

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени  
Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**РУДАКОВА АННА АНДРЕЕВНА**

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

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

кандидат биологических наук

**Косоруков Вячеслав Станиславович**

доктор медицинских наук, доцент

**Титов Константин Сергеевич**

Москва – 2022 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
1.1. Современные подходы к вакцинотерапии опухолей.....	10
1.2. Неоантигены – мишень для противоопухолевой иммунотерапии .....	15
1.3. Селекция иммуногенных неоантигенов для иммунотерапии рака.....	18
1.4. Пептидные неоантигенные противоопухолевые вакцины .....	25
1.5. Адъюванты для противоопухолевых вакцин .....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	39
2.1. Пептиды.....	39
2.2. Приготовление моделей вакцины и адъюванта .....	43
2.3. Схемы вакцинации животных.....	43
2.4. Получение сыворотки крови мышей.....	44
2.5. Подготовка клеток селезенки.....	44
2.6. Культивирование <i>in vitro</i> клеток мышинной меланомы B16-F10.....	45
2.7. Перевивка меланомы B16-F10 мышам и оценка противоопухолевого эффекта. ....	45
2.8 Методы оценки иммуногенности .....	46
2.8.1 ELISPOT .....	46
2.8.2 Метод оценки изменений иммунофенотипа селезенки мышей с использованием проточной цитофлуориметрии.....	48
2.8.3. ELISA.....	50
2.9 Статистическая обработка данных.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	53
3.1. Оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности моделей вакцины из нескольких неоантигенных пептидов.....	53
3.1.1. Оценка иммуногенности моделей вакцины из нескольких неоантигенных пептидов .....	55
3.1.2. Оценка противоопухолевой эффективности моделей вакцины из нескольких неоантигенных пептидов .....	58

3.2. Оценка влияния адьюванта Poly(I:C) на иммунофенотип клеток селезенки мышей.....	65
3.3. Оценка иммуногенности отдельных синтетических неоантигенных пептидов	69
3.4. Противоопухолевый эффект иммуногенных синтетических неоантигенных пептидов .....	78
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	88
ВЫВОДЫ .....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень её 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 в злокачественных новообразованиях многочисленных соматических мутаций. 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 [153].

Было обнаружено, что у онкологических больных с опухолями, отличающимися высокой генетической нестабильностью, адаптивная иммунотерапия приводит к развитию Т-клеточного иммунного ответа против неоантигенов [149]. Соматические мутации в опухоли были в большинстве случаев уникальны для каждого пациента, и, к сожалению, не могли 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 [3].

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 [30, 196,170].

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. [136].

Ранее в НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» 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 [4]. 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 адъюванта Poly(I:C).
2. Изучить иммуногенность моделей противоопухолевых вакцин, содержащих комбинации разных синтетических неоантигенных пептидов к меланоме B16-F10, с адъювантом и без адъюванта, на мышах C57Bl/6.
3. Оценить противоопухолевую эффективность моделей вакцин, содержащих комбинации синтетических неоантигенных пептидов к меланоме B16-F10, с адъювантом и без адъюванта, на мышах C57Bl/6.

4. Исследовать воздействие на иммунофенотип клеток селезенки мышей C57Bl/6 иммунизации адьювантом Poly(I:C) и развитие 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 противомеланомной вакцины, содержащих наиболее иммуногенные синтетические неоантигенные пептиды и адьювант Poly(I:C).

### **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.

### **Теоритическая и практическая значимость**

Полученные в исследование результаты имеют большое практическое значение: на их основании разработан алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов, показана необходимость использования адьюванта 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.

### **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 мышины меланомы B16-F10 и нормальной ткани мышей C57Bl/6. В качестве адъюванта 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  $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), и методом ELISA по определению уровней сывороточных цитокинов ИФН- $\gamma$ , интерлейкинов (ИЛ) -2, -4 и -10. Воздействие адъюванта 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 цитометрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна – Уитни и применяли программу STATISTICA v.7.

### **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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -продуцирующих спленоцитов, а 41 % пептидов – увеличение уровня интерферона- $\gamma$  в сыворотке крови иммунизированных мышей. Одновременно увеличение количества интерферон- $\gamma$ -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.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Диссертация выполнена с использованием сертифицированного современного оборудования, а также с применением современных методов статистического анализа данных, что позволяет считать полученные результаты



достоверными. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в отечественных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Апробация диссертации состоялась на научной конференции с участием 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 17 «мая» 2022 г.

Основные положения научной работы представлены на следующих конференциях: VII Петербургский международный онкологический форум "Белые Ночи 2021", VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии 2021.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Современные подходы к вакцинотерапии опухолей

Активация иммунной системы с помощью иммунотерапии является эффективным и многообещающим подходом к лечению злокачественных новообразований [24]. Последнее десятилетие ознаменовалось успехами в иммунотерапии таргетными препаратами – блокаторами контрольных точек иммунитета CTLA4 и PD-1, что привело к прорыву в лечении ряда онкологических заболеваний, в том числе меланомы [79, 175], почечно-клеточного рака [127], немелкоклеточного рака легкого [26], рака мочевого пузыря [142] и рака яичников [72].

Иммунные чек-пойнты или контрольные точки иммунитета – это система ингибиторных механизмов, участвующих в регуляции иммунного ответа, они необходимы для предотвращения аутоиммунных реакций и защиты от повреждения иммунными клетками органов и тканей организма. Эти ингибиторные механизмы используются и в опухолевой ткани, защищая клетки опухоли от распознавания и элиминации иммунной системой [3].

Результатом иммунотерапии является активация и пролиферация опухолево-реактивных Т-клеток, распознающих специфичные для опухоли пептиды, представленные на главном комплексе гистосовместимости (major histocompatibility complex – МНС) опухолевых клеток. [180].

Одно из развивающихся направлений иммунотерапии – противоопухолевые терапевтические вакцины. Вакцины традиционно использовались для предотвращения инфекционных заболеваний, тренируя иммунную систему быстро и специфично уничтожать патоген. Однако способность вакцин вызывать и усиливать антиген-специфичные иммунные ответы рассматривается, как имеющая потенциал для применения в лечении рака [24]. Цель противоопухолевых вакцин – помочь иммунной системе распознать антигенные маркеры, экспрессированные на опухолевых клетках, и уничтожить эти клетки. В основе создания терапевтических противоопухолевых вакцин лежит антигенное отличие опухоли от нормальной ткани.

Идея разработки терапевтических вакцин против рака развивается с момента открытия Георгом Клейном (George Klein) в 1967 году опухолеспецифических антигенов. В 70-е годы 20 века с испытаний цельноклеточных противоопухолевых вакцин началась история вакцинотерапии рака. С тех пор было проведено множество экспериментальных и клинических исследований различных вариантов вакцин, но большинство из них вызывали слабый клинический эффект, даже если наблюдалась активация иммунного ответа в результате вакцинации [1].

Исследования эффективности противоопухолевых вакцин долгое время терпели неудачи, за исключением профилактических вакцин от гепатита В и вируса папилломы человека – инфекций, которые способны вызвать рак печени и рак шейки матки, соответственно [96, 150]. Эти профилактические вакцины были эффективны, так как они не сталкивались с основными проблемами терапевтических противоопухолевых вакцин: низкой иммуногенностью и иммуносупрессивным микроокружением опухоли [81].

Одним из основных препятствий на пути к разработке эффективной противоопухолевой вакцины является выбор антигена. Антигенный состав опухолей разнообразен и зависит от типа опухоли. Опухолевые антигены могут сильно различаться при разных типах рака и даже у разных пациентов с одним и тем же заболеванием. Опухолевые антигены подразделяются на ассоциированные с опухолью (опухолеассоциированные антигены (ОАА)) и антигены, специфичные для данной опухоли (опухолеспецифичные антигены (ОСА)). ОАА обнаруживаются как в опухолевых, так и в нормальных клетках организма, однако их экспрессия в опухолях гораздо более высокая, чем в нормальной ткани. ОАА принято подразделять на дифференцировочные, раковотестикулярные и гиперэкспрессированные [5, 81]. Поскольку ОАА это собственные антигены, которые встречаются и в нормальных тканях, Т-клетки, которые высоко-аффинно связываются с ОАА обычно удаляются из иммунного репертуара с помощью центральных и периферических механизмов толерантности, и поэтому

противоопухолевые вакцины, использующие эти антигены, должны быть достаточно мощными, чтобы преодолеть толерантность.

ОСА обнаруживаются только в опухолевой ткани и отсутствуют в нормальных клетках, их главной особенностью является уникальность для злокачественных клеток. Среди ОСА выделяют группу антигенов вирусного происхождения и антигены, возникшие в результате мутационных изменений клеточных белков, – неоантигены [5]. ОСА могут с высокой аффинностью связываться с Т-клеточными рецепторами и приводить к активации Т-клеток. Хотя онковирусные антигены экспрессируются в опухолях специфических типов (например, антигены Е6 и Е7 вируса папилломы человека при раке шейки матки), они характерны для многих пациентов с такой опухолью. Также неоантигены, кодируемые онкогенными драйверными мутациями, могут встречаться у разных пациентов и типах опухолей и, соответственно, они называются общими неоантигенами. Но большинство неоантигенов уникальны для каждого индивидуального пациента и его опухоли (индивидуальные неоантигены), и это требует создания персонализированной терапии, направленной на них [81].

В таблице 1 представлены преимущества и недостатки использования ОАА и ОСА в качестве мишеней терапевтических противоопухолевых вакцин.

**Таблица 1** – Мишени терапевтических противоопухолевых вакцин

Антигены	Опухولةассоциированные		Опухولةспецифические		
	Гиперэкспрессированные белки, дифференцировочные антигены	Раково-тестикулярные антигены	Онко-вирусные антигены	Общие неоантигены	Индивидуальные неоантигены
Примеры	hTERT, HER2, MUC-1, gp100, MART-1, тирозиназа и др. [186, 51, 58, 16, 94, 139]	MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1, PRAME и др. [47, 80, 91, 69]	HBV [32], HPV E6, E7 [178] и др.	IDH1, KRAS и др. [163, 189]	Уникальны для каждой опухоли [136, 137, 157]
Опухولةвая специфичность	Вариабельная	Хорошая	Идеальная		
Центральная толерантность	Высокая	Низкая	Нет		
Встречаемость у большинства пациентов	Высокая		Высокая		Низкая

Стратегии вакцинотерапии опухолей, сфокусированные на ОАА, в основном терпели неудачи в генерации эффективных противоопухолевых иммунных ответов. Так как Т-клетки с высокой аффинностью, распознающие собственные антигены организма, удаляются во время развития центральными и периферическими механизмами толерантности иммунной системы, ОАА-направленные противоопухолевые вакцины сталкиваются с проблемой активации любых оставшихся низко аффинных Т-клеток [42, 81].

Полногеномный анализ опухолей при разных онкологических заболеваниях выявил гораздо больше мутаций, чем это ожидалось вначале этих исследований. Продукты мутировавших генов служат потенциальными терапевтическими мишенями, особенно если являются результатом драйверных мутаций, влияющих на канцерогенез, как это происходит с HER2, p53 или Ras; многие из этих драйверных мутантных белков являются мишенями для таргетной терапии моноклональными антителами, ингибиторами ферментов и рецепторов, но в результате исследований, проведенных в последние годы, появились доказательства, что и «пассажирские» мутации, которые на первый взгляд кажутся не важными для канцерогенеза, могут обладать иммуногенностью и служить мишенями для иммунотерапии [3]. В случае продуктов таких «пассажирских» мутаций в основе терапии лежит стимуляция иммунной системы к узнаванию новых антигенов и развитию иммунологической реакции против опухоли. Таким образом, высокая мутационная нагрузка опухоли, с одной стороны, ускоряет процесс эволюции опухоли, с другой стороны – обеспечивает наличие новых антигенов, позволяющих атаковать опухоль Т-клеткам [3].

Для осуществления терапевтического эффекта стимулированный вакциной иммунный ответ должен быть способен убивать миллионы или даже миллиарды опухолевых клеток. Кроме того, исследования последнего десятилетия выявили множество мощных иммуносупрессивных механизмов, которые развиваются во время прогрессирования злокачественной опухоли. Во многих случаях эти механизмы основаны на патологической активации супрессоров, которые в нормальных состояниях вовлечены в ослабление естественного иммунного ответа

при состояниях, когда патоген уже удален или рана зажила. Более того, иммунная система у многих больных раком серьезно ослаблена из-за возраста, побочных эффектов терапии рака или истощения иммунных клеток [82, 174].

Растущее понимание биологии препятствий иммунному ответу, направленному на уничтожение опухоли, привело к новым подходам, которые позволили исследователям начать разработку эффективных противоопухолевых вакцин. Много новой информации получено из исследований, анализирующих взаимодействия иммунной системы и опухоли, включая понимание того, как опухоли эксплуатируют механизмы чек-пойнтов Т-клеток. Развитие ингибиторов иммунных чек-пойнтов, первыми из которых были анти-CTLA-4, анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела, привело к выдающемуся прорыву в лечении рака [14], однако оказалось, что эти виды терапии эффективны только у определенных подгрупп пациентов, а многие опухоли, изначально отвечающие на терапию ингибиторами иммунных чек-пойнтов, в конечном итоге рецидивируют [97]. Стало ясно, что необходима дополнительная терапия, которая может вызвать противоопухолевые ответы у пациентов, которые не отвечали на лечение блокаторами иммунных чек-пойнтов, или у которых развилась к ним устойчивость. В ряде исследований показано, что применение противоопухолевых терапевтических вакцин с ингибиторами иммунных чек-пойнтов является перспективным направлением для улучшения эффективности иммунотерапии рака [136].

Кроме того, исследования, направленные на выявление эффективных мишеней противоопухолевых вакцин, помогли улучшить селекцию антигенов, в том числе, более иммуногенных ОСА, а также опухолеспецифичных неоантигенов [118, 151].

Мутации, происходящие в опухолевых клетках, могут генерировать новые эпитопы собственных антигенов, которые называются неоэпитопами или неоантигенами. Развитие высокопроизводительного секвенирования дало возможности для своевременной и экономически эффективной идентификации этих опухолеспецифичных мутаций у индивидуальных пациентов и привело к

клиническим испытаниям терапии, направленной на такие мутантные белки. Развитие алгоритмов предсказания связывания эпитопов с МНС I класса привело к идентификации потенциально иммуногенных неопитопов. Все вместе это привело к развитию персонализированных терапевтических противоопухолевых вакцин, адаптированных для лечения опухолей индивидуальных пациентов [24].

Подтверждение концепции лечения злокачественных новообразований с помощью вакцинотерапии персонализированными неоантигенными вакцинами было получено в нескольких исследованиях на мышинных моделях [30, 104, 114]. Kreiter et al. на моделях мышинных опухолей меланомы B16F10 и колоректального рака CT26 показали, что вакцинация и неоантигенными РНК-вакцинами и синтетическими длинными неоантигенными пептидами вызывала выраженную противоопухолевую активность [104]. В исследовании, проведенном Martin S.D. et al., вакцинация неоантигенными длинными синтетическими пептидами вызывала сильные Т-клеточные ответы, но не влияла на увеличение продолжительности жизни мышей [114]. Martin S.D. et al. показали, что опухоли с высокой мутационной нагрузкой наиболее вероятно имеют несколько кандидатных неоантигенов для формирования вакцины, в отличие от опухолей с низкой мутационной нагрузкой, в которых ограничено количество иммуногенных эпитопов, однако индукция неоантиген-специфичных иммунных ответов с помощью иммунотерапии или терапевтических вакцины возможна для обоих типов опухолей [114]. Далее клинические исследования подтвердили потенциал персонализированных неоантигенных вакцин в лечении меланомы [137, 157], немелкоклеточного рака легкого и рака мочевого пузыря [136].

## **1.2. Неоантигены – мишень для противоопухолевой иммунотерапии**

Неоантиген-специфичные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки обнаружены при разных типах опухолей, отвечающих на иммунотерапию [25, 17].

Вакцины, направленные на неоантигены, имеют ряд преимуществ перед традиционными вакцинами, использующими ОАА. Во-первых, неоантигены экспрессируются только в опухолевых клетках и могут таким образом вызывать

действительно опухолеспецифические Т-клеточные ответы, тем самым предотвращая повреждение нормальных тканей. Во-вторых, неоантигены являются *de novo* эпитопами, полученными из соматических мутаций, что предоставляет возможность обхода Т-клеточной центральной толерантности к собственным эпитопам и таким образом индуцирует иммунный ответ против опухоли.

Неоантигены в опухолях могут возникать в результате различных мутационных событий, число и тип мутаций варьируют в зависимости от типа рака [187]. К этим событиям относятся точечные мутации, инсерции или делеции и слияние генов. В исследовании [154] обнаружено, что неоантигены, полученные в результате сдвига рамки считывания могут быть более иммуногенными, чем полученные в результате миссенс-мутаций из-за отсутствия сходства с последовательностями в кодирующем геноме человека. Неоантигены, полученные в результате слияния генов, также являются иммуногенными и могут иметь особое значение при низкой мутационной нагрузке опухоли [197]. Неоантигены могут также возникать из транскриптомных aberrаций, включая опухоль-специфичную гиперэкспрессию генов, альтернативный сплайсинг экзона, удержание интрона, преждевременное редактирование транскрипции, чтение через стоп-кодон рибосомами, и из восходящих открытых рамок считывания [153].

В опухолях, вызванных вирусами, вирусные белки могут являться альтернативным классом опухолеспецифических неоантигенов. Благодаря чужеродной природе вирусных антигенов в опухолях, индуцированных, например, вирусом папилломы человека или Эпштейн – Барра, происходит генерация сильного противоопухолевого ответа [152].

Также, опухолеспецифические посттрансляционные модификации белков, например, фосфорилирование, ацетилирование, метилирование и другие, могут быть потенциальным источником неоантигенов [92].

В опухолях с высокой неоантигенной нагрузкой наблюдается увеличение инфильтрации иммунными клетками [64]. В исследовании Brown S.D. et al.



использовали данные RNA-seq колоректальных опухолей, рака яичника, молочной железы, мозга, почки и легкого 515 пациентов из Атласа генома рака, чтобы идентифицировать иммуногенные мутации, эпитопы которых представлены белками МНС, кодируемыми аутологичными аллелями HLA-A каждого пациента. Оказалось, что наличие мутационных эпитопов коррелировало с увеличением выживаемости пациентов. Опухоли с иммуногенными мутациями содержали больше опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, о чем можно было судить по экспрессии гена CD8A, и имели повышенную экспрессию маркеров PDCD1 и CTLA4. Мутационные эпитопы были очень редки в опухолях без признаков инфильтрации цитотоксическими лимфоцитами [27]. Matsushita H. et al. обнаружили, что при ясноклеточной карциноме почки наличие неоантигенных эпитопов и высокая экспрессия иммунных генов CD8 Т-клеток и их эффекторных молекул CD8A, перфорина и гранзима А не коррелировали с прогнозом, и предположили, что, это связано с наблюдаемой корреляцией этих генов с экспрессией других генов, ассоциированных с иммуносупрессией в микроокружении опухоли (CTLA-4, PD-1, LAG-3, PD-L1, PD-L2, IDO1 и IL10), то есть, сильные противоопухолевые эффекторные иммунные реакции, вызванные наличием иммуногенных неоэпитотов, уравнивались иммуносупрессивным микроокружением опухоли. Исследователи предположили, что иммуносупрессивные молекулы следует рассматривать как высокоприоритетные мишени для модуляции иммунных реакций [119].

В работе Van Allen, E. M. et al. у 110 пациентов с меланомой показано, что мутационная нагрузка, неоантигенная нагрузка и экспрессия цитолитических маркеров в иммунном микроокружении опухоли были в значительной степени связаны с ответом на терапию блокатором CTLA-4 [181]. А в исследованиях [148, 108] показано, что наличие неоантигенов позитивно коррелировало с прогнозом и с пользой от назначения блокаторов PD-1 у пациентов с немелкоклеточным раком легкого или колоректальным раком. В частности, Rizvi N.A. et al. обнаружили, что при немелкоклеточном раке легкого более высокая несинонимичная мутационная нагрузка в опухолях связана с улучшением объективного ответа на терапию анти-

PD-1, длительной клинической пользой и выживаемостью без прогрессирования [148], а Le D.T. et al. показали, что высокая нагрузка соматическими мутациями опухоли у пациентов с колоректальным раком связана с длительной выживаемостью без прогрессирования и клинической пользой от терапии пембролизумабом [108].

