

На правах рукописи

РУДАКОВА АННА АНДРЕЕВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ НЕОАНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ
В МОДЕЛИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
ВАКЦИНЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научные руководители:

кандидат биологических наук
доктор медицинских наук, доцент

Косоруков Вячеслав Станиславович
Титов Константин Сергеевич

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий научно–исследовательским отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Уласов Илья Валентинович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов института регенеративной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «30» марта 2023 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 20__ года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Одним из новых перспективных экспериментальных подходов к иммунотерапии злокачественных опухолей является создание персонализированных вакцин, направленных на усиление распознавания иммунной системой мутантных опухолевых неоантигенов. Неоантигены – это специфичные для опухоли и отсутствующие в нормальных тканях антигены, которые образуются в результате накопления многочисленных соматических мутаций в злокачественных новообразованиях. Прогрессия опухоли обычно сопровождается накоплением «драйверных» и «пассажирских» соматических мутаций. Некоторые из этих мутаций случаются в генах, кодирующих белки, которые представляют несинонимичные полиморфизмы. Некоторые замены могут приводить к возникновению новых опухолевых антигенов, или неоантигенов, которые делают опухолевые клетки заметными для адаптивной иммунной системы (Roudko, 2020).

Было обнаружено, что у онкологических больных с опухолями, отличающимися высокой генетической нестабильностью, адаптивная иммунотерапия приводит к развитию Т-клеточного иммунного ответа против неоантигенов (Robbins, 2013). Соматические мутации в опухоли в большинстве случаев уникальны для каждого пациента, и не могут быть универсальными мишенями для вакцинотерапии рака, поэтому изучение неоантигенов не выходило за рамки фундаментальных исследований и долгое время эти результаты не попадали из лабораторий в клинику.

В последние годы благодаря развитию биоинформатического анализа и повышению доступности полноэкзомного секвенирования для детекции всех мутаций в опухоли, появилась возможность предсказывать, какие мутированные пептиды будут высокоаффинно связываться с аутологичными молекулами человеческих лейкоцитарных антигенов с последующей активацией иммунного ответа. Были разработаны подходы к созданию персонализированных противоопухолевых вакцин на основе химически синтезированных опухолевых неоантигенных пептидов, отобранных в результате биоинформатического прогнозирования иммуногенности (Castle, 2012; Simon, 2013; Yadav, 2014).

Так как неоантигены специфичны для опухолей и не присутствуют в нормальных тканях, к ним не вырабатывается центральная толерантность, и благодаря этому они

являются отличными мишенями для генерации и развития иммунных ответов, особенно в сочетании с терапией ингибиторами контрольных точек иммунной системы (Ott, 2020).

В НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством Косорукова В.С. был разработан биоинформатический подход для анализа данных секвенирования последнего поколения (NGS – next genome sequence) образцов меланомы и нормальной ткани и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16-F10 (Косоруков, 2019). В результате этой работы были синтезированы пептиды для создания модели персонализированной неоантигенной вакцины против меланомы мышей.

Цель исследования

Оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели персонализированной противоопухолевой вакцины против мышинной меланомы B16-F10.

Задачи исследования

1. Разработать алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов, полученных в результате полноэкзомного секвенирования и биоинформатического анализа меланомы B16-F10, и адьюванта Poly(I:C).
2. Изучить иммуногенность моделей противоопухолевых вакцин, содержащих комбинации разных синтетических неоантигенных пептидов, к меланоме B16-F10, с адьювантом и без адьюванта, на мышах C57Bl/6.
3. Оценить противоопухолевую эффективность моделей вакцин, содержащих комбинации синтетических неоантигенных пептидов к меланоме B16-F10, с адьювантом и без адьюванта, на мышах C57Bl/6.
4. Исследовать воздействие на иммунофенотип клеток селезенки мышей C57Bl/6 иммунизации адьювантом Poly(I:C) и развития опухоли меланомы B16-F10.
5. Оценить иммуногенность моделей противоопухолевых вакцин, содержащих один синтетический неоантигенный пептид и адьювант Poly(I:C) и выбрать наиболее иммуногенные пептиды.
6. Изучить противоопухолевую эффективность моделей вакцин, содержащих наиболее иммуногенные синтетические неоантигенные пептиды и адьювант Poly(I:C).

Методология и методы исследования

В работе использовали комплекс современных методов для исследования иммуногенности и противоопухолевой эффективности 43 пептидов длиной от 25 до 27 аминокислот, синтезированных по результатам биоинформатического анализа данных секвенирования мышинной меланомы B16-F10 и нормальной ткани мышей C57Bl/6. В качестве адьюванта в моделях вакцины применяли агонист TLR-3 Poly(I:C). Исследование проводили на мышах C57Bl/6 с подкожно перевитой меланомой B16-F10. Противоопухолевую активность оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей. Оценку иммуногенности пептидов проводили методом ELISpot по определению количества клеток, продуцирующих интерферон- γ (INF- γ), и методом ELISA по определению уровней сывороточных цитокинов INF- γ , интерлейкинов (IL) -2, -4 и -10. Воздействие адьюванта на иммунофенотип спленоцитов оценивали в реакции иммунофлуоресценции с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Анализ результатов ELISpot проводили с использованием программ Excel и GraphPad Prism 5.0, результаты сравнивали с помощью непарного t-теста. Для статистического анализа данных проточной цитофлуориметрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна – Уитни и применяли программу STATISTICA v.7.

Научная новизна

Впервые изучена иммуногенность и противоопухолевая эффективность моделей вакцины против мышинной меланомы B16-F10, содержащих комбинации смесей синтетических неоантигенных пептидов без адьюванта и с адьювантом Poly(I:C). Впервые показано влияние роста опухоли B16-F10 и иммунизации агонистом TLR-3 Poly(I:C) на иммунофенотип клеток селезенки мышей C57Bl/6. Выбраны наиболее иммуногенные синтетические неоантигенные пептиды для мышинной модели противомеланомной вакцины и оценена их противоопухолевая эффективность на экспериментальных животных. Показано, что иммунизация моделями вакцины с адьювантом, содержащими смесь пептидов, оказывает лучший противоопухолевый эффект, чем иммунизация моделью вакцины, содержащей только один пептид.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в исследовании результаты имеют большое практическое значение: на их основании разработан алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой

эффективности синтетических неоантигенных пептидов, показана необходимость использования адъюванта для усиления эффективности противоопухолевых неоантигенных пептидных персонализированных вакцин. В результате проведенного исследования показана иммуногенность и противоопухолевая эффективность многократной иммунизации вакциной, содержащей смесь нескольких неоантигенных синтетических пептидов и адъювант Poly(I:C).

Разработаны подходы к персонализированной вакцинотерапии опухолей, которые в дальнейшем будут использованы для создания персонализированных неоантигенных пептидных вакцин для терапии меланомы человека.

