (МБУЗ ГКБ №1 города Новосибирска). В день операции до оперативного вмешательства у пациенток забирали периферическую венозную кровь в контейнеры «Гемасин» в объеме 100мл. Во время операции забирался фрагмент опухолевого материала, объемом 1-2 см<sup>3</sup>. Определение уровня экспрессии рецептора Her2/neu на материале опухолевой ткани проводилось методом иммуногистохимического анализа, результаты предоставлены проф., д.м.н., Сидоровым С.В.. В таблице 1

представлена характеристика пациентов, вошедших в данное исследование. В качестве контроля использовалась периферическая венозная кровь 9 HLA-A\*02 позитивных условно-здоровых доноров, средний возраст 37,7 года (от 25 до 56 лет). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИКИ» (№91 от 25.09.2015г) и проводилось с добровольного информированного согласия всех больных и условно здоровых доноров.

Таблица 1. Характеристика группы пациентов

Пол	Женский – 100% (40/40)
Средний возраст	58,6 лет (35-77)
Наличие HLA-A02 генотипа	HLA-A*02 – позитивные – 50% (20/40), HLA-A*02 – негативные – 50% (20/40).
Экспрессия рецептора ErbB2/Her2-neu на поверхности опухолевых клеток	Экспрессирующие рецептор Her2/neu – 65% (26/40), из них высокоэкспрессирующих (2+, 3+) - 46% (12/26). Неэкспрессирующие рецептор Her2/neu – 35%(14/40)
TNM	T1N0M0 – 32,5% (13/40), T1N1M0 – 10% (4/40), T2N0M0 – 30% (12/40), T2N1M0 – 27,5% (11/40)
Гистологический диагноз	Инфильтративно-протоковый рак – 95 % (38/40), аденокарцинома – 2,5% (1/40), папиллярный рак – 2,5% (1/40)

### Культивирование клеточной линии MCF-7.

Линия клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 была получена из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Культивирование клеточной линии MCF-7 осуществлялось в среде EMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 80 мкг/мл гентамицина, 2мМ L-глутамина,  $5 \times 10^{-5}$  мМ меркаптоэтанола и 10мкг/мл бычьего инсулина. Пассажи проводились один раз в 3-4 дня, при достижении монослоя в культуральном флаконе, снятие клеток осуществлялось ферментативным способом с помощью раствора Версена и трипсина (3:1) на льду. Жизнеспособность клеточной линии на момент использования в опыте составляла не менее 92%.

### **Выделение мононуклеарных клеток периферической крови**

Мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови выделяли в стерильных условиях стандартным методом в градиенте фиккола-урографина ( $\rho=1,077$  г/л) [40, Воупт А., 1968]. Для этого, 100 мл цельной крови исследуемых пациентов разводили 50 мл среды RPMI 1640. Далее 30 мл крови наслаивали на 15 мл фиколл-урографина и центрифугировали 45 минут при 1500 об/мин и температуре 20-22 °С. Интерфазное кольцо, содержащее МНК, собирали, дважды отмывали в 15 мл среды RPMI 1640. После выделяли клетки с повышенной адгезивной способностью. Для этого отмывые клетки ресуспендировали в 25 мл полной среды RPMI, содержащей 10% FCS, 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES буфера,  $5 \times 10^{-4}$  М 2-меркаптоэтанола, 80 мкг/мл гентамицина, 100 мкг/мл бензилпенициллина, переносили в культуральные флаконы ( $75\text{см}^3$ ) в максимальной концентрации 50 млн. клеток на 1 флакон и инкубировали в течение 2 часов в атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  при 37 С.

Через 2 часа, среду с неприлипшими клетками удаляли, клетки осаждали путем центрифугирования при 1200 об/мин в течение 10 минут и переносили в культуральный флакон со средой RPMI-1640 до проведения процедуры ссаживания. Клетки культивировались в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  при 37°С.

Поверхность культурального флакона с прилипшими клетками омывали средой RPMI-1640, клетки собирали с помощью скребка для клеточных культур, осажда-

ли путем центрифугирования при 1200 об/мин в течение 10 минут и разводили до концентрации 1 млн/мл.

### **Получение лизата опухолевых клеток**

Опухолевые клетки получали путем механической и ферментативной дезагрегации опухоли. Для этого, образец опухоли в стерильных условиях отчищали от соединительной ткани и разделяли на фрагменты 2-3 мм<sup>2</sup>. Для дезагрегации фрагменты опухоли помещали в раствор трипсин-Версена на 24 часа при +4<sup>0</sup>С, а затем на 40 минут при 37<sup>0</sup>С. После, полученный раствор мягко ресуспензировали и помещали в полную среду RPMI 1640 с 10% FCS для инактивации трипсина. Оставшиеся крупные фрагменты подвергали дополнительной механической дезагрегации. Полученные суспензии клеток помещали в 5 мл среды RPMI 1640, центрифугировали при 1000 об/мин 10 минут и разделяли на две части. Первая часть клеток замораживалась в 90% FCS и 10% ДМСО при -76<sup>0</sup>С для хранения и дальнейшего проведения цитотоксического теста. После размораживания жизнеспособность полученных опухолевых клеток оценивали по окрашиванию эритрозином, она составляла не менее 50%.

Для получения лизата, оставшиеся клетки подвергали трем циклам замораживания в среде RPMI 1640 до -76<sup>0</sup>С в течение 20 минут с последующим оттаиванием при комнатной температуре, а затем пропускали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Общая концентрация белка в лизате определялась на приборе «NanoDrop» (Thermo Scientific, США) по соотношению оптической плотности на длине волны 260/280 нм.

Протокол получения ДНК-конструкций, а также структура универсальных и HLA-A\*02:01-специфических цитотоксических Т-клеточных эпитопов указаны в приложении 1.

### **Получение популяции антиген-активированных дендритных клеток**

Прилипшую фракцию моноклеарных клеток культивировали в 48-луночном планшете в концентрации 1 млн/мл, в объеме 0,5мл в RPMI-1640 с добавлением 10% FCS, гентамицина 80 мкг/мл, 2мМ L-глутамин, 5x10<sup>-5</sup> мМ меркаптоэтанола в присутствии ростовых факторов: 50 нг/мл рчГМ-КСФ и 100 нг/мл рчИЛ-4 в те-

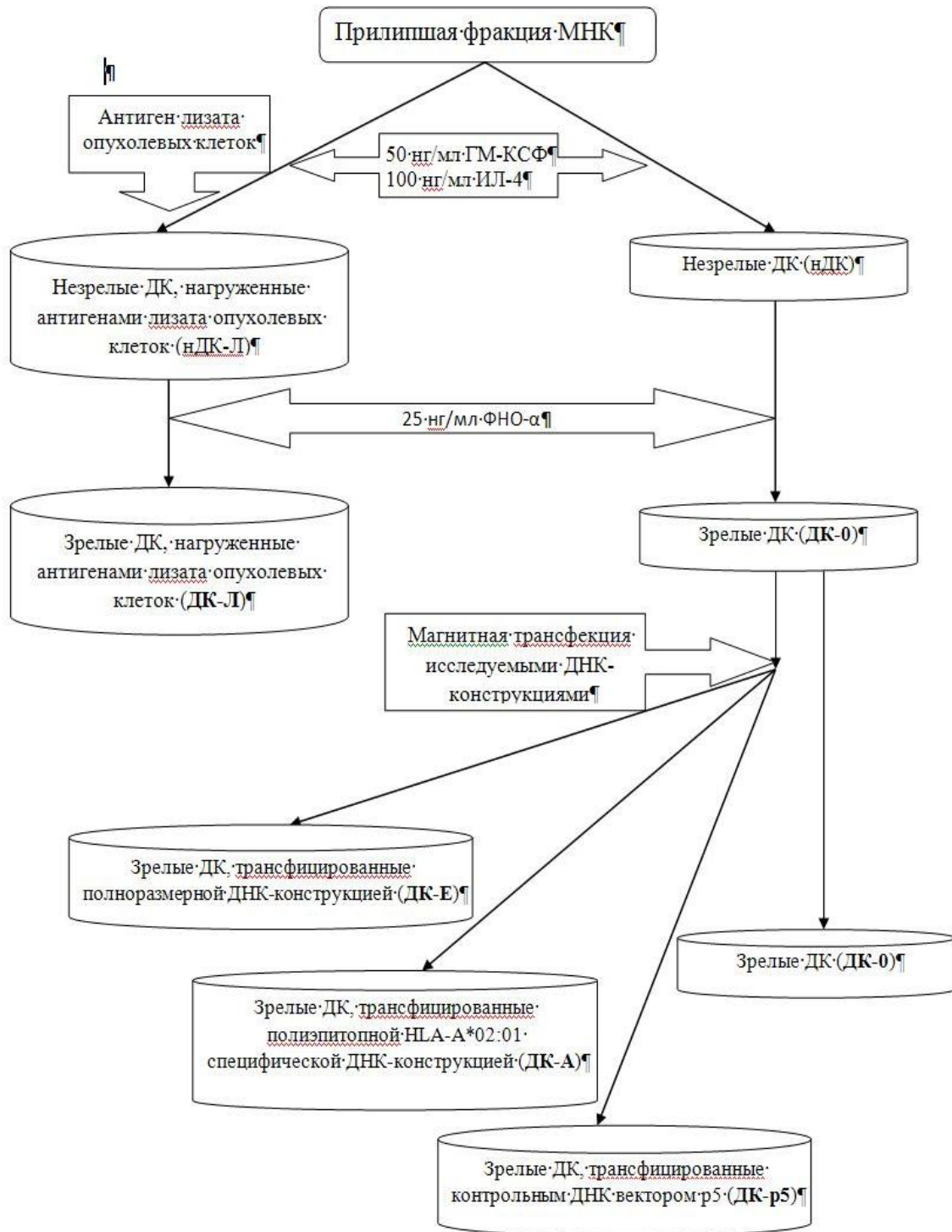
чение 96 часов для получения популяции незрелых дендритных клеток. В часть лунок с популяцией незрелых ДК спустя 48 часов от начала культивирования добавлялся лизат аутологичных опухолевых клеток в концентрации 100 мкг/мл для получения популяции лизат-активированных ДК (ДК-Лизат). Для получения популяции зрелых ДК, во все лунки спустя 96 часов от начала культивирования, независимо от проведенной антигенной стимуляции, добавлялся рчФНО- $\alpha$  (25 нг/мл) [Obermaier В., 2003]. Для нагрузки оставшихся ДК опухолевыми антигенами через 24 часа после добавления рчФНО- $\alpha$  проводили трансфекцию клеток ДНК конструкциями. В качестве контроля использовали популяцию ДК, созревание которых происходило без добавления лизата опухолевых антигенов и ДК, трансфицированных плазмидой, не кодирующей опухолевые антигены.

### **Трансфекция и оценка эффективности трансфекции ДК**

Процедура магнитной трансфекции осуществлялась с помощью реактивов фирмы Promokine согласно протоколу производителя. Для этого, за 20 минут до проведения трансфекции в 25мкл среды DMEM проводили образование комплекса 0,3мкл реагента МАTra-A, представляющего собой магнитные наночастицы, и 0,3 мкг исследуемой ДНК конструкции при комнатной температуре. За 5 минут до окончания инкубации в соответствующих лунках, содержащих популяцию зрелых ДК, проводилась смена культуральной среды RPMI-1640 на 250 мкл культуральной среды DMEM. Для осуществления непосредственно процесса трансфекции, полученный комплекс плазида-МАTra-A добавлялся в каждую исследуемую лунку в объеме 25 мкл. Планшет с клетками помещали на магнитную плату в течение 15 минут. По окончании процедуры трансфекции, осуществлялась смена среды DMEM. Последующее культивирование клеток продолжалось в 300 мкл полной среды RPMI-1640 без сопутствующих созревающим стимулов в течение 24 часов в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 С до проведения следующего этапа работы.

Оценка эффективности трансфекции проводилась с помощью набора для нуклеотидной трансляции Promo-Fluor-500 Nick Translation Labeling Kit («Promokine), с дальнейшим анализом на проточном цитофлуориметре с использованием метода Flow-Fish [Rufner N., 1999].

Полная схема получения дендритных клеток, использующихся в эксперименте, представлена на рисунке 1.



**Рисунок 1** Схема получения антиген-активированных дендритных клеток

Примечание:

МНК – мононуклеарные клетки; ДК – дендритные клетки; нДК – незрелые ДК

ДК0 – культура зрелых ДК, созревание которых происходило в отсутствие антигенной стимуляции;



ДК-p5 – культура ДК, трансфицированных контрольной плазмидой ДНК-конструкцией pDNA5-BC-C;

ДК-A – культура ДК, трансфицированных одним из вариантов HLA-A\*02:01-специфичной плазмидной ДНК-конструкции, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*02:01-антигенные детерминанты;

ДК-E – культура ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей полный белок ERBB2;

ДК-Л – культура ДК, нагруженных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток.

### **Определение фенотипических и функциональных показателей дендритных клеток.**

Оценку фенотипа клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе BD FACS Aria (Becton Dickinson США), предварительно проведя мечение соответствующими моноклональными антителами CD3-Fitc/CD14-PE, HLA-DR-Fitc/ CD11c-PE, CD86-Fitc/CD83-PE. Для анализа 100 тыс. исследуемых клеток отмывались от культуральной среды RPMI-1640 в 200 мкл раствора PBS с азидом натрия ( $\text{NaN}_3$ ), центрифугировались 10 минут при 1500 об/мин и помещались в 100 мкл раствора PBS с азидом. Клетки инкубировали с соответствующими сочетаниями антител в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. По окончании инкубации, клетки повторно отмывались от антител и фиксировали в 100 мкл холодного раствора 1% параформальдегида для последующего анализа.

Способность полученных ДК к рецептор-опосредованному эндоцитозу оценивалась по способности клеток в зависимости от температуры культивирования поглощать FITC-меченный декстран [Sallusto F., 1995]. Для этого, 100 тыс. исследуемых клеток отмывали от культуральной среды RPMI-1640 раствором PBS с азидом (объем 500 мкл) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. Клетки инкубировали в 100 мкл раствора PBS с азидом при добавлении 10 мкл раствора FITC-меченного декстрана (0,5 мг/мл) в течение 60 минут при  $+4^{\circ}\text{C}$  (на льду) и  $+37^{\circ}\text{C}$ . Далее для подавления поверхностной неспецифической флуоресценции добавляли 100 мкл раствора трипанового синего (0,5 мг/мл) при  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 5 минут с последующей двукратной отмывкой. Индекс эндоцитозной ак-

тивности дендритных клеток определялась путем вычисления отношения внутриклеточного поглощения FITC-меченного декстрана при 37С к неспецифическому связыванию, которое происходит при +4С.

### **Совместное культивирование различных популяций ДК и мононуклеарных клеток**

Совместное культивирование исследуемых популяций дендритных клеток (ДК(А или А<sub>Her</sub>), ДК(Лизат), ДК(Е)) и неприлипшей фракции мононуклеарных клеток (нфМНК) проводилось в 48-луночных и 96-луночных планшетах в течение 96 часов, в соотношении 333 мкл МНК и 33 мкл ДК в 48-луночном планшете, и 222 мкл МНК и 22 мкл ДК в 96-луночном планшете. Для этого, неприлипшую фракцию МНК собирали из культурального флакона, центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут и доводили до концентрации 1 млн/мл. Исследуемые дендритные клетки собирали по группам в отдельные пробирки, центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 минут и доводили до концентрации 1 млн/мл. Совместное культивирование клеток (ДК и МНК) проводили в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, гентамицина 80 мкг/мл, 2мМ L-глутамина,  $5 \times 10^{-5}$  меркаптоэтанола, в присутствии или отсутствии рЧИЛ-12 – 10нг/мл и рЧИЛ-18 – 100 нг/мл. Таким образом, каждая группа клеток (исследуемые и контрольные) была поделена на 2 подгруппы, в зависимости от условий культивирования:

- без дополнительного воздействия;
- при добавлении цитокинов (рЧИЛ-12 и рЧИЛ-18);

В качестве контроля использовали неприлипшую фракцию мононуклеарных клеток, культивированную в тех же условиях, а также сокультивированных с дендритными клетками, созревание которых происходило в отсутствии опухолевых антигенов или с дендритными клетками, трансфицированными контрольной плазмидой, не кодирующей опухолевые антигены.

Для оценки количества перфорин-позитивных клеток, спустя 48 часов после ссаживания клеточную суспензию из 96-луночного планшета отмывали, а затем продолжали культивирование в объеме 250 мкл полной среды RPMI-1640, в те-

чение 48 часов без совместного культивирования с опухолевыми клетками опухолевых клеток.

Таким образом, после ссаживания получились следующие группы клеток:

- нфМНК и нфМНК + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18;
- нфМНК + ДК(0) и нфМНК + ДК(0) + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18;
- нфМНК + ДК(p5) и нфМНК + ДК(p5) + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18.
- нфМНК + ДК(A-HER) и нфМНК + ДК(A-HER) + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18;
- нфМНК + ДК(A) и нфМНК + ДК(A) + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18;
- нфМНК + ДК(E) и нфМНК + ДК(E) + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18;
- нфМНК + ДК(Лизат) и нфМНК + ДК(Лизат) + рЧИЛ-12+рЧИЛ-18.

#### **Определение цитотоксического эффекта на опухолевые клетки и клеточную линию MCF-7.**

Для оценки цитолитической активности совместной культуры нфМНК и ДК использовали нерадиоактивный цитотоксический тест CytoTox96 (Promega, США), основанный на количественном определении содержания внутриклеточного фермента – лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которое увеличивается пропорционально гибели опухолевых клеток [Korzeniewski]. Процедуру осуществляли согласно протоколу фирмы-производителя. Для этого, перед постановкой цитотоксического теста проводили инкубацию в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 37 °С в течение 16-18 часов клеток-мишеней – аутологичных опухолевых клеток или клеток опухолевой линии MCF-7 – с совместной культурой нфМНК (клетки-эффекторы) и ДК в соотношении 10:1. Гибель клеток-мишеней оценивали по высвобождению внутриклеточного фермента (лактатдегидрогеназы). Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра при длине волны 490 нм. Уровень цитотоксичности оценивали как отношение оптической плотности в образце со смесью эффекторов и мишеней к оптической плотности в образце с полностью лизированными мишенями, выраженное в процентах. Учитывали поправки на присутствие ЛДГ в среде и спонтанный выход ЛДГ из эффекторов и клеток-мишеней (опухолевые клетки).

