

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ LABORATORY AND EXPERIMENTAL STUDIES

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49

УДК: 616-006.81-091.811:615.155

Для цитирования: *Боробова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Карпенко Л.И., Жеравин А.А., Ильичев А.А., Бажан С.И.* Способность искусственных антигенных конструкций, содержащих эпитопы белков, ассоциированных с меланомой, стимулировать цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови в отношении клеток меланомы. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 43–49. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49.

For citation: *Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Karpenko L.I., Zheravin A.A., Ilyichev A.A., Bazhan S.I.* Ability of protein epitope-containing constructs associated with melanoma to stimulate the cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells against melanoma cells. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 43–49. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49.

СПОСОБНОСТЬ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЭПИТОПЫ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕЛАНОМОЙ, СТИМУЛИРОВАТЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

**Е.А. Боробова^{1,2}, Д.В. Антонец², Е.В. Старостина², Л.И. Карпенко², А.А. Жеравин¹,
А.А. Ильичев², С.И. Бажан²**

Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, Россия¹
Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15. E-mail: borobova-elena@rambler.ru¹

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия²
Россия, 630559, п. Кольцово, Новосибирская область²

Аннотация

Цель исследования – оценить способность ДНК-конструкций pMEL-TC1 и pMEL-A0201, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены меланомы, стимулировать противоопухолевый ответ в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*. **Материал и методы.** Изучение цитотоксической активности проводилось в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo* с использованием мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови HLA-A*02:01 позитивных доноров. Цитотоксическую активность оценивали двумя методами: 1) по способности МНК, стимулированных дендритными клетками, трансфицированными плазмидами pMEL-TC1 и pMEL-A0201, вызывать лизис клеток меланомы человека линии Mel Is, а также 2) по уровню их гранзим-продуцирующей активности. В качестве положительного контроля использовалась рекомбинантная плазида, кодирующая полноразмерный антиген клеток меланомы MART-1. **Результаты.** Полученные результаты показали, что дендритные клетки HLA-A*02:01+ доноров, трансфицированные плазмидными конструкциями pMel-A0201 и pMel-TC1, стимулировали цитотоксическую активность аутологичных МНК в отношении клеток меланомы Mel Is. Как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по уровню стимуляции продукции гранзима В аллелеспецифическая конструкция достоверно превзошла конструкцию, кодирующую полноразмерный белок MART1. **Заключение.** ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные полипептиды, составленные из эпитопов опухолевых антигенов, способны стимулировать противоопухолевый цитотоксический ответ. Данный подход может послужить основой для разработки новых способов иммунотерапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: меланома, ДНК-вакцинные конструкции, Т-клеточные эпитопы, полиэпитопные антигены, цитотоксические Т-лимфоциты, меланома кожи, иммуногены, цитотоксическая активность, иммунный ответ.

ABILITY OF PROTEIN EPITOPE-CONTAINING CONSTRUCTS ASSOCIATED WITH MELANOMA TO STIMULATE THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AGAINST MELANOMA CELLS

E.A. Borobova^{1,2}, D.V. Antonets², E.V. Starostina², L.I. Karpenko², A.A. Zheravin¹, A.A. Ilyichev², S.I. Bazhan²

E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia¹
15, Rechkunovskaya Street, 630055-Novosibirsk, Russia. E-mail: borobova-elena@rambler.ru¹
Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk, Russia²
Koltsovo-630559, Novosibirsk Region, Russia²