Личный вклад

Автором лично проведен анализ научной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в постановке целей и задач настоящего исследования, их экспериментальной реализации, анализе и обобщении данных, изложении полученных результатов в виде публикаций.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Биологические науки»), направление исследований п. 2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Положения, выносимые на защиту

1. Двукратная иммунизация моделями вакцины, содержащими смеси 5 – 6 синтетических неоантигенных пептидов и адъювант Poly(I:C), вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа, наблюдается увеличение количества интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов у иммунизированных мышей C57Bl/6.

2. Четырехкратная иммунизация моделями вакцины, содержащими смеси пептидов и адъювант Poly(I:C), эффективнее замедляет рост меланомы B16-F10 у мышей C57Bl/6 по сравнению с двукратной.

3. Смесь «пептиды 7», содержащая пептиды g.101573665, g.190937554, g.60246193, g.7163330, g.77174891, PSKPSFQE с Poly(I:C), оказывает наилучший эффект,

по сравнению с остальными моделями вакцины (ТРО=100-93% на 17 – 31 сутки от перевивки опухоли, $p < 0,05$; УПЖ = 100%, $p < 0,05$; излечение 2 мышей из 5).

4. Адъювант Poly(I:C) обладает высокой иммуногенностью, *in vitro* увеличивает количество интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов мышей. Иммунизация Poly(I:C) мышей с подкожно перевитой меланомой B16-F10 приводит к увеличению количества Т-лимфоцитов, в том числе, наивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, что может дать преимущество в борьбе иммунитета против опухолей, иммунный надзор за которыми осуществляется Т-клетками.

5. Двукратная иммунизация моделями вакцины, содержащими только один пептид и адъювант Poly(I:C), выявила, что 79% пептидов вызывают увеличение числа интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов, а 41 % пептидов – увеличение уровня интерферона- γ в сыворотке крови иммунизированных мышей. Одновременно увеличение количества интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов и увеличение уровня этого цитокина в сыворотке крови иммунизированных мышей вызывают 24 % пептидов.

6. Четырехкратная иммунизация смесью «пептиды 7» с Poly(I:C) оказывает более выраженный противоопухолевый эффект, по сравнению с иммунизацией моделями вакцины, содержащими один пептид из этой смеси и адъювант.

Внедрение результатов исследования

Разработанные алгоритмы оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов и адъювантов используются в научно-практической деятельности лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Материалы, полученные в работе, будут использованы при разработке персонализированных неоантигенных пептидных вакцин для терапии меланомы человека.

Основные положения научной работы представлены на следующих научных конференциях: VII Петербургский международный онкологический форум "Белые Ночи 2021"; VI Всероссийская конференция по молекулярной онкологии 2021.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 17 мая 2022 года на совместной научной конференции лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории трансгенных препаратов, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории химического синтеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, лаборатории клинической иммунологии отдела клинико-лабораторной диагностики и онкологического отделения хирургических методов лечения №12 (онкодерматологии) отдела лекарственного лечения НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Материалы диссертационного исследования изложены в полном объеме в 3 научных статьях в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

Объем и структура работы

Диссертация написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 200 источников, в том числе 195 зарубежных. Работа изложена на 114 страницах, содержит 11 таблиц и 19 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Синтетические неоантигенные пептиды, использованные в исследовании, были выбраны в результате биоинформатического анализа данных секвенирования мышинной меланомы B16-F10 и нормальной ткани мышей C57Bl/6. С помощью биоинформатической модели, основанной на искусственных нейронных сетях, был спрогнозирован рейтинг иммуногенности пептидов, аффинных к H2-к (MHC I) мышей C57Bl/6 (Косоруков, 2019). Перечень пептидов и их характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Перечень исследуемых пептидов

№	Название пептида	Ген	Замена	Последовательность	Рейтинг
1	g.101573665C>G	Krt75	p.G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLGGTRRVSIG	2,09
2	g.105559136C>T	Apbb1	p.C654Y	ASLSEAVQAA_Y_MLRVYQKCLDARSQTST	2,19
3	g.106886296T>A	Olf706	p.I174F	TVYTMYPFCMSQE_F_RHLLCEILPLLK	3,55
4	g.107599034A>C	Sema3b	p.L663V	LRRLVLHV_V_SAAQAERLARAEAAAPA	0,00
5	g.108075690C>A	Ampd2	p.Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_YLYYLAQIG	5,19
6	g.108814677G>C	Nckipsd	p.K492N	MQTDTDQHQ_N_LCYSALVLAMVFSMGEA	2,86
7	g.109894747T>G	Dennd5a	p.D1250A	PITAHMYE_A_VALIKDHTLVNSLIRVLQ	13,86
8	g.110327865C>T	Pole	p.L1847F	TLHNMMKK_F_FLQLIAEFKRLGSSVVYA	3,58
9	g.116820833G>C	Hpd1	p.P144A	AGYRGSFL_A_GFRPLPCTPGPGWVSHVD	2,81
10	g.121734550T>C	Gm7298	p.C48R	YTETPEKI_R_LHLYHLNETVTITASLVS	1,45
11	g.123421534G>C	Tubb3	p.G402A	FRRKAFLHWYTGE_A_MDEMEFTEAESNM	0,00
12	g.126439132G>T	Arsj	p.R509M	FNITADPYERVDLSS_M_YPGIVKLLRR	2,17
13	g.130452479T>G	Cd55	p.D254A	SDSYTYSQVVITYSC_A_KGFILVGNASIY	1,31
14	g.140328678C>G	Mrm2	p.R134T	TFLCPADVTDTP_T_TFQKILELLPSRRAD	1,87
15	g.142664440A>G	Wipi2	p.T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_VRLPFCGHKNI	1,30
16	g.145123749C>T	Arpc1b	p.S117F	WAPNENKFAVGSF_F_RVISICYFEQEND	6,57
17	g.153509426A>T	St6galnac3	p.D30E	LLLAMRLVN_E_ATFPLLLNCFGQPKTKW	1,34
18	g.155991934C>A	B3galt6	p.R228L	LVHYLRLS_L_EYLRAWHSEDVSLGTWLA	5,15
19	g.190937554G>A	Angel2	p.D166N	RNV DSTCEDREDKF_N_FSVMSYNILSQD	1,40
20	g.28894578A>C	Actn4	p.F855V	SGLVTFQAFID_V_MSRETTDTDTADQVI	6,59
21	g.29565843C>G	Tnpo3	p.G504A	VDRNPQFLDPVL_A_YLMKGLCEKPLASA	4,16
22	g.35197173T>G	3110043 O21Rik	p.Q297H	VQGLLKDATGSFVLPFR_H_VMYAPYPTT	2,39
23	g.4007844T>G	Mthfd11	p.F294V	WIPSGTTILNCFHD_V_LSGKLSGGSPGV	0,42
24	g.41232378A>G	Tm9sf3	p.Y382H	PAMVCGTAFINFAIY_H_HASRAIPFG	2,11
25	g.45553003G>T	Poll	p.H509N	ALLYFTGSA_N_FNRSMRALAKTKGMSLS	2,51
26	g.5098048A>C	Atp6v1h	p.K147T	VHMAARIA_T_LAAWGKELMEGSDLNYY	3,44
27	g.54847269G>T	Enpp2	p.P755Q	PEAKYDAFLVTNMV_Q_MYPAFKRVWTYF	8,09