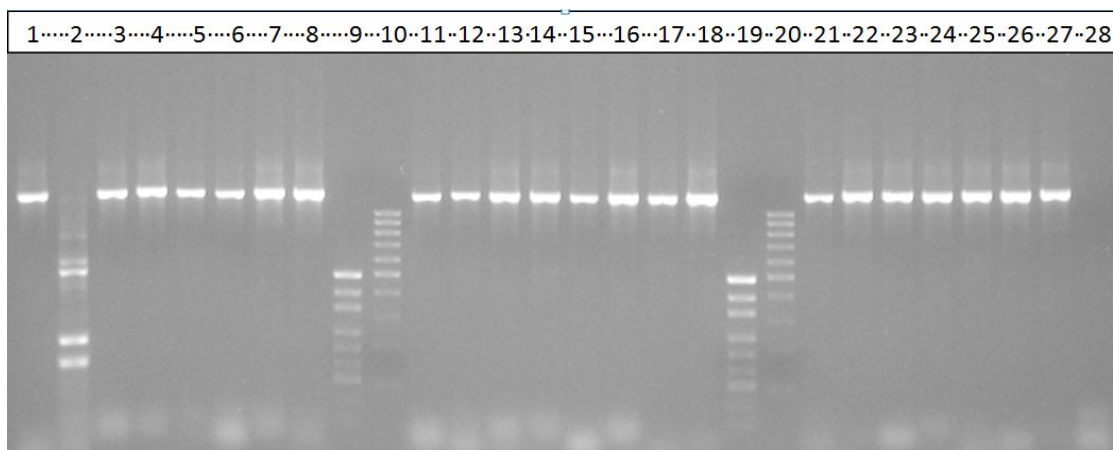
#### **Определения содержания перфорин-позитивных клеток**

Для определения количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах нфМНК с исследуемыми и контрольными группами ДК проводили методом проточной цитофлюориметрии на приборе BD FACS Aria (Becton Dickinson США), используя соответствующие моноклональные антитела FITC-perforin. Для этого, анализируемые клетки собирали, однократно отмывали раствором PBS с азидом в объеме 500 мкл при 1200 об/мин в течение 10 минут, проводили фиксирование клеток в 100 мкл холодного раствора 1% параформальдегида в течение 20 минут. Фиксированные клетки повторно отмывали, осадок ресуспензировали в 200 мкл PBS, содержащего 0,2% Tween 20 и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре для пермеабиллизации клеточной мембраны. После этого, клетки повторно отмывали и инкубировали в 10 мкл PBS с 2 мкл FITC-меченных антител к перфоруину в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации, клетки отмывали от метки и повторно фиксировали в 100 мкл холодного раствора 1% параформальдегида для дальнейшего определения перфорин-позитивных клеток.

#### **Генотипирование для выявления аллеля HLA-A\*02.**

Для генотипирования использовали оставшиеся клетки от неприлипшей фракции мононуклеарных клеток. Выделение ДНК осуществлялось фенол-хлороформным способом с последующим типированием на наличие аллеля HLA-A02 с использованием коммерческого набора ALLSET™ GOLD HLA A LOW RES SSP («Invitrogen», США) согласно инструкции производителя.

В ходе проведения работы набрана группа условно-здоровых доноров (27 человек), среди которых было выявлено 18 человек носителей аллеля HLA-A02, из них 3 имели гомозиготный набор. Все пациентки (n=40), входившие в исследование, были генотипированы (рисунок 2), и по итогам были разделены на пациентов несущих аллель HLA-A\*02 (n=20), и несущих другие аллельные варианты (n=20).



**Рисунок 2** Электрофорез в 2% агарозном геле образца ДНК гомозиготного по HLA-A02 (донор № 6). Во 2-ой лунке (слева направо) положительные банды, свидетельствующие о наличии аллеля HLA-A02. Лунки 9, 10, 19 и 20 – маркеры молекулярного веса ДНК.

Также было показано наличие аллеля HLA-A02 у клеточной линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, на которой в последующих этапах проводилось тестирование цитотоксичности культуры МНК и ДК.

### **Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка результатов производилась при помощи программы «Statistica 6.0». Для статистической проверки значимости результатов использовались критерии ANOVA для повторных измерений, Уилкоксона и Манна-Уитни. Различия сравниваемых параметров считали статистически значимыми, если вероятность ошибки  $p$  была меньше 0,05. Все данные представлены в виде среднего и ошибки среднего для параметрического распределения, медианы и квартильного размаха для непараметрического распределения. Для построения графиков использовалось программное обеспечение GraphPadPrism 6.0.

### Глава 3. Результаты исследований

#### 3.1 Оценка протокола получения зрелых дендритных клеток в группе условно-здоровых доноров

Культуры зрелых ДК получали из прилипшей фракции МНК по ранее отработанной схеме согласно методике, описанной в главе «Материалы и методы» [Хрипко 2008, Шевченко 2009, Шевченко 2008]. Фенотипический профиль полученных клеток определялся на проточном цитофлуориметре FACS Aria.

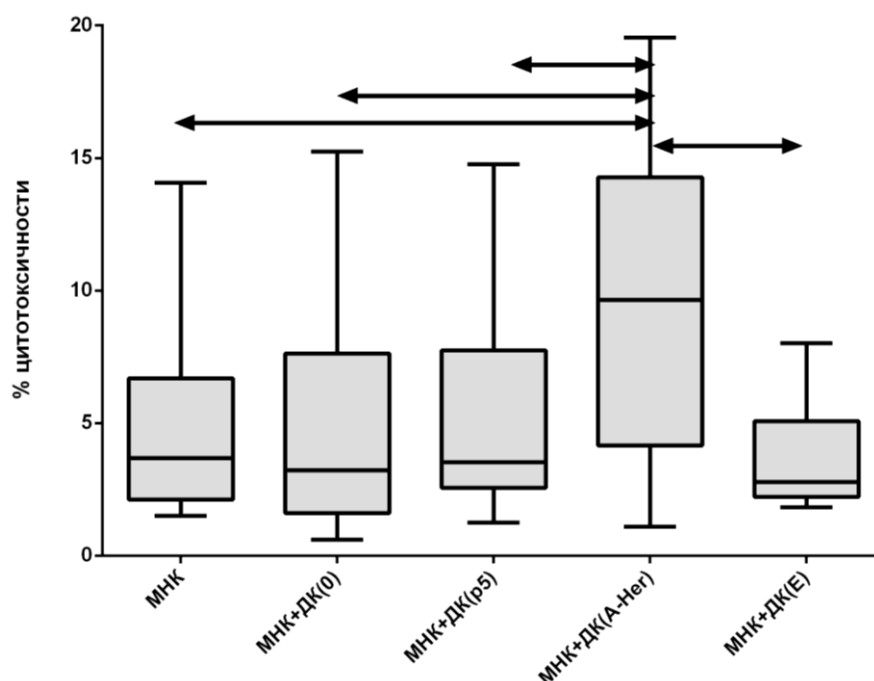
В группе условно-здоровых доноров показано достоверное снижение уровня экспрессии маркера CD14, и достоверное увеличение CD83, на поверхности ДК, что согласуется с литературными данными по описанию фенотипа ДК [Burdek M., 2010; Dauer M. 2003; Obermaier B., 2003]. При сравнении показателя эндоцитозной активности незрелые дендритные клетки более интенсивно по сравнению со зрелыми дендритными клетками захватывают АГ, что свидетельствует о преобладании механизма рецептор-опосредованного эндоцитоза, и о сохранении способности зрелых ДК к неспецифическому связыванию декстрана без проникновения его в клетку.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности протокола получения дендритных клеток из мононуклеарных клеток периферической крови. Незрелые ДК обладают более высокой эндоцитозной активностью, что может быть использовано для нагрузки их опухолевыми антигенами. Используемые в дальнейшей работе ДК, обладают фенотипом, относящимся к зрелым дендритным клеткам, и имеют соответствующую своей степени зрелости эндоцитозную способность.

### **3.2 Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК конструкциями, на цитотоксический потенциал культуры мононуклеарных клеток условно-здоровых доноров**

На следующем этапе работы необходимо было провести оценку способности ДК, трансфицированных опытными плазмидами (HLA-A\*02:01-специфичной для белка HER2/neu, т.н.плазида A<sub>HER</sub>, и кодирующей полноразмерный белок ERBB2, т.н.плазида E), стимулировать цитотоксический потенциал культуры МНК. Для этого, было решено использовать два теста: определение цитотоксической активности в отношении клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, а также стимуляцию культуры МНК по накоплению перфорин-позитивных клеток. Клеточная линия MCF-7 была выбрана в связи с показанной экспрессией опухолевого антигена HER2-neu и молекулы HLA-A\*02:01 [Subik K., 2010]. Набор группы условно-здоровых доноров осуществлялся с проведением генотипирования и включением в исследование только HLA-A\*02-позитивных доноров.

Для оценки цитотоксичности МНК мы использовали тест, в котором определялось количество высвобожденного фермента ЛДГ при совместном культивировании клеток с клеточной линией аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (рисунок 3).



**Рисунок 3 Цитотоксическая активность культуры моноклеарных клеток, сокультивированных с аутологичными дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, против клеточной линии MCF-7 в группе HLA-A\*02-позитивных условно-здоровых доноров (N=8). Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей.**

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции;

МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;

МНК+ДК(A-Her) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu;

МНК+ДК (E) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей полный белок ERBB2;

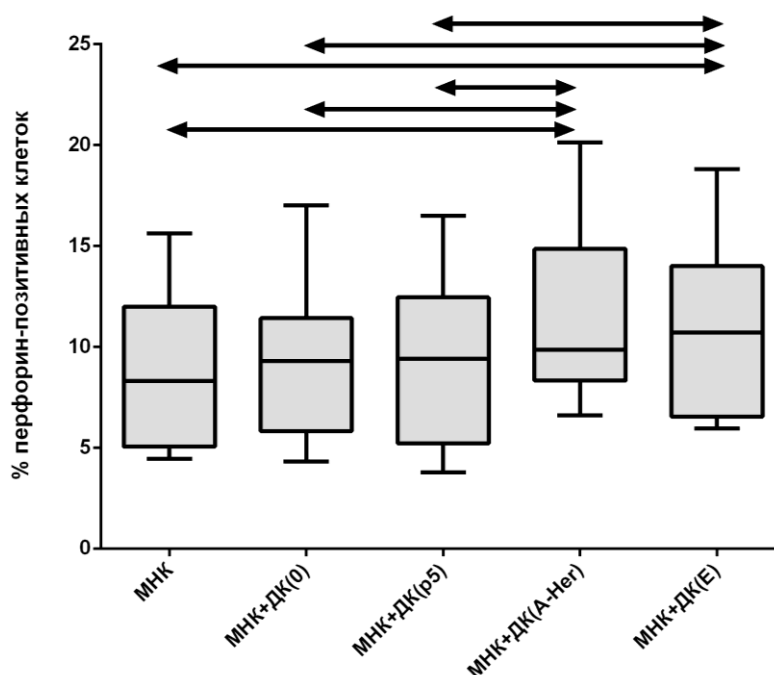
Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ ).

В результате проведенного эксперимента нами установлено, что трансфекция зрелых ДК плазмидой A<sub>HER</sub>, приводит к достоверному увеличению цитотоксического ответа культуры МНК по сравнению со всеми контрольными группами (нативной культурой МНК, совместной культурой МНК с ДК без трансфекции, со-



вместной культурой МНК с ДК, трансфицированными контрольным вектором р5), а также с ДК, трансфицированными плазмидой E.

Однако, как следует из рисунка 4, трансфекция ДК обеими исследуемыми плазмидами (плазмидой A<sub>HER</sub> и плазмидой E) достоверно увеличивают цитотоксический потенциал культуры МНК через стимуляцию перфорин-позитивных клеток.



**Рисунок 4** Содержание перфорин-позитивных клеток в совместной культуре мононуклеарных клеток HLA-A\*02-позитивных условно-здоровых доноров и аутологичных дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями (N=10). Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей.

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции;

МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;

МНК+ДК(A-Her) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu;

МНК+ДК (E) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей полный белок ERBB2;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ ).

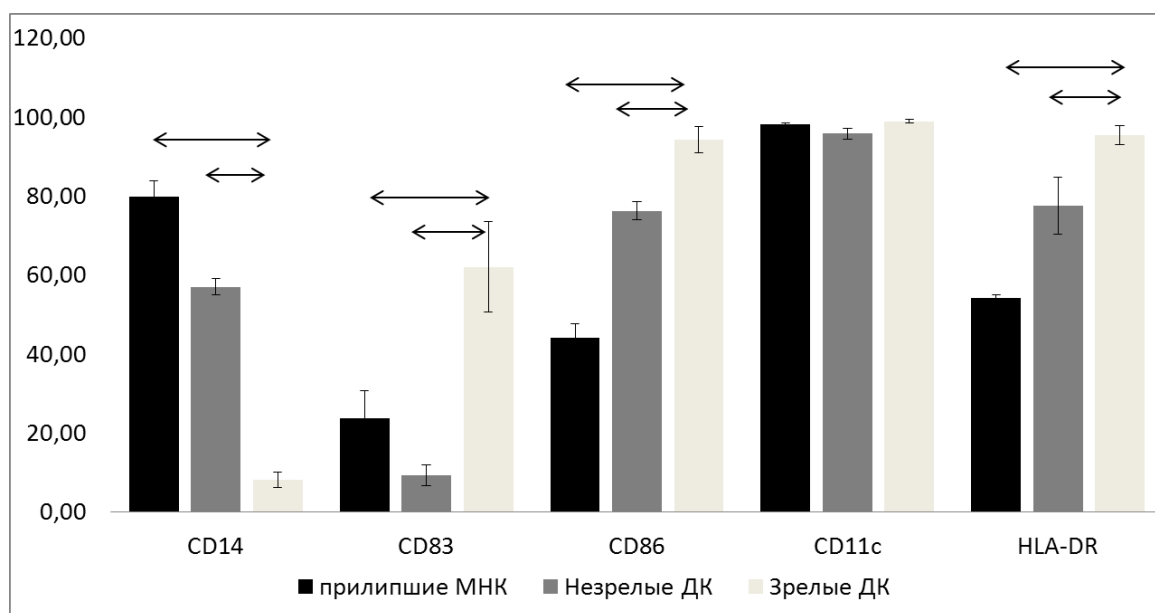
Несмотря на стимуляцию перфорин-позитивных клеток, использование ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими полноразмерный белок ERBB2, не приводит к развитию эффективной цитотоксической активности МНК, что может быть связано с наличием иммуносупрессорных и латентных эпитопов, входящих в состав ДНК-конструкции.

В результате проведенной работы было показано достоверное влияние ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2/neu, на количество клеток несущих перфориновые гранулы, а также на цитотоксический ответ в отношении клеточной линии MCF-7, что свидетельствует об эффективности индукции специфического цитотоксического иммунного ответа в культуре МНК с помощью трансфицированных дендритных клеток. В дальнейшем, в связи с показанной неэффективностью применения плазмиды, кодирующей полноразмерный белок ERBB2, нами было решено продолжить работу с использованием материала больных раком молочной железы под воздействием только HLA-A\*02:01-специфичной полиэпитопной ДНК-конструкцией. В связи с гетерогенностью антигенного профиля аутологичных опухолевых клеток, в целях формирования эффективного иммунного ответа, было решено использовать трансфекцию ДК эквимольной смесью 3 HLA-A\*02:01 ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфические антигенные детерминанты различных опухоль-ассоциированных антигенов. Использование эквимольной смеси 3 ДНК-конструкций, позволяет уменьшить размер конструкции, что облегчает процесс трансфекции и последующие процессинг и презентацию антигенов дендритными клетками.

### 3.3 Оценка протокола получения зрелых дендритных клеток в группе больных раком молочной железы

Для проведения дальнейшей работы нами проводилась оценка эффективности протокола получения культуры зрелых дендритных клеток из прилипшей фракции мононуклеарных клеток периферической крови у больных РМЖ. Для этого мы оценивали уровень экспрессии основных дифференцировочных маркеров и уровень эндоцитозной активности полученных клеток согласно методике, описанной выше.

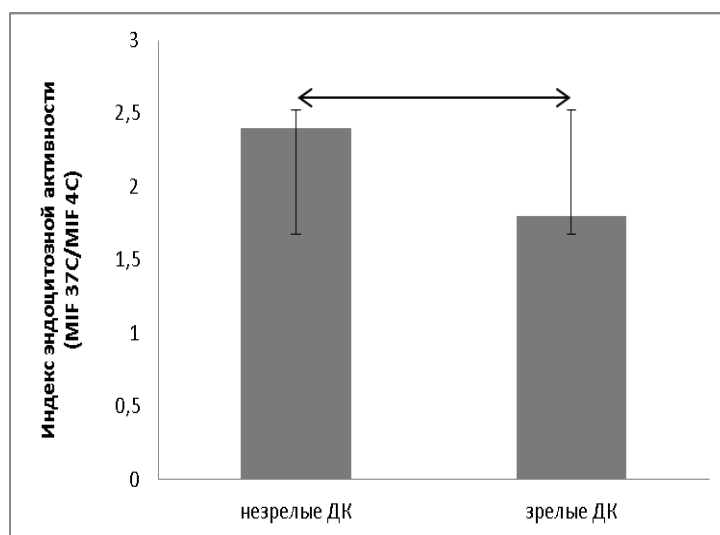
Показано, что под действием соответствующих цитокинов МНК больных раком молочной железы дифференцируются в зрелые ДК и имеют фенотип, соответствующий характеристикам зрелых ДК (Рисунок 5).



**Рисунок 5** Экспрессия дифференцировочных маркеров прилипающей фракцией МНК, незрелыми и зрелыми дендритными клетками больных раком молочной железы (N=5)

Примечание: Данные представлены как процент (%) положительных клеток в популяции моноцитов. Стрелками показаны достоверные различия (Wilcoxon test,  $p < 0,05$ ).

На рис. 6 представлены результаты эндоцитозной активности дендритных клеток в группе больных раком молочной железы на разных этапах созревания дендритных клеток. Незрелые дендритные клетки больных раком молочной железы более интенсивно по сравнению со зрелыми дендритными клетками захватывают декстран, что указывает на сохранность рецептор-опосредованного механизма эндоцитоза у больных раком молочной железы.