Abstract

Aim. The aim of the study was to evaluate the ability of pMEL-TCI and pMEL-A0201 DNA-constructs encoding artificial polypeptide melanoma antigens to induce antitumor T cell immune response ex vivo. **Material and Methods.** Dendritic cells were obtained from peripheral blood mononuclear cells of HLA-A02:01-positive donors; DCs transfected with target DNA vaccine constructions were co-cultured with autologous T lymphocytes to stimulate anti-tumor effector T cells. Specific activity of ex vivo stimulated PBMC was assessed (1) by their ability to cause lysis of human melanoma Mel Is cells, and (2) by the level of their granzyme-producing activity. A recombinant plasmid encoding the full-length MART-1 melanoma antigen was used as a positive control. **Results.** All DNA vaccine constructions as well as positive control construction were found to be able to stimulate specific anti-tumor immune responses of autologous PBMC ex vivo, and these PBMC were found to induce melanoma Mel Is cells lysis. Both the efficiency of induced cytotoxic responses and the level of granzymes production stimulated with DCs transfected with pMel-A0201 significantly exceeded those stimulated with DCs transfected with either pMel-TCI or with DNA construction encoding the full-length MART-1 protein. The cytotoxicity level correlates with the level of granzyme B production in CD8+ T lymphocytes. **Conclusion.** DNA vaccine constructions encoding artificial polypeptides composed of tumor antigen epitopes can stimulate the antitumor cytotoxic response. This approach can be used as the basis for the development of new methods of immunotherapy for cancer.

Key words: melanoma, DNA-vaccine constructs, T-cell epitopes, artificial immunogens, cytotoxic T-lymphocytes, skin melanoma, immunogens, cytotoxic activity, immune response.

Введение

Меланома является наиболее опасным злокачественным новообразованием кожи [1]. В последнее десятилетие отмечается стремительный рост заболеваемости меланомой кожи (МК) по всему миру, при этом пока не существует универсального метода терапии этой опухоли. Стандартные методы лечения меланомы позволяют добиться определенных результатов, но не приводят к увеличению выживаемости больных. Высокая смертность и низкая эффективность лечения диктуют необходимость разработки новых методов лечения МК.

Известно, что клетки меланомы обладают высокой иммуногенностью. Описан ряд белковых антигенов, специфичных для меланомы и некоторых других форм злокачественных опухолей, отсутствующих (или практически отсутствующих) на нормальных клетках организма человека. Среди них можно выделить такие антигены, как Melan-A/MART-1, gp100, тирозиназа, MAGE-3 и NY-ESO-1 [2–4]. Это обстоятельство дает возможность разработки стратегии иммунотерапии меланомы, основанной на применении терапевтических вакцин, создаваемых с использованием достижений

современной иммунологии, биоинформатики и клеточных технологий. Весьма привлекательной в этом плане представляется ДНК-вакцинация, индуцирующая активацию цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов – главных эффекторных клеток противоопухолевого иммунного ответа [5].

Ранее с использованием программного обеспечения TEpredict и PolyCTLDesigner [6, 7] был проведен теоретический дизайн последовательностей двух искусственных Т-клеточных иммуногенов (MEL-A0201 и MEL-TCI), содержащих как цитотоксические (CD8+ CTL), так и хелперные (CD4+ Th) Т-клеточные эпитопы 6 меланомных антигенов (NY-ESO-1, MART1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1) [8]. Иммуноген MEL-TCI содержит эпитопы, рестриктированные наиболее распространенными аллельными вариантами молекул HLA I класса, тогда как конструкция MEL-A0201 является аллель-специфической, в которую включены эпитопы, рестриктированные молекулами HLA-A*02:01. Искусственные гены, кодирующие целевые иммуногены, спроектированы с использованием программного обеспечения GeneDesigner [9]. Для увеличения экспрессии

целевых генов использовались кодоны высокоэкспрессируемых генов человека. Спроектированные гены были синтезированы (Evrogen LLC, Russia) и клонированы в составе плазмиды pcDNA3.1, являющейся эукариотическим экспрессионным вектором. В качестве положительного контроля использовалась рекомбинантная плазида, кодирующая полноразмерный антиген клеток меланомы MART1. Экспрессия целевых генов в составе ДНК-вакцинных конструкций была подтверждена с помощью трех методов: ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими моноклональными антителами (МКА) 29F2 к маркерному эпитопу белка р24 ВИЧ-1 [8].