28	g.56226589G>T	Herc2	p.C4450F	GGLAGPDGTKSVFGQM_F_AKMSSFSPDS	9,98
29	g.58476516A>C	Orc2	p.F278V	RVDQKTLHNLLRK_V_VPSFSAEIERLNQ	2,51
30	g.60246193G>T	Gm4951	p.D267Y	FMFSLPNIT_Y_SVIEKKRNFLRWKTWLE	12,98
31	g.6393021C>G	Sdcbp	p.I219M	SSGHVGFIFKSGK_M_TSIVKDSSAARNG	49,72
32	g.64957410G>C	Klhl28	p.P110A	GTVFISQDTVESLL_A_AANLLQIKLVLK	5,23
33	g.65813948T>A	Pbk	p.V145D	GSPFPAAVILR_D_ALHMARGLKYLHQEK	3,09
34	g.66708664A>C	Lins1	p.K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLLYFQL	3,89
35	g.69027878G>A	Smc4	p.D767N	SGGGSKVMRGRMGSSVI_N_EISVEEVNK	4,47
36	g.69615465A>T	Nsun2	p.K138M	AWHTNLSRKILR_M_SPLAKFHQFLVSE	3,32
37	g.7163330C>T	Pcmt1	p.P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPPC	4,88
38	g.77174891A>C	2210408I 21Rik	p.D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLLNSFPGDLEFK	4,44
39	g.81419559T>A	Adgrv1	p.Y5165F	KITTIP_F_TTEVFAPVTETVTVSAIP	1,17
40	g.93352588T>C	Ppp1r7	p.L170P	RNIEGIDKLTQLKK_P_FLVNNKINKIEN	0,00
41	REGVELCPG	Obs1	p.T1764M	REGVELCPGNKYEMRRHGTTHSLVIHD	0,00
42	GFSQPLRRL	Sema3b	L663V	GFSQPLRRLVLHV_V_SAAQAERLARAEE	0,00
43	PSKPSFQE	Kif18b	p.K739N	PSKPSFQEFVDWE_N_VSPELNSTDQPFL	0,00

Для оценки иммуногенности и противоопухолевой активности пептиды вводили мышам подкожно, каждый пептид по отдельности или объединяя в группы по 5 – 6 пептидов, 2- или 4-кратно. В моделях вакцины, содержащих один пептид, 1 доза вакцины содержала 100 мкг пептида. В моделях вакцины, содержащих смесь пептидов, 1 доза вакцины содержала суммарное количество пептидов 500 – 600 мкг. В качестве адьюванта использовали Poly(I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt, P1530-100MG, Sigma), синтетический аналог двуцепочечной РНК, агонист TLR-3. Адьювант вводили животным за 5 – 10 минут до пептидов, 1 доза содержала 50 мкг Poly(I:C).

В исследованиях использовали 404 инбредных мышей самок (n=234) и самцов (n=170) линии C57Bl/6 весом 20 – 22 г, полученных из отделения лабораторных животных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Модели вакцины вводили подкожно. Иммунизацию проводили 2-кратно или 4-кратно с недельными интервалами, в 0 и 7 дни или в 0, 7, 14 и 21 дни. Для иммунологических экспериментов на 4 – 5 день после последнего введения препаратов (на 12 или 25 дни от начала экспериментов) у мышей

забирали сыворотку и селезенки для выделения спленоцитов. Для оценки противоопухолевого эффекта моделей вакцины и адъювантов использовали клеточную линию меланомы мышей B16-F10. На 14 день после начала иммунизации мышам переливали по 75 тыс. клеток/мышь меланомы B16-F10. Таким образом, при двукратной иммунизации введение вакцины осуществлялось до перевивки опухоли, а при четырехкратной – 2 вакцинации до перевивки опухоли и 2 – после перевивки опухоли.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) у мышей в группах, получавших модели вакцины или адъювант по сравнению с животными в контрольной группе, которые не получали препаратов. Минимальные критерии противоопухолевой активности – торможение роста опухоли $\geq 50\%$, увеличение продолжительности жизни $\geq 50\%$.

Иммуногенность пептидов с адъювантом, пептидов без адъюванта и отдельно адъюванта оценивали по определению количества клеток, продуцирующих интерферон- γ , методом ELISpot, с помощью набора для определения мышинового INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech). Спленоциты инкубировали 48 ч с адъювантом, с исследуемыми пептидами, которыми ранее иммунизировали данных животных, а также с пептидами, которые не использовали для иммунизации данных животных, для того чтобы выявить специфичность действия пептидов. При анализе результатов ELISpot иммуногенность пептидов оценивали по количеству клеток, продуцирующих интерферон- γ (количеству точек в лунках): количество точек меньше 30 считали отсутствием реактивности, от 30 до 50 – слабая иммуногенность, от 50 до 200 – средняя и от 200 и выше – сильная.

Изменения иммунофенотипа селезенки мышей оценивали в реакции иммунофлуоресценции с использованием проточной цитофлуориметрии (таблица 2).

Таблица 2 – Антитела для иммунофенотипирования спленоцитов

Название	Краситель	Клон	Производитель
NKp46 (CD335)	eFluor450	29A1.4	eBioscience
CD62L	eFluor450	MEL-14	eBioscience
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	Biolegend
CD4	PE-Cy7	GK1.5	Biolegend
CD44	APC-Cy7	IM7	Biolegend
CD8	PE	53-6.7	Biolegend
CD8	FITC	53-6.7	Biolegend
CD69	PE	H1.2F3	Biolegend
CD19	FITC	6D5	Biolegend
CD3	PE	17A2	Biolegend
CD3	APC	17A2	Biolegend

Подсчет результатов реакции проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™ (Bekton Dikenson). Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию FVS510. Процент исследуемых клеток высчитывали от всех живых CD45+ клеток селезенки.

Для определения индивидуальной иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов помимо ELISpot использовали метод ELISA. С помощью набора Mouse Th1/Th2 Uncoated ELISA (88-7711-44, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) измеряли в сыворотках крови мышей, ранее иммунизированных отдельно каждым пептидом с адьювантом, уровни цитокинов INF- γ , IL-2, IL-4 и IL-10.