**Рисунок 6 Индекс эндоцитозной активности дендритных клеток в зависимости от степени зрелости в группе больных раком молочной железы (N=5)**

Примечание: Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего (Wilcoxon test,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, использование данного протокола получения культуры ДК позволяет получать функционально-зрелые дендритные клетки из мононуклеарных клеток периферической крови, что позволяет использовать их в дальнейшем исследовании возможности формирования противоопухолевого иммунного ответа в группе больных раком молочной железы.

### **3.4 Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухолеассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток больных раком молочной железы**

На следующем этапе работы по исследованию возможности модуляции цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток больных раком молочной железы с помощью трансфицированных ДК, нами оценивались:

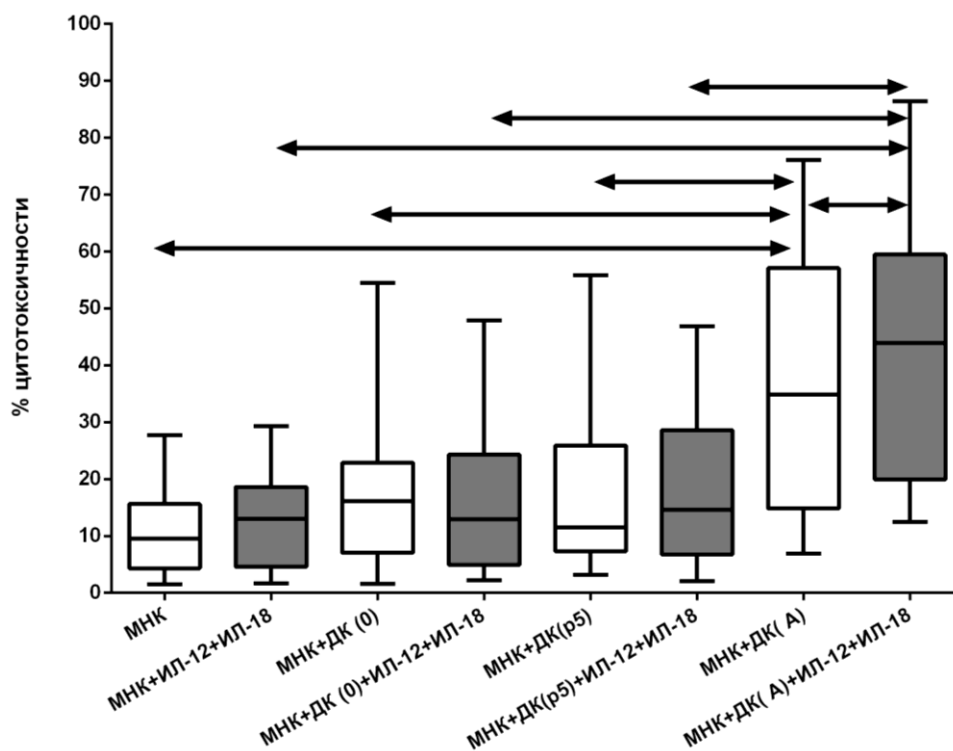
- цитотоксическая активность клеток против аутологичных опухолевых клеток, полученных из опухолевого материала;
- потенциальная цитотоксичность по накоплению количества клеток, содержащих гранулы перфорины;

Для усиления Th1-клеточных реакций использовались рекомбинантные цитокины ИЛ-12 и ИЛ-18, которые поляризуют дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 1-го типа. Синергическое действие ИЛ-18 и ИЛ-12 усиливает пролиферацию Т-клеток и продукцию ИФН- $\gamma$ , оказывает влияние на активацию, дифференцировку и выживаемость ЦТЛ *in vivo*, в его присутствии значительно возрастает эффекторная функция CD8<sup>+</sup> клеток [Schmidt CS, 2002; Obleuhova I.A., 2013].

Способность полученных трансфицированных ДК стимулировать прямую цитотоксическую активность против аутологичных опухолевых клеток оценивалась по уровню высвобождения внутриклеточного фермента лактатдегидрогеназы.

При анализе общей выборки пациентов было показано усиление цитотоксического эффекта при применении ДК, трансфицированных плазмидой А, по сравнению со всеми контрольными группами. При дополнительной стимуляции ИЛ-12 и ИЛ-18 было показано однонаправленное усиление цитотоксической активности в группе МНК с ДК, трансфицированной плазмидой А, по сравнению с клетками

всех контрольных групп. Кроме того, отмечено достоверное влияние ИЛ-12 и ИЛ-18 на цитотоксическую активность данной культуры по сравнению с аналогичной культурой клеток без дополнительных стимуляторов (Рисунок 7)



**Рисунок 7 Цитотоксический ответ мононуклеарных клеток больных раком молочной железы, сокультивированных с трансфицированными дендритными клетками, против аутологичных опухолевых клеток. (N=38). Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей.**

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции;

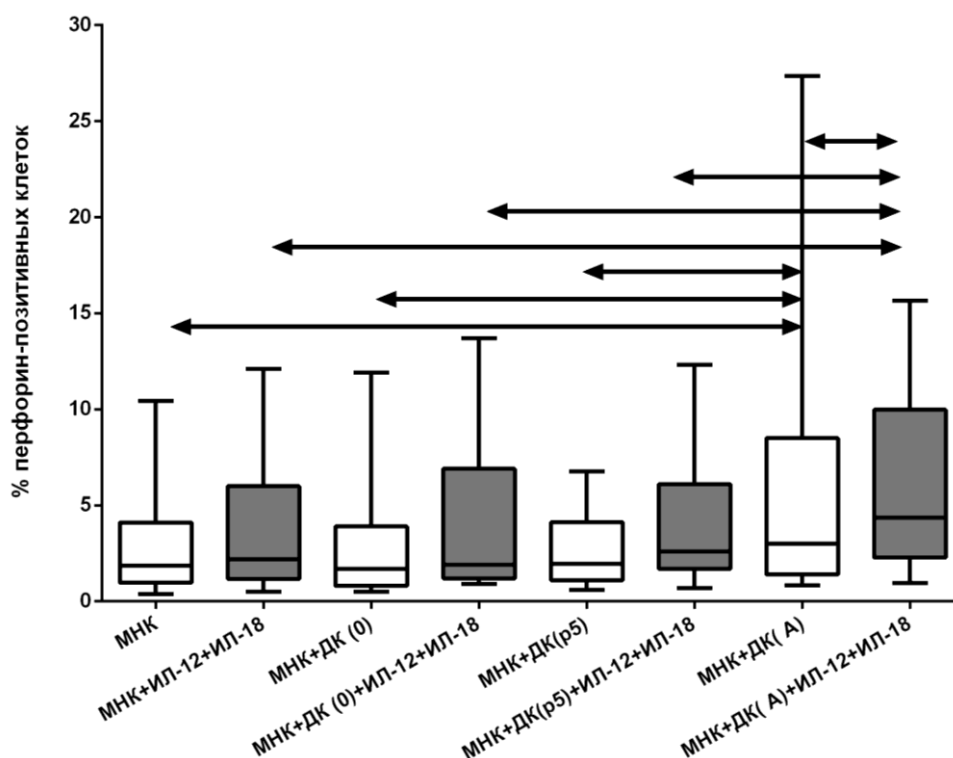
МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;

МНК+ДК(А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

При исследовании одного из возможных механизмов цитотоксической активности в культуре МНК нами отмечено достоверное увеличение перфорин-позитивных клеток в ответ на сокультивирование МНК и дендритными клетками,

трансфицированными плазмидой А, по сравнению со всеми контрольными группами (МНК, МНК+ДК(0), МНК+ДК(p5)), с увеличением количества перфорин-позитивных клеток при стимулирующем влиянии ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рисунок 8).



**Рисунок 8** Процентное содержание перфорин-позитивных клеток в культуре МНК больных раком молочной железы и аутологичных трансфицированных ДК (n=40). Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей.

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции;

МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;

МНК+ДК(А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

Низкое значение количества перфорин-позитивных клеток, помимо озвученного ранее, может быть связано с ранее происходящими цитотоксическими процессами в организме больного и соответствующей дегрануляцией клеток. Кроме то-

го, активная наработка внутриклеточных гранул перфорины происходит при непосредственном клеточном контакте клеток-эффекторов и клеток-мишеней, а в ходе нашего протокола оценка количества перфорин-позитивных клеток происходит вне такого контакта.

Таким образом, совместное культивирование зрелых дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, и неприлипающей фракции моноклеарных клеток приводит к достоверному повышению содержания перфориновых гранул с потенциальной цитотоксической активностью. Добавление иммунорегуляторных цитокинов, ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает дополнительное индуцирующее влияние на уровень цитотоксической активности МНК.

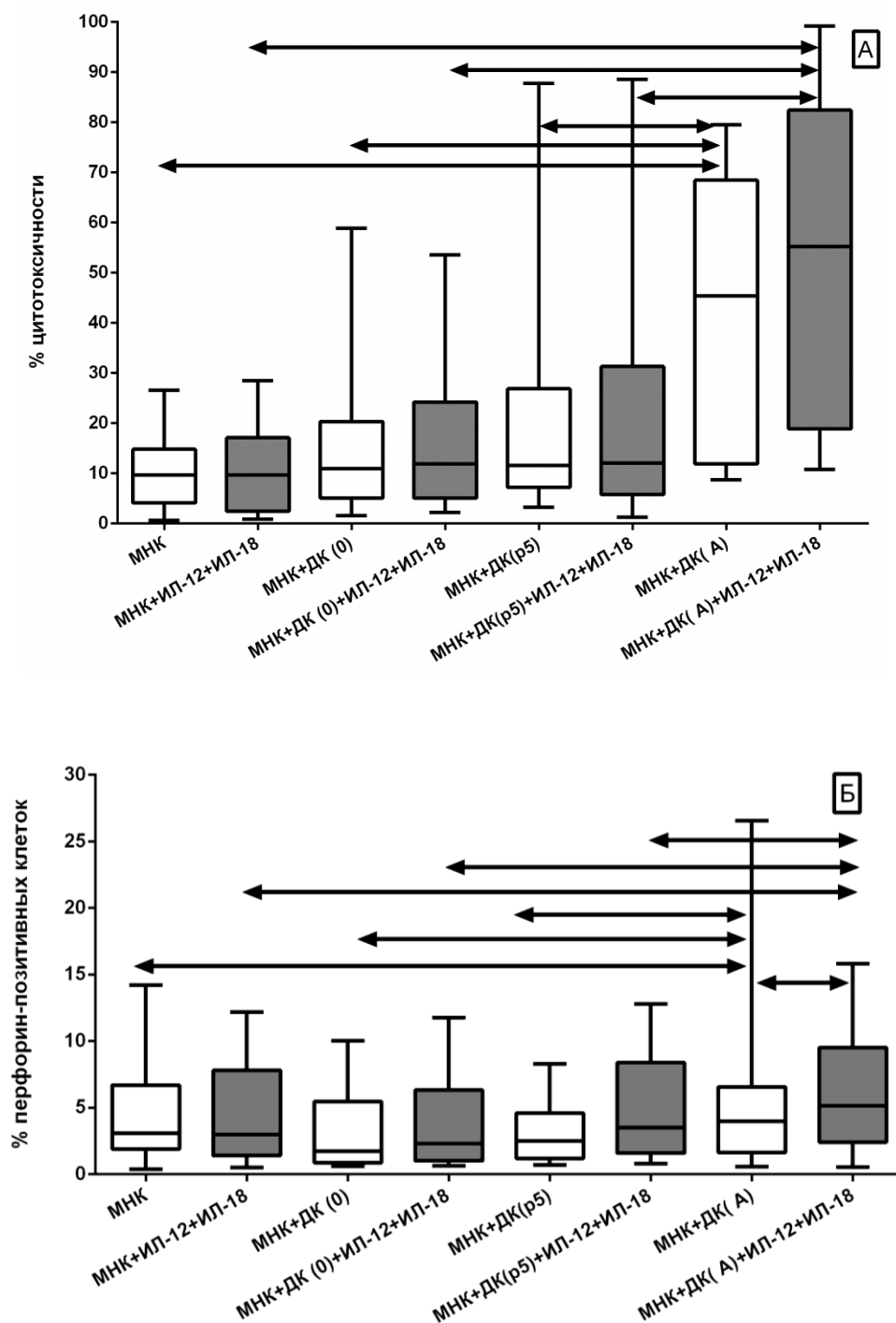
Система генов главного комплекса гистосовместимости (у человека это лейкоцитарные антигены — Human Leukocyte Antigens — HLA) осуществляет генетический контроль над развитием специфического иммунного ответа и участвует в поддержании иммунного постоянства организма. Большинство известных эпитопов ОАА представляются Т клеткам в комплексе с молекулами МНС I класса и распознаются опухоль-специфичными цитотоксическими CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Гаплотип HLA-A\*02 известен как наиболее распространенный вариант семейства HLA-A, а вариант HLA-A\*02:01 несут свыше 95% HLA-A2-позитивных лиц кавказоидной популяции [Chen, 2012]. В связи с вышперечисленными фактами, было решено разделить выборку больных РМЖ в зависимости от гаплотипа HLA-A\*02 и оценить эффективность трансфицированных полиэпитопной HLA-A\*02:01-специфичной ДНК-конструкцией дендритных клеток модулировать цитотоксический ответ в данных подгруппах.



**3.5 Влияние дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухолеассоциированных антигенов, на цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток больных раком молочной железы в зависимости от наличия генотипа HLA-A\*02**

После разделения больных по наличию HLA-A\*02, в каждой отдельной выборке пациентов оценивались цитотоксический ответ культуры МНК против аутологичных опухолевых клеток и количество перфорин-позитивных клеток в данных культурах, при сокультивировании с дендритными клетками, трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА.

В группе HLA-A\*02 позитивных больных (Рисунок 9А), дендритные клетки, трансфицированные плазмидой А, достоверно стимулируют цитотоксический ответ МНК при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18 по сравнению со всеми группами контроля (МНК, МНК+ДК(0) и МНК+ДК(p5)) против аутологичных опухолевых клеток.



**Рисунок 9. Цитотоксический эффект совместной культуры мононуклеарных клеток HLA-A\*02-позитивных больных раком молочной железы и трансфицированных дендритных клеток. Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей.**

**А) Цитотоксический тест (N=19)**

**Б) Процент перфорин-позитивных клеток (N=20).**

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) –совместная культура МНК и ДК без трансфекции;

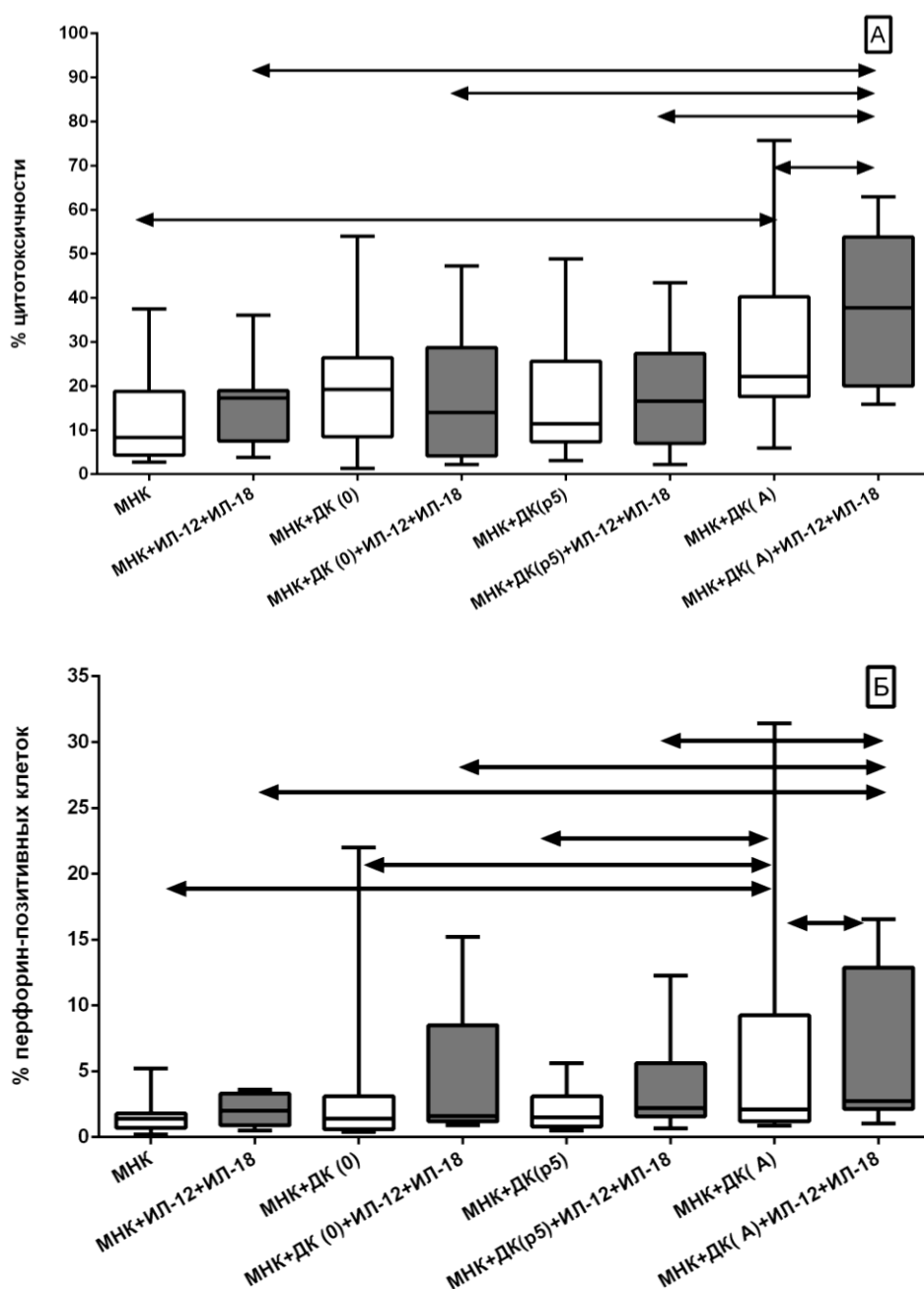
МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;

МНК+ДК (А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

В группе HLA-A\*02 позитивных больных, достоверная стимуляция перфорин – продуцирующей функции МНК в сравнении со всеми группами контроля (МНК, МНК+ДК(0), МНК+ДК (p5)) получена при совместном культивировании с ДК, трансфицированными плазмидой А, в культурах клеток при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рисунок 9Б). При использовании цитокинов, наблюдается достоверное увеличение образования клеток, несущих гранулы перфорина при сокультивировании МНК с трансфицированными плазмидой А ДК по сравнению с аналогичной культурой клеток без добавления цитокинов.