Цель исследования заключалась в оценке способности искусственных полиэпитопных иммуногенов, сконструированных нами ранее, индуцировать противоопухолевый ответ в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*.

Материал и методы

Получение миелоидных дендритных клеток

Образцы крови здоровых доноров были получены в ФГБУ «НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина». Протокол исследования № 4 от 29.04.2016 был рассмотрен и одобрен на заседании этического комитета центра. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) HLA-A*02:01 позитивных доноров выделяли из лейкомаксы в градиенте плотности с использованием Lymphocyte separation medium (MP BIOMEDICALS, США). Клетки интерфазного кольца собирали, дважды отмывали, инкубировали в среде RPMI-1640 2 ч в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при 37 °С. Прилипшую фракцию культивировали в 48-луночном планшете (Greiner bio-one, Германия) в концентрации 1 млн/мл, в объеме 0,5 мл полной среды RPMI-1640 в присутствии 100 нг/мл rhGM-CSF и 20 нг/мл rhIL-4 в течение 4 сут для получения незрелых дендритных клеток (ДК). Далее проводилась процедура магнитной трансфекции на стадии незрелых ДК согласно инструкции производителя (PromoKine, USA). Для индукции созревания к культуре трансфицированных ДК добавляли коктейль цитокинов: rhTNF-α (50 нг/мл), rolі I:C (20 мкг/мл), IFN гамма (20 нг/мл), IFN альфа (20 нг/мл), ИЛ-1 β (25 нг/мл) и инкубировали в течение 24 ч. Для оценки фенотипа ДК были использованы соответствующие меченные флюорохромами моноклональные антитела anti-CD14-FITC, anti-CD83-PE, anti-CD86-PerCP-Cy5.5, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD11C-PE с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACS CALIBUR (BD, США). Клетки в количестве 0,3×10⁶ инкубировали с антителами в течение

20 мин при комнатной температуре в темноте, затем отмывали PBS, содержащим 0,02 % ЭДТА и 1 % азида натрия, и фиксировали в растворе с 0,1 % параформальдегида. Уровень экспрессии маркеров на поверхности полученных ДК составил более 80 % для CD80/CD86/CD11c/CD80.

Стимуляция МНК в совместной культуре с ДК

Зрелые дендритные клетки, трансфицированные плазидами pMEL-TCI, pMEL-A0201, pcDNA-MART1, pcDNA3.1, подвергались совместному культивированию с неприлипшей фракцией МНК в течение 48 ч (в соотношении ДК:МНК = 1:10) в среде RPMI-1640 с содержанием 10 % FBS при 37 °С, 5 % CO₂. Полученные активированные клетки использовались для оценки цитотоксической активности и уровня продукции гранзима В цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Изучение гранзим-продуцирующей активности цитотоксических Т-лимфоцитов

Уровень гранзим-продуцирующей активности цитотоксических Т-лимфоцитов в совместной культуре МНК и ДК, трансфицированных целевыми плазидами, оценивался с помощью метода проточной цитофлуориметрии. К суспензии МНК с дендритными клетками (2 сут культуре) в стерильных условиях добавляли по 1 мкл на 1×10⁶ клеток ингибитора транспорта белков BD GolgiStop согласно инструкции производителя набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD), инкубировали 4–6 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Стимуляция МНК осуществлялась смесью синтетических пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, входящие в состав целевых

Таблица

Синтетические пептиды, выбранные для стимуляции предшественников CTL в совместной культуре МНК и ДК, трансфицированных плазидами pMEL-TCI, pMEL-A0201 и pcDNA-MART1