Результаты экспериментов представляли в виде среднего арифметического и его стандартного отклонения ($M \pm s$). Анализ результатов ELISpot проводили с использованием программ Excel и GraphPad Prism 5.0, результаты сравнивали с помощью непарного t-теста. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для статистического анализа данных проточной цитофлуориметрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна – Уитни и применяли программу STATISTICA v.7. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

Оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности моделей вакцины из нескольких неоантигенных пептидов

На первом этапе исследования оценили иммуногенность и противоопухолевую эффективность 2-кратной иммунизации моделями вакцины, состоящими из нескольких пептидов, с адьювантом и без адьюванта. Пептиды разделили на группы, каждая из которых включала 5 или 6 пептидов (Таблица 3).

Таблица 3 – Пептиды, сформированные в группы для введения животным

Название	Пептиды	Количество пептидов и растворителя в 1 дозе модели вакцины
Пептиды 1	g.116820833; g.140328678; g.142664440; g.145123749; g.35197173	500 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) и 500 мкл физиологического раствора
Пептиды 2	g.110327865; g.126439132; g.4007844; g.6393021; g.64957410	
Пептиды 3	g.123421534; g.130452479; g.28894578; g.4553003; g.5098048	
Пептиды 4	g.107599034; g.108075690; g.109894747; g.29565843; g.56226589	

Пептиды 5	g.65813948; g.69615465; g.69027878; g.93352588; REGVELCPG; GFSQPLRRL	600 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) и 600 мкл физиологического раствора
Пептиды 6	g.10559136; g.106886296; g.108814677; g.121734550; g.153509426	500 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) в 50 мкл ДМСО и 450 мкл физиологического раствора
Пептиды 7	g.101573665; g.190937554; g.60246193; g.7163330; g.77174891; PSKPSFQE	600 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) в 60 мкл ДМСО и 540 мкл физиологического раствора
Пептиды 8	g.155991934; g.41232378; g.54847269; g.58476516; g.66708664; g.81419559	

Пептиды растворяли и формировали модели вакцины непосредственно перед введением мышам. Исследовали эффективность моделей вакцины с адьювантом Poly(I:C) и без адьюванта, а также отдельно адьюванта без пептидов.

Для исследования 144 мышей разделили на 18 групп, в каждой группе было по 8 животных: 8 групп получали смеси пептидов без адьювантов, 8 групп – смеси пептидов с Poly(I:C), 1 группа – Poly(I:C) без пептидов, 1 группа – контрольная. На 12 день после первой иммунизации у 3 мышей из каждой группы забирали спленоциты для оценки иммуногенности моделей вакцины и адьюванта методом ELISpot, а оставшимся 5 мышам перевивали меланому B16-F10.

В спленоцитах мышей, ранее иммунизированных пептидами с адьювантом, в ответ на *in vitro* стимуляцию пептидами, входившими в состав модельной вакцины, увеличивалось количество интерферон- γ -продуцирующих клеток селезенки мышей, все модели вакцины обладали высокой иммуногенностью, количество точек превышало 200. Тогда как при добавлении в лунки с клетками мышей пептидов из других групп, не входивших в состав модельной вакцины, количество интерферон- γ -продуцирующих клеток либо оставалось таким же, как в контроле (пептиды 3, пептиды 6), либо увеличивалось на уровне, соответствующем слабой иммуногенности (пептиды 1, 2, 5, 7, 8) или средней иммуногенности (пептиды 4) (Таблица 4, Рисунок 1).

Таблица 4 – Влияние смесей пептидов на продукцию интерферона- γ спленоцитами

Группа мышей	Количество продуцирующих интерферон- γ спленоцитов при стимуляции <i>in vitro</i>							
	Пептиды 1	Пептиды 2	Пептиды 3	Пептиды 4	Пептиды 5	Пептиды 6	Пептиды 7	Пептиды 8
Контроль	6 \pm 2	5 \pm 4	7 \pm 4	7 \pm 4	6 \pm 4	5 \pm 2	6 \pm 2	4 \pm 2
Poly(I:C)	24 \pm 10	27 \pm 13	4 \pm 3	31 \pm 13	50 \pm 13	4 \pm 2	33 \pm 8	27 \pm 12

Продолжение таблицы 4

Пептиды 1	23±5	–	–	12±5	–	–	–	–
Пептиды 2	–	4±1	3±3	–	–	–	–	–
Пептиды 3	–	3±3	15±13	–	–	–	–	–
Пептиды 4	2±1	–	–	19±5	–	–	–	–
Пептиды 5	–	–	–	–	7±6	3±2	–	–
Пептиды 6	–	–	–	–	1±0	10±9	–	–
Пептиды 7	–	–	–	–	–	–	41±16	3±2
Пептиды 8	–	–	–	–	–	–	3±2	4±2
Пептиды 1 + Poly(I:C)	405±100	–	–	56±12	–	–	–	–
Пептиды 2 + Poly(I:C)	–	359±32	4±4	–	–	–	–	–
Пептиды 3 + Poly(I:C)	–	31±8	386±37	–	–	–	–	–
Пептиды 4 + Poly(I:C)	34±8	–	–	396±62	–	–	–	–
Пептиды 5 + Poly(I:C)	–	–	–	–	325±56	2±1	–	–
Пептиды 6 + Poly(I:C)	–	–	–	–	47±21	341±53	–	–
Пептиды 7 + Poly(I:C)	–	–	–	–	–	–	394±65	23±5
Пептиды 8 + Poly(I:C)	–	–	–	–	–	–	47±16	438±36

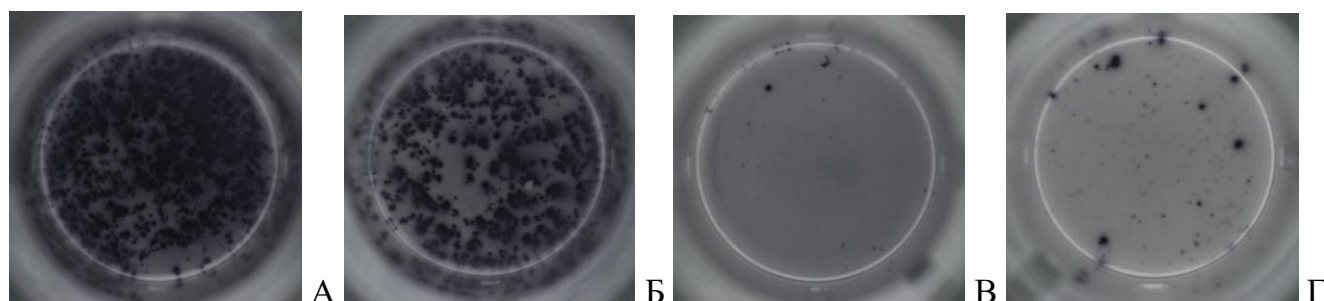


Рисунок 1 – Продукция интерферона- γ спленоцитами мышей, ранее иммунизированных пептидами с адьювантом, после *in vitro* стимуляции пептидами, входившими (А, Б) или не входившими (В, Г) в состав модели вакцины

В спленоцитах мышей, иммунизированных моделями вакцины без адьюванта, пептиды *in vitro* не вызывали стимуляции продукции интерферона- γ , кроме модели «пептиды 7», которая обладала слабой иммуногенностью (таблица 4).