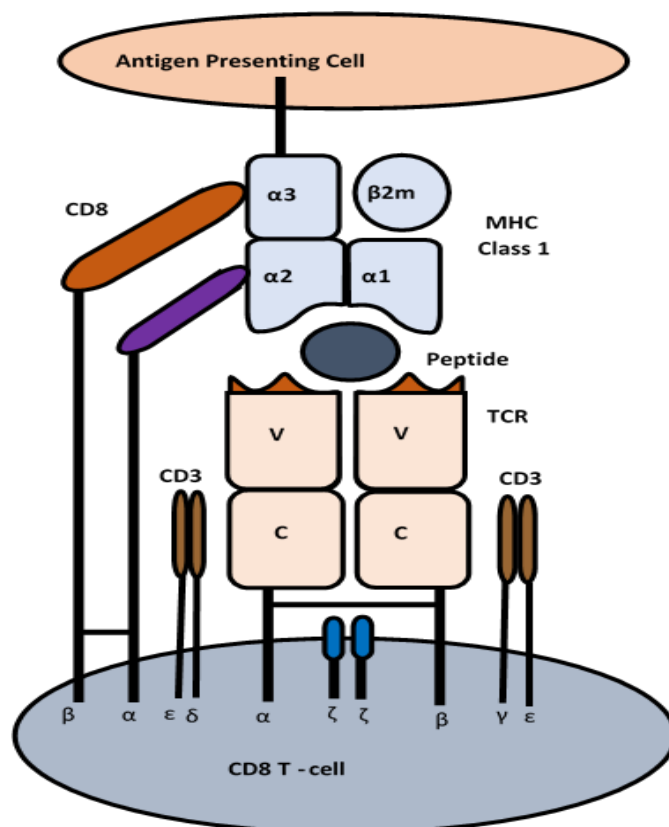
Для эффективной противоопухолевой терапии, в том числе и иммунотерапии, имеет фундаментальное значение высокий уровень генетической гетерогенности опухолей, то есть наличия разной экспрессии неоантигенов как в метастазах, так и внутри одной опухоли. Удаление опухолевых клеток, экспрессирующих определенные неоантигены, приводит к избыточному росту других клеток, не экспрессирующих эти антигены. Verdegaal E.M.E. et al. проанализировали стабильность неоантиген-специфических Т-клеточных ответов и антигенов, которые они распознают у двух пациентов с меланомой IV стадии, получавших лечение с помощью адоптивного переноса Т-клеток. Авторы исследования предположили, что неоантигены, распознаваемые Т-клетками, могут избирательно удаляться из популяции опухолевых клеток либо за счет общего снижения экспрессии генов, либо за счет потери мутантных аллелей. Потеря экспрессии неоантигенов, распознаваемых Т-клетками, сопровождалась развитием неоантиген-специфической реактивности опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов. Полученные Verdegaal E.M.E. et al. данные демонстрируют динамические взаимодействия между опухолевыми клетками и Т-клетками. [183]. Таким образом, для эффективной борьбы со всеми опухолевыми клетками при создании вакцин необходимо нацеливаться на множество неоантигенов, чтобы снизить вероятность ухода опухоли от иммунного ответа

### **1.3. Селекция иммуногенных неоантигенов для иммунотерапии рака**

Аффинность неоантигенного пептида к главному комплексу гистосовместимости МНС I является на сегодняшний день единственным параметром, который можно с некоторой надежностью предсказать *in silico* с помощью вычислительных инструментов по последовательностям

неоантигенного пептида и аллелей HLA пациента. В работах [112, 147] изложена концепция «качества неоантигена». Эта концепция сочетает в себе биофизические, химические и рассчитанные с помощью вычислительных инструментов свойства неоантигена, который наиболее вероятно вызовет продуктивный иммунный ответ против опухоли. К этим свойствам относятся аффинность неоантигена к МНС, авидность комплекса «пептид – МНС» к распознающему Т-клеточному рецептору (TCR), тип Т-клеток, реагирующих на неоантиген и сходство последовательности с известными высокоиммуногенными эпитопами. Параметр «качество неоантигена» является критическим аспектом в сегрегации ответов на терапию блокаторами иммунных чек-пойнтов, но он обычно не учитывается в алгоритмах предсказания неоантигенов [153]. Т-клетки праймируются антиген-презентирующими клетками (АПК), которые захватили опухолевые антигены и расщепили их на короткие пептиды, которые затем представили на молекулах МНС I и II класса

На рисунке 1 представлена молекулярная основа распознавания антигена. АПК экспрессируют комплекс МНС-I, который состоит из двух белков – консервативного  $\beta$ 2-микроглобулина и варибельной  $\alpha$ -цепи. Комплекс «МНС-I – антиген» распознается Т-клеточным рецептором (TCR).



**Рисунок 1** – Схема взаимодействия главного комплекса гистосовместимости антиген-презентирующей клетки с Т-клеточным рецептором CD8+ клетки

Каждый Т-клеточный рецептор (TCR) состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, связанных дисульфидной связью. Гетеродимеры  $\alpha:\beta$  по структуре аналогичны Fab-фрагменту молекулы иммуноглобулина, включая переменные (V) и константные (C) области. Разнообразие репертуара Т-клеток кодируется в V-доменах  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей в трех областях, определяющих комплементарность, которые образуют сайт связывания антигена на конце TCR (выделены оранжевым на рисунке 1). CD8 представляет собой дисульфидно-связанный гетеродимер  $\alpha:\beta$  или гомодимер  $\alpha:\alpha$ , где каждая цепь содержит один Ig-подобный домен, связанный с мембраной полипептидной цепью. CD8 связывается с консервативной областью домена  $\alpha 3$  молекулы MHC I на АПК, но также взаимодействует с доменом  $\alpha 2$  MHC I, вероятно, через  $\alpha$ -цепь. Запуск TCR антигеном инициирует сигнальный каскад, запускаемый сигнальным комплексом, состоящим из  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - и  $\delta$ -цепей CD3, а также гомодимера  $\zeta$ -цепи.

Каждый TCR определяет клональную Т-клеточную популяцию. Дополнительные взаимодействия, такие как «CD8 – МНС-I» не обязательны для распознавания антигена, но требуются для эффективной активации Т-клеток.

Внутри клетки антигены получают при деградации белков с помощью 80S протеасомы. Пептиды длиной 9-12 аминокислотных остатков транспортируются из цитозоля с помощью специального белкового механизма (TAP – transporter associated with antigen presentation) и встраиваются в молекулы МНС-I в эндоплазматическом ретикулуме [161].

Кроме того, антигены могут получаться из внеклеточных источников – захваченных некротических или апоптотических клеток и других везикул, которые кросс-презентируются на профессиональных АПК, таких как дендритные клетки (ДК) [43]. При росте опухоли субпопуляции тканевых резидентных и мигрирующих ДК захватывают дебрис опухолевых клеток и доставляют его в дренирующие лимфатические узлы. [193]. Там АПК праймируют наивные Т-клетки и обучают их распознавать добытые антигены. В зависимости от подтипа АПК, природы антигена и типа представления антигена, могут достигаться различные Т-клеточные ответы – CD4+ (Th1, Th2, Th17 и Treg) или цитотоксические CD8+ [68, 123]. Большинство АПК праймируют наивные CD4+ Т-клетки посредством представленных на МНС-II пептидов. Тогда как кросс-презентирующая субпопуляция XCR1+ ДК праймирует исключительно наивные CD8+ Т-клетки [88, 195] и является существенной для успешной иммунотерапии [73]. После праймирования увеличивается популяция реактивных Т-клеток, которые инфильтрируют опухоль и удаляют опухолевые клетки. Таким образом, точная селекция антигена, процессинг и праймирование Т-клеток являются основой успешного иммунного ответа.

Развитие высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа привело к повышению доступности идентификации персонализированных неоантигенов. В 2007 году был предложен первый алгоритм прогнозирования связывания мутатных неоантигенных пептидов, определенных в результате секвенирования, с локусами HLA-A и -B [130].

Этот алгоритм был использован в работе Castle J.C. и соавт., которые изучили мутаном мышинной опухоли B16-F10 и обнаружили 962 точечные соматические мутации, из которых 563 несинонимичные соматические мутации были в генах, экспрессирующих белки. После биоинформатического анализа ученые исследовали потенциально иммуногенные неоантигенные пептиды и обнаружили, что только треть мутантных эпитопов были иммуногенными и лишь 2 неоантигенных эпитопа обладали противоопухолевой активностью [30].

Мышиная меланома B16-F10 является слабо иммуногенной опухолью из-за низкой экспрессии молекул МНС I класса и отсутствия МНС-II [164], но, несмотря на это, 2 мутантных эпитопа, исследованные в работе [30], вызывали сильные иммунные реакции, способные компенсировать почти полное отсутствие молекул МНС в опухоли.

Биоинформатический анализ опухолевого мутаннома использован в целом ряде исследований [118, 149, 53, 196, 104, 39, 114], в результате которых подтверждено, что являющиеся продуктами соматических мутаций пептиды, представленные молекулами МНС I или II, могут вызывать активацию цитотоксических Т-лимфоцитов, и в итоге приводить к контролю над заболеванием и регрессии опухоли [3].

На сегодняшний день хорошо изучен процесс выбора иммуногенных неоантигенов, существует много вычислительный пайплайнов, разработанных для предсказания неоантигенов из опухолевого генома [121, 77].

Совместными усилиями ученых найдены правильные валидированные предиктивные алгоритмы для таргетинга неоантигенов. Типичный пайплайн выбора неоантигенов включает следующие шаги:

- Полноэкзомное или полногеномное секвенирование опухолевой ДНК и образцов нормальной ткани на платформе Illumina;
- Контроль качества секвенированных библиотек;
- Выравнивание с референсным геномом;
- Повторная калибровка базового качества;
- Сравнение нормы и опухоли для выявления соматических мутаций;

- Преобразование соматических мутаций ДНК в мутированные пептидные последовательности;
- Оценка аллелей HLA и аффинности мутантного эпитопа (9-11 а.а.) для выбора неоантигенов;
- Анализ экспрессии предполагаемых неоантигенов, например, если возможно, секвенирование РНК [153].

Существует много инструментов для проверки качества библиотек, наиболее широкое применение нашли FastQC и GATK (Genome Analysis Toolkit) [109]. Для поиска соматических мутаций в образцах опухоли используются различные программы, такие как Mutect, VarScan2, VarDict, SomaticSniper, Strelka, FasrD [87, 38].

Важным шагом в пайплайне поиска неоантигенных пептидов является типирование аллелей HLA и прогнозирование взаимодействия с ними неоантигенов. Вариабельная  $\alpha$ -цепь главного комплекса гистосовместимости является высоко полиморфной и кодируется в гене HLA, представленном тремя локусами на человеческой 6 хромосоме: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Таким образом, распределение аллели HLA содержит название гена (A, B или C), за которым следуют цифры, отделенные двоеточиями, первые две цифры указывают на серологическую активность (A\*01, B\*03 и т.д.), а следующие две цифры означают последовательность белка (A\*01:05, B\*03:05 и т.д.). Из-за высокого уровня полиморфизма каждого гена, точное типирование HLA-аллели на уровне белка из результатов полноэкзомного или РНК-секвенирования является сложной задачей, для решения которой разработано множество платформ, из которых наилучшей чувствительностью и селективностью обладает Optitype [107, 99]. Прогнозирование взаимодействия опухолевого неоантигенного эпитопа и аллелей HLA для идентификации неоантигенов из общего пула мутантных пептидов также производится с помощью ряда инструментов и программ, наиболее широко из которых используется NetMHC-pan.

Не каждый неоантиген, представленный на комплексе MHC-I, способен индуцировать CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ. Иммуногенный неоантиген должен

эффективно праймировать и стимулировать Т-клетки вследствие взаимодействия комплекса неоантиген-МНС-I с TCR одного или нескольких клонов Т-клеток. Этот процесс обычно приводит к цитокиновым ответам (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ), высвобождению IL-2 и пролиферации Т-клеток, а также приобретению цитолитической активности CD8+Т-клетками. Вакцинация приводит к праймированию и экспансии неоантиген-специфичных Т-клеток. Эти ответы могут быть оценены с помощью исследований, измеряющих продукцию цитокинов в ответ на пептиды (исследования типа ELISA или внутриклеточное окрашивание) или связывание синтетических тетрамерных или декстрамерных комплексов с молекулами пептид-МНС-I [153].

Неоантиген-специфичные Т-клетки с эффекторной функцией идентифицировали среди мононуклеаров периферической крови после вакцинации или даже после спонтанной индукции [9], а также среди опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов [63].

Т-клеточные рецепторы TCR формируются в результате V(D)J-рекомбинации – произвольной сборки генных сегментов V, D и J, что потенциально может создавать огромное разнообразие TCR (по разным оценкам, от  $10^{15}$  [45] до  $10^{16}$  рецепторов) [125]. Несмотря на это потенциальное разнообразие, TCR Т-клеток, которые распознают один и тот же эпитоп пептид-МНС, часто имеют общие особенности консервативной последовательности, что позволяет предположить, что можно прогнозировать модель специфичности эпитопа [44]. Авторы исследования [44] с помощью разработанных аналитических инструментов провели углубленную характеристику десяти эпитоп-специфичных репертуаров TCR CD8+ Т-клеток мышей и людей, представляющих более 4600 пар последовательностей TCR $\alpha\beta$ , полученных из одной клетки, от 110 субъектов. Каждый эпитоп-специфичный репертуар содержит кластеризованную группу рецепторов, которые имеют сходство с основными последовательностями, а также рассеянный набор разнообразных «посторонних» последовательностей. Определив общие мотивы в основных последовательностях, ученые смогли выделить ключевые консервативные



остатки, определяющие основные элементы распознавания TCR [44]. Результаты этого исследования могут быть ценным инструментом для селекции иммуногенных неоантигенов для дизайна вакцин, уточняя прогноз результатов иммунотерапии, или, позволяя выбрать наиболее авидные TCR для адоптивной T-клеточной терапии.

#### **1.4. Пептидные неоантигенные противоопухолевые вакцины**

Неоантигенные противоопухолевые вакцины развиваются в двух направлениях – пептидные вакцины и РНК-вакцины [78].

Терапевтические противоопухолевые вакцины на основе пептидов исследуются и разрабатываются уже почти 40 лет, но этот подход все еще остается в статусе «потенциально интересного» для терапии рака [173]. Несмотря на отсутствие на рынке одобренных международными или российскими организациями пептидных противоопухолевых вакцин, в области их доклинических и клинических исследований были достигнуты значительные успехи. Пептидные вакцины способны вызывать иммунный ответ против опухоли, множество клинических испытаний дают обширную информацию, которая помогает продвигаться вперед этому направлению исследований. [105, 182, 21]. Обнаружено, что низкая эффективность пептидных вакцин, связанная с резистентностью к иммунотерапии опухолевых клеток и иммуносупрессивным опухолевым микроокружением, может преодолеваться комбинированием с другими формами иммунотерапии, в том числе с блокаторами иммунных чек-пойнтов [21].

Пептиды в составе вакцины обеспечивают наиболее простой способ таргетинга специфических опухолевых эпитопов, представляя собой порцию антигена в ассоциации с молекулой главного комплекса гистосовместимости, который распознается T-клеточным рецептором, таким образом, стимулируя опухоль-реактивные T-клетки. Такое точное нацеливание на опухолевые клетки позволяет избегать чрезмерных иммунных реакций (в том числе, аутоиммунных) и обеспечивает безопасность и переносимость пептидных вакцин. Кроме того, синтез пептидов для клинического применения занимает меньше времени и

экономически более эффективен, чем получение терапевтических моноклональных антител. Однако экономические преимущества получения пептидов нивелируются тем фактом, что для эффективной терапии необходима разработка персонализированных пептидов [173].

Выбор пептидной последовательности – первое обязательное условие для разработки пептидной вакцины, но только его одного недостаточно для получения эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Для достижения эффективности терапевтических пептидных вакцин также необходимо учитывать длину пептида, схему и режим введения, применение адъювантов, комбинации с другими препаратами.

Минимальные пептидные эпитопы из 8-11 аминокислот могут связываться с определенными аллелями HLA I класса (HLA-I) без дальнейшего процессинга, таким образом, формируя лиганды к CD8+ Т-клеткам. Длинные пептиды из 13-18 аминокислот могут прямо связываться с аллелями HLA II класса (HLA-II) и стимулировать CD4+ Т-клетки. Однако кажущаяся простота применения пептидных вакцин из минимальных пептидных эпитопов связана с риском того, что большинство введенных пептидов будут экзогенно связываться с HLA-экспрессирующими клетками, вследствие чего не будут экспрессироваться костимулирующие молекулы и не произойдет стимуляция Т-клеток [54, 160]. Это проблема особенно принципиальна для HLA-I, который экспрессируется большинством ядродержащих клеток организма, и иммунизация короткими пептидами может скорее приводить к индукции толерантности, чем к активации иммунитета [122].

Синтетические длинные пептиды, проходившие клинические исследования, в большинстве случаев имели длину более 20 аминокислот. Таким пептидам требуется процессинг, который способствует презентации эпитопов профессиональными АПК, такими как ДК, идеально подходящими для прайминга Т-клеток.

Грамотный выбор длинных пептидных последовательностей может подобрать регионы, включающие как HLA-I, так и HLA-II связывающие эпитопы,

более того, могут быть представлены связывающие мотивы для множества аллелей HLA. Иммуногенность вакцинации длинными пептидами может быть усилена использованием нескольких длинных пептидов к разным неоантигенам, индивидуальным для пациента [137].

Для эффективного связывания с HLA-I пептидов необходим процессинг, для которого требуется попадание пептидов в цитозоль клетки. В работах [48, 20] представлена возможность использования длинных пептидных последовательностей, модифицированных добавлением пептидов, пенетрирующей клетку, и на животных моделях показана индукция CD8+ T-клеточных ответов на длинные пептиды. Интересно, что хотя этот подход способствует индукции CD8+T-клеток, он происходит не за счет CD4+T-клеточных иммунных ответов, которые в большей степени известны как важнейший компонент противоопухолевого иммунитета [115, 104]. Действительно, CD4 T-клетки, особенно Th1 клетки, не только важны для эффективного прайминга CD8+T-клеток, рекрутирования их в опухолевую ткань и формирования памяти, но они могут также влиять на CD8-независимые противоопухолевые эффекты, обосновывая подходы, направленные на индукцию CD4+T-клеток, при пептидной вакцинотерапии [156].

Подходы к выбору эпитопов для создания пептидных вакцин различаются в зависимости от того, является эпитоп неоантигеном, или это немутантный ОАА. Для последних важно установить преимущественную экспрессию белка в опухоли и презентацию пептида HLA-молекулами опухолевых клеток, что наиболее точно осуществляется с помощью масс-спектрометрии [7]. Для идентификации мутантных неоантигенных эпитопов используются технологии высокопроизводительного секвенирования и биоинформатические алгоритмы предсказания связывания пептид-HLA, которые можно комбинировать с характеристикой пептидов [60].

Помимо связывания пептидного эпитопа с HLA при выборе иммуногенного пептида также необходимо подтверждать его распознавание T-клетками [140, 171, 44].

В 2017 году опубликованы результаты I фазы клинического исследования пептидной неоантигенной персонализированной вакцины для лечения меланомы [137]. Для получения вакцины ученые провели полноэкзомное секвенирование ДНК опухолевых и нормальных клеток каждого пациента, включенного в исследование, идентифицировали соматические мутации, подтвердили экспрессию мутантных аллелей секвенированием РНК, оценили связывание с аутологичными HLA-A или HLA-B пациентов и синтезировали длинные пептиды для клинического применения, таргетные к 20 неоантигенам каждого пациента, в состав вакцины включили адъювант Хилтонол (poly-ICLC4), являющийся агонистом TLR3 (Toll-like receptor 3) и MDA-5 (melanoma differentiation-associated protein 5). Оценку эффективности вакцины проводили у ранее нелеченых пациентов с меланомой с высоким риском прогрессирования (стадия IIIВ/С или IVM1a/b) после хирургического удаления опухоли. Показали безопасность и иммуногенность вакцины. Индуцированные вакцинацией CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки нацеливались на 58 (60%) и 15 (16%) из 97 уникальных неоантигенов пациентов. Эти Т-клетки отличали мутированные антигены от антигенов дикого типа и в некоторых случаях распознавали аутологичные опухоли. Из 6 пациентов у 4 не было рецидива заболевания в течение 25 месяцев после вакцинации, тогда как 2 других получили рецидив, но после анти-PD-1 терапии у них наблюдалась полная регрессия опухоли и расширение репертуара неоантиген-специфичных Т-клеток [3].

В 2020 г. Р.А. Ott и соавт. [136] опубликовали результаты Ib фазы клинических испытаний персонализированной неоантигенной вакцины NEO-PV-01 в комбинации с блокаторами PD-1 у пациентов с диссеминированной меланомой, немелкоклеточным раком легкого или раком мочевого пузыря. У 82 пациентов продемонстрирована безопасность такого режима применения препаратов и отсутствие серьезных побочных эффектов, связанных с терапией. У всех пациентов после вакцинации наблюдали *de novo* неоантиген-специфичные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеточные ответы. Индуцированные вакциной Т-клетки имели цитотоксический фенотип и были способны направляться в опухоль и

способствовать уничтожению опухолевых клеток. Кроме того, после вакцинации наблюдали распространение эпитопов, направленных на неоантигены, не включенные в вакцину. Эти результаты подтверждают безопасность и иммуногенность описанного режима вакцинации пациентов с прогрессирующими солидными опухолями. Однако около 25% пациентов не смогли участвовать в исследовании, в основном из-за прогрессирования заболевания или из-за невозможности создать вакцины вследствие малого количества опухолевых клеток в образцах биопсии или небольшого количества мутаций в опухоли. Для решения таких проблем необходимо ускорить сроки производства вакцины и найти более эффективные подходы к отбору образцов опухолей. Кроме того, может быть интересно, рассмотреть стратегию предварительного производства персонализированных вакцин на более ранней стадии заболевания для использования во время более поздней линии лечения [136].

В исследовании Р.А. Ott и соавт. 2020 г. для предсказания неоантигенов использовали масс-спектрометрию [7] с целью создания рейтинга эпитопов, который учитывает экспрессию неоантигена, потенциал протеасомного процессинга и сродство связывания с HLA I класса [131]. Полученная в результате применения этой стратегии вакцина вызывала CD8 + Т-клеточный ответ у большинства пациентов, но, что интересно, она также часто вызывала и CD4 + Т-клеточные ответы, несмотря на отсутствие предсказания связывания с HLA II класса в схеме отбора пептидов. Аналогичные наблюдения были сделаны в предыдущих работах с неоантигенными вакцинами [137, 157]. В исследовании [6] было показано, что презентация МНС-II в основном зависит от представления этих неоантигенных эпитопов дендритными клетками. В работе [136] генерация CD4 + Т-клеток, по мнению авторов, связана с экзогенной нагрузкой МНС-II пептидами, используемыми в вакцине, поскольку их размер колеблется от 14 до 35 аминокислот, что согласуется с распределением длин представленных эпитопов МНС класса II. В исследованиях [10, 104] на доклинических моделях опухолей отмечена ключевая роль CD4 + Т-клеток в контроле над опухолью. Эндогенные CD4 + Т-клеточные ответы против неоантигенов наблюдали у

пациентов с меланомой, и было показано, что неоантиген-реактивные CD4 + Т-клетки опосредуют клиническую регрессию опухолевых поражений. В исследовании [136] поствакцинальные периферические CD4 + Т-клетки активировали CD107a, что указывает на их цитолитическую способность, в ответ на стимуляцию неоантигенными пептидами, входящими в состав вакцины. Другим важным аспектом иммунного ответа на вакцинацию NEO-PV-01 было то, что поствакцинальные Т-клетки проявляли фенотип клеток памяти, обладали цитотоксическим потенциалом, были мутантно-специфичными, долговечными и могли мигрировать в опухоль.

В работе [40] представлены результаты I/IIa фазы клинического исследования персонализированной неоантигенной вакцины, содержащей 4-20 синтетических длинных пептида, отобранных с использованием платформы ATLAS для поиска эпитопов. В качестве адъюванта в состав вакцины входил Poly-ICLC. Вакцину получали 8 пациентов с солидными опухолями с высоким риском рецидива. Показана хорошая переносимость вакцины. У всех пациентов обнаружены периферические CD4+ и CD8+ ответы против как минимум одного неоантигена, 99% всех пептидов стимулировали Т-клеточные ответы (74% индуцировали CD8+ Т-клеточные ответы, и 92% – CD4+). Продолжительность Т-клеточных ответов составила более 12 месяцев.