Пептиды		
pMEL-TCI	pMEL-A0201	pcDNA-MART1
EADPTGHSY	IMPKAGLLI	RRRNGYRAL
SVLEVFEGR	CILESLFRA	YRALMDKSL
YRAREPVTK	YIFATCLGL	ALMDKSLHV
YEDYFPEIF	FLWGRALA	GYPKKGHGH
EHSAYGEPR	LMWITQCFI	DKSLHVGTV
ESRLLFYL	HLLLRKYRV	PAYEKLSAE
LTAADHRQL	ALMDKSLHV	GYRALMDKS
IRLTAADHR		RNGYRALMD
RRRNGYRAL		
HLLLRKYRV		
YRALMDKSL		
MPREDAHFI		
ALMDKSLHV		

полиэпитопных иммуногенов MEL-A0201 и MEL-TCI и белка MART-1 (таблица). Каждый пептид добавлялся в количестве 10 мкг/мл на 1×10^6 клеток.

В качестве контроля для оценки неспецифической стимуляции использовали форбол-12-мирикат-13-ацетат (PMA) (30 нг/мл) с иономицином (Io) (1 мкг/мл). Стимуляцию в этом случае проводили в течение 4–6 ч с добавлением BD GolgiStop. После инкубации клеток с ингибитором транспорта белков BD GolgiStop проводили окрашивание следующими моноклональными антителами: CD4/CD8/CD3/GR B (BD Biosciences, USA). Клетки с моноклональными антителами инкубировали 30 мин при 4 °С. Далее клетки промывали и проводили анализ уровня продукции гранзима В эффекторными Т-лимфоцитами на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur. Подсчет гранзим В продуцирующих CD8+ клеток проводился среди пула CD8+ клеток.

Оценка цитотоксической активности

Анализ цитотоксической активности аутологичных МНК, генерируемых в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*, проводился путем измерения содержания фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемого из поврежденных клеток-мишеней, в качестве которых использовались опухолевые клетки меланомы линии Mel Is (Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, г. Москва). Измерения проводились согласно инструкции производителя набора CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). В лунки 96-луночного планшета вносились клетки меланомы Mel Is в количестве 2×10^5 см². Клетки культивировались в среде RPMI-1640 с содержанием 10 % FBS при 37 °С в 5 % CO₂ в течение ночи. Через 16 ч в культуру опухолевых клеток вносили смесь ДК с аутологичными МНК. Соотношение эффекторных клеток и клеток мишеней составляло 10:1. Планшет с клетками инкубировался в течение 16–18 ч, после чего измеряли уровень ЛДГ в культуральной среде.

Статистический анализ

Статистическое сравнение результатов, полученных с использованием различных конструкций, проводили с помощью парного однонаправленного теста Стьюдента с поправкой на множественное тестирование по методу Бенжамини – Хохберга (FDR). Проверку гомоскедастичности проводили с помощью критерия Бартлетта. Во всех случаях критический уровень значимости был принят равным 5 % (0,05). Анализ результатов и построение графиков выполняли на персональном компьютере с использованием свободной программной среды для статистического анализа R [9]. Данные в тексте представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Результаты

Исследование цитотоксической активности активированных эффекторных клеток по отношению к клеткам-мишеням

Поскольку основным механизмом элиминации опухолевых клеток является их непосредственный лизис, то мы провели исследование цитотоксической активности эффекторных клеток, сформированных в совместной культуре МНК и зрелых ДК, нагруженных плазмидами pMEL-TCI, pMEL-A0201, pcDNA-MART1, pcDNA3.1 [8]. В качестве мишени использовали клетки меланомы человека линии Mel Is, экспрессирующие на своей поверхности антиген MART-1. Оценка цитотоксической активности эффекторных клеток проводилась колориметрическим методом, позволяющим провести количественное определение содержания лактат-дегидрогеназы – цитозольного фермента, выделяющегося из лизированных клеток (см. раздел «Материал и методы»).