В результате исследования выявили что Poly(I:C) является адьювантом с высокой иммуногенностью. *In vitro* Poly(I:C) неспецифически увеличивал число интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов мышей во всех 18 группах. В лунках со спленоцитами мышей из групп, которых ранее иммунизировали Poly(I:C) одним или с пептидами,

количество интерферон- γ -продуцирующих клеток составляло в среднем около 400, а при стимуляции не иммунизированных спленоцитов наблюдали около 200 интерферон- γ -продуцирующих клеток (Рисунок 2).

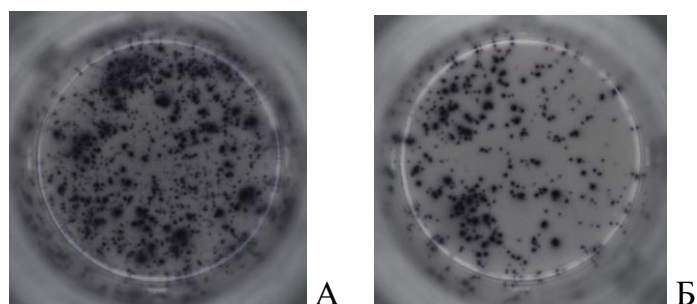


Рисунок 2 – Количество продуцирующих интерферон- γ спленоцитов у ранее иммунизированных адьювантом Poly(I:C) мышей (А) и у не иммунизированных (Б)

Таким образом, показано, что 2-кратная иммунизация мышей смесями пептидов в сочетании с адьювантом Poly(I:C) вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа. Результаты оценки противоопухолевого эффекта моделей вакцины и адьюванта после 2-кратной иммунизации представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Противоопухолевый эффект 2-кратной иммунизации Poly(I:C), смесями пептидов без адьюванта и с адьювантом

Группа	ТРО, %				УПЖ, %
	18 сутки	23 сутки	27 сутки	29 сутки	
Poly(I:C)	67	7	60	65	27
Пептиды 1	0	0	0	0	7
Пептиды 2	0	0	0	0	0
Пептиды 3	0	0	0	0	0
Пептиды 4	16	0	0	0	3
Пептиды 5	82	34	0	15	18
Пептиды 6	100	91	72	71	19
Пептиды 7	88	68	35	32	58
Пептиды 8	37	20	0	0	14
Пептиды 1 + Poly(I:C)	64	0	0	0	10
Пептиды 2 + Poly(I:C)	0	0	0	0	3
Пептиды 3 + Poly(I:C)	0	0	0	0	0
Пептиды 4 + Poly(I:C)	100*	100*	98*	83*	60*
Пептиды 5 + Poly(I:C)	95	76*	69*	34	40
Пептиды 6 + Poly(I:C)	95*	40*	44	18	35
Пептиды 7 + Poly(I:C)	100*	100*	97*	93*	67*
Пептиды 8 + Poly(I:C)	57	69	62	53	67*

* $p < 0,05$ по отношению к контролю

Смеси пептидов 1 – 3 не обладали противоопухолевым эффектом как при введении без адъюванта, так и с Poly(I:C). Возможно, это было связано с плохой растворимостью некоторых пептидов в физрастворе, что могло снизить их биодоступность.

Эффект смесей пептидов значительно усиливался при использовании адъюванта Poly(I:C), самого по себе обладающего противоопухолевой активностью, но менее выраженной, чем при комбинации с пептидами. Только смесь пептидов 6 без адъюванта вызывала более выраженное торможение роста опухолей, чем при применении с Poly(I:C) или одного адъюванта, но статистически эти данные были недостоверны; 3 из 5 пептидов, входивших в состав смеси пептиды 6, были синтезированы в минимальном количестве, поэтому повторить эксперимент для уточнения этих данных не удалось.

Смесь пептидов 7 с адъювантом оказывала наилучший эффект, по сравнению с остальными моделями вакцины: у двух мышей из 5 не развились опухоли, и животные прожили более 90 дней. Эти же пептиды были эффективны и без адъюванта, в отличие от смесей других пептидов без адъювантов, пептиды 7 увеличивали продолжительность жизни мышей на 58% при 2-кратной иммунизации.

Для смесей пептидов 4, 7 и 8 с адъювантом и без адъюванта оценили противоопухолевый эффект 4-кратной иммунизации. Процент торможения роста опухолей увеличился по сравнению с 2-кратной во всех группах (Таблица 6 и Рисунок 3).

Таблица 6 – Противоопухолевый эффект моделей пептидной вакцины с Poly(I:C) и без адъюванта при 4-кратной вакцинации

Группа	ТРО, %					УПЖ, %
	17 сут	21 сут	24 сут	28 сут	31 сут	
Poly(I:C)	100*	85*	72	70	63	20
Пептиды 4	38	5	0	12	0	3
Пептиды 7	100*	93*	90*	89	78	43
Пептиды 8	100*	76*	71	69	69	20
Пептиды 4 + Poly(I:C)	100*	100*	100*	94*	84*	57*
Пептиды 7 + Poly(I:C)	100*	100*	100*	96*	93*	100* Излечение 2 из 5 мышей
Пептиды 8 + Poly(I:C)	100*	100*	100*	95*	88*	97* Излечение 1 из 5 мышей