Таким образом, персонализированные пептидные неоантигенные вакцины предоставляют возможность усиливать опухолеспецифические иммунные ответы и являются дополнительным инструментом для иммунотерапии [132]. Более того, потенциал этих индуцированных вакциной неоантиген-специфичных Т-клеточных ответов обеспечивает иммунологическую память после терапии и возможность долгосрочной защиты против рецидива заболевания. Ограничения персонализированного подхода к иммунотерапии – высокая стоимость и задержки, связанные с производством индивидуальных вакцин, неопределенность в отношении оптимальной платформы поиска неоантигенов и отсутствие консенсуса в отношении наиболее подходящей платформы разработки вакцины [24]. Для пептидных вакцин также остается актуальной проблемой довольно

низкая иммуногенность при монотерапии, в связи, с чем необходимо применение различных стратегий усиления эффективности, в том числе адъювантов [185, 190].

### 1.5. Адъюванты для противоопухолевых вакцин

Адъюванты (термин происходит от *adjuvare* – «помогающий», или «способствующий») – вещества, усиливающие иммунную реакцию на чужеродные антигены или собственные опухолеассоциированные антигены [1]. Адъюванты являются ключевым компонентом многих противоопухолевых вакцин, так как преодолевают иммунотолерантность опухолевого микроокружения, приводя к генерации выраженных противоопухолевых иммунных ответов [2].

Вещества, применяемые в качестве адъювантов в составе противоопухолевых вакцин, можно условно разделить на два подтипа. К первому относятся те, которые стимулируют активную неспецифическую иммунную реакцию, как клеточную, так и гуморальную, и таким образом помогают улучшать антиген-специфичные иммунные ответы. Ко второму – вещества, образующие в месте введения вакцины, депо с медленно высвобождающимся антигеном, а также системы доставки, которые позволяют эффективно доставлять антиген к АПК и через это обеспечивать развитие антиген-специфических иммунных ответов [2].

Наиболее часто в составе противоопухолевых вакцин используются такие адъюванты как эмульсия «масло в воде» или алюминиевые квасцы, они разрешены к применению во многих странах, но часто их эффективность недостаточно высока. Для дизайна более эффективных вакцин важно, чтобы адъювант помогал повышать иммуногенность и снижал опухоль-индуцированную иммуносупрессию [66].

Перспективными адъювантами, изученными в составе современных противоопухолевых вакцин, в том числе и пептидных неоантигенных вакцин, являются вещества, относящиеся к стимуляторам врожденного иммунного ответа [65].

Классификация иммунных ответов на «врожденные» и «приобретенные» является базовым концептом иммунологии. Врожденный иммунитет – первая линия защиты против вторгающихся патогенных микроорганизмов, тогда как приобретенный, или адаптивный, иммунитет – вторая линия защиты, которая срабатывает против повторного заражения тем же патогеном. Однако распознавание патогенов компонентами системы врожденного иммунитета системой инициирует адаптивный иммунитет [65].

Защита большинства многоклеточных организмов обеспечивается компонентами врожденного иммунитета, адаптивный иммунитет появляется у позвоночных. Ключевое различие между врожденным и приобретенным иммунными ответами заключается в том, что врожденный иммунный ответ кодируется в зародышевой ДНК, тогда как приобретенные иммунные ответы требуют реаранжировки генов [86].

Врожденный иммунитет обеспечивается паттерн-распознающими рецепторами (pattern recognition receptors – PRRs), экспрессирующимися в «пехотинцах» врожденной иммунной системы – дендритных клетках (ДК) и макрофагах. PRRs распознают молекулы микроорганизмов, такие как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением/опасностью (danger-associated molecular patterns – DAMPs), и запускают продукцию защитных генов хозяина, включающих интерфероны типа I (ИНФ) [84].

Паттерн-распознающие рецепторы по структурной гомологии подразделяются на семейства: TLRs (toll-like receptors, толл-подобные рецепторы), RLRs (RIG-1-like receptors), NLRs (NOD-like receptors) и CLRс (C-type lectin receptors), из которых наиболее хорошо изученным в разных аспектах является семейство TLR [93, 143, 166, 135, 165, 159].

Толл-подобные рецепторы TLRs – трансмембранные рецепторы типа I, с эктодоменами, содержащими богатые лецитином повторы, обеспечивающими распознавание PAMPs, трансмембранными доменами и внутриклеточным толл-



интерлейкин-1 рецепторным (TIR, Toll-interleukin receptor) доменом, который необходим для активации внутриклеточных сигнальных путей [67]. Идентифицированы 10 человеческих и 12 мышинных TLRs, TLR1-TLR9 сохранены у обоих видов. Мышиный TLR10 нефункционален из-за инсерции ретровируса, а TLR11–13 имеются у мышей, но утрачены в геноме человека [93]. Ключевая роль TLRs в защите организма хозяина – регуляция врожденных и приобретенных иммунных ответов в эпителиальных клетках слизистых оболочек и обеспечение привлечения лейкоцитов в инфицированные ткани [23]. Хотя TLRs развивались как сигнальная система для детекции инфекций, в некоторых случаях они могут запускаться собственными молекулами организма. Это доказано для внутриклеточных TLRs, которые детектируют нуклеиновые кислоты, в том числе TLR3 (активируется двухцепочечной РНК), TLR7 and 8 (активируются одноцепочечной РНК), TLR9 (активируется мотивами CpG одноцепочечной ДНК) и в 2012 году открыто для TLR13 (орфанного рецептора у мышей, который детектирует сохраненную 23s рибосомальную РНК) [65, 134]. Чтобы избежать аутоиммунной реакции, чувствительные к нуклеотидам TLRs должны различать микробные и собственные продукты. Мощные TLR7/9 ответы на собственные нуклеотиды предрасполагают к аутоиммунным заболеваниям, таким как ревматоидный артрит и системная красная волчанка. Следовательно, внутриклеточные TLR ответы должны строго контролироваться, чтобы индуцировать достаточный ответ против патогенов без индукции пагубных ответов на составляющие собственного организма [57, 116].

Давно известна связь между злокачественным новообразованием и воспалением [18]. Около 25% опухолей связаны с хроническим воспалением, вызванным инфекцией или физико-химическими агентами [102]. PRRs участвуют в регуляции контроля воспаления, активация TLR запускает множественные провоспалительные и другие сигнальные каскады, цель которых – уничтожение патогена. Однако если патоген не удастся уничтожить, развивается хроническое воспаление, в которое также вовлечены TLR [172, 146].

В ряде работ, описывающих доклинические и клинические испытания неоантигенных пептидных вакцин, использовали в качестве адъювантов агонисты TLR3 – Poly(I:C), или его производные [30, 137].

TLR3 активируются вирусной двуцепочечной РНК и обнаружены в широком диапазоне клеток, включая эпителиальные клетки, дендритные клетки, моноциты, тучные клетки и натуральные киллеры. Активация TLR3 вызывает продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов адгезии [85].

Также обнаружено, что TLR3 экспрессируется и в опухолевых клетках. Активация TLR3 в опухолевых клетках и опухолевом микроокружении может играть важную роль в прогрессировании опухолей [199].

TLR3 обычно расположен в эндосомах, где его люминальный эктодомен (ECD) встречается с его лигандами, наиболее важным из которых является двуцепочечная РНК (дцРНК). TLR3-ECD состоит из 23 богатых лейцином повторов и имеет форму плоской подковы, он сильно гликозилирован [19]. Плоская форма способствует связыванию с лигандом и активации сигнальных путей [101]. Связывающий сайт TLR3 специфичен для дцРНК, но не различает последовательности оснований в лигандах дцРНК. TLR3-ECD взаимодействует с дцРНК двумя сайтами свободной от гликана латеральной поверхности. Эти сайты взаимодействуют только с рибозо-фосфатным остовом дцРНК, что приводит к неспецифическому связыванию с последовательностями оснований лиганда TLR3 [110]. Минимальная длина, необходимая для связывания с дцРНК с TLR3 – 40-45 пар оснований, а оптимальный рН – ниже 6,5 [46]. Аффинность TLR3 к дцРНК высокая (около 10 нМ) в оптимальных условиях, но снижается при увеличении рН больше 6 и снижении длины дцРНК меньше 45 пар оснований [110].

TLR3 экспрессируется несколькими видами опухолей, которые часто связаны с вирусной инфекцией (рак шейки матки, гепатоцеллюлярная карцинома, множественная миелома, меланома, рак молочной железы, рак предстательной железы и рак головы и шеи) и тесно связан с клиническими характеристиками, прогнозом заболевания и вероятностью метастазирования [199].

Опухолевое микроокружение сильно влияет на прогрессию опухоли и на противоопухолевый иммунитет [89]. Иммуносупрессивное опухолевое микроокружение в основном составляют опухолеассоциированные макрофаги, гранулоцитарные или моноцитарные миелоидные супрессорные клетки и регуляторные Т-клетки [62]. Объем инфильтрации и состав иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, различается в опухолях разных типов, и может иметь большое значение для успешной иммунотерапии [61]. В ряде исследований было показано, что активация TLR меняет свойства опухолевого микроокружения, например, лиганды TLR3 меняют фенотип опухолеассоциированных макрофагов с M2 на M1. При активации агонистом TLR3 Poly(I:C) опухолеассоциированные макрофаги продуцировали TNF- $\alpha$  в клеточной линии мышинной карциномы легкого, что приводило к гибели опухолевых клеток и подавлению роста опухоли [169, 167].

Агонисты TLR3, используемые в качестве адъювантов в противоопухолевых вакцинах – полирибоинозиновая-полирибоцитидиловая кислота (Polyriboinosinic – polyribocytidylic acid) (poly(I:C)) и ее производные poly-ICLC (Хилтонол, Hiltonol) и poly-IC<sub>12</sub>U (Амплиген) – синтетические имитаторы полимеров вирусной двуцепочечной РНК со схожим механизмом действия. Эффекты Poly(I:C) на опухолевые и иммунные клетки были подтверждены во многих *in vitro* и *in vivo* исследованиях, что привело к выбору Poly(I:C) и его производных в качестве адъювантов для противоопухолевых вакцин. [11].

Poly(I:C) вызывает сильный иммунный ответ, с участием интерферонов типа I и III и цитокинов Th1. Продукция интерферона типа I важна для эффективности Poly(I:C) в качестве Th1-адъюванта и может влиять на миграцию АПК, процессинг антигена и продукцию антиген-специфичных В- и Т-клеток [76, 192]. В исследованиях *in vitro* Poly(I:C) индуцировал стабильное созревания ДК, приводящее к секреции интерферона- $\beta$  и провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-12p70, кросс-презентации экзогенных антигенов CD8+ Т-клеткам и праймингу Th1 иммунных ответов [117, 31, 184.]

В ряде исследований Poly(I:C) усиливал экспрессию МНС I класса на фибробластах, кератиноцитах, клетках эпителия шейки матки HeLa и мышинной гиломы GL261 [71, 22, 200]. Такая регуляция экспрессии молекулы МНС I класса на негемопоэтических клетках во время вирусной инфекции усиливает презентацию внутриклеточных антигенов вирус-специфичным цитотоксическим Т-лимфоцитам, что важно для распознавания инфицированных клеток и предотвращения распространения внутриклеточных патогенов [138]. Данный механизм может быть важен для эффективного удаления опухолевых клеток при использовании Poly(I:C) в качестве адъюванта в составе неоантигенной вакцины. Однако повышение экспрессии молекулы МНС I класса на негемопоэтических клетках может иметь и негативное значение, так как с ним связывают развитие аутоиммунных побочных эффектов [70].

Shime H. et al [168] обнаружили, что Poly(I:C) воздействует на миелоидные супрессорные клетки и вызывает сильные противоопухолевые иммунные ответы, включая активацию NK-клеток. На чувствительной к NK-клеткам мышинной опухоли B16 у мышей C57BL/6 внутрибрюшинное введение Poly(I:C) индуцировало активацию миелоидных супрессорных клеток, вызывая экспрессию CD69 и продукцию интерферона- $\gamma$  в NK-клетках. Интерферон- $\gamma$  непосредственно ингибировал пролиферацию опухолевых клеток B16. Праймирование NK-клеток приводило к замедлению роста опухоли.

Poly(I:C) является также лигандом RIG-1 и MDA-5, в сигнальные пути которых вовлечены, как и в случае с TLR3, IRF3/IRF7 и NF- $\kappa$ B, что также приводит к транскрипции интерферонов типа I и провоспалительных цитокинов [106].

Для производного Poly(I:C), стабилизированного поли-L-лизином и карбоксиметилцеллюлозой – Poly-ICLC наблюдали активацию цитотоксических Т-лимфоцитов при подкожном введении мышам с пептидной вакциной [200]. После подкожного введения Poly-ICLC 8 здоровым добровольцам показана активация сигнальных путей врожденного иммунитета, включая продукцию интерферона и воспаления [28, 70].

Poly(I:C) и его производные использовали в качестве адъювантов в моделях неоантигенных вакцин в работах [30, 137, 95].

Многочисленные исследования показали, что использование в качестве адъювантов агонистов TLR3 имеет большой потенциал, поскольку они способны прямо воздействовать на опухолевые и иммунные клетки, а также активировать иммунную систему. Доклинические исследования Poly(I:C) и его производных в качестве адъювантов противоопухолевых вакцин показали многообещающие результаты, как при одиночном применении [120, 158, 191, 113, 52, 70, 129, 30], так и в комбинации с другими адъювантами [176, 198, 34, 194, 35, 12, 75, 33]. В этих исследованиях проведено сравнение эффективности вакцин с Poly(I:C) или Poly-ICLC и без адъювантов, и показано, что добавление агонистов TLR3 приводило к улучшению опухолеспецифических иммунных ответов, а также к лучшей элиминации опухоли.

Результаты ранних фаз клинических испытаний также показывают, что использование Poly-ICLC в качестве адъюванта в составе противоопухолевых вакцин вызывало иммунологический и клинический эффекты [133, 126, 155, 179, 98, 49, 137, 124, 50].

Хотя пока известны результаты I/II фаз клинических испытаний противоопухолевых вакцин с адъювантами производными Poly(I:C), они показывают, что агонисты TLR3 могут быть хорошим кандидатом в адъюванты, особенно для неоантигенных пептидных вакцин.

Противоопухолевые вакцины на основе синтетических неоантигенных пептидов показали в клинических испытаниях свою безопасность и хорошую переносимость, описана их способность специфически стимулировать опухоль-реактивные Т-клетки [173]. Однако клиническая эффективность пептидных вакцин пока не приближается к той эффективности, которая достигается при использовании в качестве иммунотерапии ингибиторов иммунных чек-пойнтов. Тем не менее, достигнуты значительные успехи в выборе таргетных опухолевых антигенов, идентификации эпитопов, связывающихся с HLA-молекулами, в подборе оптимального размера пептидов для композиции вакцины.

Ограниченный потенциал используемых в настоящее время адъювантов и иммуносупрессивное опухолевое микроокружение – основные препятствия эффективности вакцин, которые необходимо преодолевать [173].

Таким образом, стратегия создания противоопухолевых вакцин с использованием данных секвенирования опухоли пациента и HLA-типирования циркулирующих клеток периферической крови в качестве основы для прогнозирования иммуногенных неоантигенов имеет большие возможности для применения в персонализированной терапии больных раком. Доклинические исследования таких вакцин и последующая интеграция технологий в клиническую практику – многообещающая инновация в лечении онкологических больных [3].

Изучение иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели персонализированной противоопухолевой вакцины против мышиной меланомы B16-F10 необходимо для развития персонализированной вакцинотерапии, для создания и понимания в дальнейшем персонализированных вакцин для терапии меланомы человека.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Пептиды

Синтетические неоантигенные пептиды, использованные в исследовании, были выбраны в результате биоинформатического анализа данных секвенирования мышинной меланомы B16-F10 и нормальной ткани мышей C57Bl/6 [4]. Секвенирование экзома и транскриптома опухолевой и нормальной ткани мышей было выполнено на платформе Illumina HiSeq2500, анализ качества полученных библиотек выполняли с помощью программ FastQC и MultiQC, для поиска мутаций в опухоли использовали программы GATK Mutect2 и Strelka [4]. Предсказание коротких пептидов, аффинных к главному комплексу гистосовместимости (МНС) H2 мыши проводили с помощью биоинформатической модели netMHCpan (версия 3.0), использующий глубокие искусственные нейронные сети, для предсказания коротких пептидов, способных вызвать иммунный ответ; использовались мутации типа миссенс и фреймшифт, а для подтверждения, что мутированные аллели экспрессируются в опухоли использовали транскриптомные данные [4]. С помощью биоинформатической модели, основанной на искусственных нейронных сетях, был спрогнозирован рейтинг иммуногенности пептидов, аффинных к H2-к (МНС I) мышей C57Bl/6 [4].

Пептиды для исследования были синтезированы в ООО «Атомтехсервис» (Ульяновск, Россия) и в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Пептиды в виде лиофильно высушенных проб были расфасованы в пробирки-эппендорфы с маркировкой, на которой указано название пептида и количество пробы в пробирк

Перечень пептидов и их характеристики представлены в таблице 2.

**Таблица 2** – Перечень исследуемых пептидов

№	Название пептида	Ген	Замена	Последовательность	Рейтинг
1	g.101573665C>G	Krt75	p.G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLG GTRRVSIG	2,09
2	g.105559136C>T	Apbb1	p.C654Y	ASLSEAVQAA_Y_MLRVYQK CLDARSQTST	2,19
3	g.106886296T>A	Olfir706	p.I174F	TVYTMYPFCMSQE_F_RH LLCEILPLLK	3,55
4	g.107599034A>C	Sema3b	p.L663V	LRRLVLHV_V_SAAQAERL ARAEAAAPA	0,00
5	g.108075690C>A	Ampd2	p.Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_ YLYYLAQIG	5,19
6	g.108814677G>C	Nckipsd	p.K492N	MQTDTQDHQ_N_LCYSALV LAMVFSMGEA	2,86
7	g.109894747T>G	Dennd5a	p.D1250A	PITAHMYE_A_VALIKDHTL VNSLIRVLQ	13,86
8	g.110327865C>T	Pole	p.L1847F	TLHNMKK_F_FLQLIAEF KRLGSSVVA	3,58
9	g.116820833G>C	Hpd1	p.P144A	AGYRGSFL_A_GFRPLPCTP GPGWVSHVD	2,81
10	g.121734550T>C	Gm7298	p.C48R	YTETPEKI_R_LHLYHLNET VTITASLVS	1,45
11	g.123421534G>C	Tubb3	p.G402A	FRRKAFLHWYTGE_A_MDE MEFTEAESNM	0,00
12	g.126439132G>T	Arsj	p.R509M	FNITADPYERVDLSS_M_YP GIVKKLLRR	2,17
13	g.130452479T>G	Cd55	p.D254A	SDSYTYSQVVITYSC_A_KG FILVGNASIY	1,31
14	g.140328678C>G	Mrm2	p.R134T	TFLCPADVTDTP_T_TFQKILE LLPSRRAD	1,87
15	g.142664440A>G	Wipi2	p.T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_V RLPFCGHKNI	1,30



16	g.145123749C>T	Arpc1b	p.S117F	WAPNENKFAVGSG_F_RVIS ICYFEQEND	6,57
17	g.153509426A>T	St6galnac 3	p.D30E	LLLAMRLVN_E_ATFPLLN CFGQPKTKW	1,34
18	g.155991934C>A	B3galt6	p.R228L	LVHYLRLS_L_EYLRAWHS EDVSLGTWLA	5,15
19	g.190937554G>A	Angel2	p.D166N	RNV DSTCEDREDKF_N_FSV MSYNILSQD	1,40
20	g.28894578A>C	Actn4	p.F855V	SGLVTFQAFID_V_MSRETT D TDTADQVI	6,59
21	g.29565843C>G	Tnp03	p.G504A	VDRNPQFLDPVL_A_YLMK GLCEKPLASA	4,16
22	g.35197173T>G	3110043 O21Rik	p.Q297H	VQGLLKDATGSFVLPFR_H_ VMYAPYPTT	2,39
23	g.4007844T>G	Mthfd11	p.F294V	WIPSGTTILNCFHD_V_LSG KLSGGSPGV	0,42
24	g.41232378A>G	Tm9sf3	p.Y382H	PAMVCGTAFINFAIY_H_ HASRAIPFG	2,11
25	g.45553003G>T	Poll	p.H509N	ALLYFTGSA_N_FNRSMRA LAKTKGMSLS	2,51
26	g.5098048A>C	Atp6v1h	p.K147T	VHMAARIA_T_LAAWGKE LMEGSDLNYY	3,44
27	g.54847269G>T	Enpp2	p.P755Q	PEAKYDAFLVTNMV_Q_M YPAFKRVWTYF	8,09
28	g.56226589G>T	Herc2	p.C4450F	GGLAGPDGTKSVFGQM_F_ AKMSSFSPDS	9,98
29	g.58476516A>C	Orc2	p.F278V	RVDQKTLHNLLRK_V_VPS FSAEIERLNQ	2,51
30	g.60246193G>T	Gm4951	p.D267Y	FMFSLPNIT_Y_SVIEKKRNF LRWKTWLE	12,98
31	g.6393021C>G	Sdcbp	p.I219M	SSGHVGFIFKSGK_M_TSIV KDSSAARNG	49,72

32	g.64957410G>C	Klh128	p.P110A	GTVFISQDTVESLL_A_AAN	5,23
33	g.65813948T>A	Pbk	p.V145D	GSPFPAAVILR_D_ALHMAR GLKYLHQEK	3,09
34	g.66708664A>C	Lins1	p.K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAA KCLASLLYFQL	3,89
35	g.69027878G>A	Smc4	p.D767N	SGGGSKVMRGRMGSSVI_N _EISVEEVNK	4,47
36	g.69615465A>T	Nsun2	p.K138M	AWHTNLSRKILR_M_SPLLA KFHQFLVSE	3,32
37	g.7163330C>T	Pcmt1	p.P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNG TPDSVGLPPC	4,88
38	g.77174891A>C	2210408I 21Rik	p.D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLL NSFPGDLEFK	4,44
39	g.81419559T>A	Adgrv1	p.Y5165F	KITTIP_F_TTEVFAPVTETV TVSAIP	1,17
40	g.93352588T>C	Ppp1r7	p.L170P	RNIEGIDKLTQLKK_P_FLV NNKINKIEN	0,00
41	REGVELCPG	Obs1	p.T1764M	REGVELCPGNKYEMRRHG TTHSLVIHD	0,00
42	GFSQPLRRL	Sema3b	L663V	GFSQPLRRLVLHV_V_SAA QAERLARAEE	0,00
43	PSKPSFQE	Kif18b	p.K739N	PSKPSFQEFVDWE_N_VSPE LNSTDQPFL	0,00

Для оценки иммуногенности и противоопухолевой активности пептиды вводили мышам C57Bl/6 подкожно, каждый пептид по отдельности и объединяя в группы по 5-6 пептидов, 2- или 4-кратно. Пептиды объединяли в группы на первом этапе исследования в случайном порядке. В качестве адьюванта использовали Poly(I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt TLR ligand tested 100мг, P1530-100MG, Sigma).