Результаты исследования цитотоксической активности МНК, стимулированной под влиянием различных иммуногенных конструкций, представлены на рис. 1. Статистический анализ полученных результатов показал, что цитотоксическая активность МНК, стимулированных дендритными клетками, трансфицированными конструкциями pcDNA-MART1 ($9,47 \pm 1,31$), pMel-TCI ($17,3 \pm 0,67$) и pMel-A0201 ($20,03 \pm 3,13$), значимо превосходит цитотоксический ответ, наблюдавшийся в совместной культуре МНК и ДК, трансфицированных векторной плазмидой pcDNA3.1 ($5,32 \pm 1,28$) ($p \leq 0,05$). Кроме того, цитотоксический ответ, индуцированный целевыми конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCI, достоверно превосшел цитотоксический ответ, индуцированный плазмидой pcDNA-MART1, кодирующей полноразмерный белок MART-1 ($p=0,035$). При этом различий между цитотоксическим ответом, индуцированным препаратами pMel-A0201 и pMel-TCI, не наблюдалось ($p=0,26$).

Цитотоксические лимфоциты могут лизировать опухолевые клетки с помощью гранзима В, который является сериновой протеазой и накапливается в секреторных гранулах цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров. Для подтверждения предположения о том, что лизис опухолевых клеток в нашем случае может осуществляться гранзимом В, мы определяли содержание клеток, экспрессирующих внутриклеточный гранзим В в культуре МНК здоровых доноров после совместного культивирования с ДК, трансфицированными препаратами целевых ДНК-вакцинных конструкций, по сравнению с совместными культурами МНК и ДК, трансфицированными контрольными плазмидами. Содержание клеток, имеющих в цитоплазме гранулы гранзима В, определяли с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ISC).

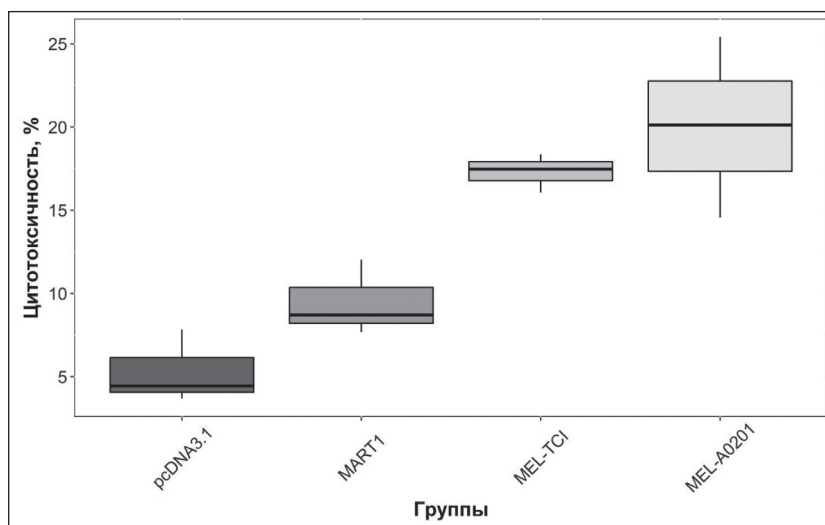


Рис. 1. Результаты исследования цитотоксического ответа МНК условно-здоровых доноров, стимулированного при совместном культивировании с аутологичными ДК, трансфицированными различными иммуногенными конструкциями, против линии клеток меланомы человека Mel 1s (n=3).

Примечания: pcDNA3.1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой; MART-1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART1, кодирующей полноразмерный белок MART-1; Mel-A0201 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой rMel-A0201; Mel-TCl – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой rMel-TCl