* $p < 0,05$ по отношению к контролю

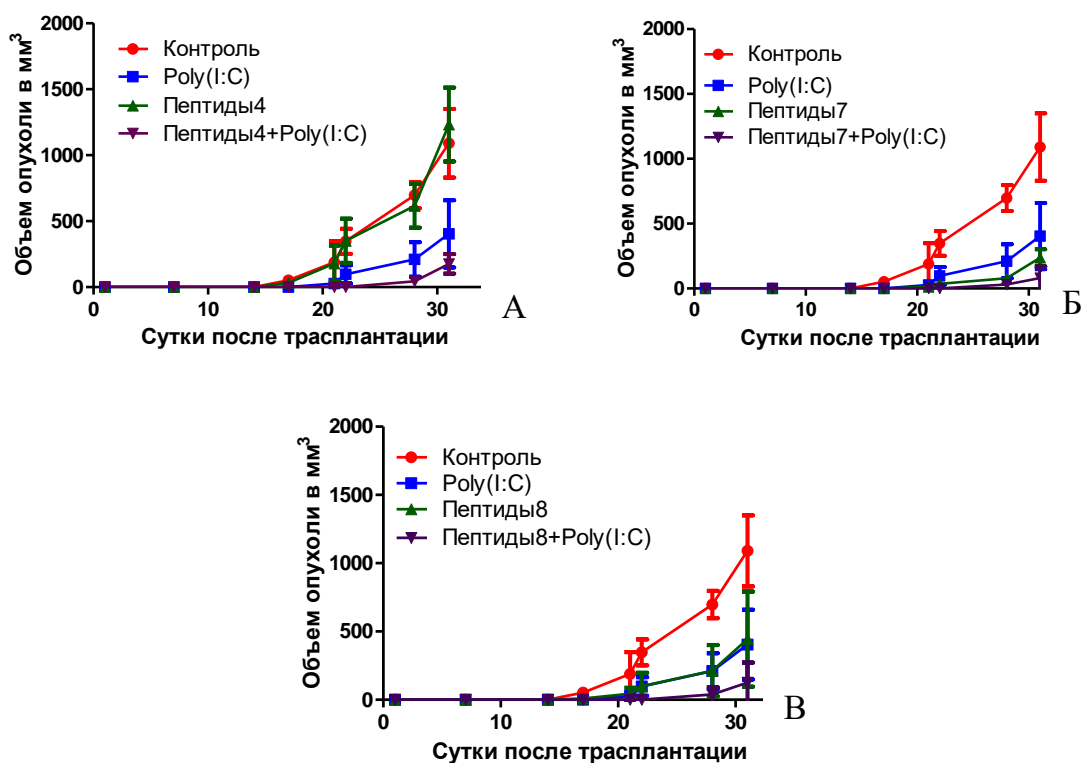


Рисунок 3 – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 4-кратно Poly(I:C), пептиды 4 и пептиды 4 с Poly(I:C) (А), пептиды 7 и пептиды 7 с Poly(I:C) (Б), пептиды 8 и пептиды 8 с Poly(I:C) (В)

В двух группах «пептиды 7+адьювант», «пептиды 8+адьювант» при 4-кратной иммунизации увеличилась продолжительности жизни (100% и 97%) по сравнению с 2-кратной (67% и 67%) (см. таблицы 5 и 6). Излечение наблюдали у 2 мышей, в группе «пептиды7 + адьювант», и у 1 мыши в группе «пептиды 8 + адьювант».

Таким образом, четырехкратная иммунизация, при которой 2 введения моделей вакцины проводились до перевивки опухоли, а 2 – после, более эффективно сдерживала рост опухоли у мышей C57Bl/6, по сравнению с 2-кратной иммунизацией, проведенной до перевивки меланомы B16-F10.

Оценка влияния адьюванта Poly(I:C) на иммунофенотип клеток селезенки мышей

Для более детального исследования иммунных процессов, происходящих при феномене торможения роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C), мы изучили изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей. Мышей разделили на 4 группы: группа 1 – контроль (n=6); группа 2 – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10 (n=5); группа 3 – мыши без опухоли, которые получили Poly(I:C) подкожно в дозе 50 мкг 6-кратно с интервалом 3 сут (n=5); группа 4 – мыши с меланомой B16-F10, которые

получали Poly(I:C) 6-кратно с интервалом 3 сут, первое введение Poly(I:C) было через сутки после перевивки опухоли (n=6). Через 19 дней после начала эксперимента у мышей забирали селезенки и выделяли клетки для анализа.

В группе 4 к окончанию эксперимента у 3 мышей не выросли опухоли, а у 3 имели объем не более 0,5 см³, тогда как у мышей в группе 2 опухоли достигали объема 1 см³ (Рисунок 4).

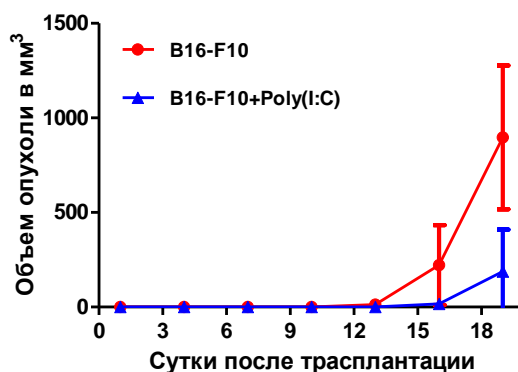


Рисунок 4 – Рост меланомы у мышей в группах 2 (B16-F10 без препарата) и 4 (B16-F10 с Poly(I:C))

При изучении влияния опухолевой нагрузки клетками B16-F10, а также 6-кратного введения Poly(I:C) в сочетании с опухолевой нагрузкой и без нее на иммунофенотип спленоцитов выявлен ряд отличий, которые оказались статистически значимы (Таблица 7).

Таблица 7 – Субпопуляции исследуемых клеток (медиана (min÷max) в %)

Антигены	Группы			
	1 контроль	2 B16-F10	3 Poly(I:C)	4 B16-F10 + Poly(I:C)
CD4	18,9 (17,0÷21,8)	14,9* (11,8÷18,8)	16,8 (11,8÷19,2)	19,7*** ** (17,1÷21,1)
CD8	10,1 (8,7÷11,4)	9,2 (8,1÷11,6)	9,3 (9,0÷12,0)	12,2* ** ** (9,8÷13,2)
CD4/CD8	1,8 (1,7÷2,1)	1,5 (1,2÷2,0)	1,7 (0,9÷2,0)	1,6* (1,4÷1,8)
CD69 на CD4	12,1 (10,7÷14,9)	16,2* (14,2÷23,2)	17,3* (15,0÷19,9)	13,9*** ** (10,5÷15,7)
CD69 на CD8	4,5 (4,0÷5,3)	6,2* (5,3÷7,5)	6,6* (5,6÷11,5)	5,15*** (4,3÷6,8)
Tn от CD4	55,0 (50,9÷55,8)	49,3* (38,3÷54,1)	51,8 (46,4÷53,6)	61,3* ** ** (57,5÷65,4)
Tem от CD4	34,9 (34,2÷38,8)	37,6 (35,9÷51,5)	39,6* (38,0÷43,9)	28,6* ** ** (25,7÷32,7)

Продолжение таблицы 7

Tn от CD8	41,5 (36,5÷43,5)	35,0* (27,8÷40,0)	39,6 (33,8÷42,6)	44,0* ** * (42,2÷53,4)
Tem от CD8	16,4 (14,6÷22,0)	20,7 (13,1÷25,1)	16,0 (15,0÷18,5)	10,8* ** * (9,2÷14,2)
Tcm от CD8	38,1 (35,1÷40,2)	41,5 (35,0÷47,5)	40,3* (37,9÷48,2)	39,7 (33,3÷41,8)
CD19	51,5 (49,5÷53,9)	55,7* (54,7÷57,7)	54,4 (49,4÷56,5)	52,3** (44,3÷56,1)
CD3	32,7 (29,9÷38,3)	30,0 (26,6÷32,7)	30,2 (28,4÷34,2)	36,2** * (31,2÷38,8)
NK (NKp46)	3,3 (2,9÷4,4)	2,8* (2,8÷3,2)	2,7* (2,2÷2,9)	2,9* (1,9÷3,2)

*Различия показателей по сравнению с группой 1 (контроль) статистически значимы ($p < 0,05$);