## **2.2. Приготовление моделей вакцины и адьюванта**

Пептиды растворяли в PBS или ДМСО, таким образом, чтобы получилась концентрация 100 мкг в 10 мкл. Для приготовления модели вакцины, содержащей смесь пептидов, после растворения пептиды смешивали в один общий пул и доводили до нужного объема физиологическим раствором (ПанЭко). Таким образом, при оценке эффективности модели вакцины, содержащей только один пептид, 1 доза модели вакцины содержала 100 мкг этого пептида в 300 мкл физиологического раствора, в случае с пептидами, растворимыми в ДМСО – с 10% ДМСО в физрастворе. А при оценке моделей вакцины, содержащей смесь пептидов, 1 доза вакцины содержала 100 мкг каждого пептида (суммарное количество менялось, в зависимости от количества пептидов) в 500 или 600 мкл физиологического раствора, в случае нерастворимых пептидов, содержащем также 10%.

Адьювант Poly(I:C) готовили отдельно и вводили животным за 5-10 минут до пептидов, так как в некоторых случаях добавление адьюванта в смесь пептидов вызывало выпадение осадка, 1 доза адьюванта содержала 50 мкг Poly(I:C) в 300 мкл физиологического раствора.

В качестве контроля использовали модели вакцины без адьюванта, содержащие те же пептиды в той же дозировке.

Для оценки эффективности адьюванта отдельно от пептидов, использовали ту же дозу, что и в остальных экспериментах – 1 доза содержала 50 мкг Poly(I:C) в 300 мкл физиологического раствора.

## **2.3. Схемы вакцинации животных**

В исследованиях использовали в качестве биомоделей 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. Исследования выполняли в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской

конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Модели вакцины вводили подкожно в складку кожи на левом боку мыши по направлению к передней лапке, в экспериментах с адьювантом за 5 – 10 мин до введения пептидов в то же место вводили Poly(I:C). Иммунизацию проводили 2-кратно или 4-кратно с недельными интервалами, в 0 и 7 дни или в 0, 7, 14 и 21-й дни.

Для иммунологических экспериментов на 4-5 день после последнего введения препаратов (на 12 или 25 дни от начала экспериментов) у мышей получали сыворотку и селезенки для выделения спленоцитов.

#### **2.4. Получение сыворотки крови мышей**

Для получения наибольшего объема крови использовали терминальный забор крови из сосудов шеи. С помощью этого метода от каждой мыши удается собрать от 0,5 до 1 мл крови. Из-за малых объемов получаемого материала объединяли кровь нескольких животных одной группы в общую пробирку и отстаивали до образования сгустка при комнатной температуре в течение 60 мин, затем сгусток отделяли. Сыворотку осветляли центрифугированием при 3000 g 30 мин, аликвотировали по 100 мкл и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ , не допуская повторных циклов оттаивания и замораживания материалов.

#### **2.5. Подготовка клеток селезенки**

Селезенки удаляли у ранее умерщвленных мышей и помещали в стерильную среду RPMI-1640, после чего каждую селезенку растирали с помощью отдельного стерильного гомогенизатора. Получившуюся клеточную суспензию фильтровали через марлевые салфетки и центрифугировали при 1500 оборотов 7 мин и дважды отмывали в среде RPMI-1640 (ПанЭко). После чего клеточный осадок ресуспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 2мМ L-глутамин (ПанЭко), пенициллин (25000 ед) – стрептомицин (25000 мкг) (ПанЭко) и 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone). Полученную клеточную суспензию пропускали через стерильный одноразовый фильтр для клеток с

диаметром пор 50 мкм (Filcons, BD), затем подсчитывали клетки в камере Горяева.

## **2.6. Культивирование *in vitro* клеток мышинной меланомы B16-F10**

Для оценки противоопухолевого эффекта моделей вакцины и адъювантов использовали клеточную линию меланомы мышей B16-F10. Мышиная меланома B16 спонтанно возникла у мыши C57Bl/6 в 1954 году и была выделена в Jackson Memorial Laboratory. Пассирование *in vivo* привело к формированию высоко метастатического дочернего клона B16-F10 [56].

Клетки B16-F10 для исследования получали из Банка клеточных линий группы криоконсервации биоматериалов и иммунотерапии опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» Минздрава России, которую ранее исследовали на наличие иммуногенных мутаций для создания неоантигенных пептидов. Клеточная линия B16-F10 хранилась в глубокой заморозке в жидком азоте. Культивирование клеточной линии проводили в полной 10% ростовой среде RPMI-1640 (ПанЭко), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), 2 mM L-глутамин (ПанЭко), пенициллин (25000 ед) – стрептомицин (ПанЭко) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. При достижении клетками монослоя проводили пересев клеток. Прикрепленную культуру клеток снимали с культурального флакона раствором Версена, отмывали в полной среде, подсчитывали в камере Горяева и рассаживали в новые культуральные флаконы по 400 тыс. клеток на флакон.

## **2.7. Перевивка меланомы B16-F10 мышам и оценка противоопухолевого эффекта**

На 14 день после начала иммунизации моделями вакцинам мышам из групп, в которых оценивался противоопухолевый эффект, в правый бок перевивали по 75 тыс. клеток/мышь меланомы B16F10 в 500 мкл среды RPMI-1640. Количество клеток для перевивки было выбрано по публикации [30]. 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 адьювант по сравнению с животными в контрольной группе, которые не получали никаких препаратов. Объем (V) опухоли у каждого животного вычисляли по формуле:

$$V = \pi/6 \times L \times W \times H,$$

где L, W, H – линейные размеры опухоли (длина, ширина и высота), а затем вычисляли средний объём опухоли в группе. Объем опухолей измеряли 2-3 раза в неделю.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = ((V_k - V_o)/V_k) \times 100, \text{ где}$$

$V_k$  – средний объем опухолей в контрольной группе ( $\text{мм}^3$ ),

$V_o$  – средний объем опухолей в опытной группе ( $\text{мм}^3$ ).

Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) вычисляли после гибели всех животных в опыте по формуле:

$$\text{УПЖ (\%)} = ((\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k)/\text{СПЖ}_k) \times 100, \text{ где}$$

$\text{СПЖ}_k$  – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни),

$\text{СПЖ}_o$  – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии противоопухолевой активности – торможение роста опухоли  $\geq 50\%$ , увеличение продолжительности жизни  $\geq 50\%$ .

## **2.8 Методы оценки иммуногенности**

### **2.8.1 ELISPOT**

Иммуногенность пептидов с адьювантом, пептидов без адьюванта и отдельно адьюванта оценивали по определению количества клеток, продуцирующих интерферон- $\gamma$ , методом ELISpot, согласно инструкции к набору

для определения мышинового INF- $\gamma$  (3321-2AW-Plus, Mabtech). Клетки селезенки мышей инкубировали 48 ч с адьювантом, 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. В качестве положительного контроля стимуляции продукции интерферона- $\gamma$  использовали конканвалин А (ПанЭко).

Планшеты, содержащие антитела к интерферону- $\gamma$ , доставали из упаковки и промывали добавлением 200 мкл/лунку стерильного PBS 4 раза. Затем добавляли по 200 мкл/лунку полной 10% среды RPMI-1640, инкубировали минимум 30 минут при комнатной температуре. Удаляли среду и добавляли суспензию спленоцитов в полной 10% среде RPMI-1640 по 100 мкл клеток/лунку в разведении 4 млн клеток в 1 мл. После этого в лунки планшета с клетками добавляли исследуемые стимуляторы продукции интерферона- $\gamma$  (пептид или смесь пептидов, или Poly(I:C), или конканвалин А в 100 мкл полной ростовой среды, в контрольные лунки с клетками добавляли просто по 100 мкл полной ростовой среды RPMI-1640. Затем планшеты оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C. Через 48 ч проводили детекцию спотов. Для этого снимали клетки стряхиванием с планшета и 5-кратно отмывали лунки в 200 мкл PBS на лунку. Детектирующее антитела R4-6A2-биотин разводили до концентрации 1 мкг/мл в PBS, содержащем 0,5% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), добавляли их в каждую лунку по 100 мкл и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После инкубации 5-кратно промывали лунки 200 мкл на лунку. Стрептавидин-ALP разводили 1 к 1000 в PBS-0,5% ТЭС и добавляли в каждую лунку по 100 мкл, инкубировали 1 час при комнатной температуре в темноте. Затем снова промывали планшеты 5-кратно в 200 мкл/лунку PBS. После чего добавляли в лунки по 100 мкл проявляющего субстрата BCIP/NBT-plus и ждали 5-15 минут проявления отдельных пятен, образующиеся в точках расположения антителообразующих клеток. После проявления пятен, планшеты тщательно промывали дистиллированной водой, как внутри лунок, так и снаружи нижней часть мембраны, для чего снимали пластиковую подложку планшета. Затем

планшеты оставляли просохнуть при комнатной температуре в темноте и подсчитывали пятна в лунках на приборе ELISpot reader. Результаты сохраняли в электронном виде и добавляли в протокол исследования.

При анализе результатов ELISpot иммуногенность пептидов оценивали по количеству клеток, продуцирующих интерферон- $\gamma$  (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 [30].

### **2.8.2 Метод оценки изменений иммунофенотипа селезенки мышей с использованием проточной цитофлуориметрии**

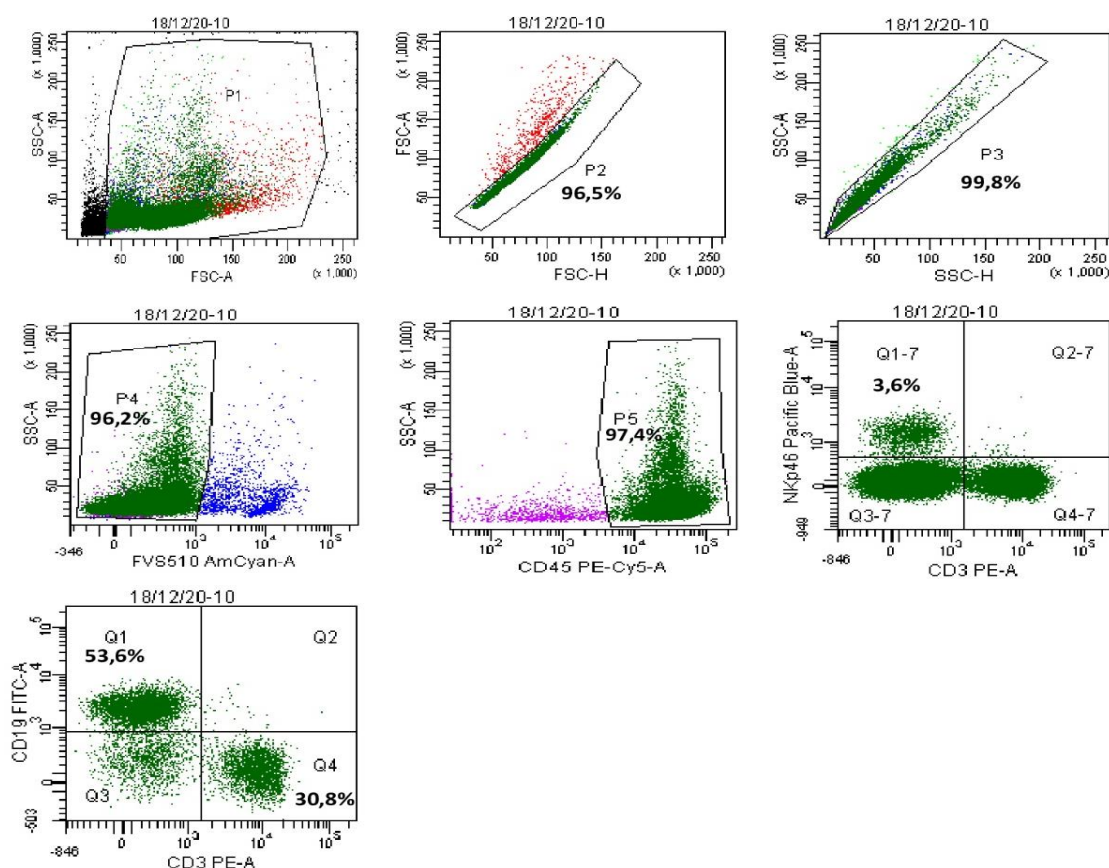
В суспензии спленоцитов проводили гипотонический лизис эритроцитов. Для этого клетки центрифугировали, удаляли надосоточную жидкость, к осадку клеток добавляли 360 мкл дистиллированной воды и сразу же перемешивали, через 10-15 секунд добавляли 6-8 мл PBS для устранения гипотонии, перемешивали и центрифугировали 5 минут при 200 g, затем еще раз отмывали в 5 PBS 5 минут при 200 g. Далее окрашивали клетки красителем жизнеспособности Fixable Viability Stain 510 (FVS510) (BD Biosciences) в соответствии с рекомендациями производителя (1 мкл FVS510 на 500 мкл суспензии клеток), пробирку с клетками оставляли в темноте на 15 минут, затем дважды отмывали в 5 мл PBS 5 минут при 200 g. После чего клетки разносили в пробирки для проточного цитометра и окрашивали антителами (Таблица 3), инкубировали 30 мин в темноте, затем однократно отмывали в 1 мл PBS.

Подсчет 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<sup>+</sup> клеток селезенки. Стратегия гейтирования представлена на рисунках 2 и 3.

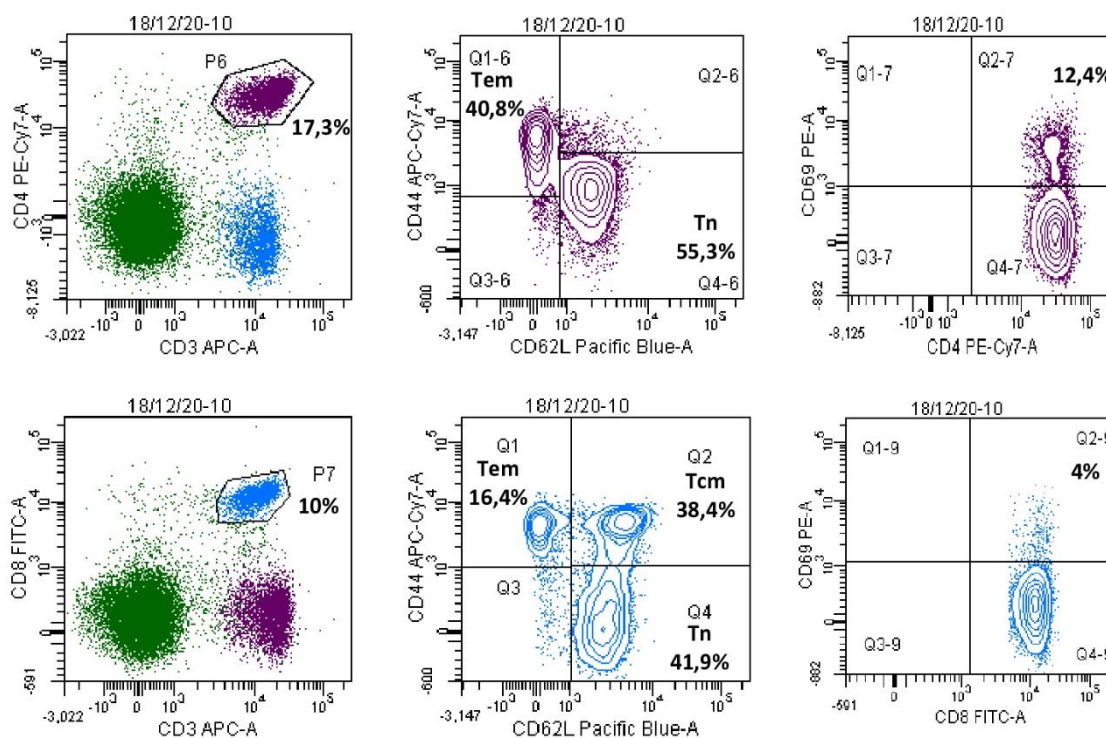


**Таблица 3** – Антитела для иммунофенотипирования спленоцитов

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



**Рисунок 2** – Стратегия гейтирования лейкоцитов селезенки мыши, пробирка 1. Из всех событий лейкоциты можно отличить по их свойствам FSC / SSC (гейт P1). После гейтирования лейкоцитов дублеты исключаются дважды (P2 и P3) с последующим исключением мертвых клеток (P4). Далее выделяются все CD45+ клетки (P5) и уже из этого гейта проводятся дальнейшие измерения Т-, В-, НК-клеток



**Рисунок 3** – Стратегия гейтирования лейкоцитов селезенки мыши, пробирка 2. Выделение CD45<sup>+</sup> клеток и исключение мертвых клеток с дублетами аналогично рисунку 1. Далее выделяются CD4<sup>+</sup> Т-клетки (P6) и среди них определяются CD69<sup>+</sup> клетки, а также Tn и Tem. Среди CD8<sup>+</sup> Т-клеток (P7) определяются CD69<sup>+</sup> клетки, а также Tn, Tcm, Tem

### 2.8.3. ELISA

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 ранее иммунизированных каждым по отдельности пептидом мышей уровни цитокинов, определяющих пути развития иммунного ответа Th1/Th2 – INF- $\gamma$ , IL-2, IL-4 и IL-10.

В планшет для ELISA (Corning Costar) вносили связывающие антитела в PBS по 100 мкл/лунку и инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. На следующий день аспирировали лунки планшета и 3-кратно отмывали в 250 мкл/лунку отмывочного буфера PBST (PBS + 0,05% Tween-20). Для блокировки неспецифического связывания в лунки планшета добавляли ELISA/ELISAPOT

Diluent 1X 200 мкл и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Пока шла инкубация подготавливали стандарты. Для этого дистиллированной водой восстанавливали стандарты мышинных INF-  $\gamma$ , IL-2 и IL-4, а IL-10 – с помощью добавления ELISA/ELISASPOT Diluent 1X (объем необходимой жидкости для восстановления каждого стандарта указан на флаконе). Оставляли стандарты для восстановления на 10 – 30 минут, аккуратно перемешивали для полного и гомогенного растворения. Концентрация восстановленных стандартов:

- мышинный INF-  $\gamma$ : 2000 пг/мл;
- мышинный IL-2: 200 пг/мл;
- мышинный IL-4: 500 пг/мл;
- мышинный IL-10: 4000 пг/мл.

Стандарты перед использованием перемешивали и сразу же использовали, так как хранить их нельзя. На следующем этапе удаляли блокирующий буфер и однократно промывали отмывочным буфером. Готовили двукратные серийные разведения стандартов, чтобы получить стандартную кривую для 8 точек. Для этого добавляли 100 мкл ELISA/ELISASPOT Diluent 1X в лунки, оставляя первые лунки пустыми. Далее добавляли 200 мкл/лунку стандартов в топовой концентрации в пустые лунки A1/A2, переносили 100 мкл топовых стандартов из лунок A1/A2 в лунки B1/B2, хорошо перемешивали их содержимое, отбирали 100 мкл и переносили в лунки C1/C2, таким образом процедуру повторяли еще 5 раз. Затем добавляли по 100 мкл/лунку исследуемых образцов в соответствующие лунки, в пустые лунки добавляли ELISA/ELISASPOT Diluent 1X. Планшет инкубировали в течение ночи при +4°C.

Далее подготавливали детектирующие антитела. Для этого растворяли в ELISA/ELISASPOT Diluent 1X 1000× детектирующие антитела INF-  $\gamma$  1 к 1000, и 250× детектирующие антитела IL-2, IL-4, IL-10 – 1 к 250.

Опустошали лунки планшета и 5 раз отмывали в 250 мкл отмывочного буфера. Добавляли по 100мкл/лунку детектирующих антител во все лунки, инкубировали 1 ч. В это время готовили авидин-HRP в разведении 1:250 в ELISA/ELISASPOT Diluent 1X. Далее отмывали 5 раз лунки планшета в 250 мкл

отмывочного буфера и добавляли в лунки по 100 мкл авидин-HRP, инкубировали при комнатной температуре 30 минут. Отмывали 7 раз, добавляли проявляющий раствор ТМВ по 100 мкл/лунку и инкубировали при комнатной температуре 15 минут, затем добавляли 50 мкл Стоп-раствора (Stop Solution, 1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Подсчитывали результаты спектрофотометрически на планшетном ридере при длине волны 450 нм и анализировали полученные данные.

## **2.9 Статистическая обработка данных**

Результаты экспериментов представлены 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 цитометрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна – Уитни и применяли программу STATISTICA v.7. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. 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, состоящих из нескольких пептидов, с адьювантом и без адьюванта. Пептиды разделили на группы, каждая из которых включала 5 или 6 пептидов (Таблица 4). Группы пептидов формировали случайным образом, опираясь только на растворимость пептидов, поскольку в начале работы оказалось, что некоторые пептиды были нерастворимы в водных растворах. Пептиды в первых 5 группах растворяли в физиологическом растворе, а в остальных группах – сначала в диметилсульфоксиде, а затем в физрастворе.