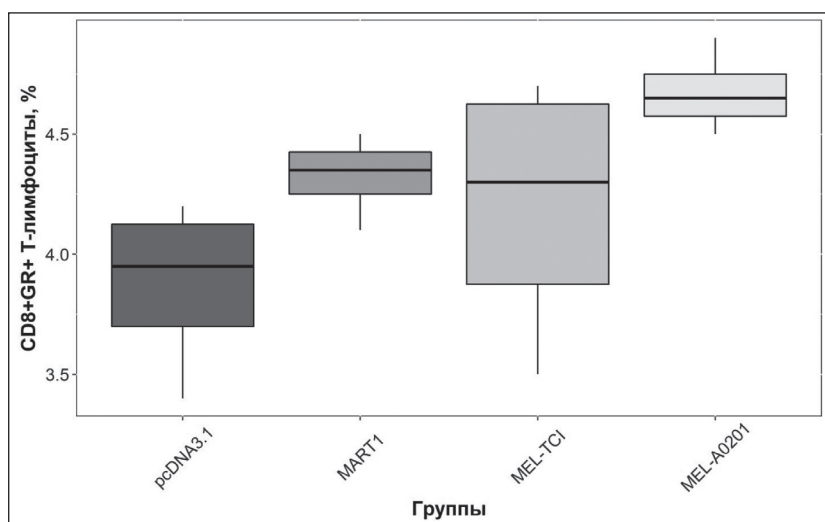


Рис. 2. Результаты исследования количества CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В, в совместной культуре МНК условно-здоровых доноров с помощью метода ICS (n=4).

Примечания: pcDNA3.1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой; MART-1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART1, кодирующей полноразмерный белок MART-1; Mel-A0201 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой rMel-A0201; Mel-TCl – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой rMel-TCl

Результаты определения количества CD8+ клеток, продуцирующих гранзим В, полученные в опытных и контрольных образцах, представлены как процент от общего количества CD8+ лимфоцитов в пробе, значение которого оценивалось на основе анализа данных проточной цитометрии (рис. 2). Среди МНК, стимулированных препаратом rMel-A0201, обнаруживается в среднем 4,67 % ($\pm 0,09$) CD8+ гранзим-положительных CD8+ Т-лимфоцитов; среди МНК, культивированных с ДК, трансфицированными плазмидой pcDNA3,1 – 3,88 $\pm 0,18$; среди МНК, стимулиро-

ванных ДК, трансфицированными конструкцией rMel-TCl – 4,2 $\pm 0,28$; и 4,33 $\pm 0,09$ – среди МНК, стимулированных ДК, трансфицированными pcDNA-MART1. Статистический анализ результатов, представленных на рис. 2, показал, что в культурах МНК с ДК, трансфицированными rMel-A0201, относительное количество CD8+ гранзим-положительных CD8+ Т-лимфоцитов значительно превосходит результат, полученный в культурах МНК с ДК, трансфицированными pcDNA-MART1 и pcDNA3.1 ($p=0,018$). Отличия между остальными культурами были незначительными.