**Различия показателей по сравнению с группой 2 (B16-F10) статистически значимы ($p < 0,05$);

***Различия показателей по сравнению с группой 3 (Poly(I:C)) статистически значимы ($p < 0,05$).

В группе 4 обнаружен ряд параметров, медиана которых оказалась в промежутке между значениями для групп контроля (1 группа) и B16-F10, не получавшей Poly(I:C) (2 группа). Вероятно, опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на эти иммунологические параметры. В группе 4 мышей с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), кроме того обнаружен ряд параметров, медиана которых оказалась ближе к контролю (группа 1), чем к значениям в группах 2 (B16-F10) и 3 (здоровых мышей, получавшей Poly(I:C)). По всей видимости, иммуноактивирующее влияние Poly(I:C) ослабевает под воздействием опухоли, но так как опухолевая нагрузка меньше в группе 4, то и показатели ближе к нормальным. Общее количество CD3+ клеток и количество наивных Т-клеток CD4+ и CD8+ в группе с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), выше по сравнению с остальными группами, что может дать преимущество в борьбе иммунитета против Т-зависимых опухолей, иммунный надзор за которыми в большей степени осуществляется Т-клетками.

Таким образом, выявлены параметры иммунофенотипа клеток селезенки мышей, на которые влияет опухолевая нагрузка и/или введение адьюванта Poly(I:C) – иммунорегуляторный индекс CD4/CD8, количество CD69+ Т-клеток CD4+ и CD8+, количество В- и NK-клеток.

Оценка иммуногенности отдельных синтетических неоантигенных пептидов

Для оценки вклада каждого пептида в эффективность моделей вакцин, было исследовано влияние 4-кратной иммунизации каждым индивидуальным пептидом с адьювантом на активацию Т-клеточного иммунитета по изменению продукции интерферона- γ спленocyтaми мышей (Таблица 8), а также на изменение уровня

сывороточных цитокинов интерферона- γ и интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-10 (Таблица 9). Из-за небольших количеств некоторых синтезированных образцов пептидов, на данном этапе исследования удалось оценить эффективность 34 пептидов.

Таблица 8 – Влияние пептидов на продукцию INF- γ спленоцитами иммунизированных мышей

№	Название пептида	Количество INF- γ -продуцирующих клеток из $1 \cdot 10^5$ спленоцитов	
		Стимуляция клеток ранее иммунизированных мышей	Стимуляция клеток не иммунизированных мышей
1	g.101573665C>G	549 \pm 9	89 \pm 13
2	g.105559136C>T	352 \pm 17	11 \pm 2
3	g.107599034A>C	220 \pm 15	10 \pm 4
4	g.108075690C>A	4 \pm 1	2 \pm 1
5	g.109894747T>G	2 \pm 2	1 \pm 1
6	g.110327865C>T	20 \pm 4	8 \pm 3
7	g.126439132G>T	373 \pm 17	46 \pm 11
8	g.142664440A>G	396 \pm 10	90 \pm 15
9	g.145123749C>T	29 \pm 3	3 \pm 2
10	g.153509426A>T	204 \pm 17	5 \pm 2
11	g.190937554G>A	158 \pm 20	4 \pm 1
12	g.28894578A>C	51 \pm 1	9 \pm 3
13	g.29565843C>G	434 \pm 3	76 \pm 8
14	g.35197173T>G	422 \pm 7	65 \pm 12
15	g.4007844T>G	197 \pm 12	84 \pm 2
16	g.41232378A>G	244 \pm 27	5 \pm 2
17	g.45553003G>T	102 \pm 2	8 \pm 3
18	g.5098048A>C	209 \pm 15	6 \pm 2
19	g.54847269G>T	132 \pm 14	6 \pm 2
20	g.56226589G>T	445 \pm 13	1 \pm 1
21	g.58476516A>C	19 \pm 8	8 \pm 4
22	g.60246193G>T	440 \pm 15	14 \pm 6
23	g.6393021C>G	426 \pm 9	4 \pm 2
24	g.64957410G>C	138 \pm 11	5 \pm 1
25	g.65813948T>A	414 \pm 16	13 \pm 2
26	g.66708664A>C	208 \pm 1	53 \pm 11
27	g.69027878G>A	5 \pm 1	3 \pm 1
28	g.69615465A>T	13 \pm 5	2 \pm 1
29	g.7163330C>T	338 \pm 7	6 \pm 3
30	g.77174891A>C	247 \pm 15	11 \pm 2
31	g.81419559T>A	372 \pm 16	18 \pm 4
32	g.93352588T>C	366 \pm 12	27 \pm 6
33	GFSQPLRRL	442 \pm 17	95 \pm 12
34	PSKPSFQE	272 \pm 29	96 \pm 22

Таблица 9 – Влияние пептидов на уровень цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей

№	Название пептида	Уровень цитокинов, пг/мл			
		Th1		Th2	
		INF- γ	IL-2	IL-4	IL-10
1	g.101573665C>G	<15	<2	<4	<30
2	g.105559136C>T	93,1 \pm 5,6	<2	61,9 \pm 3,7	<30
3	g.107599034A>C	<15	<2	<4	<30
4	g.108075690C>A	<15	<2	27,5 \pm 2,9	<30
5	g.109894747T>G	<15	<2	<4	<30
6	g.110327865C>T	131,9 \pm 3,9	<2	110,0 \pm 2,8	<30
7	g.126439132G>T	321,8 \pm 2,9	<2	212,3 \pm 4,5	<30
8	g.142664440A>G	<15	<2	<4	<30
9	g.145123749C>T	19,3 \pm 5,3	<2	10,9 \pm 1,8	<30
10	g.153509426A>T	<15	<2	<4	<30
11	g.190937554G>A	29,5 \pm 3,1	<2	23,1 \pm 3,6	<30
12	g.28894578A>C	<15	<2	<4	<30
13	g.29565843C>G	<15	<2	<4	<30
14	g.35197173T>G	<15	<2	<4	<30
15	g.4007844T>G	<15	<2	<4	<30
16	g.41232378A>G	<15	<2	<4	<30
17	g.45553003G>T	32,4 \pm 3,8	2,9 \pm 0,1	8,5 \pm 1,9	114,8 \pm 4,2
18	g.5098048A>C	<15	<2	<4	<30
19	g.54847269G>T	<15	<2	<4	<30
20	g.56226589G>T	<15	<2	<4	<30
21	g.58476516A>C	16,4 \pm 1,8	<2	12,5 \pm 2,6	<30
22	g.60246193G>T	<15	<2	<4	<30
23	g.6393021C>G	<15	<2	<4	<30
24	g.64957410G>C	<15	<2	<4	<30
25	g.65813948T>A	<15	<2	<4	<30
26	g.66708664A>C	<15	<2	<4	<30
27	g.69027878G>A	1760,7 \pm 56,5	<2	660,4 \pm 13,7	<30
28	g.69615465A>T	664,0 \pm 28,2	<2	410,5 \pm 1,9	<30
29	g.7163330C>T	27,4 \pm 5,0	<2	<4	<30
30	g.77174891A>C	<15	<2	<4	<30
31	g.81419559T>A	662,4 \pm 17,8	<2	383,2 \pm 4,9	<30
32	g.93352588T>C	18,9 \pm 4,9	<2	17,7 \pm 1,9	<30
33	GFSQPLRRL	76,8 \pm 6,3	<2	70,5 \pm 7,1	<30
34	PSKPSFQE	212 \pm 24,5	<2	146 \pm 5,3	<2