**Таблица 4** – 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	500 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) и 500 мкл физиологического раствора
Пептиды 3	g.123421534 g.130452479 g.28894578 g.4553003 g.5098048	500 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) и 500 мкл физиологического раствора
Пептиды 4	g.107599034 g.108075690 g.109894747 g.29565843 g.56226589	500 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) и 500 мкл физиологического раствора

*Продолжение таблицы 4*

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	600 мкг пептидов (по 100 мкг каждого) в 60 мкл ДМСО и 540 мкл физиологического раствора

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

Всего в этом эксперименте использовали 144 мыши-самки линии C57Bl/6 весом 20-22 г, которых разделили на 18 групп, в каждой группе было 8 мышей: 8 групп получали смеси пептидов без адъювантов, 8 групп – смеси пептидов с Poly(I:C), 1 группа – Poly(I:C) без пептидов, 1 группа – контрольная, в которой мыши не получали никакого воздействия.

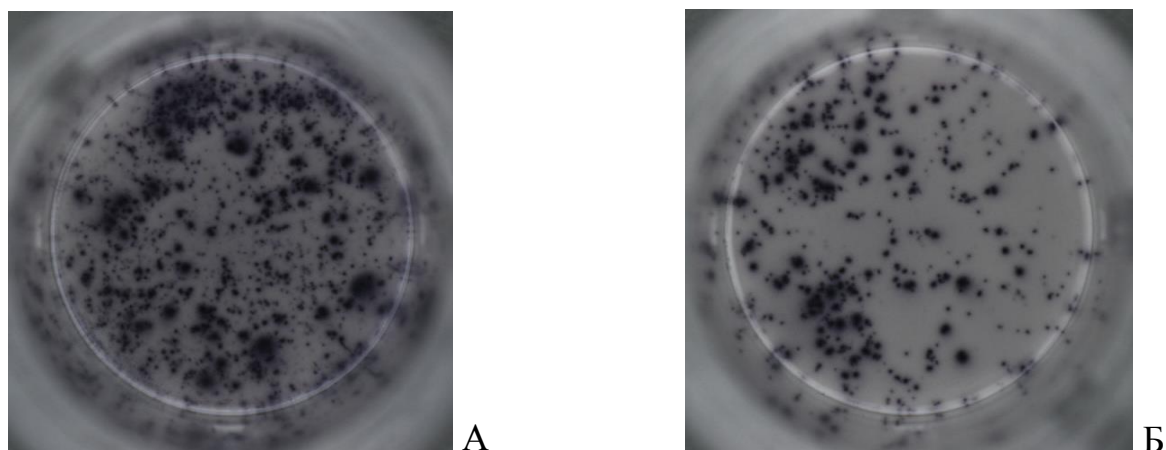
Иммунизация проводилась в 0 и 7 дни. Исследуемые модели вакцин вводили подкожно (в складку кожи на левом боку мыши, по направлению к передней лапке). В группах мышей, получавших пептиды с адъювантом, Poly(I:C) вводили подкожно за 5 минут до введения пептидов в то же самое место (складку кожи на левом боку).

На 12 день после первой инъекции у 3 мышей из каждой группы забирали спленоциты для оценки иммуногенности моделей вакцины и адъюванта. Оставшимся 5 мышам из каждой группы на 12 день в правый бок перевивали по 75 тыс. клеток/мышь меланомы B16-F10 в 500 мкл среды RPMI-1640.

### **3.1.1. Оценка иммуногенности моделей вакцины из нескольких неоантигенных пептидов**

Иммуногенность пептидов с адъювантом, пептидов без адъюванта и адъюванта оценивали методом ELISpot по изменению количества спленоцитов, продуцирующих интерферон- $\gamma$ . Для этого клетки селезенки мышей инкубировали 48 ч со смесями пептидов, которыми до этого иммунизировали животных. Для проверки специфичности иммунного ответа, в часть лунок со спленоцитами добавляли смеси пептидов, которыми не иммунизировали данных животных. Также часть спленоцитов инкубировали с адъювантом – Poly(I:C), он неспецифически увеличивал число клеток, продуцирующих интерферон- $\gamma$ . В качестве положительного контроля стимуляции продукции интерферона- $\gamma$  в часть лунок добавляли конканвалин А. В контрольные лунки со спленоцитами не добавляли ничего, кроме ростовой среды. Каждую точку ставили в триплете.

В результате этого исследования подтвердилось, что Poly(I:C) является адъювантом с высокой иммуногенностью. *In vitro* он на том же уровне, что и конканвалин А, неспецифически увеличивал число интерферон- $\gamma$ -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- $\gamma$ -продуцирующих клеток составляло в среднем около 400, а при стимуляции не иммунизированных спленоцитов наблюдали около 200 интерферон- $\gamma$ -продуцирующих клеток (Рисунок 4).



**Рисунок 4** – Количество продуцирующих интерферон- $\gamma$  спленоцитов у ранее иммунизированных адьювантом Poly(I:C) мышей (А) и у неиммунизированных (Б)

Кроме того, *in vitro* инкубация со смесями пептидов 1, 2, 4, 5, 7, 8 спленоцитов мышей, иммунизированных только Poly(I:C), выявила незначительное повышение количества интерферон- $\gamma$ -продуцирующих клеток, по сравнению с контролем (Таблица 5).

**Таблица 5** – Влияние смесей пептидов на продукцию интерферона- $\gamma$  спленоцитами мышей

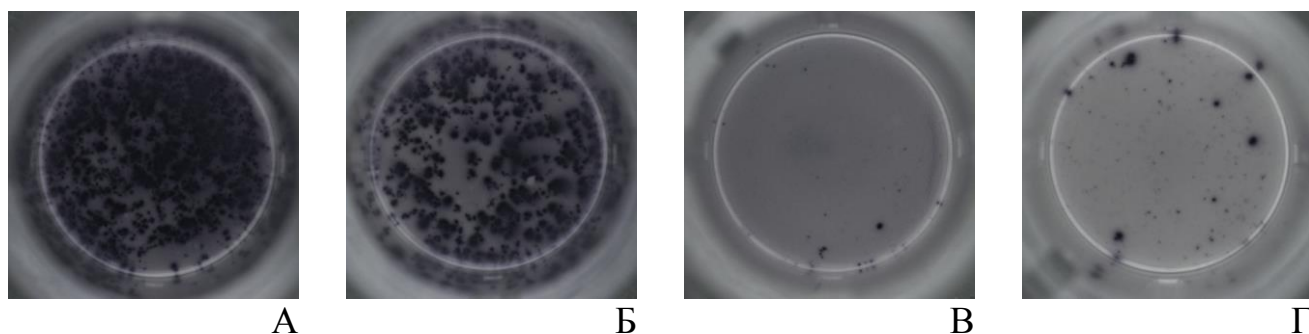
Группа	Количество продуцирующих интерферон- $\gamma$ спленоцитов при воздействии <i>in vitro</i> пептидов							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль	6 $\pm$ 2	5 $\pm$ 4	7 $\pm$ 4	7 $\pm$ 4	6 $\pm$ 4	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2
Poly(I:C)	24 $\pm$ 10	27 $\pm$ 13	4 $\pm$ 3	31 $\pm$ 13	50 $\pm$ 13	4 $\pm$ 2	33 $\pm$ 8	27 $\pm$ 12
Пептиды 1	23 $\pm$ 5	–	–	12 $\pm$ 5	–	–	–	–
Пептиды 2	–	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 3	–	–	–	–	–
Пептиды 3	–	3 $\pm$ 3	15 $\pm$ 13	–	–	–	–	–
Пептиды 4	2 $\pm$ 1	–	–	19 $\pm$ 5	–	–	–	–
Пептиды 5	–	–	–	–	7 $\pm$ 6	3 $\pm$ 2	–	–
Пептиды 6	–	–	–	–	1 $\pm$ 0	10 $\pm$ 9	–	–
Пептиды 7	–	–	–	–	–	–	41 $\pm$ 16	3 $\pm$ 2
Пептиды 8	–	–	–	–	–	–	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2



Пептиды 1 + Poly(I:C)	<b>405±100</b>	–	–	56±12	–	–	–	–
Пептиды 2 + Poly(I:C)	–	<b>359±32</b>	4±4	–	–	–	–	–
Пептиды 3 + Poly(I:C)	–	31±8	<b>386±37</b>	–	–	–	–	–
Пептиды 4 + Poly(I:C)	34±8	–	–	<b>396±62</b>	–	–	–	–
Пептиды 5 + Poly(I:C)	–	–	–	–	<b>325±56</b>	2±1	–	–
Пептиды 6 + Poly(I:C)	–	–	–	–	47±21	<b>341±53</b>	–	–
Пептиды 7 + Poly(I:C)	–	–	–	–	–	–	<b>394±65</b>	23±5
Пептиды 8 + Poly(I:C)	–	–	–	–	–	–	47±16	<b>438±36</b>

В спленоцитах мышей из групп, иммунизированных моделями вакцины без адьюванта, пептиды *in vitro* не вызывали стимуляции продукции интерферона- $\gamma$ , кроме модели «пептиды 7», которая обладала слабой иммуногенностью.

В спленоцитах мышей, ранее иммунизированных пептидами с адьювантом, в ответ на *in vitro* стимуляцию пептидами, входившими в состав модельной вакцины, увеличивалось количество интерферон- $\gamma$ -продуцирующих клеток селезенки мышей, все модели вакцины обладали высокой иммуногенностью, количество точек превышало 200. Тогда как при добавлении в лунки с клетками этих мышей пептидов из других групп, не входивших в состав модельной вакцины, количество интерферон- $\gamma$ -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) и средней иммуногенности (пептиды 4) (Таблица 5, Рисунок 5).



**Рисунок 5** – Продукция интерферона- $\gamma$  спленоцитами мышей, ранее иммунизированных пептидами с адьювантом, после стимуляции пептидами *in vitro*: А, Б – стимуляция пептидами, входившими в состав модели вакцины; В, Г – стимуляция пептидами, не входившими в состав модели вакцины

Таким образом, показано, что 2-кратная иммунизация мышей смесями пептидов в сочетании с адьювантом Poly(I:C) вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа.

### 3.1.2. Оценка противоопухолевой эффективности моделей вакцины из нескольких неоантигенных пептидов

Противоопухолевый эффект моделей вакцины и адьюванта после 2-кратной вакцинации оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжения жизни в опытных группах по сравнению с нелеченой контрольной группой, результаты представлены в таблице 6.

**Таблица 6** – 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

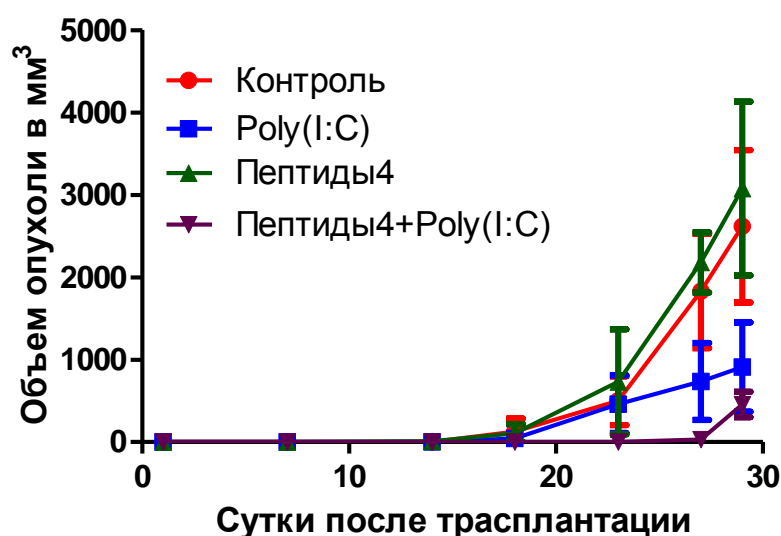
Продолжение таблицы 6

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* 2 из 5 мышей прожили более 90 дней
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 адьюванта, так и с Poly(I:C), возможно, это было связано с низкой растворимостью некоторых пептидов в физрастворе, что могло приводить к снижению их биодоступности.

На рисунках 6 – 10 представлены графики роста опухолей в группах, в которых пептиды отдельно или с адьювантом вызывали торможение роста опухоли.



**Рисунок 6** – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 2-кратно Poly(I:C), пептиды 4 и пептиды 4 с Poly(I:C)

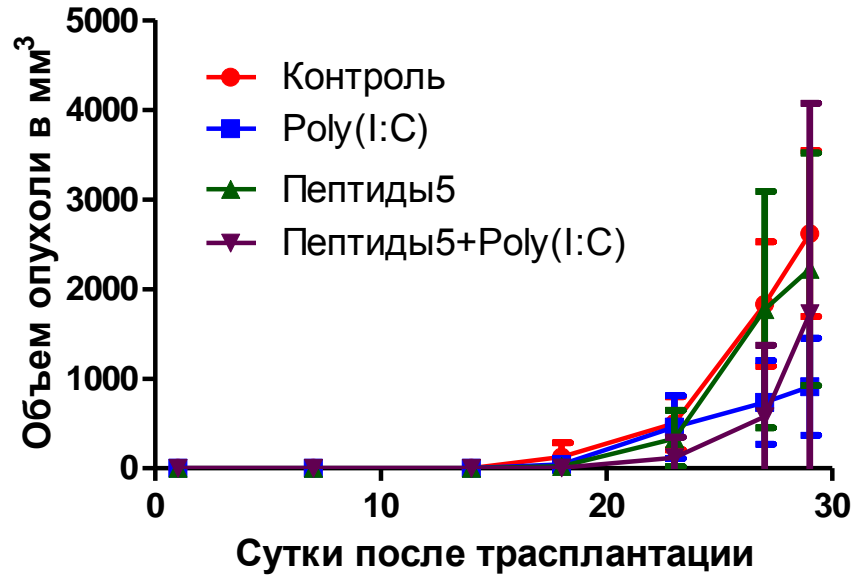


Рисунок 7 – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 2-кратно Poly(I:C), пептиды 5 и пептиды 5 с Poly(I:C)

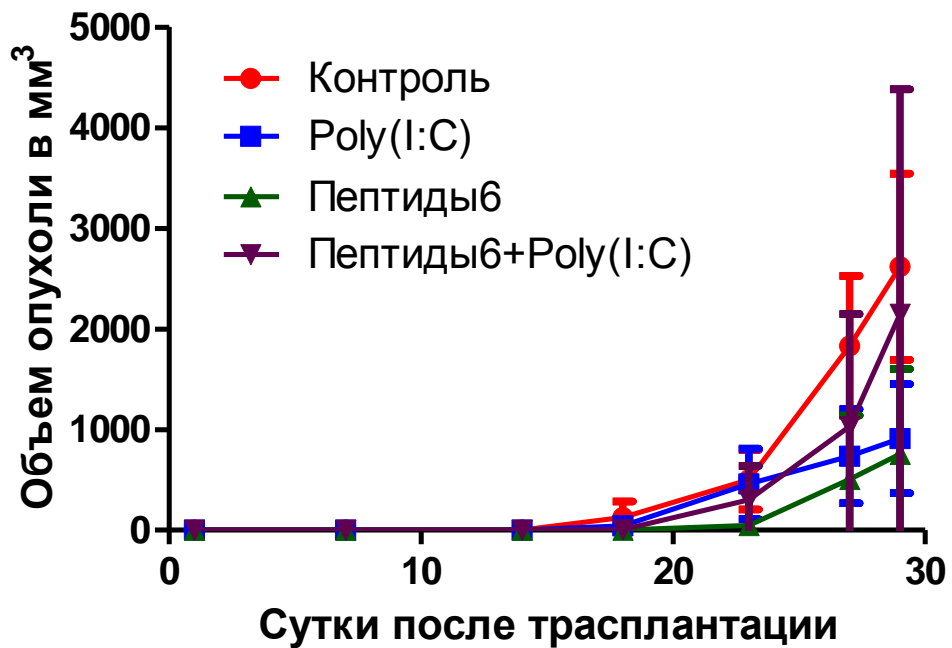
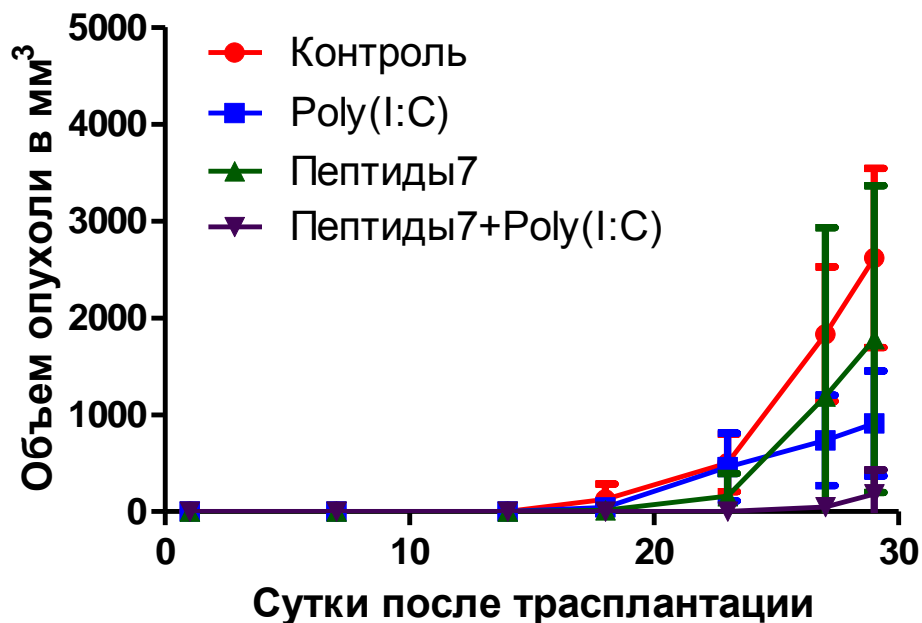
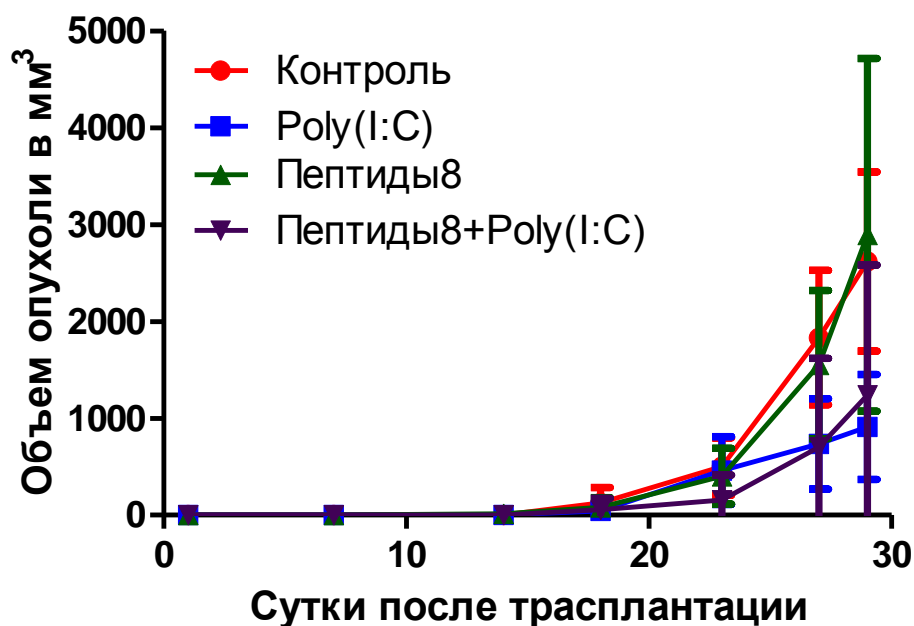


Рисунок 8 – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 2-кратно Poly(I:C), пептиды 6 и пептиды 6 с Poly(I:C)



**Рисунок 9** – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 2-кратно Poly(I:C), пептиды 7 и пептиды 7 с Poly(I:C)



**Рисунок 10** – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 2-кратно Poly(I:C), пептиды 8 и пептиды 8 с Poly(I:C)

Эффект смесей пептидов значительно усиливался при использовании адьюванта Poly(I:C), самого по себе обладающего противоопухолевой активностью, но менее выраженной, чем при комбинации с пептидами.

Только смесь пептидов 6 без адьюванта вызывала более выраженное торможение роста опухолей, чем при применении с Poly(I:C) или одного адьюванта, но статистически эти данные были незначимы; 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 адьювантом 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 адьюванта, в отличие от смесей других пептидов без адьювантов, пептиды 7 увеличивали продолжительность жизни мышей на 58% при 2-кратной иммунизации.

Для смесей пептидов 4, 7 и 8 с адьювантом и без адьюванта оценили противоопухолевый эффект 4-кратной иммунизации мышей-самок C57Bl/6 весом 20-22 г. В каждой группе было по 5 мышей. Иммунизация проводилась в 0 и 7, 14 и 21 дни. На 12 день после первой инъекции мышам в правый бок перевивали по 75 тыс. клеток/мышь меланомы B16-F10 в 500 мкл среды RPMI-1640.

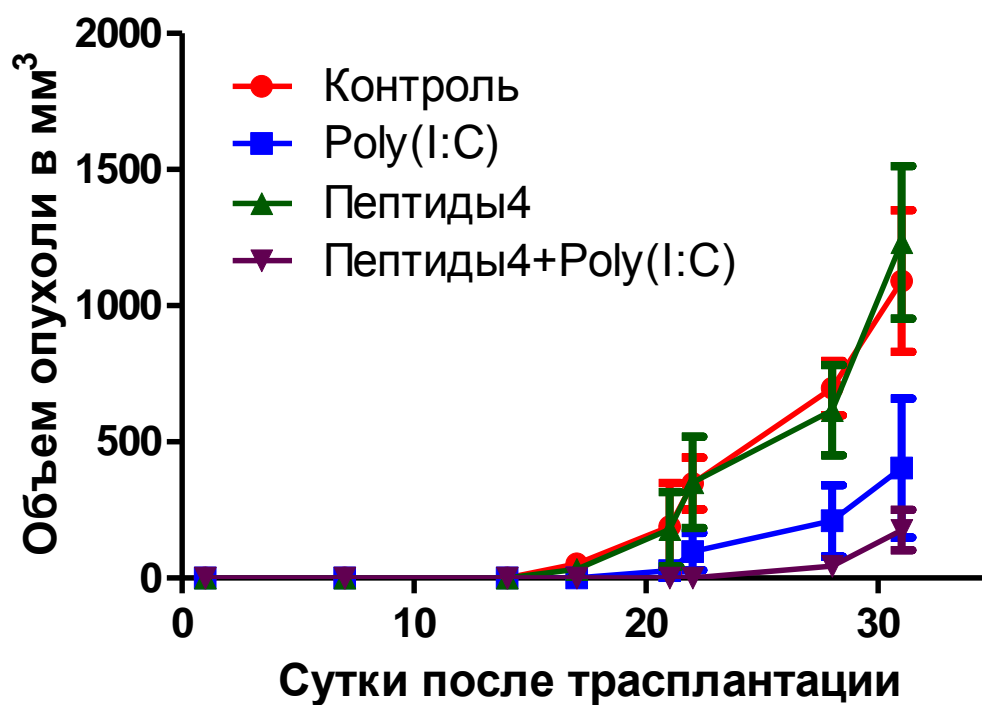
Четырехкратная иммунизация увеличила процент торможения роста опухолей по сравнению с двукратной во всех группах (Таблица 7 и Рисунки 11-13).