В группе HLA-A\*02 негативных больных раком молочной железы (Рисунок 10А), культивирование МНК и трансфицированных ДК без добавления ИЛ-12 и ИЛ-18 выявило различия только с нативной популяцией МНК. Однако при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18 достигается достоверное увеличение цитотоксического потенциала совместной культуры МНК и ДК, трансфицированных плазмидой А, при сравнении со всеми группами контроля.



**Рисунок 10. Цитотоксический эффект совместной культуры мононуклеарных клеток HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы и трансфицированных дендритных клеток. Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей.**

**А) Цитотоксический тест (N=19)**

**Б) Процент перфорин-позитивных клеток (N=20).**

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и ДК без трансфекции;

МНК+ДК(p5) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой pDNA5-BC-C;

МНК+ДК (А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

В группе HLA-A02 негативных больных показано достоверное влияние сокультивирования МНК с ДК, трансфицированными плазмидой А на количество перфорин-позитивных клеток при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18. Стоит отметить, что цитокины оказывают достоверное стимулирующее влияние на накопление перфориновых гранул (Рисунок 10Б).

Таким образом, в нативных культурах клеток без добавления ИЛ-12 и ИЛ-18 только в группе HLA-A\*02-позитивных больных совместное культивирование МНК и ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты ОАА, приводит к формированию эффективного противоопухолевого иммунного ответа против аутологичных опухолевых клеток, связанное с увеличением количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах. Однако в присутствии рчИЛ-12 и рчИЛ-18 независимо от наличия гаплотипа HLA-A02 у больных раком молочной железы, использование ДК, трансфицированных плазмидой А, позволяет эффективно стимулировать цитотоксический потенциал культуры МНК. Полученные результаты могут быть связаны, с перекрестным сродством HLA-A\*02:01-специфичных иммуногенных эпитопов к другим вариантам гаплотипа HLA-A, а также с непосредственным количеством иммуногенных эпитопов, входящих в данную конструкцию.

Таким образом, нами показана эффективная стимуляция цитотоксического потенциала культуры моноклеарных клеток при использовании дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, как у HLA-A\*02-позитивных, так и у HLA-A\*02-негативных

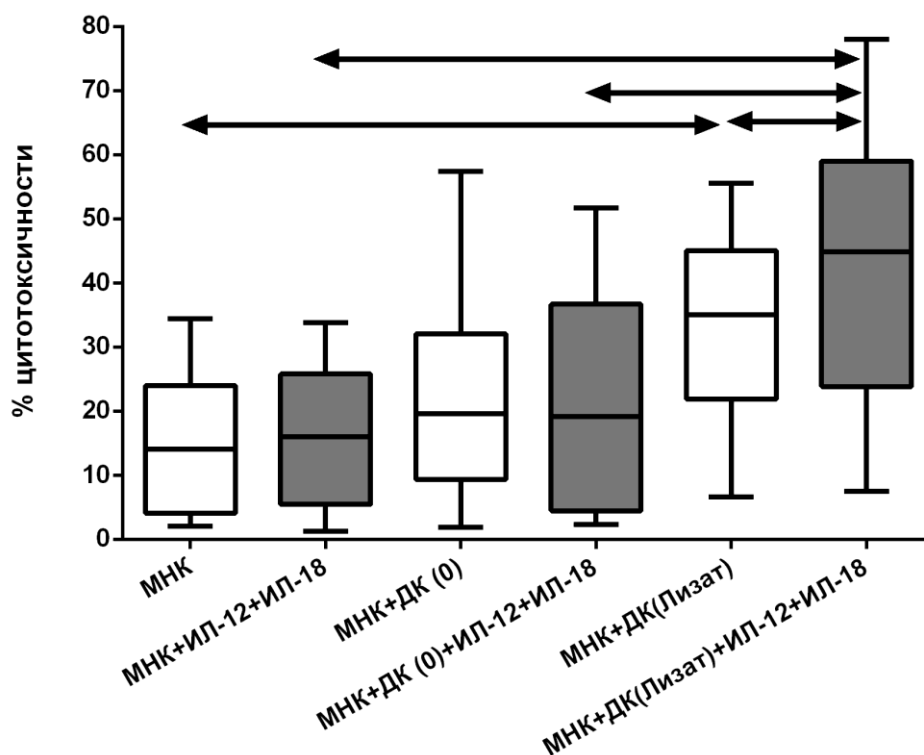
больных раком молочной железы при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18. При исследовании одного из возможных механизмов развития цитотоксического эффекта МНК, нами показано увеличение количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах МНК с трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями дендритными клетками и ИЛ-12 и ИЛ-18.

В настоящее время, в исследованиях возможности стимуляции цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа используются дендритные клетки, праймированные различными по структуре опухолевыми антигенами, такие как цельные белки или отдельные пептиды, лизат опухолевых клеток, ДНК/РНК-конструкции. Основным преимуществом использования целых белков или антигенов лизата аутологичных опухолевых клеток для праймирования дендритных клеток является возможность предоставлять полный набор антигенов, характерных для опухоли человека на данном этапе развития. Существенными недостатками обоих типов антигенов является наличие в составе эпитопов, способствующих развитию аутоиммунных и иммуносупрессивных реакций, изменчивость антигенного профиля опухолевых клеток по мере роста и метастазирования, а также невозможность контроля над эффективностью захвата, процессинга и презентации только иммуностимулирующих эпитопов. Таким образом, в связи с существующими данными литературы, на следующем этапе было решено провести сравнение двух разных источников опухолевых антигенов для праймирования дендритных клеток с целью формирования наиболее специфического цитотоксического иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы против аутологичных опухолевых клеток.

### **3.6 Влияние дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, на цитотоксический потенциал мононуклеарных клеток больных раком молочной железы**

Праймирование дендритных клеток антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток является наиболее распространенным способом специфичной активации цитотоксического ответа МНК [Курилин В.В., 2012; Obleukhova I.A., 2014]. Считается, что использование дендритных клеток, нагруженных антигенами опухолевого лизата, позволяет стимулировать цитотоксический Т-клеточный ответ как CD8<sup>+</sup>, так и CD4<sup>+</sup> Th1-лимфоцитами. Для проверки эффективности разработанной в качестве источника антигенов полиэпитопной ДНК-конструкции, было решено сравнить цитотоксическую активацию МНК трансфицированными и классическими лизат-активированными дендритными клетками.

При оценке цитотоксической активности совместной культуры МНК и праймированных лизатом зрелых дендритных клеток против аутологичных опухолевых клеток, была показана достоверная стимуляция противоопухолевого ответа по сравнению со всеми группами контроля при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, а также с клетками, культивированными в отсутствии ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рисунок 11).



**Рисунок 11 Цитотоксичность совместной культуры МНК и аутологичных дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, по отношению к опухолевым клеткам больных раком молочной железы (n=22). Данные представлены в виде медианы и разброса кваттилей**

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

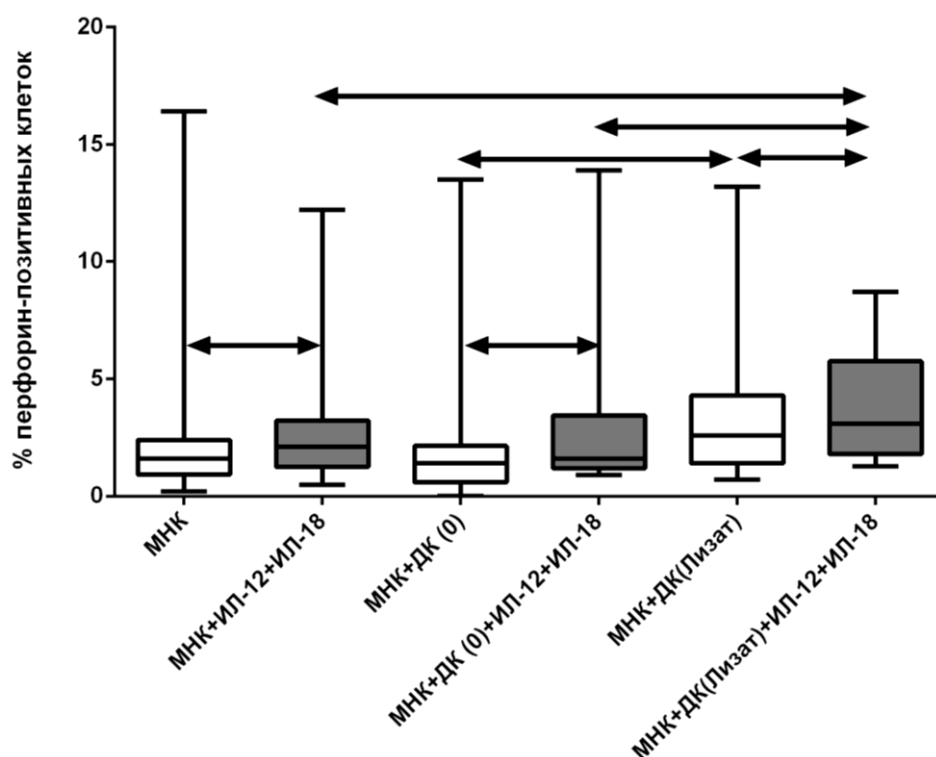
МНК+ДК(0) –совместная культура МНК и зрелых ДК, созревание которых происходило в отсутствие опухолевого антигена

МНК+ДК (Лизат) - совместная культура МНК и ДК, нагруженных лизатом аутологичных опухолевых клеток;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

При сокультивировании МНК и дендритных клеток, нагруженных антигенами лизата опухолевых клеток, получено достоверное увеличение перфорин-позитивных клеток в присутствии рЧИЛ-12 и рЧИЛ-18 при сравнении со всеми группами контроля (МНК, МНК+ДК(0)) (Рисунок 12), а также культурой клеток без цитокинов.





**Рисунок 12** Процентное содержание перфорин-позитивных клеток в совместной культуре МНК больных раком молочной железы и аутологичных дендритных клеток, праймированных антигенами лизата опухолевых клеток (n=25). Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей

Примечание:

МНК – контрольная культура МНК;

МНК+ДК(0) – совместная культура МНК и зрелых ДК, созревание которых происходило в отсутствие опухолевого антигена

МНК+ДК (Лизат) - совместная культура МНК и ДК, нагруженных лизатом аутологичных опухолевых клеток;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

Таким образом, нами показано, что только в присутствии иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 дендритные клетки, праймированные антигенами лизата опухолевых клеток, стимулируют цитотоксический ответ культуры МНК, выраженный в увеличении цитотоксической активности МНК против аутологичных клеток и увеличением количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах.

В ходе выполнения работы мы показали эффективность разработанного нами протокола получения зрелых дендритных клеток с последующим проведением

процедуры магнитной трансфекции для нагрузки ДК полиэпитопными ДНК-конструкциями. Нами показано, что использование ДК, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты белка HER2/neu, является эффективным способом активации цитотоксического потенциала культуры МНК по сравнению с использованием ДК, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок ERBB2. При дальнейшем исследовании, мы показали, что совместное использование ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, приводит к значимому увеличению цитотоксического потенциала МНК в общей выборке пациентов, а также у HLA-A\*02-позитивных. При добавлении цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 происходит индукция цитотоксического ответа культуры МНК с трансфицированными смесью ДНК-конструкций ДК в группе HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы. Использование ИЛ-12 и ИЛ-18 при совместном культивировании трансфицированных дендритных клеток с мононуклеарными клетками значительно усиливает цитотоксический потенциал последних против аутологичных опухолевых клеток у больных раком молочной железы. При исследовании одного из возможных механизмов развития цитотоксического эффекта МНК, нами показано увеличение количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах МНК с трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями дендритными клетками. Исследования другого способа антиген-специфического праймирования дендритных клеток, а именно с использованием антигенов лизата аутологичных опухолевых клеток, выявили значимый уровень клеточно-опосредованной цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных раком молочной железы только при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, в отличие от трансфицированных дендритных клеток.

Суммируя полученные данные об эффективности трансфицированных дендритных клеток индуцировать цитотоксическую активность культуры мононуклеарных клеток, а также данные литературы, можно заключить, что использование

дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, является эффективным способом индукции противоопухолевого ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы. Использование иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 способствует дополнительному повышению цитотоксического потенциала данных культур.

## Глава 4. Обсуждение

Еще в конце 19 века, Coley W.B., пионер противоопухолевой иммунотерапии, отметил, что некоторые опухоли могут регрессировать при заражении пациентов бактериальными инфекциями. Спустя 15 лет, Эрлих предположил, что трансформированные клетки постоянно появляются в нашем организме, однако иммунная система распознает и элиминирует их до клинического проявления заболевания. В середине 20 века, Бернет и Томас привели экспериментальные доказательства данной теории, показав регрессию опухоли под влиянием иммунной системы на модели трансплантации опухоли. Данная концепция позднее была подкреплена открытием опухоль-ассоциированных антигенов и открытием инфильтрирующих лимфоцитов. Все эти открытия привели к пониманию, что воздействуя на иммунную систему, удастся получить развитие эффективного цитотоксического иммунного ответа, направленного на подавление развития онкологического процесса [Boudreau J.E., 2011].

Благодаря прицельному исследованию взаимодействия иммунной системы и опухолевых клеток стало понятно, что антитела и Т-клетки могут избирательно вызывать гибель трансформированных клеток. Исследования генетических и эпигенетических событий, происходящих в опухолевых клетках, позволило детально изучить природу и специфичность/чувствительность опухолевых антигенов, предоставившие новые возможности для проведения прицельной антиген-специфической иммунотерапии. В ходе исследований были определены детали распознавания антигенов Т-клетками, которые открыли возможности проведения модификации антигенов для значительного усиления их иммуностимулирующей способности. Кроме того, сейчас стало известно о лигандах, рецепторах и сигнальных путях, которые участвуют в регуляции иммунного ответа и о влиянии микроокружения опухоли на данные молекулы. Ключевыми клетками, которые

запускают весь каскад эффекторных реакций, являются ДК. Способность ДК захватывать, обрабатывать и предоставлять АГ, экспрессия на их поверхности основных костимуляторных молекул и синтез провоспалительных цитокинов, позволяют дендритным клеткам обеспечивать наивные Т-клетки всеми необходимыми сигналами для запуска АГ-специфической дифференцировки и пролиферации, приводящей к образованию клонов эффекторных Т-клеток. В зависимости от набора данных факторов, происходит формирование клеточного цитотоксического, гуморального или регуляторного иммунного ответа. В условиях онкологического процесса происходит смещение типа эффекторного ответа в сторону регуляторного, что препятствует элиминации трансформированных клеток и даже наоборот, способствует их росту. В связи с чем, основной целью многих исследований является получение такой популяции антиген-активированных ДК, которая при введении в организм больного будет способствовать восстановлению баланса иммунного ответа и смещение его в сторону цитотоксических клеточных реакции.

На сегодняшний день трансфекция ДНК-конструкциями рассматривается как эффективный способ доставки опухолевых антигенов дендритным клеткам для представления последних в комплексе с молекулами МНС и является современным вариантом получения иммунотерапевтических вакцин для лечения онкологических заболеваний [Palucka K., 2011a]. Создание полиэпитопных конструкций, содержащих не весь антиген, а только эпитопы, стимулирующие Th1 и цитотоксические клетки представляется наиболее перспективным подходом для стимуляции клеточного иммунного ответа в связи с отсутствием иммуносупрессивных эпитопов, которые содержатся в полноразмерных конструкциях. Полиэпитопные конструкции могут содержать эпитопы из различных белковых антигенов, и в тоже время покрывать заданное разнообразие аллельных вариантов молекул МНС. Для увеличения иммуногенности и для оптимизации МНС I- или МНС II-зависимой презентации эпитопов в состав полиэпитопных конструкций могут быть включены различные сигнальные последовательности. Известно, что в ходе онкогенеза опухолевые клетки способны изменять свой антигенный профиль, как под влиянием иммунных реакций организма, так и в ходе своего метастазирова-

ния и проводимой химио- и/или лучевой терапии. Благодаря включению в ДНК-конструкции иммуногенных эпитопов нескольких ОАА возможно максимально охватить антигенный репертуар опухолевых клеток и развить поликлональный Т-клеточный иммунный ответ. Антигенный профиль эпителиальных форм опухолей во многом перекрывается, что позволяет предполагать возможность создания универсальной конструкции, эффективной при нескольких типах опухолей, в том числе и в профилактических целях для предотвращения рецидива и метастазирования опухоли, а также при высокой генетической предрасположенности к развитию онкологического заболевания. ДНК-конструкции можно использовать, когда получение опухолевого материала затруднено либо невозможно в силу разных причин (например, небольшой размер опухоли). Несмотря на явные преимущества использования трансфицированных ДК с целью стимуляции противоопухолевого иммунного ответа, данный метод нагрузки редко встречается в клинической практике и находится на стадии преклинических испытаний при раке молочной железы.

Эффективность любой вакцины напрямую связаны с типом и качеством ответной иммунной реакции. Формирование антиген-специфического иммунного ответа требует взаимодействия между антиген-специфическими Т-клетками и профессиональными АПК, включающем моноциты, макрофаги и ДК. В данной работе использовались дендритные клетки, получаемые из прилипающей фракции мононуклеаров периферической крови условно-здоровых доноров с подтвержденным наличием аллеля HLA-A\*02 и больных раком молочной железы. Взаимодействие ДК и Т-лимфоцитов приводит к активации, клональной экспансии, и дифференцировке Т-клеток в эффекторные CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup>-лимфоциты, а также клетки памяти. Стимуляция иммунного ответа в направлении Th1 и цитотоксического ответа является наиболее актуальным для иммунотерапии онкологических заболеваний [Kulikova E.V., 2015].

Известно, что природа и эпитопный состав АГ оказывает влияние на уровень и тип эффекторных реакций. В связи с чем, было проведено исследование влияния ДК, трансфицированными различными ДНК-конструкциями, на формирова-

ние цитотоксического иммунного ответа МНК против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7, экспрессирующая на своей поверхности целевые антигены ERBB2, и аутологичных опухолевых клеток.