Обсуждение

Учитывая существующие в настоящее время проблемы в создании терапевтических вакцин против онкологических заболеваний, эта задача требует новых подходов. За последнее десятилетие был предложен ряд стратегий, учитывающих современные знания о противоопухолевом иммунитете. Один из подходов к созданию эффективных и безопасных вакцин нового поколения основан на дизайне мозаичных полиэпитопных антигенов на основе широкого спектра протективных В- и/или Т-клеточных детерминант [10–16]. В частности, данный подход включает создание искусственных полиэпитопных конструкций, оптимизированных для повышения эффективности процессинга и включающих большое количество консервативных Т-клеточных эпитопов, взаимодействующих с широким спектром аллельных вариантов молекул МНС. В данной работе исследовалась способность ранее созданных ДНК-вакцинных конструкций pMel-A0201 и pMel-TCl индуцировать противоопухолевый иммунный ответ, который оценивался по способности МНК вызывать лизис клеток меланомы Mel Is в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*. Полученные результаты показали, что дендритные клетки HLA-A*02:01+ доноров, трансфицированные ДНК-вакцинными конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCl, стимулировали у аутологичных МНК развитие цитотоксической активности в отношении клеток меланомы Mel Is. Причем как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по уровню продукции гранзима В аллелеспецифическая конструкция достоверно превзошла ДНК-вакцинную конструкцию, кодирующую полноразмерный белок MART1.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan; 68 (1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
2. Halama N., Zoernig I., Jaeger D. Advanced malignant melanoma: immunologic and multimodal therapeutic strategies. *J Oncol.* 2010; 2010: 689893. doi: 10.1155/2010/689893.
3. Pandolfi F., Cianci R., Lolli S., Dunn I.S., Newton E.E., Haggerty T.J., Boyle L.A., Kurnick J.T. Strategies to overcome obstacles to successful immunotherapy of melanoma. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008 Jul-Sep; 21 (3): 493–500.
4. Parmiani G. Melanoma antigens and their recognition by T cells. *Keio J Med.* 2001 Jun; 50 (2): 86–90.
5. Denapoli P.M., Zanetti B.F., dos Santos A.A., de Moraes J.Z., Han S.W. Preventive DNA vaccination against CEA-expressing tumors with anti-idiotypic scFv6. C4 DNA in CEA-expressing transgenic mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2017 Mar; 66 (3): 333–342. doi: 10.1007/s00262-016-1940-4.
6. Antonets D.V., Bazhan S.I. PolyCTLDesigner: a computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens. *BMC Res Notes.* 2013 Oct 10; 6: 407. doi: 10.1186/1756-0500-6-407.
7. Antonets D., Maksyutov A. TEpredict: software for T-cell epitope prediction. *Mol Biol (Mosk).* 2010 Jan-Feb; 44 (1): 1309.
8. Боробова Е.А., Антонетц Д.В., Старостина Е.В., Смирнова О.Ю., Шербakov Д.Н., Волкова О.Ю., Орешкова С.Ф., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Кандидаты ДНК-вакцины против меланомы: дизайн, конструирование и оценка экспрессии целевых генов в эукариотических клетках. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: биология, клиническая медицина.* 2012; 10 (5): 23–30. [Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Smirnova O.Yu., Scherbakov D.N., Volkova O.Yu., Oreshkova S.F., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Candidates of DNA vaccine against melanoma: design, engineering and estimating the expression of target genes in eu-

Заключение

Исследование специфической активности ДНК-вакцинных конструкций pMel-A0201 и pMel-TCl, кодирующих искусственные полиэпитопные Т-клеточные антигены меланомы, позволяет сделать следующие выводы:

- цитотоксическая активность МНК, стимулированная ДК, трансфицированными ДНК-вакцинными конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCl, достоверно превосходит цитотоксический ответ, индуцированный ДК, трансфицированными контрольными плазмидами pсDNA3.1 и pсDNA-MART1; различия между цитотоксическими ответами, индуцированными под влиянием конструкций pMel-A0210 и pMel-TCl, недостоверны;

- аллелеспецифическая конструкция MEL-A0201 обладает достоверно более выраженной способностью стимулировать продукцию гранзима В CD8+ Т-лимфоцитами в совместных культурах МНК+ДК, по сравнению с ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок MART1 и векторной плазмидой pсDNA 3.1;

- полученные результаты свидетельствуют о том, что искусственные Т-клеточные антигены, спроектированные с использованием цитотоксических и хелперных эпитопов, отобранных из различных опухолевых антигенов меланомы, способны индуцировать иммунный ответ в отношении клеток МК. Данный подход может быть использован для разработки новых способов иммунотерапии не только меланомы, но и других злокачественных опухолей.

karyotic cells. *Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina.* 2012; 10 (5): 23–30. (in Russian)].

9. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. URL: <https://www.R-project.org>. (cited: 06.08.2018).

10. Villalobos A., Welch M., Minshull J. In silico design of functional DNA constructs. *Methods Mol Biol.* 2012; 852: 197–213. doi: 10.1007/978-1-61779-564-0_15.

11. Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. *Vaccine.* 2004 Apr 16; 22 (13–14): 1672–82. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.09.048.