В двух группах «пептиды7+адьювант», «пептиды8+адьювант» при 4-кратной иммунизации возрос показатель увеличения продолжительности жизни (100% и 97%) по сравнению с 2-кратной иммунизацией (67% и 67%) (Таблицы 6 и 7). У 2 мышей, иммунизированных смесью «пептиды7 + адьювант» не развились опухоли, а в группе «пептиды 8 + адьювант» такой эффект наблюдали у 1 мыши.

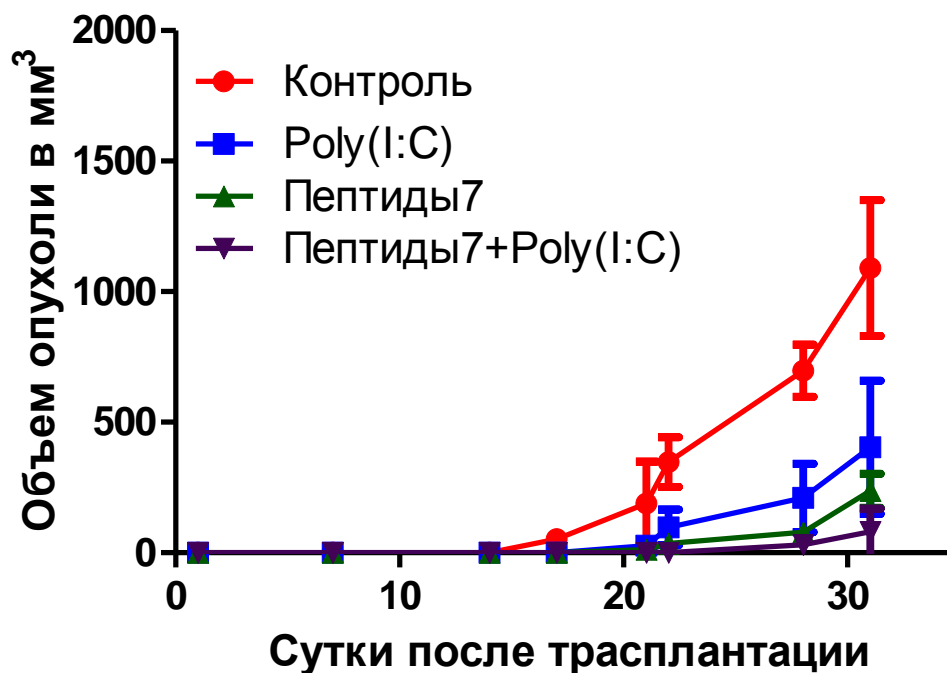
**Таблица 7** – Противоопухолевый эффект моделей пептидной вакцины с Poly(I:C) и без адьюванта при 4-кратной вакцинации

Группа	ТРО, %					УПЖ, %
	17 сут	21 сут	24 сут	28 сут	31 сут	
Poly(I:C)	100*	85*	72	70	63	20
Пептиды4	38	5	0	12	0	3
Пептиды7	100*	93*	90*	89	78	43
Пептиды8	100*	76*	71	69	69	20
Пептиды4+ Poly(I:C)	100*	100*	100*	94*	84*	57*
Пептиды7+ Poly(I:C)	100*	100*	100*	96*	93*	100* 2 из 5 мышей прожили более 90 дней
Пептиды8+ Poly(I:C)	100*	100*	100*	95*	88*	97* 1 из 5 мышей прожила более 90 дней

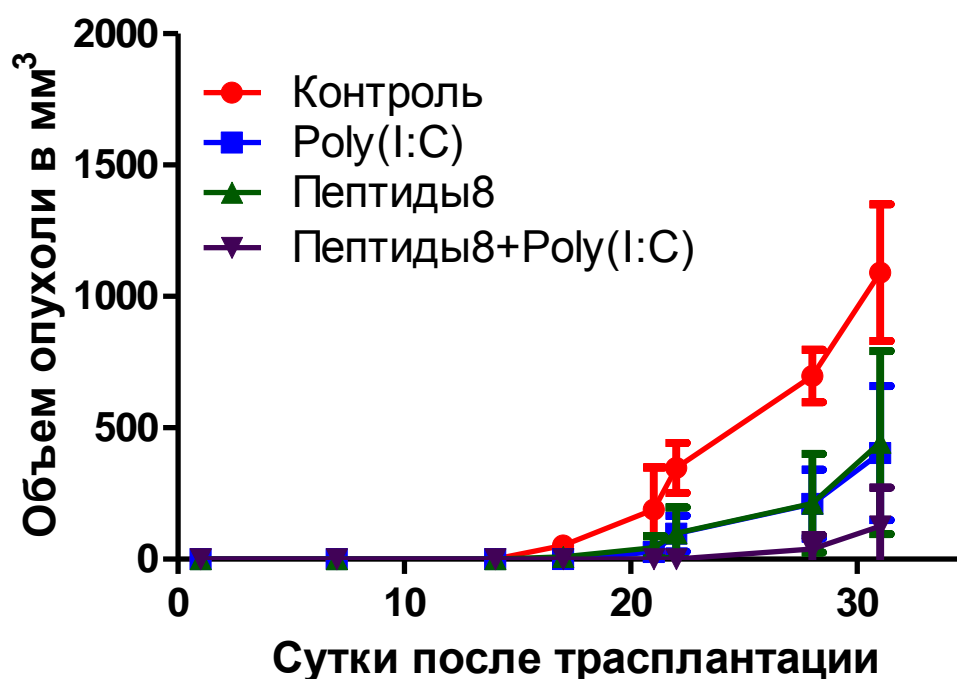
\* $p < 0,05$  по отношению к контролю



**Рисунок 11** – 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)



**Рисунок 12** – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 4-кратно Poly(I:C), пептиды 7 и пептиды 7 с Poly(I:C)



**Рисунок 13** – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 4-кратно Poly(I:C), пептиды 8 и пептиды 8 с Poly(I:C)



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

### **3.2. Оценка влияния адьюванта Poly(I:C) на иммунофенотип клеток селезенки мышей**

Чтобы лучше понимать иммунные процессы, происходящие при феномене торможения роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C), мы изучили изменения иммунофенотипа клеток селезенки мышей. Для этого 22 мышей-самок C57Bl/6 весом 20-22 г разделили на 4 группы:

группа 1 – контроль – интактные мыши (n=6);

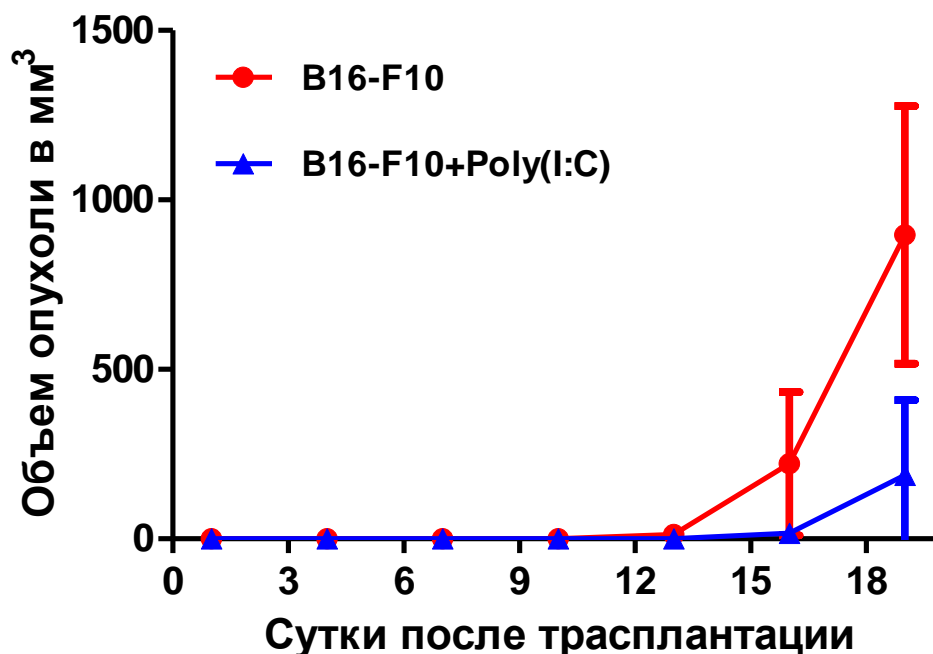
группа 2 – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10 (n=5);

группа 3 – мыши без опухоли, которые получили Poly(I:C) подкожно в дозе 50 мкг в 300 мкл физиологического раствора 6-кратно с интервалом 3 сут (n=5);

группа 4 – мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, которые получали Poly(I:C) подкожно в дозе 50 мкг в 300 мкл физиологического раствора 6-кратно с интервалом 3 сут, первое введение Poly(I:C) было на 1 сутки после перевивки опухоли (n=6).

Мышам в группах 2 и 4 перевивали меланому B16-F10 подкожно по 75 тыс. клеток/мышь. 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 остальных имели объем не более  $0,5 \text{ см}^3$ , тогда как у мышей в группе 2 опухоли достигали объема  $1 \text{ см}^3$  (Рисунок 14).



**Рисунок 14** – Рост меланомы у мышей в группах 2 (B16-F10 без препарата) и 4 (B16-F10 с Poly(I:C))

Оценивали такие иммунологические параметры как количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и иммунорегуляторный индекс CD4 /CD8 [128]. Помимо этого, оценивали состояние дифференцировки CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, определяемое экспрессией CD44 и CD62L. Наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки (T<sub>n</sub>) обладают фенотипом CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup>. После инфицирования или иммунизации на антиген-активированных CD8<sup>+</sup> Т-клетках повышается экспрессии CD44 и теряется CD62L, и эти клетки становятся эффекторными Т-клетками (T<sub>eff</sub>). После разрешения инфекции популяция клеток CD8 T<sub>eff</sub> сокращается, начинают формироваться популяции клеток памяти. CD8<sup>+</sup> Т-клетки часто определяют как Т-клетки центральной памяти (T<sub>cm</sub>) CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> и Т-клетки эффекторной памяти (T<sub>em</sub>) CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup>. Для CD4<sup>+</sup> Т-клеток состояние дифференцировки определяется схожим образом, но с помощью проточной цитометрии отчетливо выделяются только две популяции это T<sub>n</sub> и T<sub>em</sub> [41]. Также оценивали экспрессию CD69, являющегося ранним маркером активации лимфоцитов из-за его быстрого появления на поверхности плазматической мембраны после стимуляции [36]. Отмечено, что CD69 связан с ингибированием

противоопухолевого иммунного надзора [55]. Возможно, вклад в этот процесс также вносит экспрессия CD69 на CD4+ Т-клетках, обладающих регуляторными функциями [74]. Еще один маркер, экспрессию которого оценивали на данном этапе работы – НКp46 (CD335), принадлежащий к семейству рецепторов естественной цитотоксичности. Его экспрессия ограничена НК-клетками и субпопуляцией НКТ-клеток. НКp46 считается одним из маркеров НК-клеток мыши [188]. Также изучали экспрессию маркера Т-клеток CD3 [41], и экспрессию CD19, являющегося членом суперсемейства Ig. CD19 экспрессируется на предшественниках и зрелых В-клетках, является маркером В-клеток у мышей. Плазматические клетки не экспрессируют CD19.

В таблице 8 представлены результаты иммунофенотипирования спленоцитов мышей C57BL/6.

**Таблица 8** – 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)
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)

Продолжение таблицы 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 ( $p < 0,05$ ).

При изучении влияния опухолевой нагрузки клетками меланомы B16-F10, а также 6-кратного введения адъюванта Poly(I:C) в сочетании с опухолевой нагрузкой и без нее на иммунофенотип спленоцитов мышей выявлен ряд отличий, которые оказались статистически значимы. В группе 4 мышей с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), 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). Можно предположить, что 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)). Вероятно, иммуноактивирующее влияние Poly (I:C) ослабевает под воздействием опухоли, но так как опухолевая нагрузка меньше в группе 4, то и показатели становятся ближе к нормальным. Обнаружен необычный результат – общее количество CD3+ клеток и количество наивных T-клеток CD4+ и CD8+ в группе с меланомой B16-F10, получавших Poly(I:C), выше по сравнению с остальными тремя группами, что может дать преимущество в борьбе иммунитета против T-зависимых опухолей, иммунный надзор за которыми в большей степени осуществляется T-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. Изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей в основном связаны с наличием опухоли и ее размерами. Также обнаружено, что на иммунофенотип спленоцитов оказывает влияние многократное введение Poly(I:C) во время роста опухоли.

### **3.3. Оценка иммуногенности отдельных синтетических неоантигенных пептидов**

Для оценки вклада каждого пептида в эффективность моделей вакцин, и выбора наиболее эффективных пептидов для создания оптимальной модели вакцины, было исследовано влияние 4-кратной иммунизации каждым индивидуальным пептидом с адьювантом на активацию Т-клеточного иммунитета по изменению продукции интерферона- $\gamma$  спленоцитами мышей, а также на изменение уровня сывороточных цитокинов интерферона-  $\gamma$  и интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-10.

Исследование проводили на мышах-самцах C57Bl/6 с массой тела 20-22 г, мышей разделили на группы, в каждой было по 5 животных. Иммунизацию проводили в 0 и 7, 14 и 21 дни. Исследуемый пептид вводили подкожно (в складку кожи на левом боку мыши, по направлению к передней лапке, адьювант Poly(I:C) (50 мкг/мышь в 200 мкл физраствора) вводили подкожно в тоже самое место за 5 минут до введения пептидов. Из-за небольших количеств некоторых синтезированных образцов пептидов, на данном этапе исследования удалось оценить эффективность 34 пептидов

При анализе результатов ELISpot иммуногенность пептидов оценивали по количеству клеток, продуцирующих интерферон- $\gamma$  (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 [2].

В таблице 9 и на рисунках 15 – 18 показано, что из 34 исследованных пептидов 21 обладали сильной иммуногенностью, 6 пептидов обладали средней

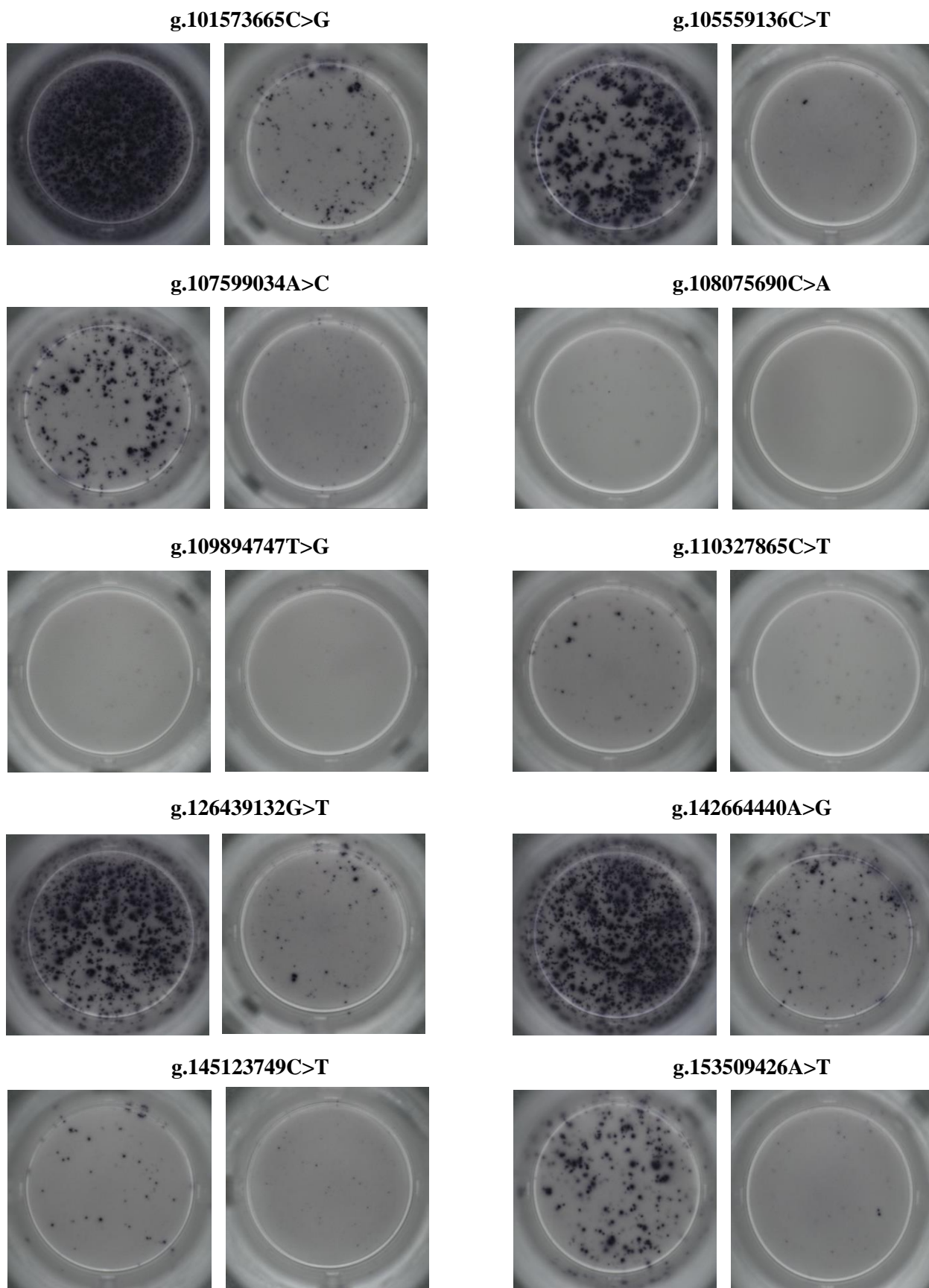
иммуногенностью, у 7 пептидов иммуногенность отсутствовала. У 8 пептидов из 21 с сильной иммуногенностью и у 1 пептида из 6 со средней иммуногенностью наблюдали неспецифическую стимуляцию продукции интерферона-  $\gamma$  в спленоцитах неиммунизированных животных.

**Таблица 9** – Влияние пептидов на продукцию INF- $\gamma$  спленоцитами иммунизированных мышей

№	Название пептида	Количество INF- $\gamma$ -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

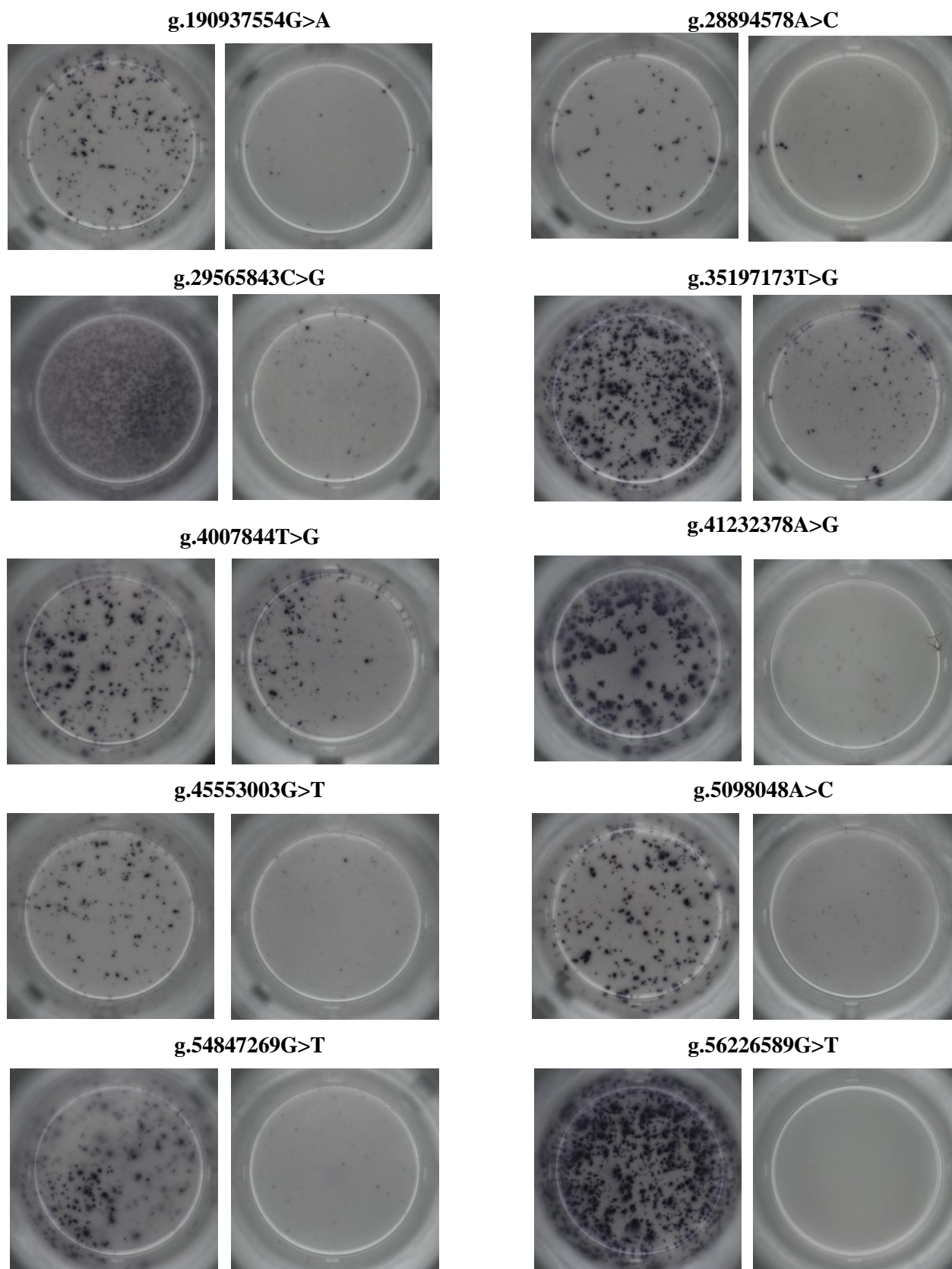
Продолжение таблицы 9

17	g.45553003G>T	102±2	8±3
18	g.5098048A>C	209±15	6±2
19	g.54847269G>T	132±14	6±2
20	g.56226589G>T	445±13	1±1
21	g.58476516A>C	19±8	8±4
22	g.60246193G>T	440±15	14±6
23	g.6393021C>G	426±9	4±2
24	g.64957410G>C	138±11	5±1
25	g.65813948T>A	414±16	13±2
26	g.66708664A>C	208±1	53±11
27	g.69027878G>A	5±1	3±1
28	g.69615465A>T	13±5	2±1
29	g.7163330C>T	338±7	6±3
30	g.77174891A>C	247±15	11±2
31	g.81419559T>A	372±16	18±4
32	g.93352588T>C	366±12	27±6
33	GFSQPLRRL	442±17	95±12
34	PSKPSFQE	272±29	96±22