Анализ проведенных экспериментов в группе условно-здоровых доноров показал достоверное повышение цитотоксической активности МНК в отношении клеточной линии MCF-7 в группах с ДК, трансфицированными HLA-A\*02:01-специфичной ДНК-конструкцией, кодирующей иммуногенные эпитопы белка Her2/neu, по сравнению с группой ДК без трансфекции, с трансфекцией контрольной плазмидой и плазмидой, кодирующей полноразмерный белок ERBB2. Также показана эффективность трансфекции зрелых ДК опытными ДНК конструкциями (кодирующей HLA-A\*02:01-специфичные эпитопы белка HER2; кодирующей полноразмерный белок ErbB2) на количество клеток, содержащих белок перфорин, в данных культурах. Несмотря на низкие значения количества перфорин-позитивных клеток, развитие эффективного цитотоксического ответа позволяет предполагать, что данного количества клеток, несущих гранулы перфорина, достаточно для проникновения основных эффекторных гранул (гранзима В) для запуска грануло-опосредованного механизма апоптоза. Кроме того, не исключено, что данные клетки также принимают участие в рецептор-опосредованных механизмах элиминации опухолевых клеток, таких как Fas- и TRAIL-зависимые механизмы цитотоксичности.

Из вышеописанного следует, что в группе условно-здоровых доноров использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, приводит к формированию эффективного клеточного цитотоксического ответа МНК против опухолевых клеток линии MCF-7.

В исследовании Scardino A. с соавторами показали, что использование аналогичной полиэпитопной конструкции pVax1/Pet-neu эффективно стимулировало противоопухолевый ЦТЛ ответ *in vitro* у условно-здоровых доноров. В состав ДНК вектора авторами были включены 12 эпитопов белка ErbB2, 8 из которых

были HLA-A0201 специфичными, а 4 не обладали выраженной специфичностью к определенному гаплотипу HLA, таким образом можно утверждать о схожести данной конструкции с HLA-A\*02:01-специфичной плазмидой, входящей в наше исследование. В отличие от нашей работы цитотоксическая активность культуры лимфоцитов изучалась против HLA-A0201 позитивной клеточной линии C1R-A2, предварительно трансфицированных отдельными иммуногенными эпитопами ErbB2, входящими в состав полиэпитопной конструкции, а также против клеточной линии MCF-7-T103. Авторами показано формирование ЦТЛ ответа только против некоторых иммуногенных эпитопов, входящих в конструкцию, а также против клеточной линии MCF-7-T103. Результаты работы авторов с МНК человека показывают возможность мобилизовать Т-клеточный репертуар человека, специфичный для многочисленных ErbB2 эпитопов, включая латентные эпитопы, входящие в нативный ген ErbB2, используя лишь часть иммуногенных эпитопов [Scardino A., 2007].

Из этого можно заключить, что исследования группы HLA-A02 позитивных условно-здоровых доноров по получению из моноцитов периферической крови ДК, и дальнейшее представление антигенов аутологичным мононуклеарным клеткам согласуется с данными литературы об эффективности использования ДК, трансфицированных полиэпитопными ДНК-конструкциями, для модуляции цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа. В работе МНК приобретают повышенный цитотоксический потенциал за счет накопления клеток, содержащих гранулы перфорина, и непосредственно оказывают специфический цитотоксический эффект на клеточную линию, экспрессирующую на своей поверхности молекулы-мишени (ErbB2/HER2-neu). Использование трансфекции ДК ДНК-конструкцией, кодирующей цельный белок ErbB2, является менее эффективным способом доставки целевого антигена, поскольку в эксперименте с клеточной линией MCF-7 не показано значимой стимуляции цитотоксического потенциала МНК, несмотря на достоверное увеличение процента перфорин-позитивных клеток. Это может быть объяснено рядом причин. Во-первых, в состав полноразмерной конструкции входят как иммуногенные эпитопы, так и латентные и иммуно-



супрессивные эпитопы, которые способны подавлять развитие иммунного ответа. Во-вторых, при построении полиэпитопных ДНК-конструкций соединение эпитопов происходит через спейсеры, чувствительные к эндо- или протеасомным ферментам, которые обеспечивают оптимальный процессинг и презентацию иммуногенных эпитопов, тем самым мы можем предугадать размер и последовательность презентуемого эпитопа. Также, в конструкцию включают таргетные сигналы, которые непосредственно оказывают влияние на внутриклеточный транспорт белковой конструкции в специфические компартменты (протеасомы или эндоплазматический ретикулум), где происходит взаимодействие иммуногенного эпитопа с молекулами МНС. При использовании ДНК-конструкции, кодирующей весь белок ERBB2, не происходит «отбора» только оптимальных иммуногенных эпитопов, необходимых для эффективной активации Т-клеток. В связи с чем, ДК осуществляют презентацию эпитопов АГ наивным Т-клеткам с дифференцировкой последних в ЦТЛ, что подтверждается увеличением количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах МНК и ДНК, трансфицированных полноразмерной ДНК конструкцией. Однако данная активация осуществляется, в том числе, и на не значимые эпитопы, поэтому не происходит увеличения цитотоксической активности культуры МНК. В-третьих, возможно недостаточное образование таких гуморальных факторов, как ИЛ-12, ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$ , которые необходимы для пролиферации и эффекторной функции CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. При недостатке цитокинов происходит недостаточная экспрессия необходимых ко-стимуляторных молекул, как на ДК, так и на Т-лимфоцитах, в связи с чем не формируется адекватный активационный сигнал для формирования эффекторной функции Т-лимфоцитов.

Таким образом, полученные данные подкрепляют утверждение, что использование ДНК конструкций позволяет прицельно стимулировать цитотоксический ответ против опухолевых клеток благодаря включению наиболее иммуногенных эпитопов опухолевых антигенов, специфичных к HLA-A\*02:01-аллелю.

В связи с показанной эффективностью в стимуляции цитотоксического потенциала МНК HLA-A\*02-позитивных условно - здоровых доноров, в дальнейшем

было проведено исследование возможности модуляции цитотоксического ответа ДК, трансфицированными только HLA-A\*02:01-специфичной полиэпитопной ДНК-конструкцией. В группе больных раком молочной железы исследовался цитотоксический потенциал МНК против аутологичных опухолевых клеток в связи с большей иммуногенностью собственных тканей организма для иммунокомпетентных клеток. В связи с гетерогенностью антигенного профиля аутологичных опухолевых клеток, помимо ДНК-конструкции, кодирующей HLA-A\*02:01-специфичные эпитопы белка ErbB2, были дополнительно разработаны две HLA-A\*02:01-специфичные конструкции, кодирующие иммуногенные эпитопы других ОАА, связанных с развитием РМЖ. В ходе эксперимента данные конструкции использовались в эквимоллярных количествах в одной смеси (плазмида А). Решение не включать в исследование ДК, трансфицированные полноразмерным геном ErbB2, основано на доказанной слабой эффективности конструкции стимулировать цитотоксический ответ в группе условно-здоровых доноров.

Для осуществления оптимальной презентации опухолевых антигенов, в культуру клеток было решено добавить такие цитокины, как ИЛ-12 и ИЛ-18, которые повышают эффективность индукции противоопухолевого иммунного ответа и поддерживают дифференцировку наивных Т-лимфоцитов в сторону эффекторных клеток.

В качестве дополнительного контроля эффективности формирования поликлонального цитотоксического ответа при сокультивировании МНК с трансфицированными ДК, было исследовано влияние ДК, нагруженных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, на культуру МНК больных раком молочной железы. Лизат опухолевых клеток представляет более широкий и индивидуальный набор опухолевых антигенов, который способствует развитию наибольшего числа Т-клеточных клонов, имеющих специфичность к разным иммуногенным эпитопам ОАА, характерных для данной опухоли. Однако существенным минусом является иммуносупрессивная и аутоиммунная активность лизата, в связи с гетерогенностью клеточного состава опухолевого материала. Также, иммуногенность антигенов лизата опухолевых клеток позволяет сформировать иммунный ответ

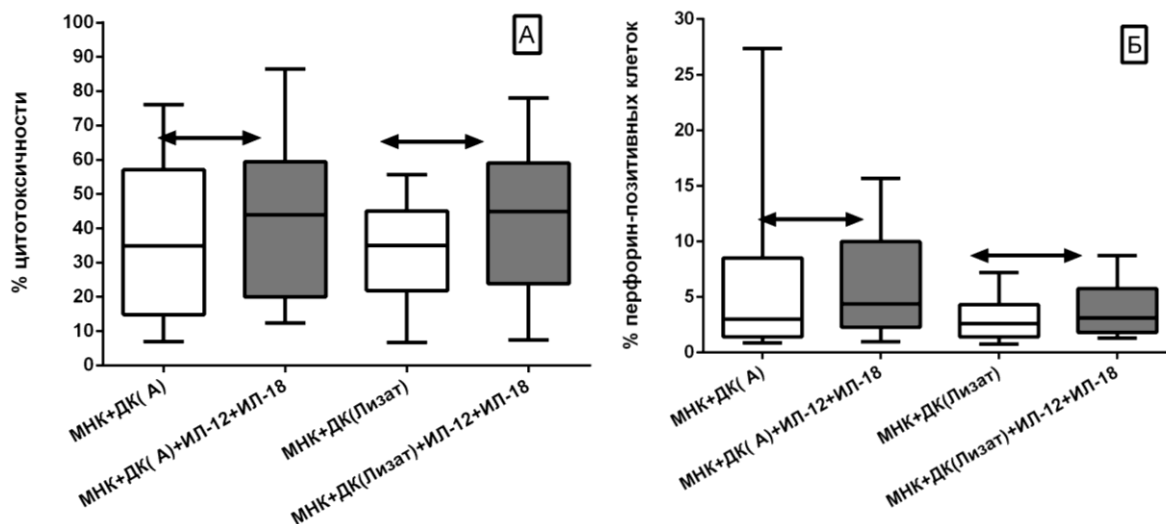
против определенной ткани опухоли, и не перекрывает возможную изменчивость антигенного профиля опухолевых клеток в ходе прогрессирования и лечения онкологического заболевания.

В группе больных РМЖ, при проведении цитотоксического теста показано достоверное повышение цитотоксического индекса МНК при сокультивировании с трансфицированными ДК, при добавлении и без ИЛ-12 и ИЛ-18, при этом цитокины оказывают значимое влияние на цитотоксический потенциал совместной культуры клеток. Данные результаты указывают на наличие у больных сенсibilизации МНК к иммуногенам собственных опухолевых клеток, которые в результате воздействия трансфицированных ДК перестают быть функционально инертными и становятся способны проявлять противоопухолевую активность. Показано эффективное накопление перфорин-позитивных клеток в культуре моноклеарных клеток под влиянием ДК, трансфицированных плазмидой А. Добавление ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает значимое влияние на количество перфорин-содержащих клеток. Полученное нами влияние иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 на развитие клеточно-опосредованных механизмов цитотоксичности согласуется с данными литературы о роли цитокинов в развитии ЦТЛ *in vivo* [Schmidt CS, 2002, Якушенко Е.В., 2005].

Нами показано, что использование дендритных клеток, активируемых антигенами лизата опухолевых клеток, позволяет осуществлять лизис аутологичных опухолевых клеток только в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18. Цитотоксический ответ культуры МНК развивается по перфорин-зависимому пути, что подтверждается увеличением количества перфорин-позитивных клеток в совместных культурах МНК и лизат-праймированных дендритных клеток.

В данных условиях культивирования только при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, можно говорить о сопоставимом эффекте при использовании двух типов ДК, а именно: дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты ОАА, и дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток (Рисунок 13). В от-

существование цитокинов праймированные лизатом дендритные клетки, в отличие от трансфицированных ДНК-конструкциями ДК, оказались не способны значимо стимулировать цитотоксический потенциал культуры МНК при сравнении с контрольными группами клеток.



**Рисунок 13 Сравнение цитотоксического эффекта совместной культуры мононуклеарных клеток больных раком молочной железы и дендритных клеток, трансфицированных смесью HLA-A\*02:01-специфичных ДНК-конструкций (N=36) или праймированных антигенами лизата аутологических опухолевых клеток (N=22):**

#### А) Цитотоксический тест

#### Б) Процент перфорин-позитивных клеток

Примечание:

МНК+ДК (А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов;

МНК+ДК (Лизат) - совместная культура МНК и ДК, нагруженных лизатом аутологических опухолевых клеток;

+ИЛ-12+ИЛ-18 – совместные культуры МНК и ДК при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18

Стрелками обозначены статистически значимые различия (ANOVA для повторных измерений,  $p < 0,05$ )

Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей;

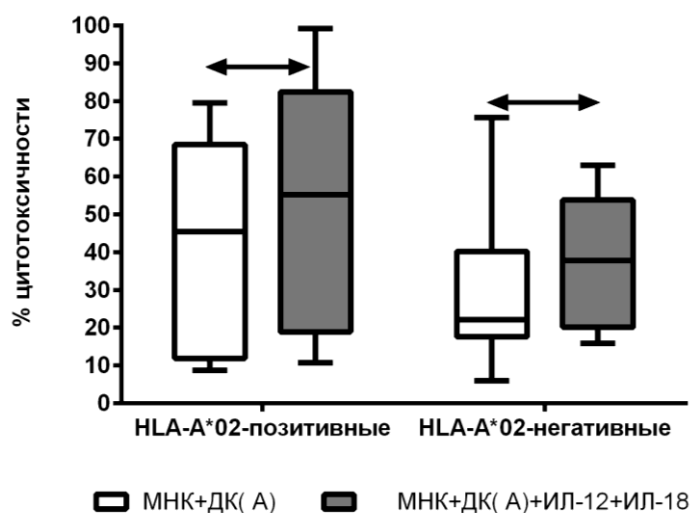
Суммируя все преимущества использования ДНК-конструкций и недостатки антигенов лизата, а именно: включение большого числа различных иммуногенных эпитопов, обладающих заданной HLA-специфичностью, возможность ис-

ключения из состава конструкции аутоиммунных и иммуносупрессивных эпитопов, а также отсутствие эффекта лизат-активированных ДК без цитокинов и сопоставимый уровень формирования цитотоксического ответа МНК при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, можно заключить, что использования смеси данных полиэпитопных HLA-A\*02:01-специфичных ДНК-конструкций, является перспективным методом модуляции противоопухолевого иммунного ответа мононуклеарных клеток периферической крови больных раком молочной железы. В будущем представляется возможным использование таких трансфицированных дендритных клеток в качестве дополнительного метода лечения онкологических больных. Также не исключается возможность проведения профилактических вакцинаций в группах с высоким риском возникновения рака молочной железы.

Для осуществления своей эффекторной функции, цитотоксические Т-лимфоциты должны распознать антигены на поверхности таргетной клетки только в комплексе с молекулами HLA. В нашей работе общая выборка больных раком молочной железы разделялась по наличию гаплотипа HLA-A\*02, как наиболее распространенного гаплотипа HLA-A у людей кавказоидной расы. Был проведен анализ возможности модуляции цитотоксического иммунного ответа при сокультивировании МНК больных раком молочной железы и трансфицированных ДК в зависимости от гаплотипа больного.

Анализ полученных результатов показал, что независимо от наличия гаплотипа HLA-A\*02 у больных раком молочной железы, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты ОАА, в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает значимое влияние на цитотоксический потенциал культуры МНК. Это подтверждается увеличением цитотоксического ответа культуры МНК против аутологичных опухолевых клеток за счет увеличения количества перфорин-позитивных клеток. Если полученный эффект аллель-специфичной ДНК-конструкции в группе HLA-A\*02:01-позитивных больных раком молочной железы был ожидаемым результатом, то полученный эффект в группе HLA-A\*02 негативных больных может быть объяснен рядом причин. Во-

первых, существует так называемое перекрестное сродство аллель-специфичных иммуногенных эпитопов к другим вариантам гаплотипа HLA-A. Во-вторых, при использовании разработанной плазмиды А, за счет большого числа презентируемых иммуногенных эпитопов, происходит презентация дендритными клетками такого количества иммуногенных эпитопов мононуклеарным клеткам, что суммарное количество развивающихся антиген-специфических клонов способствуют развитию эффективного цитотоксического иммунного ответа даже в отсутствие HLA-A\*02 гаплотипа. В-третьих, без использования ИЛ-12 и ИЛ-18 только в группе HLA-A\*02-позитивных больных ДК, трансфицированные плазмидой А, оказывают стимулирующее влияние на цитотоксический потенциал культуры МНК, что согласуется с представлениями об аффинности выбранных иммуногенных эпитопов, входящих в ДНК-конструкции. Таким образом, полученный эффект в группе HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы связан с дополнительным стимулирующим влиянием ИЛ-12 и ИЛ-18, который они оказывают на эффекторные функции иммунокомпетентных клеток. Несмотря на показанный эффект в группе HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, обращает на себя внимание присутствие выраженной тенденции к формированию более эффективного противоопухолевого иммунного ответа МНК при сокультивировании с дендритными клетками, трансфицированными плазмидой А, в группе HLA-A\*02-позитивных больных РМЖ, вне зависимости от добавления ИЛ-12 и ИЛ-18 (Рисунок 14).



**Рисунок 14 Сравнение цитотоксического ответа совместной культуры мононуклеарных клеток и дендритных клеток, трансфицированных HLA-A\*02:01-специфичной ДНК-конструкцией между HLA-A\*02-позитивными (N=19) и HLA-A\*02-негативными (N=19) больными раком молочной железы**

Примечание:

МНК+ДК (А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов;

МНК+ДК (А) – совместная культура МНК и ДК, трансфицированными смесью ДНК-конструкций, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопный иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18;

Данные представлены в виде медианы и разброса квартилей;

Стрелками обозначены статистически значимые различия (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, несмотря на развитие противоопухолевого ответа в группе HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы, его уровень при сокультивировании МНК с дендритными клетками, трансфицированными плазмидой А, даже в присутствии ИЛ-12 и ИЛ-18 остается ниже, что дополнительно подтверждает аффинность выбранных иммуногенных эпитопов. Исходя из этого, можно предположить, что использование в качестве источника антигенов ДНК-конструкций, кодирующих большое число иммуногенных эпитопов различных ОАА совместно с цитокинами ИЛ-12 и ИЛ-18, позволяет преодолевать HLA-специфическую стимуляцию цитотоксических Т-лимфоцитов за счет генерации

большого числа эффекторных клонов, но, несмотря на это, более выраженный уровень клеточно-опосредованного цитолиза МНК развивается только при совпадении HLA гаплотипа больного и HLA-специфичности иммуногенных эпитопов, входящих в ДНК-конструкцию.