Следует отметить, что продукция интерферона- γ спленocyтaми была выявлена при иммунизации 27 пептидами, а повышение интерферона- γ в сыворотке крови – при иммунизации 14 пептидами. Только 9 пептидов (g.105559136, g.126439132, g.190937554, g.45553003, g.7163330, g.81419559, g.93352588, GFSQPLRRL, PSKPSFQE) одновременно индуцировали продукцию интерферона- γ в спленocyтaх и повышали уровень этого цитокина в сыворотке крови.

Противоопухолевый эффект иммуногенных синтетических неоантигенных пептидов

Исходя из полученных результатов, мы решили оценить противоопухолевый эффект 4-кратной иммунизации отдельно каждым иммуногенным пептидом. Из-за ограниченного количества пептидов мы выбрали для этого исследования пептиды, показавшие иммуногенность в ELISpot и ELISA, и входившие в модель вакцины, содержащую смесь «пептиды 7»: g.190937554, g.7163330, PSKPSFQE.

Пептиды и Poly(I:C) вызывали торможение роста опухоли и увеличивали продолжительность жизни мышей (Таблица 10, Рисунок 5). Следует отметить, что при иммунизации отдельным пептидом наблюдался меньший эффект, чем при использовании их в смеси «пептиды 7».

Таблица 10 – Противоопухолевый эффект 4-кратной иммунизации Poly(I:C) и пептидами с адьювантом

Группа	ТРО, %					УПЖ, %
	15 сут	18 сут	23 сут	28 сут	31 сут	
Poly(I:C)	100*	82*	73*	50	46	20
g.190937554 + Poly(I:C)	100*	69	70	54	49	17
g.7163330 + Poly(I:C)	100*	87*	80*	68	52	22
PSKPSFQE + Poly(I:C)	100*	100*	86*	75*	76*	45 Излечение 1 из 5 мышей

* $p < 0,05$ по отношению к контролю

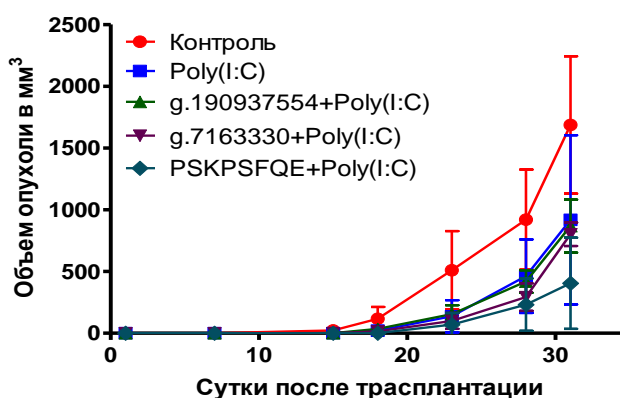


Рисунок 5 – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 4-кратно Poly(I:C) и пептиды g.190937554, g.7163330, PSKPSFQE с Poly(I:C)

Полученные нами результаты указывают на то, что иммунизация моделью вакцины, содержащей смесь нескольких пептидов, обладает более выраженным противоопухолевым эффектом, по сравнению с иммунизацией моделью вакцины, содержащей только один пептид. Возможно, это связано с гетерогенностью опухоли, и

для эффективного противоопухолевого ответа необходимо нацеливание на все мутантные неоантигены, обнаруженные в опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности моделей вакцины, состоящих из адьюванта Poly(I:C) и синтетических неоантигенных пептидов, полученных в результате полноэкзомного секвенирования и биоинформатического анализа меланомы B16-F10.

2. Двукратная иммунизация мышей смесями пептидов в сочетании с адьювантом Poly(I:C) вызывала специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа: количество интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов на лунку составило от 325 ± 56 до 438 ± 36 .

3. Четырехкратная иммунизация смесями «пептидов 4, 7, 8» с адьювантом Poly(I:C) значительно тормозила рост меланомы B16-F10 у мышей C57Bl/6. При этом смесь «пептиды 7» с Poly(I:C) оказывала наилучший эффект, по сравнению с остальными моделями вакцины (ТРО=100-93% на 17 – 31 сутки от перевивки опухоли, $p < 0,05$; УПЖ = 100%, $p < 0,05$; излечение 40%).

4. Адьювант Poly(I:C) обладает высокой иммуногенностью, стимулирует продукцию интерферона- γ во всех группах мышей (до 200 – 400 интерферон- γ -продуцирующих клеток на лунку). Poly(I:C) и опухолевая нагрузка B16-F10 изменяли ряд параметров иммунофенотипа спленоцитов мышей: иммунорегуляторный индекс CD4/CD8, количество CD69+CD4+ и CD69+CD8+ Т-клеток, количество В- и НК-клеток. В группе мышей с меланомой, получавшей Poly(I:C), наблюдалось также и повышение общего количества CD3+ клеток и количества наивных CD3+/CD4+ и CD3+/CD8+Т-клеток.

5. Двукратная иммунизация мышей моделями вакцин, содержащими только один пептид и Poly(I:C), показала, что 79 % пептидов увеличивали количество интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов у ранее иммунизированных мышей по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), 41 % пептидов вызывали повышение уровней сывороточных цитокинов интерферона- γ и интерлейкина-4, что свидетельствует о стимуляции клеточного и гуморального путей развития иммунного ответа. 24 % пептидов вызывали одновременно увеличение количества интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов и увеличение уровня этого цитокина в сыворотке крови иммунизированных мышей.

6. Иммунизация моделью вакцины, содержащей смесь нескольких пептидов, оказывает более выраженный противоопухолевый эффект, по сравнению с иммунизацией моделью вакцины, содержащей только один пептид.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пономарев, А.В. Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей / А.В. Пономарев, **А.А. Рудакова**, З.А. Соколова, М.А. Барышникова, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. — 2021. — Т. 20, № 4. — С. 51-58.

2. **Рудакова, А.А.** Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины / А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, О.С. Бурова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. — 2021. — Т. 20, № 2. — С. 61-68.

3. Барышникова, М.А. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для создания модели противомеланомной вакцины / М.А. Барышникова, **А.А. Рудакова**, З.А. Соколова, О.С. Бурова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. — 2019. — Т.18, №4. — С. 76-81.