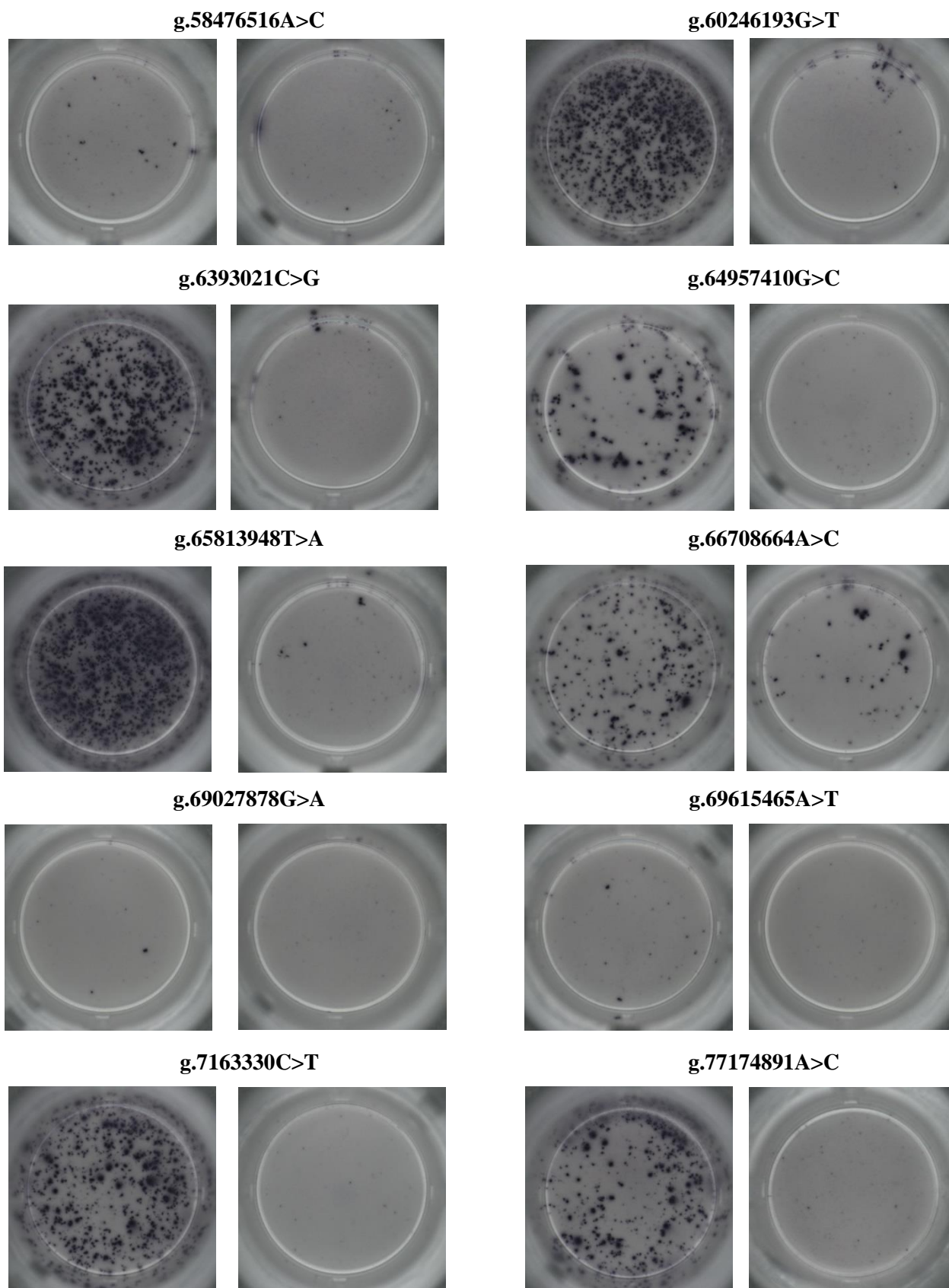


**Рисунок 15** – Интерферон- $\gamma$ -продуцирующие спленциты иммунизированных (фото справа) и неиммунизированных (фото слева) данным пептидом мышей (ELISpot), стимулированные пептидами g.101573665, g.105559136, g.107599034, g.108075690, g.109894747, g.110327865, g.126439132, g.142664440, g.145123749, g.153509426A>T

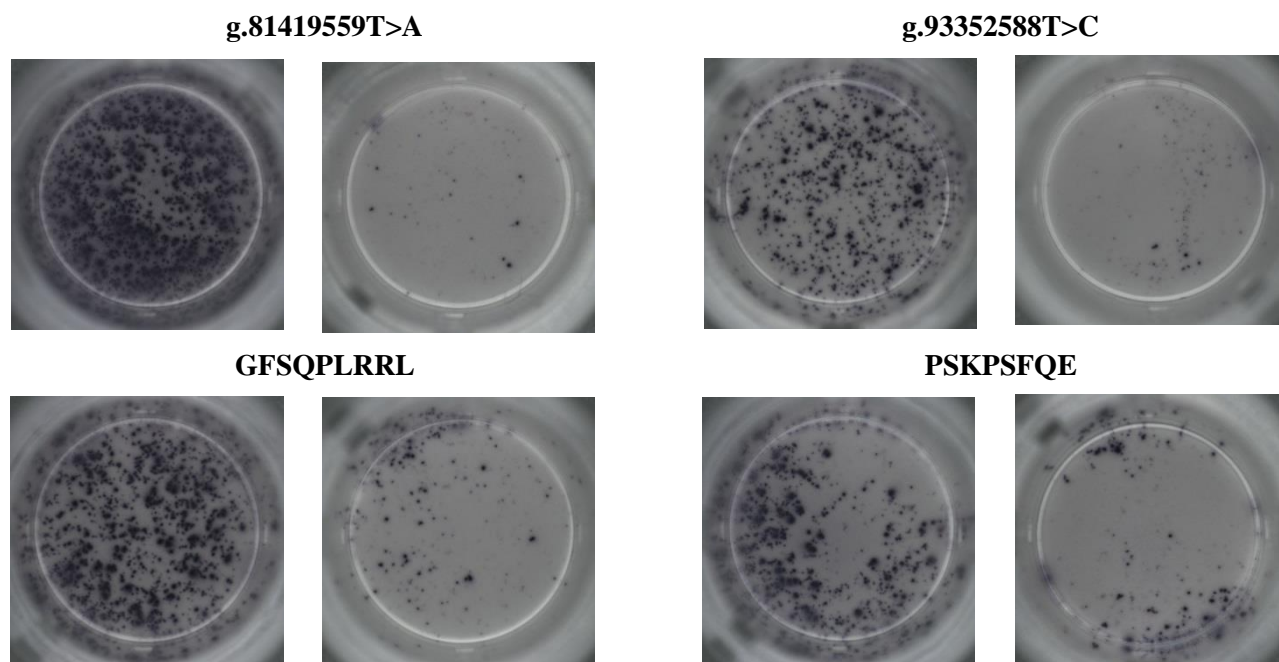




**Рисунок 16** – Интерферон  $\gamma$ -продуцирующие спленоциты иммунизированных (фото справа) и неиммунизированных (фото слева) данным пептидом мышей (ELISpot), стимулированные пептидами g.190937554, g.28894578, g.29565843, g.35197173, g.4007844, g.41232378, g.45553003, g.5098048, g.54847269, g.56226589



**Рисунок 17** – Интерферон  $\gamma$ -продуцирующие спленоциты иммунизированных (фото справа) и неиммунизированных (фото слева) данным пептидом мышей (ELISpot), стимулированные пептидами g.58476516, g.60246193, g.6393021, g.64957410, g.65813948, g.66708664, g.69027878, g.69615465, g.7163330, g.77174891



**Рисунок 18** – Интерферон  $\gamma$ -продуцирующие спленоциты иммунизированных (фото справа) и неиммунизированных (фото слева) данным пептидом мышей (ELISpot), стимулированные пептидами g.81419559, g.93352588, GFSQPLRRL, PSKPSFQE

В таблице 10 представлены результаты изменения уровня сывороточных цитокинов у иммунизированных мышей.

**Таблица 10** – Влияние пептидов на уровень цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей

№	Название пептида	Уровень цитокинов, пг/мл			
		Th1		Th2	
		INF- $\gamma$	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±3,9	<2	110,0±2,8	<30
7	g.126439132G>T	321,8±2,9	<2	212,3±4,5	<30
8	g.142664440A>G	<15	<2	<4	<30
9	g.145123749C>T	19,3±5,3	<2	10,9±1,8	<30
10	g.153509426A>T	<15	<2	<4	<30
11	g.190937554G>A	29,5±3,1	<2	23,1±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±3,8	2,9±0,1	8,5±1,9	114,8±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±1,8	<2	12,5±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±56,5	<2	660,4±13,7	<30
28	g.69615465A>T	664,0±28,2	<2	410,5±1,9	<30
29	g.7163330C>T	27,4±5,0	<2	<4	<30

## Продолжение таблицы 10

30	g.77174891A>C	<15	<2	<4	<30
31	g.81419559T>A	662,4±17,8	<2	383,2±4,9	<30
32	g.93352588T>C	18,9±4,9	<2	17,7±1,9	<30
33	GFSQPLRRL	76,8±6,3	<2	70,5±7,1	<30
34	PSKPSFQE	212±24,5	<2	146±5,3	<2

В контрольной группе и в группе, иммунизированной Poly (I:C), уровень всех сывороточных цитокинов был ниже значения оптической плотности нулевого калибратора.

В группах мышей, иммунизированных 12 пептидами, выявлено повышение уровня как INF- $\gamma$ , так и IL4, что определяет развитие иммунного ответа в направлении клеточной и гуморальной защиты соответственно. Отдельно INF- $\gamma$  был повышен только после иммунизации пептидом g.7163330C>T, а IL4 также только после иммунизации одним пептидом – g.108075690C>A. Иммунизация пептидом g.45553003G>T вызывала повышение уровня всех четырех исследованных цитокинов. Изменений уровня секреции цитокинов IL2, IL10 после иммунизации всеми остальными пептидами не отмечено.

Следует отметить, что продукция INF- $\gamma$  спленоцитами была выявлена при иммунизации 27 пептидами, а повышение цитокина INF- $\gamma$  в сыворотке крови – при иммунизации 14 пептидами. Причем, только у 9 пептидов обнаружена индукция продукции INF- $\gamma$  в спленоцитах и повышен уровень этого цитокина в сыворотке одновременно: g.105559136, g.126439132, g.190937554, g.45553003, g.7163330, g.81419559, g.93352588, GFSQPLRRL, PSKPSFQE

Также важным наблюдением является то, что иммуногенность пептидов не коррелировала с рейтингом, полученным в результате биоинформатического анализа (Таблица 2).

### 3.4. Противоопухолевый эффект иммуногенных синтетических неантигенных пептидов

Исходя из вышеописанных результатов, было принято решение 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 пептидов 7: g.190937554, g.7163330, PSKPSFQE. Пептид PSKPSFQE для этого исследования были синтезирован в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

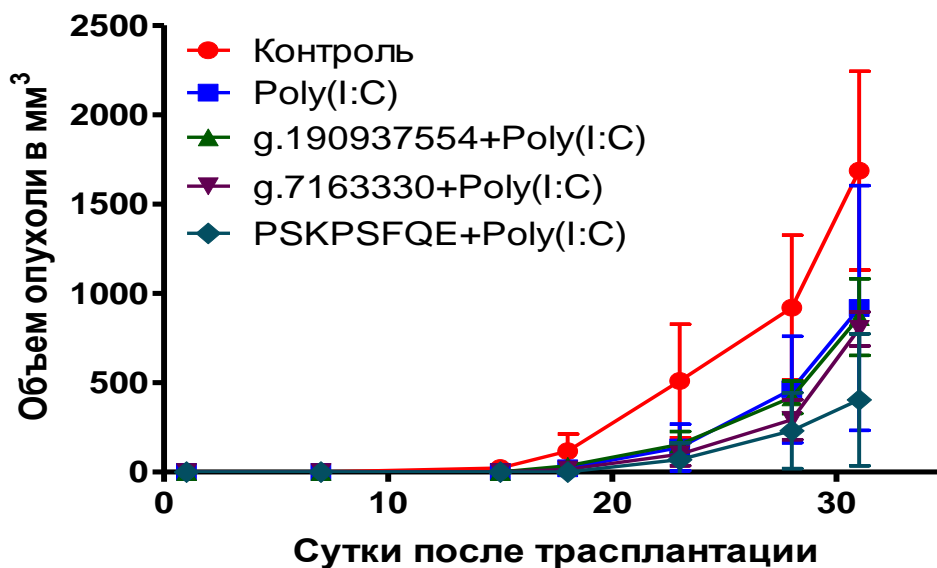
Мышей-самок линии C57Bl/6J весом 20-22 г разделили на группы: контроль (n=7); Poly(I:C) (n=6); g.190937554+Poly(I:C) (n=5), g.7163330+Poly(I:C) (n=5), PSKPSFQE+Poly(I:C) (n=5). Животных иммунизировали четырехкратно на 0, 7, 14 и 21 дни эксперимента. На 12 день от начала иммунизации мышам перевивали подкожно опухоль B16-F10 по 75 тыс. клеток на мышь.

Пептиды и Poly(I:C) вызывали торможение роста опухоли и увеличивали продолжительность жизни мышей (Таблица 11, Рисунок 19). Но при одиночном применении пептидов наблюдался меньший эффект, чем при использовании их в смеси пептиды 7.

**Таблица 11** – 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 (1 мышь прожила более 90 дней)

\*p<0,05 по отношению к контролю



**Рисунок 19** – Рост меланомы B16-F10 у мышей в контрольной группе и в группах, получавших 4-кратно Poly(I:C), пептиды g.190937554, g.7163330 и PSKPSFQE с Poly(I:C)

Таким образом, можно заключить, 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 меланомы B16-F10, и для эффективного противоопухолевого ответа необходимо нацеливание на все мутантные неоантигены, обнаруженные в опухоли.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Применение терапевтических противоопухолевых персонализированных неоантигенных вакцин – перспективный подход к лечению злокачественных новообразований, который использует иммунную систему для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. В нашей работе мы исследовали иммуногенность и противоопухолевую эффективность 43 синтетических неоантигенных пептидов к мутантным эпитопам мышинной меланомы B16-F10, синтезированных для создания прототипа модели персонализированной неоантигенной противоопухолевой вакцины [4].

Для получения пептидов, являющихся объектом исследования данной диссертационной работы, было проведено полноэкзомное секвенирование меланомы B16-F10, выращенной в мышах C57Bl/6, и нормальной ткани этих мышей. Для поиска мутаций в образцах опухоли использовались две различные программы – GATK Mutect2 и Strelka, и для дальнейшей работы использовали только мутации, предсказанные обеими программами [4, 162, 37].

В работе [111] было показано, что в меланоме B16-F10 тремя различными алгоритмами поиска соматических мутаций (GATK, SAMtools and SomaticSNiPer) было обнаружено 5338, 8672 и 8220 соответственно, мутаций в экзонах. При этом всеми тремя алгоритмами одновременно было найдено 33% мутаций. В другой статье тех же авторов [29] при анализе двух реплик меланомы B16-F10 тремя различными алгоритмами поиска соматических мутаций (GATK, SAMtools and SomaticSNiPer) было выявлено 908 соматических мутаций. По-видимому, такие различия объясняются быстрым накоплением новых мутаций в опухоли или высокой гетерогенностью опухолевой ткани [4].

Для выбора пептидов, используемых в нашем исследовании, был проведен поиск соматических мутаций, которые присутствуют только в образцах опухолей и не найдены в образцах нормальной ткани, при этом гены, несущие данные мутации, экспрессируются в образцах опухоли [4].

Для предсказания пептидов использовались мутации типа миссенс и фреймшифт. Транскриптомные данные использовались для определения, что



мутированные аллели экспрессируются в опухолях. С помощью пайплайна *vaxrank* были предсказаны пептиды длиной 25-27 аа, которые впоследствии были проранжированы по внутренней метрике. Предсказание выполнялось отдельно для каждого из экспериментальных образцов, а затем полученные наборы пептидов были объединены. Из всего получившегося набора пептидов для последующего исследования были выделены пептиды, обладающие максимальным рейтингом иммуногенности, определяемой через аффинность к МНС I. Для них также представлены параметры синтезируемости и растворимости. Соответствующие мутации были подтверждены методом прямого секвенса по Сэнгеру [4].

На первом этапе работы мы изучили иммуногенность и противоопухолевую эффективность 2-кратной иммунизации мышей C57Bl/6 несколькими моделями вакцины, каждая из которых содержала смесь 5 или 6 пептидов, и показали, что иммунизация мышей моделями вакцины, содержащими смеси пептидов с адьювантом Poly(I:C) вызывала стимуляцию клеточного иммунного ответа, выражающуюся в увеличении количества интерферон- $\gamma$ -продуцирующих клеток селезенки. Методом ELISpot показана специфическая стимуляция продукции интерферона- $\gamma$  в спленоцитах мышей, ранее иммунизированных смесями пептидов с адьювантом, данный эффект наблюдали для всех 8 моделей вакцины (таблица 5). Однако, далее оказалось, что не во всех случаях наблюдаемая стимуляция клеточного иммунитета приводила к развитию противоопухолевого ответа (таблица 6).

В качестве адьюванта для усиления эффективности моделей вакцины после изучения литературных данных был выбран Poly(I:C) [30]. Адьюванты являются важными компонентами, обеспечивающим эффективность противоопухолевых вакцин. Poly(I:C) – полирибоинозиновая-полирибоцитидиловая кислота (Polyriboinosinic – polyribocytidylic acid), синтетический имитатор полимеров вирусной двуцепочечной РНК, относится к адьювантам, которые усиливают иммуногенность вакцинных антигенов за счет стимуляции врожденного

иммунного ответа, что приводит к развитию адаптивного иммунного ответа против опухоли.

В литературе достаточно подробно описан феномен торможения роста меланомы мышей B16 под воздействием Poly(I:C) [8, 168]. В нашем исследовании мы также наблюдали торможение роста опухоли как при 2-кратной, так и при 4-кратной иммунизации мышей. Известно, что на опухолевых клетках меланомы B16 слабо экспрессируется молекула МНС класса I [164], поэтому предполагалось, что вклад Т-клеток в замедление роста опухоли под влиянием Poly(I:C) не очень существенный [8]. В то же время значителен вклад НК-клеток, связанный как с цитотоксической активностью НК-клеток [8], так и с выработкой НК-клетками интерферона-гамма, который оказался способен напрямую ингибировать пролиферацию клеток меланомы B16 [168].

В нашем исследовании мы подтвердили, что Poly(I:C) является адьювантом с высокой иммуногенностью, он неспецифически стимулировал продукцию интерферона-гамма спленоцитами мышей *in vitro* во всех исследованных группах. Чтобы лучше понимать иммунные процессы, происходящие при феномене торможения роста меланомы B16-F10 под воздействием Poly(I:C), мы изучили изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей. Кроме того, мы изучили воздействие опухолевой нагрузки на иммунофенотип клеток селезенки.

При сравнении иммунофенотипа спленоцитов мышей контрольной группы, не получавших никакого воздействия, и группы с подкожно перевитой меланомой B16-F10, обнаружены отличия. Количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток было значимо снижено в группе с меланомой, при этом также был понижен иммунорегуляторный индекс, что встречается при хронической антигенной стимуляции [28], но различие не статистически значимо. Отмечено значимое повышение субпопуляции CD69-положительных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в группе с меланомой по сравнению с контролем. В литературе есть данные о повышении количества CD69-положительных CD4<sup>+</sup> Т-клеток у мышей с опухолью B16 и отмечается, что это связано с иммуносупрессией [74]. В группе с B16-F10 нами отмечено значимое снижение количества наивных CD44<sup>-</sup> CD62L<sup>+</sup> Т-клеток CD4<sup>+</sup>

и CD8<sup>+</sup> по сравнению с контролем, что также может свидетельствовать о хронической антигенной стимуляции. Также в группе с опухолью мы видим значимое повышение количества CD19<sup>+</sup> В-клеток по сравнению с контролем. По данным литературы не было отмечено значимой разницы для CD19<sup>+</sup> В-клеток в селезенке здоровых мышей и с меланомой B16 [90]. Возможно, расхождение наших данных с литературными связано с отличиями в количестве перевиваемых опухолевых клеток. В работе [90] отмечено значимое снижение CD3<sup>+</sup> клеток в селезенке мышей с опухолью. Нами также отмечено снижение количества CD3<sup>+</sup> клеток в группе с опухолью по сравнению с контролем, но данное снижение не было статистически значимым. По данным литературы количество NK-клеток в селезенке мышей после введения меланомы B16 меняется с течением времени. Paul S. и соавт. обнаружили увеличение субпопуляции NK-клеток в селезенке на 5-й день после введения B16 по сравнению с селезенкой интактной мыши и возвращение к исходным уровням, как и в селезенке интактной мыши на 13-й день [141]. Нами обнаружено статистически значимое снижение количества NK-клеток в селезенке мышей с выраженной опухолью. Isvoranu G. и соавт. также отметили существенное снижение количества NK-клеток в селезенке мышей с меланомой B16 [83].