Из всего вышеописанного можно заключить, что использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты HER2-*neu*, позволяет формировать эффективный клеточно-опосредованный иммунный ответ МНК против опухолевых клеток линии MCF-7 по сравнению с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок ERBB2. Дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, способны оказывать потенцирующее влияние на цитотоксическую активность и количество перфорин-позитивных клеток в культуре мононуклеарных клеток периферической крови больных раком молочной железы вне зависимости от добавления ИЛ-12 и ИЛ-18. Хотя уровень развивающихся цитотоксических реакций мононуклеарных клеток больных раком молочной железы сопоставим при представлении антигенов дендритными клетками как трансфицированными ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, так и праймированными антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18, без добавления цитокинов достоверное специфическое влияние на культуру МНК было выявлено только при использовании трансфицированных дендритных клеток. Таким образом, для развития эффективного цитотоксического ответа МНК при сокультивировании с дендритными клетками, праймированными антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, дополнительная стимуляция цитокинами является обязательным фактором. Для дендритных клеток, трансфицированных полиэпитопными аллель-специфичными ДНК-конструкциями, добавление ИЛ-12 и ИЛ-18 оказывает значимое потенцирующее влияние на разви-



вающиеся клеточные противоопухолевые реакции, однако формирование цитотоксического ответа культуры МНК происходит вне зависимости от добавления цитокинов. Кроме того, совместное использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, и данных цитокинов способствует формированию такого количества антиген-специфических клонов, которое позволяет в некоторой степени преодолевать зависимость эффекторных клеток от выбранного гаплотипа HLA, способствуя развитию эффективных цитотоксических реакций культуры МНК у HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы. Таким образом, использование дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующих поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты ОАА, позволяет формировать цитотоксический противоопухолевый клеточно-опосредованный ответ в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы.

## Глава 5. Заключение

Дендритные клетки, трансфицированные различными ДНК-конструкциями, оказывают стимулирующее влияние на мононуклеарные клетки, способствуя развитию клеточных цитотоксических иммунных реакций против опухолевых клеток линии рака молочной железы человека MCF-7 в группе условно-здоровых доноров и аутологичных опухолевых клеток при раке молочной железы.

Результаты исследований в группе в группе HLA-A\*02-позитивных условно-здоровых доноров показали значимое увеличение цитотоксического потенциала совместной культуры МНК и дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкцией, кодирующей поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7. Полученные данные свидетельствуют, что экспрессируемые ДНК-конструкцией иммуногенные эпитопы эффективно проходят процессинг и презентацию дендритными клетками. Это способствует развитию клеточного цитотоксического иммунного ответа, осуществляемого, в том числе, с участием перфорин-позитивных клеток. Сравнение различных ДНК-конструкций показало, что полиэпитопная HER2-neu-специфичная ДНК-конструкция является более эффективным источником антигенов, чем ДНК-конструкция, кодирующая полный белок ERBB2, что доказано более значимым увеличением перфорин-зависимого цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7.

Исследование в группе больных раком молочной железы выявило возможность эффективной модуляции цитотоксического потенциала культуры МНК против аутологичных опухолевых клеток под влиянием дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опу-

холь-ассоциированных антигенов вне зависимости от добавления иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18. Установлено увеличение количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах, что указывает на роль клеточно-опосредованной цитотоксичности в осуществлении лизиса аутологичных опухолевых клеток.

Разделение общей выборки больных раком молочной железы показало, что в подгруппе HLA-A\*02-позитивных больных, независимо от добавления ИЛ-12 и ИЛ-18 дендритные клетки, трансфицированные с ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, оказывают достоверное влияние на цитотоксический ответ культуры МНК против аутологичных опухолевых клеток. Одним из механизмов развивающегося цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток в данных условиях культивирования является гранулоопосредованный клеточный лизис, связанный с увеличением количества перфорин-позитивных клеток в данных культурах.

Для группы HLA-A\*02-негативных больных РМЖ показано значимое увеличение цитотоксического ответа МНК при сокультивировании с дендритными клетками, трансфицированными ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов при добавлении иммунорегуляторных цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18. Однако выявленный в данной группе уровень цитотоксической реакции МНК против опухолевых клеток не достигает значений, характерных для цитотоксического ответа МНК HLA-A\*02-позитивных больных раком молочной железы.

Использование дендритных клеток, праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, позволяет модулировать развитие эффективного противоопухолевого ответа культуры мононуклеарных клеток при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18. При сравнении двух источников опухолевых антигенов, показано, что применение дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-

специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов или праймированных антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, оказывает сравнимый эффект на стимуляцию цитотоксической активности культуры МНК только при добавлении ИЛ-12 и ИЛ-18. Учитывая, что формирование эффективного цитотоксического ответа МНК происходит при сокультивировании с трансфицированными полиэпитопными ДНК-конструкциями дендритными клетками вне зависимости от добавления ИЛ-12 и ИЛ-18, а также на основании теоретических знаний о преимуществах именно полиэпитопных ДНК-конструкций, возможно предположить использование таких ДНК-конструкций для трансфекции дендритных клеток с целью модуляции противоопухолевого иммунного ответа, направленного против широкого спектра иммуногенных эпитопов ОАА.

Таким образом, по итогам проделанной экспериментальной работы можно утверждать, что подход с использованием дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, способствует индукции противоопухолевого иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы.

## Выводы

1. ДНК-конструкция, кодирующая поли-ЦТЛ-эпитопный иммуноген, содержащий HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты белка HER2-neu, в отличие ДНК-конструкции, кодирующей полноразмерный белок ERBB2, обеспечивает увеличение цитотоксического ответа культуры мононуклеарных клеток против клеточной линии рака молочной железы человека MCF-7 и количества перфорин-позитивных клеток, что свидетельствует о более эффективном формировании клеточно-опосредованного иммунного ответа.
2. У больных раком молочной железы, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, способствуют увеличению цитотоксической активности мононуклеарных клеток против аутологичных опухолевых клеток и количества перфорин-позитивных клеток, что свидетельствует об индукции противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа.
3. В группе HLA-A\*02:01-позитивных больных раком молочной железы дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*02:01-специфичные антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, в отличие от группы HLA-A\*02-негативных больных раком молочной железы индуцируют формирование эффективного клеточно-опосредованного цитотоксического ответа, что подтверждает HLA-специфичность выбранных эпитопов.
4. В группе HLA-A\*02:01-негативных больных раком молочной железы, дендритные клетки, трансфицированные ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфичные ан-

тигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, только в присутствии цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18 способствуют увеличению цитотоксического ответа культуры моноклеарных клеток и увеличению клеток, содержащих гранулы перфорины, что свидетельствует о возможности усиления антиген-специфических клеточных реакций с помощью иммунорегулирующих цитокинов.

5. Дендритные клетки, праймированные антигенами лизата аутологичных опухолевых клеток, в отличие от дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими поли-ЦТЛ-эпитопные иммуногены, содержащие HLA-A\*0201-специфические антигенные детерминанты опухоль-ассоциированных антигенов, только при добавлении цитокинов ИЛ-12 и ИЛ-18, эффективно способствуют формированию клеточного цитотоксического противоопухолевого иммунного ответа в культуре моноклеарных клеток больных раком молочной железы.

## Список сокращений

CD – cluster of differentiation

HLA – Human Leukocyte Antigen

MHC – major histocompatibility complex

TCR – T cell receptor

TGF $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор бета (tumor growth factor)

Th – T – хелпер лимфоцит

TLR – Toll-like receptor

TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand

АГ – антиген

АПК – антиген-презентирующая клетка

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК – дендритная клетка

ИЛ – интерлейкин

ИФН – интерферон

ЛУ – лимфатический узел

МНК – мононуклеарная клетка

ОАА – опухоль-ассоциированный антиген

РМЖ – рак молочной железы

рч – рекомбинантный человеческий

ФНО – фактор некроза опухоли

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

## Список литературы

1. Антонец Д.В., Максютов А.З. TEPredict: программное обеспечение для предсказания Т-клеточных эпитопов //Молекулярная биология. – 2010. – Т.44, № 1 – с. 130-139
2. Балдуева И.А., Данилова А.Б., Новик А.В. Дендритные клетки, активированные раковотестикулярными антигенами (РТА+), в лечении метастатических сарком мягких тканей. // Вопросы онкологии. – 2014. – Т.60, №6. – 700-706.
3. Барышников А.Ю., Никитин К.Д., Никифорова А.Н., Рубцова М.В. Сравнительное исследование иммуногенности противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток и дендритом *in vitro* //Аллергология и иммунология. — 2009. — Т. 10, №3. — С. 361—363.
4. Курилин В.В., Хантакова Ю.Н., Облеухова И.А., Шевченко Ю.А., Куликова Е.В., Якушенко В.К., Соколов А.В., Сенников С.В. Стимуляция дендритными клетками *in vitro* противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных клеток больных колоректальным раком. // Медицинская иммунология.- 2013.- Т.15.- №3.- С.235-246.
5. Курилин В. В., Шевченко Ю. А., Христина А. А., Облеухова И. А., Куликова Е. В., Хантакова Ю. Н., Сидоров С. В., Сенников С. В. Использование различных способов доставки антигенного материала в дендритные клетки для стимуляции цитотоксической противоопухолевой реакции в культуре мононуклеарных клеток больных раком молочной железы. // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т.9(18). - №2(1). – с.497-499
6. Моисеенко В.М., Балдуева И.А. Проблемы иммунологии опухолевого роста и возможности вакцинотерапии. // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т.7, №4. – стр.17-35.



7. Нехаева Т. Л., Балдуева И. А., Новик А. В., и др. Разработка и оптимизация вакцин на основе аутологичных дендритных клеток (ДК), активированных раково-тестикулярными антигенами, для лечения больных меланомой кожи. // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. - №5(51).

8. Сенников С.В., Куликова Е.В., Облеухова И.А., Шевченко Ю.А. Технологии индукции клеточного противоопухолевого иммунного ответа *in vitro*. // Гены и клетки. – 2015. – X(2). – стр.1-7

9. Сенников С.В., Шевченко Ю.А., Хрипко О.П., Облеухова И.А., Якушенко Е.В., Лаушкина Ж.А., Лебедева В.А., Ласкавая Е.Г., Гончаров М.А., Свистельник А.В., Красильникова И.В., Позднякова Л.Л., Козлов В.А. Экспериментальные подходы к разработке клеточных протоколов модуляции специфических иммунных реакций с помощью дендритных клеток. // В сб. науч. тр.: «Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты» Новосибирск, Наука, 2009, стр.53-75.

10. Синцов А.В., Коваленко Е.И., Ханин М.А. Апоптоз, индуцированный гранзимом В. // Биоорганическая химия. – 2008. – Том 34(6). – с.725-233.

11. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. // Под ред. М.И.Давыдова, Е.М.Аксель. М.: РОНЦ им.Н.Н.Блохина. - 2014. - 226 с.: ил.

12. Стахеева М.Н., Эйдензон Д., Слонимская Е.М. Взаимосвязь состояния иммунной системы как интегрированного целого с клиническим течением рака молочной железы. // Сибирский онкологический журнал. – 2011. - №2. – стр.11-19.

13. Тюряева И.И. Опухолевые антигены. // Цитология. – 2008. – Том 50(3). – с.189-209

14. Хрипко О.П., Якушенко Е.В., Сенников С.В., Красильникова И.В., Козлов В.А. Использование дендритных клеток и интерлейкина-18 для модуляции иммунного ответа против НВсAg *in vitro*. // Бюллетень СО РАМН.– 2008.– № 5 (133).– с.109-113

15. Шевченко Ю.А., Хрипко О.П., Облеухова И.А., Сенников С.В. Дендритные клетки и перспективы их клинического применения. // В сб. науч. тр.: «Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты» Новосибирск, Наука, 2009, стр.36-53.

16. Шевченко Ю.А., Якушенко Е.В., Сенников С.В., Лаушкина Ж.А., Романов В.В., Свистельник А.В., Козлов В.А Модуляция противотуберкулезного иммунного ответа *in vitro* с помощью антиген-активированных дендритных клеток. // Проблемы туберкулеза и болезней легких.–2008.–№2 – стр.33-35

17. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе // Медицинская иммунология. – 2005 . – Т. 7, № 4. – С. 355-364.

18. Ackerman A.L. and Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. // Nat Immunol. – 2004. – Vol.5 – p.678-684

19. Amsen D., Blander J.M., Lee G.R., Tanigaki K., Honjo T., Flavell R.A. Instruction of distinct CD4 T helper fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. // Cell. – 2004. – Vol.117. – p.515–26.

20. Andersen M.H., Pedersen L.O., Capeller B., Brocker E.B., Becker J.C., thor Straten P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes *in situ* as well as *ex vivo* in cancer patients. // Cancer Res. – 2001. – Vol.61. – p.5964-5968

21. Andersen M.H., Svane I.M., Becker J.C., Per thor Straten. The Universal Character of the Tumor-Associated Antigen Survivin. // Clin Cancer Res. – 2007. – Vol.13. – p.5991-5994.

22. Anderson KS. Tumor vaccines for breast cancer. Cancer Invest. 2009; 27(4):361–368

23. Apostolopoulos V., Xing P.X., McKenzie I.F. Murine immune response to cells transfected with human *m u c 1*: immunization with cellular and synthetic antigens. // Cancer Res. – 1994. – Vol.54. – p.5186–93.

24. Asai T., Storkus W.J., Mueller-Berghausetal J. *In vitro* generated cytolytic

T lymphocytes reactive against head and neck cancer recognize multiple epitopes presented by HLA-A2, including peptides derived from the p53 and MDM-2 proteins. // *Cancer Immun.* – 2002. - vol.2. - p. 3

25. Avila-Moreno, F., Lopez-Gonzalez, J. S., Galindo-Rodriguez, G., Prado-Garcia, H., Bajana, S., Sanchez-Torres, C. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2006. – Vol.55. - p.598–611

26. Banchereau J. and Palucka A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. // *Nat Rev Immunol.* – 2005. – Vol.5. – p.296-306

27. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.-J. et al. Immunology of dendritic cells. // *Annu. Rev. Immunol.* - 2000. – Vol.18. – p.767–811

28. Barry, M., Bleackley, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol.2. – p.401– 409

29. Becker, Y. Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers – a review. // *Anticancer Res.* – 1992. – Vol.12. – p.511–520.

30. Behrens G., Li M., Smith C.M. Belz G.T., Mintern J., Carbone F.R. et al. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. // *Immunology and Cell Biology.* – 2004. - vol.82(1). - p.84–90.

31. Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G., Harb G.M., Lebecque S. et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. // *J Exp Med.* – 1999. – Vol.190. – p. 1417–26.

32. Bernhard H., Salazar L., Schiffman K., Smorlesi A., Schmidt B., Knutson K.L. et al. Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein. // *Endocrine-Related Cancer.* – 2002. – Vol.9. – p.22-44.

33. Berzofsky J.A., Terabe M., Oh S., Belyakova I.M., Ahlers J.D., Janik J.E. et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. // *The Journal of Clinical Investigation.* – 2004. - Vol.113(11). –

p.1515-1525.

34. Betts M.R., Brenchley J.M., Price D.A., De Rosa S.C., Douek D.C., Roederer M. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells by a flow cytometric assay for degranulation. // *J Immunol Methods*. – 2003. – Vol.281. – p.65–78.

35. Bohnenkamp H.R., Coleman J., Burchell J.M., Taylor-Papadimitriou J., Noll T. Breast carcinoma cell lysate-pulsed dendritic cells cross-prime MUC1-specific CD8<sup>+</sup> T cells identified by peptide-MHC-class-I tetramers. // *Cellular Immunology*. – 2004. – Vol.231. – p.112–125

36. Bolhassani A., Safaiyan S., Rafati S. Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. // *Molecular Cancer*. – 2011. – Vol.10(3). – p.1-20

37. Bolitho P., Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. // *Curr Opin Immunol*. – 2007. – Vol.19. – p.339–347.

38. Bonini C, Lee SP, Riddell SR, Greenberg PD. Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells // *J Immunol*. – 2001 – Vol.166, № 8 – p. 5250-7.

39. Boudreau J.E., Bonehill A., Thielemans K., Wan Y. Engineering Dendritic Cells to Enhance Cancer Immunotherapy. // *Molecular Therapy*. – 2011. – vol.19(5). – p.841–853

40. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow // *Scand J Clin Lab Invest*. -1968. - Vol.21. - p.97.

41. Brossart P., Wirths S., Stuhler G., Reichardt V.L., Kanz L., Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – p.3102–3108.