12. Berzofsky J., Berkower I. Novel approaches to peptide and engineered protein vaccines for HIV using defined epitopes: advances in 1994/1995. *AIDS.* 1995; 9 Suppl A: S143–57.

13. Cardinaud S., Bouziat R., Rohrlisch P.S., Tourdot S., Weiss L., Langlade-Demoyen P., Burgevin A., Fiorentino S., van Endert P., Lemonnier F.A. Design of a HIV-1-derived HLA-B07. 02-restricted polyepitope construct. *AIDS.* 2009 Sep 24; 23 (15): 1945–54. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832fae88.

14. Iglesias M.C., Mollier K., Beignon A.S., Souque P., Adotevi O., Lemonnier F., Charneau P. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. *Molr Ther.* 2007; 15 (6): 1203–10. doi: 10.1038/sj.mt.6300135.

15. Tine J.A., Firat H., Payne A., Russo G., Davis S.W., Tartaglia J., Lemonnier F.A., Demoyen P.L., Moingeon P. Enhanced multiepitope-based vaccines elicit CD8+ cytotoxic T cells against both immunodominant and cryptic epitopes. *Vaccine.* 2005; 23 (8): 1085–91. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.01.001.

16. Woodberry T., Gardner J., Mateo L., Eisen D., Medveczky J., Ramshaw I.A., Thomson S.A., Ffrench R.A., Elliott S.L., Firat H., Lemonnier F.A., Suhrbier A. Immunogenicity of a human immunodeficiency virus

(HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8+ cytotoxic T-cell epitopes. J Virol. 1999; 73 (7): 5320–5.

Поступила/Received 06.08.18
Принята в печать/Accepted 02.11.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Боробова Елена Александровна, врач клинической лабораторной диагностики, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (г. Новосибирск, Россия); младший научный сотрудник отдела биоинженерии, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: borobova-elena@ Rambler.ru. SPIN-код: 8705-3124.

Антонен Денис Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник теоретического отдела, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). SPIN-код: 6825-8804.

Старостина Екатерина Владимировна, младший научный сотрудник отдела биоинженерии, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru. SPIN-код: 5551-1523.

Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: karpenko@vector.nsc.ru. SPIN-код: 2026-5992.

Жеравин Александр Александрович, кандидат медицинских наук, руководитель центра онкологии и радиотерапии, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (г. Новосибирск, Россия). E-mail: a_zheravin@meshalkin.ru. SPIN-код: 2858-7175.

Ильичев Александр Алексеевич, доктор биологических наук, заведующий отделом биоинженерии, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: ilyichev@vector.nsc.ru. SPIN-код: 7401-7013.

Бажан Сергей Иванович, доктор биологических наук, заведующий теоретическим отделом, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: bazhan@vector.nsc.ru. SPIN-код: 6934-4489.

Финансирование

Работа проводилась в рамках темы «Доклинические исследования ДНК-вакцины против меланомы» Государственного контракта от 13 ноября 2015 г. № 14.N08.12.0067 ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Elena A. Borobova, Reseracher, E.N. Meshalkin National Medical Research Center (Novosibirsk, Russia); State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: borobova_ea@vector.nsc.ru.

Denis V. Antonets, PhD, Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: antonets@yandex.ru.

Ekaterina V. Starostina, Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru.

Larisa I. Karpenko, PhD, Head of the Laboratory of recombinant vaccines in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: karpenko@vector.nsc.ru.

Alexander A. Zheravin, MD, PhD, Head of Oncology and Radiotherapy Department, E.N. Meshalkin National Medical Research Center (Novosibirsk, Russia). E-mail: a_zheravin@meshalkin.ru.

Alexander A. Ilyichev, PhD, Head of the Department of Bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: ilyichev@vector.nsc.ru.

Sergei I. Bazhan, PhD, Head of the Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: bazhan@vector.nsc.ru.

Funding

This study was supported by Government contract 16.512.11.2186 of Federal target program «Research and development for priority directions of science and technology complex of Russia».

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.