42. Bürdek M., S. Spranger, S. Wilde, B. Frankenberger, D. J. Schendel et al. Three-day dendritic cells for vaccine development: Antigen uptake, processing and presentation. // *Journal of Translational Medicine*. – 2010. – Vol.8. – p.90

43. Carlsson J., Nordgren H., Sjostrom J., et al. HER2 expression in breast cancer primary tumors and corresponding metastases. Original data and literature review. // *Br J Cancer*. – 2004. – Vol.90(12). – p.2344–2348.
44. Chaux P., Moutet, M., Faivre, J., Martin, F. and Martin, M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. // *Lab Invest*. - 1996. – Vol.74. – p.975–983
45. Chaux, P., Martin, M. S. and Martin, F. Defect of the CTLA4-Ig ligands on tumor-infiltrating dendritic cells. // *Adv Exp Med Biol*. – 1995. – Vol.378. – p.389–392
46. Chen KY, Liu J, Ren EC Structural and functional distinctiveness of HLA-A2 allelic variants. // *Immunol Res*. – 2012. – Vol.53(1-3). – p.182-90
47. Chen Y., Emtage P., Zhu Q., et al. Induction of ErbB-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. // *Gene Ther*. – Vol.2001. – Vol.8. – p.316–323.
48. Chen Z., Huang H., Chang T., et al. Enhanced HER-2/neu-specific antitumor immunity by cotransduction of mouse dendritic cells with two genes encoding HER-2/neu and alpha tumor necrosis factor. // *Cancer Gene Ther*. – Vol.2002. – Vol.9. – p.778–786.
49. Chikamatsu K., Albers A., Stanson J. et al. p53-specific human CD4<sup>+</sup> T-helper cells enhance in vitro generation and antitumor function of tumor-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. // *Cancer Research*. – 2003. - vol.63(13). - p.3675–3681.
50. Chow M.T., Möller A., Smyth M.J. Inflammation and immune surveillance in cancer. // *Seminars in Cancer Biology*. – 2012. – Vol.22. – p.23–32.
51. Colotta F., Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. // *Carcinogenesis*. – 2009. - №7. – 1073-1081
52. Coussens L.M. and Werb Z. Inflammation and cancer. // *Nature*. – 2002. – Vol.420 (6917). – p. 860-867

53. Coventry BJ, Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer. // *Br J Cancer*. – 2003. – Vol.89. – p.533–538.
54. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ Granzymes in cancer and immunity. // *Cell Death and Differentiation*. – 2010. – №17. – P.616-623
55. Curtsinger JM, Gerner MY, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. // *J Immunol*. – 2007. – Vol.178. – p.6752–6760.
56. Czerniecki B.J., Koski G.K., Koldovsky U., et al. Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. // *Cancer Res*. – 2007. – Vol.67. – p.1842–1852.
57. Daniel D, et al. CD4 T cell-mediated antigen-specific immunotherapy in a mouse model of cervical cancer. // *Cancer Res*. – 2005. – Vol.65 – p.2018–2025
58. Dauer M, Obermaier B, Hertel J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A: Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. // *J Immunol*. – 2003. – Vol.170. – p.4069-4076.
59. De Jong E.C., Smits H. H., Kapsenberg M.L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. // *Springer Semin Immun*. – 2004. – №26. – P.289-307
60. Delirez N., Moazzeni S.M., Shokri F., Shokrgozar M.A., Atri M., Kokhaei P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. // *Cellular Immunology*. – 2009. – Vol.257. – p.23–31
61. Denardo D.G., Barreto J.B., Andreu P., Vasquez L., Tawfik D., Kolhatkar N., et al. CD4<sup>+</sup> T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. // *Cancer Cell*. – 2009. – Vol.16. – p.91-102
62. Di Modugno F, Bronzi G, Scanlan MJ, Del Bello D, Cascioli S, et al. Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8<sup>+</sup> T-cell immune response. // *Int J Cancer*. – 2004. –

Vol.109. – p.909–918.

63. Di Modugno F., Mottolese M., Di Benedetto A., Conidi A., Novello F., et al. The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2-positive/hormonal receptor-negative tumors. // *Clin Cancer Res.* – 2006. – Vol.12. – p.1470–1478.

64. Diebold S.S. Determination of T-cell fate by dendritic cells. // *Immunology and Cell Biology.* – 2008. – Vol.86. – p.389–397

65. Disis M.L. Immune regulation of cancer. // *J Clin Oncol.* – 2010. – Vol.28. – p.4531-4538

66. Domchek S.M., Recio A., Mick R., Clark C.E., Carpenter E.L. et al. Telomerase-Specific T-Cell Immunity in Breast Cancer: Effect of Vaccination on Tumor Immunosurveillance. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol.67(21). – p.10546–10555

67. Dong H., Dai G., Xu L., Zhang Y., et al. Tumor cell lysate induces the immunosuppression and apoptosis of mouse immunocytes. *Molecular Medicine Reports.* – 2014. – Vol. 10. – p.2827-2834.

68. Dunn G.P., Koebel C.M. and Schreiber R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. // *Nat Rev Immunol.* – 2006. – Vol.6(11). – p.836-848

69. Enk A. H., Jonuleit, H., Saloga, J. and Knop, J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. // *Int J Cancer.* - 1997. – Vol.73. – p.309–316

70. Esche C., Lokshin, A., Shurin, G. V., Gastman, B. R., Rabinowich, H., Watkins, S. C., Lotze, M. T. and Shurin, M. R. Tumor's other immune targets: dendritic cells. // *J Leukoc Biol.* - 1999. – Vol.66. – p.336–344

71. Fan Z., Zhang Q. Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. // *Cellular & Molecular Immunology.* – 2005. – Vol.2 – p.259-264

72. Fassnacht M, Lee J, Milazzo C, Boczkowski D, Su Z, Nair S, Gilboa E. Induction of CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to the human stromal antigen, fi-

broblast activation protein: implication for cancer immunotherapy// Clin Cancer Res. – 2005 – Vol.11, № 15 – p.5566-71.

73. Fersching D.M.I., Nagel D., Siegele B., Salat C., Heinemann V., Holdenrieder S. et al. Apoptosis-related Biomarkers sFAS, MIF, ICAM-1 and PAI-1 in Serum of Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy. // ANTICANCER RESEARCH. – 2012. – Vol.32. – p.2047-2058.

74. Filaci G., Fravega M., Setti M., et al. Frequency of telomerase-specific CD8+ T lymphocytes in patients with cancer. // Blood. – 2006. – Vol.107. – p.1505–1512.

75. Finn O.J. Cancer immunology. // N Engl J Med. – 2008. – Vol.358. – p.2704–2715

76. Finn O.J., Binder R.J., Brickner A.G., Butterfield L.H., Ferris R.L., Kalinski P. et al. Human Tumor Antigens as Targets of Immunosurveillance and Candidates for Cancer Vaccines. // Tumor-Associated Antigens: Identification, Characterization, and Clinical Applications // Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. – 2009.

77. Florescu A., Amir E., Bouganim N., Clemons M. Immune therapy for breast cancer in 2010—hype or hope? // Current Oncology. – 2011. – Vol.18. – p.9-18

78. Frederick, M. J., Henderson, Y., Xu, X., Deavers, M. T., Sahin, A. A., Wu, H., Lewis, D. E., El-Naggar, A.K. and Clayman, G. L. 2000. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. // Am J Pathol. – 2000. – Vol.156. – p.1937–1950

79. Gabilovich D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. and Carbone, D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. // Nat Med. - 1996a. – Vol.2. – p.1096–1103.

80. Gabilovich, D. I., Ciernik, I. F. and Carbone, D. P. Dendritic cells in anti-tumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. // Cell Immunol. - 1996b. – Vol.170. – p.101–110



81. Georgiannos SN, Renaut A, Goode AW, Sheaff M. The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. // *Surgery*. – 2003. – Vol.134. - p.827–834.
82. Gillmore R., Xue S.-A, Holler A., et al. Detection of Wilms' TumorAntigen -Specific CTL in Tumor-Draining Lymph Nodes of Patients with Early Breast Cancer. // *Clin Cancer Res*. – 2006. – Vol.12. – p.34-42.
83. Grazino D.F., Finn O.J. Tumor antigens and tumor antigen discovery. // *Cancer Treatment and research*. – 2005. – Vol.123. – p.89-111
84. Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. // *Cell*. – 2010. - №140. – P.883–899.
85. Groothuis T. A., Neefjes, J. The many roads to cross-presentation. // *J Exp Med*. – 2005. – Vol.202. – p.1313–1318.
86. Grube M., Moritz S., Obermann E.C., et al. CD8+ T cells reactive to survivin antigen in patients with multiple myeloma. // *Clin Cancer Res*. - 2007. – Vol.13. – p.1053-1060
87. Grunebach, F., Muller, M. R. and Brossart, P. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. // *Cancer Immunol Immunother*. – 2005. – Vol.54. – p.517-525
88. Gutierrez C., Schiff R. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. // *Arch Pathol Lab Med*. – 2011. – Vol.135(1). – p.55–62
89. Hanisch F.G. O-glycosylation of the mucin type. // *Biol Chem*. – 2001. – Vol.382. – p.143–9.
90. Hung K., Hayashi R., Lafond-Walker A., Lowenstein C., Pardoll D., Levitsky H. The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. // *J Exp Med*. – 1998. – Vol.188(12). – 2357-2368
91. Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. // *Int J Cancer*. – 2003. – Vol.104. – p.92–97

92. Jager D., Stockert E., Gure A.O., et al. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol.61. – p.2055–2061.

93. Jaramillo A., Narayanan K., Campbell L.G., Benschhoff N.D., Lybarger L., Hansen T.H., Fleming T.P., Dietz J.R., Mohanakumar T. Recognition of HLA-A2-restricted mammaglobin-A-derived epitopes by CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes from breast cancer patients. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2004. – Vol.88(1). – p.29–41

94. Jarrossay D., Napolitani G., Colonna M., Sallusto F., Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. // *Eur J Immunol.* – 2001. – Vol.31. – p.3388–3393.

95. Johnstone R.W., Frew A.J., Smyth M.J. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. // *Nature reviews.* – 2008. - №8. – P.782-798

96. Kass R., Bellone S., Palmieri M., Can`e S., Bignotti E. et al. Restoration of tumor-specific HLA class I restricted cytotoxicity in tumor infiltrating lymphocytes of advanced breast cancer patients by in vitro stimulation with tumor antigen-pulsed autologous dendritic cells. // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2003. – Vol.80. – p.275–285.

97. Kato M., et.al. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cell // *Int. Immunol.*– 2000. –Vol. 11. – p. 1511-1519.

98. Katsenelson N.S., Shurin, G. V., Bykovskaia, S. N., Shogan, J. and Shurin, M. R. Human small cell lung carcinoma and carcinoid tumor regulate dendritic cell maturation and function. // *Mod Pathol.* - 2001. – Vol.14 - p.40–45

99. Kirk, C. J., Mule, J. J. Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines. // *Hum Gene Ther.* – 2000. – Vol.11. – p.797-806.

100. Knutson KL, Schiffman K, Cheever MA, Disis ML. Immunization of cancer patients with a HER-2/neu, HLA-A2 peptide, p369-377, results in short-

lived peptide-specific immunity. // *Clin Cancer Res.* – 2002. – Vol.8(5). – p.1014–1018

101. Kohrt HE, Nouri N., Nowels K., Johnson D., Holmes S., Lee P.P. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. // *PLoS Med.* – 2005. – Vol.2(e284). – p.904-919

102. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. // *J Immunol Methods.* – 1983. – Vol.64. – p.313–320.

103. Koski G.K., Cohen P.A., Roses R.E., Xu S., Czerniecki B.J. Reengineering dendritic cell-based anti-cancer vaccines. // *Immunol Rev.* – 2008. - Vol. 222. – p.256–276

104. Krause M., Dent E.W., Bear J.E., Loureiro J.J., Gertler F.B. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2003. – Vol.19. – p.541–564.

105. Ladjemi M.Z., Jacot W., Chardès T., Pèlegriin A., Navarro-Teulon I. Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2010. – Vol.59(9). – p.1295–1312

106. Lai Y.-P., Jeng C.-J., Chen S.-C. The Roles of CD4+ T Cells in Tumor Immunity. // *Immunology.* – 2011. – vol.2011. – p.1-6

107. Le Bon A., Durand V., Kamphuis E., Thompson C., Bulfone-Paus S., Rossmann C. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol.176. – p.4682–4689.

108. Liu K., Abrams S.I. Coordinate regulation of IFN consensus sequence-binding protein and caspase-1 in the sensitization of human colon carcinoma cells to Fas-mediated apoptosis by IFN-gamma. // *J Immunol.* – 2003. - №170. – P.6329-6337

109. Liu K., Caldwell S.A., Greeneltch K.M., Yang D., Abrams S.I. CTL Adoptive Immunotherapy Concurrently Mediates Tumor Regression and Tumor Escape.//*J Immunol.* – 2006. - №176. – P.3374-3382

110. Liu L.N., Shivakumar R., Allen C., Fratantoni J.C. Delivery of whole

tumor lysate into dendritic cells for cancer vaccination. // *Electroporation Protocols* // Edited by Li S. // *Methods Mol Biol.* – 2008. – Vol.423. – p.139-153.

111. Livingston BD, Newman M, Crimi C, McKinney D, Chesnut R & Sette A. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope DNA vaccines // *Vaccine* – 2001 – Vol.19 , № 32 – p. 4652-60.

112. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. // *J Immunol.* – 2002. – Vol.169. – p.2756–2761.

113. Lopez-Tarruella S, Schiff R. The dynamics of estrogen receptor status in breast cancer: re- shaping the paradigm. // *Clin Cancer Res.* – 2007. – Vol.13(23). – p.6921–6925.

114. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11 // *Nucleic Acids Res.* – 2008 – Vol. 36 (Web Server issue):W509-12.

115. Lundqvist, A., Noffz, G., Pavlenko, M., Saeboe-Larssen, S., Fong, T., Maitland, N. and Pisa, P. Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection. // *J Immunother.* – 2002. – Vol.25. – p.445-454.

116. Luo, D. and Saltzman, W. M. Synthetic DNA delivery systems. // *Nat Biotechnol.* – 2000. – Vol.18. – p.33-37.

117. Mantovani A. Inflammation and cancer: the Macrophage connection. // *Medicina.* – 2007. – Vol. 67 (Supl. II). – p.32-34

118. Mantovani A., Romero P., Palucka A.K., Marincola F.M. Tumor immunity: effector response to tumor and role of the microenvironment. // *Lancet.* – 2008. – Vol.371. – p.771–83.

119. Marchini C, Kalogris C, Garulli C, et al. Tailoring DNA vaccines: designing strategies against HER2-positive cancers. // *Front Oncol.* – 2013. – Vol.3. – p.122

120. Markiewicz M. A., Kast W.M. Progress in the development of immunotherapy of cancer using ex vivo-generated dendritic cells expressing multiple tumor antigen epitopes. // *Cancer Invest.* – 2004. – Vol.22. – p.417-434.
121. Markov O.V., Mironova N.L., Sennikov S.V. Prophylactic Dendritic Cell-Based Vaccines Efficiently Inhibit Metastases in Murine Metastatic Melanoma. // *PlosOne* – 2015a. – Vol.10(9). – p.1-21
122. Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model. // *Journal of Controlled Release.* – 2015b. – Vol.213. - p.45–56
123. Marzo A. L., Kinnear B. F., Lake R. A., Frelinger J.J., Collins E.J., Robinson B.W.S. et al. Tumor-specific CD4<sup>+</sup> T cells have a major 'post-licensing' role in CTL mediated anti-tumor immunity. // *Journal of Immunology.* – 2000. - vol.165(11). - p.6047–6055.
124. McCarter, M. D., Baumgartner, J., Escobar, G. A., Richter, D., Lewis, K., Robinson, W., Wilson, C., Palmer, B. E. and Gonzalez, R. Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients. // *Ann Surg Oncol.* – 2007. – Vol.14. – p.2854–2860
125. Met O., Balslev E., Flyger H., Svane I.M. High immunogenic potential of p53 mRNA-transfected dendritic cells in patients with primary breast cancer. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011. – Vol.125. – p.395–406.
126. Milani A., Sangioio D., Agiletta M.,etc. Recent advances in the development of breast cancer vaccines. *Breast Cancer: Targets and Therapy.* – 2014 – Vol6. – p.159-168
127. Mittendorf E.A., Wu Y., Scaltriti M., et al. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol.15(23). – p.7381–7388.
128. Mittendorf EA, Holmes JP, Murray JL, von Hofe E, Peoples GE. CD4<sup>+</sup> T cells in antitumor immunity: utility of an li-key HER2/neu hybrid peptide vaccine (AE37). // *Expert Opin Biol Ther.* – 2009. – Vol.9(1). – p.71–78

129. Morris J.K., Lin W., Hauser C., Marchuk Y., Getman D., Lee K.-F. Rescue of the Cardiac Defect in ErbB2 Mutant Mice Reveals Essential Roles of ErbB2 in Peripheral Nervous System Development. // *Neuron*. – 1999. – Vol.23. – p.273–283.
130. Mullauer L., Mosberger I., Grusch M., Rudas M., Chott A. Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer. // *J Pathol*. – 2000. – Vol.190. – p.20-30.
131. Musselli C., Ragupathi G., Gilewski T., Panageas K.S., Spinat Y., Livingston P.O. Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. // *Int J Cancer*. – 2002. – Vol.97. – p.660–667.
132. Nakamura, M., Iwahashi, M., Nakamori, M., Ueda, K., Ojima, T., Naka, T., Ishida, K. and Yamaue, H. Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. // *Oncology*. – 2005. – Vol.68. – p.163-170.
133. Nagorsen D., Rüttinger D. Immunotherapy of colorectal cancer.// *MEMO*. -2008. – №1. – P.205–210; Rosenblatt J., Avigan D. Dendritic Cells // *Allogeneic Stem Cell Transplantation*. / Ed.: H.M. Lazarus, M.J. Laughlin. - Springer Science + Business Media. LLC. – 2003. – Ch.45. – P.807-832
134. Novellino L., Castelli C., Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. // *Cancer Immunol Immunother*. – 2005. – Vol.54. – p.187–207.
135. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N et al. Mammaglobin A: a promising marker for breast cancer. // *Clin Chem*. – 2002. – Vol.48. – p.1362–4.
136. Obermaier B, Dauer M, Hertel 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.97-203.
137. 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.- №156(1).- P.161-164.

138. Ostrand-Rosenberg S. CD4+ T Lymphocytes: A Critical Component of Antitumor Immunity. // Cancer Investigation. – 2005. – Vol.23. – p.413–419.

139. Palucka K. et al. Recent developments in cancer vaccines. // J Immunol. – 2011a. - N186(3). - p.1325–1331

140. Palucka K., Ueno H., Fay J., Banchereau J. Dendritic cells and immunity against cancer. // J Intern Med. – 2011b. – Vol.269 (1). – p. 64–73.

141. Pedersen A.E., Stryhn A.S., Justesen S., Harndahl M., Rasmussen S. Wildtype p53-specific Antibody and T-Cell Responses in Cancer Patients. // J Immunother. – 2011. – Vol.34. – p.629–640

142. Peoples G.E., Gurney J.M., Hueman M.T., et al. Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients. // J Clin Oncol. – 2005. – Vol.23. – p.7536–45.

143. Peters B, Bulik S, Tampe R, Van Endert PM, Holzhütter HG. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors // J Immunol. – 2003 – Vol. – p. 171, № 4 – p.1741-9.

144. Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. // J. Exp. Med. – 1991. – Vol.173. – p.1099–1109.

145. Pinzon-Charry A., Maxwell, T., McGuckin, M. A., Schmidt, C., Furnival, C. and Lopez, J. A. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. // Breast Cancer Res. - 2006. – Vol.8. - R5

146. Poehlein C.H., Hu H.-M., Yamada J., Assmann I. et al. TNF plays an essential role in tumor regression after adoptive transfer of perforin/IFN-gamma double knockout effector T cells. //J Immunol. – 2003. -№170. – P.2004-2013

147. Rahman M., Davis S.R., Pumphrey J.G., Bao J., Nau M.M., Meltzer P.S. et al. TRAIL induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells with a

mesenchymal phenotype. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2009. – Vol.113(2). – p.217–230.

148. Romagnani S. Regulation of the T cell response. // *Clinical and Experimental Allergy.* – 2006. – Vol.36. – p.1357–1366

149. Rosenblatt J., Avigan D. Dendritic Cells // *Allogeneic Stem Cell Transplantation.* / Ed.: H.M. Lazarus, M.J. Laughlin. - Springer Science + Business Media. LLC. – 2003. – Ch.45. – P.807-832

150. Rossi M., Young J.W. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. // *J Immunol.* – 2005. - №175. – P. 1373-1381

151. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). // *International journal of oncology.* – 2010. - №37. – P.1361-1378.

152. Rufer N, Brümmendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, et al. 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.

153. Ruffell B., DeNardo D.G., Affara N.I., Coussens L.M. Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2010. - Vol21(1). – p.3–10.

154. Russell S.M. Determination of T-cell fate by dendritic cells: a new role for asymmetric cell division? // *Immunology and Cell Biology.* – 2008. – Vol.86. – p.423–427.

155. Sabatte, J., Maggini, J., Nahmod, K., Amaral, M. M., Martinez, D., Salamone, G., et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. – Vol.18. – p.5–17.

156. Sakai Y, Morrison BJ, Burke JD, et al. Vaccination by genetically modified dendritic cells expressing a truncated neu oncogene prevents develop-



ment of breast cancer in transgenic mice. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol.64. – p.8022–8028.

157. Sallusto F, Lanzavecchia A: Heterogeneity of CD4<sup>+</sup> memory T cells: Functional modules for tailored immunity. // *Eur J Immunol.* – 2009. – Vol.39. – p.2076-2082

158. Sallusto F., Cella, M., Danieli, C., and 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.

159. Scardino A., Alimandi M.,Correale P., Smith S.G, Bei R. et al. A Polyepitope DNA Vaccine Targeted to Her-2/ErbB-2 Elicits a Broad Range of Human and Murine CTL Effectors to Protect against Tumor Challenge. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67(14). – p. 7028–36

160. Schattner EJ, et al. CD41 T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells. // *Blood.* – 1996. – Vol.88. – p.1375–1382.

161. Schmidt CS, Mescher MF. Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12. // *J Immunol.* – 2002. – Vol.68. – p.5521–5529.

162. Schmidt S.M., Schag K., Muller M.R., et al. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. // *Blood.* – 2003. – Vol.102. – p.571-576.

163. Schultze J.L., Vonderheide R.H. From cancer genomics to cancer immunotherapy: toward second-generation tumor antigens. // *Trends Immunol.* - 2001. – Vol.22. – p.516–523.

164. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107–1111

165. Shurin, G. V., Ferris, R. L., Tourkova, I. L., Perez, L., Lokshin, A., Balkir, L., Collins, B., Chatta, G. S. and Shurin, M. R. Loss of new chemokine

CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. // *J Immunol.* – 2005a. – Vol.174. – p.5490–5498.

166. Shurin, M. R., Shurin, G. V., Lokshin, A., Yurkovetsky, Z. R., Gutkin, D. W., Chatta, G., Zhong, H., Han, B. and Ferris, R. L. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? // *Cancer Metastasis Rev.* – 2006. – Vol.25. – p.333–356

167. Singh H, Raghava GP. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites // *Bioinformatics* – 2001 – Vol.17, № 12 – p. 1236-7.

168. Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. // *Adv. Immunol.* – 2006. – Vol.90. – p.1–50.

169. Sørensen R.B., Svane I.M., Thor Straten P., Andersen M.H. A survivin specific T-cell clone from a breast cancer patient display universal tumor cell lysis. // *Cancer Biology & Therapy.* – 2008. – Vol.7(12). – p.1885-1887

170. Soussi T., Dehouche K., Beroud C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. // *Hum Mutat.* – 2000. – Vol.15. – p.105–113.

171. Steinman M.R. The dendritic cell and its role in immunogenicity. // *Annu. Rev. Immunol.* - 1991. – Vol.9. – p.271-96.

172. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. Tolerogenic dendritic cells. // *Annu Rev Immunol.* – 2003. – Vol.21. – p.685–711.

173. Subik K., Lee J-F., Baxter L., Strzepek T., Costello D., Crowley P et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. // *Breast Cancer: Basic and Clinical Research.* - 2010. – Vol.4 – p.35–41

174. Sugiyama H. WT1 (Wilms' Tumor Gene 1): Biology and Cancer Immunotherapy. // *Jpn J Clin Oncol.* – 2010. – Vol.40(5). – p.377–387

175. Svane I.M., Pedersen A.E., Nikolajsen K., Zocca M.-B. Alterations in p53-specific T cells and other lymphocyte subsets in breast cancer patients during vaccination with p53-peptide loaded dendritic cells and low-dose interleukin-2. // *Vaccine*. – 2008. – Vol.26. – p.4716–4724
176. Swann, J.B., and Smyth, M.J. Immune surveillance of tumors. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol.117. – p.1137–1146.
177. Thomas WD, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. // *J Immunol.* – 1998. – Vol.161. – p.2195–2200.
178. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwiderman A, Dick TP, Müller J, Schönfish B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products // *J Exp Med.* – 2001 – Vol. 194, № 1 – p. 1-12.
179. Trapani, J.A., Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. // *Genome Biol.* - 2001. – Vol.2. – p.3014.1–3014.7.
180. Trapani, J.A., Smyth, M.J., Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002b. – Vol.2. – p.735–747.
181. Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Asford C., Cao T., Matsui T. et al. Dendritic cell subsets in health and disease. // *Immunological Reviews.* – 2007. - Vol.219. – p.118–142
182. Viehl C.T., Tanaka Y., Chen T., Frey D.M., Tran A., Fleming T.P., Eberlein T.J., Goedegebuure P.S. Tat mammaglobin fusion protein transduced dendritic cells stimulate mammaglobin-specific CD4 and CD8 T cells. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2005. – Vol.91(3). – p.271–278
183. Voskoboinik I., Dunstone M.A., Baran K., Whisstock J.C., Trapani J.A. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. // *Immunological Reviews.* – 2010. - Vol. 235. – p.35–54

184. Wang W., Epler J., Salazar L.G., Riddell S.R. Recognition of Breast Cancer Cells by CD8+ Cytotoxic T-Cell Clones Specific for NY-BR-1. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol.66. – p.6826-6833
185. Wertel, F., Polak, G., Rolinski, J., Barczynski, B. and Kotarski, J. Myeloid and lymphoid dendritic cells in the peritoneal fluid of women with ovarian cancer. // *Adv Med Sci.* – 2006. – Vol.51. – p.174–177.
186. Wilson C.B., Rowell E., Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. // *Nat Rev Immunol.* – 2009. – Vol.9. – p.91–105.
187. Yang H., Cho N.-H., Seong S.-Y. The Tat-conjugated N-terminal region of mucin antigen 1 (MUC1) induces protective immunity against MUC1-expressing tumours. // *Clinical and Experimental Immunology.* – 2009. – Vol.158. – p.174–185
188. Zapata-Benavides P., Tuna M., Lopez-Berestein G., Tari A.M.. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – Vol.295. – p.784-790
189. Zehentner B.K., Carter D. Mammaglobin: a candidate diagnostic marker for breast cancer. // *Clin Biochem.* – 2004. – Vol.37. – p.249-257
190. Zhang T, Maekawa Y, Hanba J, Dainichi T, Nashed BF, Hisaeda H, Sakai T, Asao T, Himeno K, Good RA, Katunuma N. Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice // *Immunology* – 2000 – Vol.100, № 1 – p. 13-20.
191. Zhou Y., Bosch M.L., Salgaller, M. L. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity. // *J Immunother.* – 2002. – Vol.25. – p.289-303.
192. Chen KY, Liu J, Ren EC. Structural and functional distinctiveness of HLA-A2 allelic variants. *Immunol Res.* – 2012 - Vol.53(1-3). - p.182-90
193. Kulikova A.V., Kurilin V.V., Schevchenko J.A., etc. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumor-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumor cells in a culture of

mononuclear cells from colorectal cancer patients. // *Scand J Immunol.* – 2015. – Vol.82(2). – p.110-117.

194. Pol J., Bloy N., Buqué A., Eggermont A., Cremer I., Sautès-Fridman C. et al. Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. // *OncoImmunology.* – 2015. – Vol.4(4). - e974411.

### Приложение 1 Дизайн ДНК-конструкций

Цитотоксические Т-клеточные эпитопы, использованные для получения иммуногенов были предсказаны с помощью программы TEpredict [Антонец Д.В., 2010] в составе белка HER2 (P04626.1), с учетом основных шагов МНС I-рестриктированной презентации антигена – протеасомной деградацией [Toes R.E., 2001], и пептидного связывания с ТАР (Transporters associated with antigen processing) [Peters B., 2003]. Пептиды, не имеющие по прогнозам, сайта протеасомной деградации на С-конце или неэффективные при связывании с ТАР были исключены из дальнейшего анализа. Таким образом, был выбран минимальный набор из 35 МНС I-рестриктированных пептидов с пятикратным перекрытием. Выбранные эпитопы были объединены в более длинные пептиды, если они перекрывались в рамках исходной последовательности HER2. Пептиды предсказанные с использованием либо TEpredict или NetMHC [Антонец Д.В., 2010, Lundegraad C., 2008], как HLA-A\*0201-связующие были выбраны для построения HLA-A\*0201-специфичного иммуногена в том же порядке. Индивидуальные гены, с модифицированными кодонами, оптимизированные для экспрессии в клетках млекопитающих, были синтезированы на основе HLA-A\*0201-специфичных последовательностей. ДНК была клонирована в эукариотическом векторе pDNAVACCUltra5 (Nature Technology Corporation, США) непосредственно после CMV промотора. Трансформация E.coli (штамм XL2blue) каждой из ДНК-плазмид подтверждалась результатами рестрикции и секвенированием ДНК. Плазмидную ДНК получали из соответствующих клонов, очищали с использованием EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией завода-изготовителя и повторно ресуспендировали в стерильном PBS. Концентрацию ДНК определяли методом УФ-спектроскопии. Для исследования функциональных свойств были получены ДНК-конструкции на основе ДНК-вектора pDNAVACCUltra5, кодирующие, HLA-A\*02:01-специфичные полиэпитопные иммуногены (pDNA5-BC-A1 (HER2/neu специфичная), pDNA5-BC-A2 (ОАА специфичная), pDNA5-BC-A3 (ОАА специфичная). ДНК-конструкция pDNA5-BC-A2 содержит 73 антигенные

детерминанты таких ОАА, как HER2, mammoglobin, NY-BR-1, и hMena; ДНК-конструкция pDNA5-BC-A3 содержит 74 антигенные детерминанты таких ОАА, как WT1, hTERT, survivin, p53, и Muc1. pDNA5-BC-A1, pDNA5-BC-A2 и pDNA5-BC-A3 использовались в эквимольных количествах. Конструкция на основе DNA-вектора pDNAVACScultra5 без вставок иммуногенных пептидов была использована в качестве контроля (конструкция DNA(p5)).

### **Структура HLA-A\*0201 специфичных цитотоксических Т-клеточных эпитопов.**

Хотя иммуногенность пептидов, определяется в основном его сродством к МНС, показано, что соседние аминокислотные остатки флангового эпитопа влияют на эффективность протеасомного высвобождения и TAP-зависимую транспортировку в эндоплазматическую сеть [Livingston BD, 2001]. Выбранные фрагменты HER2 и предсказанные HLA-A\*0201-специфичные пептиды были объединены в HLA-A\*0201-специфичные (рисунок 15) поли-CTL-эпитопы. Структура эпитопов оптимизировалась выбором соответствующего паросочетания эпитопов, подходящих спейсеров для каждой пары эпитопов и оптимального расположения эпитопов в пределах конструкции, с целью увеличения эффективности процессинга полиэпитопа и презентации целевых эпитопов. Для усиления эффективности в дополнение к цитотоксическим Т-клеточным эпитопам антигенная конструкция должна содержать Т-хелперные эпитопы, которые были предсказаны с использованием моделей прогнозирования ProPred [Singh H, 2001]. В состав поли-Th фрагмента был включен универсальный иммуногенный пептид PADRE (Pan DR Т-хелперный эпитоп – AKFVAAWTLKAAA). Пептиды были соединены через двухосновные K/P-K/R мотивы, необходимые для расщепления лизосомальными катепсинами В и L, участвующими в процессинге эндцитированных антигенов [Zhang T, 2000, Kato M., 2000]. Этот поли-Т-хелперный эпитоп является общим для обоих полиэпитопных иммуногенов (рисунок 15).

#### **BC-A1**

MEIAALCRWGILLLALLPPGAPPDLLLALLPPGAPDATLEEEITGYLAAILDEAYVMAPIILHNGAYSLPQLFEDNY  
 ALSIIISAVVGIAQLMPYGCLLRLLVVVLGVVRDLQLRSLTEIAILLVVVLGVVPAVVGILLVVADALCRWGLLLA  
 DYISAWPDSLRLDKIFGSLAFLAKFVAAWTLKAAAKKAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKKPICTIDVYMI

MVKCWMIDSEKKAQMRILKETELRKVKVLGSGAKKIKWMALESILRRRFTHQSDVKKPICTIDVYMIMVKCWMID  
**SRKRSHAGYQTI**

### BC-A2

ILLVVVLGVALCRWGLLLQLFEDNYALYTSNDSYIVAVVGILLVVSQYSGQLKVAYLEEITGYLSAMMHALE  
 VAASIISAVVGIHLYQGCQVVVLLIAENTMLMLLQONVDVSLDQKLFQLAMMHALEVLQMPYGCLLVMAGVGSFY  
 VACLTSTVQLVALLSHGAVIEVLIYDSSLCDLVLQIQRNPQLGLMEEMSALRLLQETELVSLTPLLLSIAGLAAAI  
 AGAAAAKIFGSLAFLKLLMVLMLAALMEEMSALLVDAEEYLVALQLRSLTEIAAMQLIYDSSLAYLEEITGYLL  
 LALLPPGAKIFGSLAFLAFLNQTDETLFLVDRKCQLAILDEAYVMAAFLNQTDETLYLLHENCMLKLLSHGAVIN  
 MWLQQQLVAFLLIKNANAAILHNGAYSLFASAMMHALLMVLMLAALAAAVYSEILSVATINPQVSKTTIDVYMIM  
 VAALLNWCMQIAVVLGVVFGILYDSSLCDLALMDMQTFKASMSEDNRPLTSLNVEVFMQVFETLEEIATLEEIT  
 GYLKVMEINREVKLLMVLMLASLSKILDVTYISAWPDSLATINPQVSKTLMVLMLAALSLSKILDVTGLACHQLC  
 AAASIISAVVGIALLSHGAVIEVALIHHNTHLAGLQAASQPASLFESSAKIMIMVKCWMI LLMVLMLAAAYMIMVK  
 CWM

### BC-A3

ELMLGEFLKLSTAPPVHNVLICGAQYRIVLDFAPPGAGLAPPQHILIRVAFLLSSLRPSLRMFPNAPYLFLK  
 LTRHRVYLGSYGFRLFLLLLLTVLYMFPNAPYLKQSQHMTEVSLGEQQYSVQQYSVPPPVALLGRNSFEVRLTEV  
 IASILLLLTVLTVAAALGSTAPPVYMFNAPYLGFPWCGLLRLLFFYRKSVMFPNAPYLLMSVYVVELALWGQDV  
 TSVKLCVPQLWVSLSYTNPAVGLAPPQHILIRVELMLGEFLKLILAKFLHVLVVPYEPPEVALLLLLTVLTVCLAK  
 TCPVSLPPPGRVGLAPPQHILIVLVCVLVALFMCHHAVRICMTWNQMNLLARCALFVVLAFGFALLAYLQVNSL  
 QTVALLPAVPSLYLFFYRKSVMFLHVLMSVYVALLLTVLTVVYQGSYGFRLSLPPPGRVLLQAYRFHASLGEQQY  
 SVALWGQDVTSVVVPYEPPEVCMTNQMNLSFKNWPFLKLLPENNVLSTPPPGRVVRMPEAAPVAELLRSFFY  
 VRLFFYRKSVALLDTRTLEVAYLQVNSLQTVSLQELTWKMYLFFYRKSVALLVLCVLVAFDLQVNSLTLPPAWQ  
 PFLALLGRNSFEVSTPPPGRVLMMLGEFLKLYLGSYGFRLALNKMFCQLILSTLLCSLRMPEAAPVSTAPPVHN  
 VRLVDDFLLVKLCVPQLWVFLSFHISNLLMLGEFLKLMFCQLAKT

## Рисунок 15 Структура полиэпитопных иммуногенов HER2.

Примечание: Спейсерные последовательности выделены серым цветом. Оба полиэпитопа состоят из соответствующих поли-CTL-эпитопов и общего поли-Th-эпитоп фрагмента (выделено рамкой). Начальные позиции CTL-эпитопов, показаны жирным шрифтом. Общие N-концевые лидерные пептиды показаны белым шрифтом на черном фоне, 11 аминокислотных остатков человеческого LAMP-1 белка C-концевой части показаны подчеркнутым белым жирным шрифтом на черном фоне. Последовательность PADRE выделена подчеркнутым жирным шрифтом.

Антигенные конструкции, обладающие N-концевой сигнальной последовательностью для направления в эндоплазматический ретикулум вместе с C-концевой



лизосомальной последовательностью, перенаправляющей ассоциированный иммуноген в лизосомы для деградации, где пептидные фрагменты могут связываться с рециркулирующими молекулами МНС II класса, являются гораздо более эффективными в индукции Т-хелперного иммунного ответа, чем аналогичные иммуногены, лишенные таких сигналов [Bonini C., 2001, Fassnacht M, 2005]. N-концевой лидерный пептид был разработан по аналогии с оригинальным HER2 сигнальным пептидом с использованием веб-сервера SignalP [Bernhard H, 2002]. Последние 11 аминокислот человеческого белка LAMP-1 были выбраны в качестве C-концевого сортировочного сигнала [Антонец Д.В., 2010], который был непосредственно слит с C-концом поли-Th фрагмента. Затем поли-CTL эпитоп с N-концевой лидерной последовательностью и поли-Th эпитоп с C-концевой частью LAMP-1 были объединены через спейсер, формирующий протеасомный сайт расщепления на C-конце поли-CTL участка.