При сравнении иммунофенотипа спленоцитов контрольной группы и группы без опухоли, получавшей Poly(I:C), показано отсутствие значимых различий для количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и показателя CD4/CD8, при этом отмечается незначительное снижение иммунорегуляторного индекса после введения препарата (см. таблицу. 8). Мы отметили статистически значимое повышение количества CD69-положительных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в группе без опухоли, получавшей Poly(I:C), по сравнению с контролем. Из литературы известно о способности Poly(I:C) индуцировать экспрессию CD69 на поверхности CD4<sup>+</sup> Т-клеток [145]. Нами отмечено значимое повышение количества клеток CD4<sup>+</sup> T<sub>em</sub> и CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> в группе, получавшей Poly(I:C), по сравнению с контролем. В литературе есть данные, что введение мышам Poly(I:C) через 12 часов приводит к снижению количества Т-клеток памяти в селезенке [15], но

через сутки или более показано, что Poly(I:C) стимулирует пролиферацию CD44+ CD8+ Т-клеток памяти [177]. Также есть данные, что через несколько дней процент CD8+ Т-клеток памяти в крови мышей начинает превышать значения нормы [103]. Нами не отмечено статистически значимых различий для параметров CD19 и CD3. При этом отмечено значимое снижение количества НК-клеток после воздействия Poly(I:C) по сравнению с контролем. Можно отметить, что количество НК-клеток в группе, получавшей (Poly(I:C)), оказалось ниже, чем во всех остальных группах.

Опираясь на сравнения изменений иммунофенотипа между контролем и группами с перевитой опухолью или без опухоли, но получавшей Poly(I:C), для некоторых из которых найдены подтверждения и обоснования в литературе, мы проанализировали результаты, полученные в группе, в которой мышам и переливали меланому и вводили Poly(I:C). Из данных, приведенных в таблице 8 можно увидеть, что медианы таких параметров, как CD4/CD8, количество CD69-положительных Т-клеток CD4+ и CD8+, CD19, NKp46 для этой группы находятся между значениями медиан контроля и группы с B16-F10. Это может свидетельствовать о торможении роста опухоли под воздействием адьюванта Poly(I:C). Вероятно, опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на иммунологические параметры.

Если сравнить показатели CD4/CD8, количество CD69-положительных Т-клеток CD4+ и CD8+, процент наивных Т-клеток от CD4+ и CD8+, то можно отметить, что в группе, получавшей Poly(I:C) без опухоли, они выше, чем в группе с B16-F10, не получавшей Poly(I:C). В связи с этим можно предположить, что Poly(I:C) оказывал более сильное влияние на активационный маркер CD69 по сравнению с воздействием, оказываемым опухолью. Но при этом не было такой антигенной стимуляции как в случае опухоли и процент наивных Т-клеток остался более высоким, чем в группе с опухолью B16-F10.

Для группы с меланомой, получавшей Poly (I:C), вычисленное значение иммунорегуляторного индекса CD4/CD8 находится между более высоким значением в группе Poly(I:C) без опухоли и более низким значением в группе

B16-F10 (без Poly(I:C)) (см. таблицу 8). Это может свидетельствовать о том, что меньший размер опухоли вызывает более слабую антигенную нагрузку и иммунорегуляторный индекс не понижается до значений группы B16-F10 за счет влияния Poly (I:C). В группе B16-F10 + Poly (I:C) количество CD19<sup>+</sup> В-клеток и CD69-положительных Т-клеток ниже, чем в группе Poly(I:C) и в группе B16-F10, но выше, чем в контроле. То есть данные значения ближе к нормальным, чем в группе с опухолью и в группе с Poly (I:C). Количество НК-клеток в группе B16-F10 + Poly (I:C), также оказалось ближе к контролю, чем в группе с опухолью и в группе с Poly (I:C). Такое приближение указанных выше параметров в группе B16-F10 + Poly (I:C) к значениям в контрольной группе можно объяснить тем, что иммуноактивирующее влияние Poly (I:C) ослабевает под воздействием опухоли, за счет чего, например, становится меньше CD69-положительных Т-клеток. Но так как опухолевая нагрузка слабее, то и показатели становятся ближе к нормальным. В то же время нами обнаружено, что в группе B16-F10 + Poly (I:C) общее количество CD3<sup>+</sup> клеток и количество наивных Т-клеток CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> оказалось выше, чем во всех остальных группах. Этот результат является достаточно необычным. Можно предположить, что повышение наивных Т-клеток под действием Poly(I:C) может дать преимущество в борьбе иммунитета против Т-зависимых опухолей, иммунный надзор за которыми в большей степени осуществляется Т-клетками. Например, имеются данные, что Poly(I:C) способствовал усилению местного Т-клеточного ответа на мышинной модели опухоли 4T1-Luc [59].

Таким образом, мы обнаружили, что изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей в основном связаны с наличием и размерами опухоли. Но в то же время, на иммунофенотип спленоцитов также оказывает влияние многократное введение Poly(I:C) во время роста опухоли.

На следующем этапе работы мы оценили иммуногенность каждого отдельного пептида в сочетании с Poly(I:C) у мышей без опухоли по стимуляции продукции интерферона- $\gamma$  спленоцитами и по изменению уровней сывороточных цитокинов Th1/Th2. По литературным данным, успех противоопухолевой

иммунотерапии часто зависит от критического баланса Т-хелперных иммунных ответов Th1 и Th2, управляемых антиген-презентирующими клетками [100]. Путь развития иммунного ответа Th1 приводит к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, уничтожающих опухолевые клетки. Также, Th1-лимфоциты могут убивать опухолевые клетки активируя цитокинами рецепторы смерти на поверхности опухолевых клеток. Th2-лимфоциты отвечают за развитие гуморального иммунного ответа [100].

Обнаружено, что 27 пептидов стимулировали продукцию интерферона- $\gamma$  в спленоцитах ранее иммунизированных животных, однако 8 из этих пептидов продемонстрировали неспецифическую стимуляцию продукции интерферона- $\gamma$  у неиммунизированных мышей, возможно, связанную с макрофагами селезенки. Для 12 пептидов показана стимуляция одновременно клеточного и гуморального путей развития иммунного ответа. Только 8 пептидов вызывали одновременно и увеличение продукции интерферона- $\gamma$  в спленоцитах и увеличение уровня этого цитокина в сыворотке крови иммунизированных мышей.

Иммуногенность пептидов не коррелировала с рейтингом, рассчитанным в результате биоинформатического анализа, предсказывающим связывание пептидов с МНС I. Пайплайн, который использовали для прогнозирования иммуногенности пептидов, находится в процессе усовершенствования, поэтому полученные в нашем исследовании данные важны для улучшения алгоритмов предсказания.

Наша работа перекликается с исследованием Castle, 2012, в котором изучали мутаном меланомы B16-F10. Из 962 мутаций, обнаруженных в B16-F10, Castle и соавт. были отобраны как потенциально иммуногенные 50 для иммунизации мышей. Мыши были иммунизированы пептидами или РНК-вакцинами. Пептидные последовательности были сконструированы таким образом, что содержали мутантный аминокислотный остаток в центре и по 13 остатков с обеих сторон. После иммунизации для 17 из 50 мутаций показали реактивность против мутантного варианта. Противоопухолевый эффект показали

только для двух пептидов, содержащих мутации *Tubb3* (G402A) и *Kif18b* (K739N).

В нашем исследовании также были спрогнозированы пептиды, совпадающие с описанными в статье Castle, но последовательности пептидов в нашей работе отличались тем, что содержали дополнительные аминокислотные остатки на одном из концов, а на другом конце у них, наоборот, отсутствовали некоторые остатки, обычно последовательности отличались 1-2 концевыми остатками [4]. Например, пептид с мутацией в гене *Pbk* почти полностью совпадает с пептидом из работы [30], кроме того, что не содержит двух остатков (DS) на N-конце, и, наоборот, содержит два остатка EK на C-конце. Интересно, что в работе [30] *Pbk* не вызывал иммунного ответа на уровне пептида, но проявлял иммуногенные свойства при введении в форме РНК, а в нашей работе пептид с мутацией *Pbk* – g.65813948T>A – вызывал значимое повышение продукции интерферона- $\gamma$  в спленоцитах иммунизированных им мышей (414 $\pm$ 16 точек).

Также в нашей работе были спрогнозированы пептиды, содержащие мутации в генах *Tubb3* и *Kif18b*, сходные с теми, которые в работе [30] показали противоопухолевый эффект. Эффективность пептида с мутацией *Tubb3* – g.123421534 – в нашей работе была изучена в составе смеси пептидов 3, показано, что в этой группе отсутствовал противоопухолевый эффект, в дальнейшие этапы исследования этот пептид не вошел из-за небольшого количества, связанного со сложностями синтеза.

Однако, пептид с мутацией *Kif18b* – PSKPSFQE– был эффективен в составе смесей пептидов 7, также показано, что он увеличивал продукцию интерферона- $\gamma$  в спленоцитах как ранее иммунизированных им мышей (272 $\pm$ 29 точки в ELISpot), так и в неиммунизированных спленоцитах (96 $\pm$ 22 точки), увеличивал уровень сывороточных цитокинов INF- $\gamma$  и IL-4. Кроме того, PSKPSFQE при одиночном использовании в сочетании с адьювантом обладал противоопухолевым эффектом, выражающимся в торможении роста опухоли и увеличении продолжительности жизни мышей на 45% (1 мышь из 5 в группе прожила более 90 дней).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка персонализированных вакцин, направленных на усиление распознавания иммунной системой мутантных опухолевых неоантигенов является одним из новых перспективных экспериментальных подходов к иммунотерапии злокачественных новообразований.

Неоантигены являются отличными мишенями для генерации и развития иммунных ответов, так как они специфичны только для опухоли и к ним не вырабатывается центральная толерантность.

Целью нашей работы стало изучение иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов, к мутантным эпитопам мышинной меланомы B16-F10, синтезированных для создания прототипа модели персонализированной неоантигенной противоопухолевой вакцины.

В соответствии с поставленными задачами впервые разработан алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности вакцин, содержащих комбинации разных синтетических неоантигенных пептидов или один пептид. Подтверждена необходимость использования адъюванта для повышения иммуногенности пептидов. В результате проведенных исследований были выбраны несколько пептидов, которые обладали высокой иммуногенностью и противоопухолевым эффектом. Исследованы и выявлены параметры иммунофенотипа клеток селезенки мышей, на которые влияет опухолевая нагрузка и/или введение адъюванта Poly(I:C). Доказана эффективность четырехкратной иммунизации по сравнению с двукратной. В заключительной части исследования было доказано, что модели вакцины, содержащие смесь нескольких пептидов в сочетании с адъювантом, обладают более выраженным противоопухолевым эффектом, чем вакцина, содержащая только один пептид.

Разработанные подходы к персонализированной вакцинотерапии опухолей, в дальнейшем могут быть использованы для создания персонализированных неоантигенных пептидных вакцин для терапии меланомы человека.



## ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм оценки иммуногенности и противоопухолевой эффективности моделей вакцины, состоящих из адъюванта 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 адъювантом Poly(I:C) вызывала специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа: количество интерферон- $\gamma$ -продуцирующих спленоцитов на лунку составило от  $325 \pm 56$  до  $438 \pm 36$ .

3. Четырехкратная иммунизация смесями «пептидов 4, 7, 8» с адъювантом 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. Адъювант Poly(I:C) обладает высокой иммуногенностью, стимулирует продукцию интерферона- $\gamma$  во всех группах мышей (до 200 – 400 интерферон- $\gamma$ -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 NK-клеток. В группе мышей с меланомой, получавшей Poly(I:C), наблюдали 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- $\gamma$ -продуцирующих спленоцитов у ранее иммунизированных мышей по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), 41% пептидов вызывали повышение уровней сывороточных цитокинов интерферона- $\gamma$  и интерлейкина-4, что свидетельствует о стимуляции клеточного и гуморального путей развития иммунного ответа. 24 % пептидов вызывали одновременно увеличение

количества интерферон- $\gamma$ -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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АПК – антиген-презентирующие клетки

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ (IL) – Интерлейкин

ИФН – Интерферон

ОАА – Опухлеассоциированные антигены

ОСА – Опухолеспецифические антигены

РНК – Рибонуклеиновая кислота

СПЖ – средняя продолжительность жизни животных

ТРО – торможение роста опухоли

ТЭС – телячьей эмбриональной сыворотки

УПЖ – Увеличение продолжительности жизни

CLRs – C-type lectin receptors

CTLA4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4)

DAMPs – danger-associated molecular patterns

ECD – эктодомен

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

ELISpot – Enzyme-Linked ImmunoSpot

HLA – Human Leukocyte Antigens (человеческие лейкоцитарные антигены, или система тканевой совместимости человека)

INF – interferon (интерферон)

IRF – interferon regulating factor (регуляторный фактор интерферонов)

MDA – melanoma differentiation-associated protein

MHC I – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

NGS – Next-Generation Sequencing (секвенирование нового поколения)

NLRs – nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns

PD-1 – Programmed cell death 1

Poly(I:C) – Polyriboinosinic – polyribocytidylic acid

PRRs – pattern recognition receptors

RLRs – retinoic acid-inducible gene-I-like receptors

TAP – transporter associated with antigen presentation

TCR – T-cell receptor (Т-клеточной рецептор)

Th – Т-хелперы

Tn – наивные Т-клетки

Tcm – Т-клетки центральной памяти

Teff – эффекторные Т-клетки

Tem – Т-клетки эффекторной памяти

TIR –Toll-interleukin receptor

TLR – Toll-like receptor (Толл-подобные рецепторы)

TNF – Tumor necrosis factor (Фактор некроза опухоли)

TRAF – Tumour Necrosis Factor-Receptor (рецептор фактора некроза опухолей)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Барышников, А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака / А.Ю. Барышников // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – Т. 112, № 2. – С. 59-63.
2. Барышникова, М.А. Адьюванты в вакцинотерапии опухолей / М.А. Барышникова, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. - 2018. – Т.17, № 4. - С. 36-44.
3. Барышникова, М.А. Неоантигены в иммунотерапии опухолей / М.А. Барышникова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т.17, № 2. – Р. 6–14.
4. Косоруков, В.С. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей / В.С. Косоруков, М.А. Барышникова, Е.Н. Кособокова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т.18, № 3. – С. 23–30.
5. Лебедева, Е.С. Вакцины для лечения злокачественных новообразований/ Е.С. Лебедева, Р.И. Атауллаханов, Р.М. Хаитов // Иммунология. – 2019. – Т.40, № 4. – С. 64–76.
6. Abelin, J.G. Defining HLA-II ligand processing and binding rules with mass spectrometry enhances cancer epitope prediction / J.G. Abelin, D. Harjanto, M. Malloy et al. // Immunity. - 2019. – Vol. 51, № 4 – P. 766–779.
7. Abelin, J.G. Mass spectrometry profiling of HLA-associated peptidomes in mono-allelic cells enables more accurate epitope prediction / J.G. Abelin, D.B. Keskin, S. Sarkizova et al. // Immunity. – 2017. – Vol. 46, № 2 - P. 315-326.
8. Akazawa, T. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells / T. Akazawa, T. Ebihara, M. Okuno et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. - Vol. 104, № 1. – P. 252-257.
9. Ali, M. Induction of neoantigen-reactive T cells from healthy donors / M. Ali, E. Giannakopoulou, M. Bösch et al. // Nature Protocols. – 2019. – Vol. 14, № 6. – P. 1926–1943.

10. Alspach, E. MHCII neoantigens shape tumour immunity and response to immunotherapy / E. Alspach, D.M. Lussier, A. P. Miceli et al. // *Nature*. - 2019. – Vol. 574, № 7780 - P. 696–701.
11. Ammi, R. Poly (I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs / R. Ammi, J. De Waele, Y. Willemen et al. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – Vol. 146. – P.120-131.
12. Aranda, F. Adjuvant combination and antigen targeting as a strategy to induce polyfunctional and high-avidity T-cell responses against poorly immunogenic tumors / F. Aranda, D. Llopiz, N. Diaz-Valdes et al. // *Cancer Research*. - 2011. – Vol. 71, № 9. – P. 3214–3224.
13. Awate, S. Mechanisms of action of adjuvants / S. Awate, L.A. Babiuk, G. Mutwiri // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – Vol.4. – P. 114.
14. Bagchi, S. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer: clinical impact and mechanisms of response and resistance / S. Bagchi, R. Yuan, E.G. Engleman // *Annual review of pathology*. – 2021. – Vol.16. – P. 223-249.
15. Bahl, K. Analysis of apoptosis of memory T cells and dendritic cells during the early stages of viral infection or exposure to toll-like receptor agonists / K. Bahl, A. Huebner, R. Davis, R. Welsh // *Journal of Virology*. - 2010. - Vol. 84, № 10. – P. 4866-4877.
16. Bakker, A. B. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes / A. B. Bakker, M. W. Schreurs, A. J. de Boer et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1994. – Vol. 179, № 3 – P. 1005–1009.
17. Balachandran, V. P. Identification of unique neoantigen qualities in long-term survivors of pancreatic cancer / V. P. Balachandran, M. Luksza, J.N. Zhao et al. // *Nature*. – 2017. - Vol.551, № 7681 – P. 512- 516.
18. Balkwill, F. Inflammation and cancer: back to Virchow? / F. Balkwill, Mantovani A. // *Lancet*. - 2001. – Vol. 357, № 9255 – P. 539–545.

19. Bell, J.K. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors / J.K. Bell, G.E.D. Mullen, C.A. Leifer et al. // *Trends Immunology*. – 2003. – Vol. 24, № 10. - P. 528–533.
20. Belnoue, E. Enhancing antitumor immune responses by optimized combinations of cell-penetrating peptide-based vaccines and adjuvants / E. Belnoue, W. Di Bernardino-Besson, H. Gaertner et al. // *Molecular Therapy* - 2016. – Vol. 24, № 9 - P. 1675-1685.
21. Bezu, L. Trial. Watch: peptide-based vaccines in anticancer therapy / L. Bezu, O. Kepp, G. Cerrato et al.. // *Oncoimmunology*. - 2018. – Vol. 7, № 12 - P. e1511506.
22. Black, A.P. Immune evasion during varicella zoster virus infection of keratinocytes / A.P. Black, L. Jones, G.N. Malavige, G.S. Ogg Clin // *Experimental Dermatology*. – 2009. – Vol.34, № 8. – P. 941–944.
23. Blander, J.M. Regulation of phagosome maturation by signals from Toll-like receptors / J.M. Blander, Medzhitov R. // *Science*. – 2004. – Vol.304, № 5673 - P. 1014–1018.
24. Blass, E. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines / E. Blass, P.A. Ott // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 18. – P. 215-229.
25. Bobisse, S. Neoantigen-based cancer immunotherapy / S. Bobisse, P.G. Foukas, G. Coukos, A. Harari // *Annals of Translational Medicine*. - 2016. – Vol.4, № 14. – P.262.
26. Brahmer, J. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small cell lung cancer / J. Brahmer, K.L. Reckamp, P.Baas, et al. // *New England Journal of Medicine*.- 2015. – Vol. 373, № 2 – P. 123–135.
27. Brown, S. D. Neo-antigens predicted by tumor genome meta-analysis correlate with increased patient survival / S. D. Brown, R. L. Warren, E. A. Gibb et al. // *Genome Research*. – 2014. – Vol. 24, № 5 – P. 743–750.
28. Caskey, M. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans / M. Caskey, F. Lefebvre, A. Filali-

Mouhim et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208, № 12. - P. 2357-2366.

29. Castle, J.C. Mutated tumor alleles are expressed according to their DNA frequency / J.C. Castle, M. Loewer, S. Boegel et al. // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 4743

30. Castle, J.C. Exploiting the mutanome for tumor vaccination / J. C. Castle, S. Kreiter, J. Diekmann et al. // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72, № 5 – P. 1081-1091.

31. Cella, M. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA / M. Cella, M. Salio, Y. Sakakibara, et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 1999. – Vol. 189, № 5 - P. 821–829.

32. Chang, M. H. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study / M. H. Chang, S. L. You, C. J. Chen // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2009. – Vol. 101, № 19. – P. 1348–1355.

33. Chen, S. Enhanced anti-tumor effects of HPV16E749–57-based vaccine by combined immunization with Poly(I:C) and oxygen-regulated protein 150 / S. Chen, R. Ou, J. Tang et al. // *Cancer Epidemiology*. - 2013. – Vol.37, № 2. – P. 172–178.

34. Cho, E.I. Toll-like receptor agonists as third signals for dendritic cell-tumor fusion vaccines / E.I. Cho, C. Tan, G.K. Koski et al. // *Head & Neck*. - 2010. – Vol. 32, № 6. – P.700–707.

35. Cho, H.I. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell / H.I. Cho, E. Celis // *Cancer Research*. - 2009. – Vol. 69, № 23. – P.9012 - 9019

36. Cibrian, D. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper / D. Cibrian, F. Sanchez-Madrid // *European Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 47, № 6. - P. 946–953.

37. Cibulskis, K. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples / K. Cibulskis, M.S. Lawrence, S.L. Carter et al. // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Vol. 31, № 3. – P. 213-219.



38. Clark, M. Performance comparison of exome DNA sequencing technologies / M. Clark, R. Chen, H. Lam et al. // *Nature Biotechnology*. – 2011. – Vol. 29, № 10 – P. 908–914.
39. Cohen C.J. Isolation of neoantigen-specific T-cells from tumor and peripheral lymphocytes / C.J. Cohen, J.J. Gartner, M. Horovitz-Fried et al. // *Journal of Clinical Investigation*. - 2015. – Vol. 125, № 10. – P. 3981–3991.
40. Cohen, R. Broad immunogenicity from GEN-009, a neoantigen vaccine using ATLASTM, an autologous immune assay, to identify immunogenic and inhibitory tumor neoantigens / R. Cohen, M. Johnson, P. Twardowski et al. // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 420.
41. Cossarizza, A. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition) / A. Cossarizza, H-D. Chang, A. Radbruch et al. // *European Journal of Immunology*. – 2019. – Vol. 49, № 10. – P. 1457-1973
42. Coulie, P.G. Tumour antigens recognized by T-lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy / P.G. Coulie, B.J. Van Den Eynde, P. Van Der Bruggen, T. Boon // *Nature Reviews Cancer*. - 2014. – Vol. 14, № 2 - P.135–146.
43. Cruz, F.M. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules / F.M. Cruz, J.D. Colbert, E. Merino et al. // *Annual Review of Immunology*. – 2017. – Vol. 35. – P. 149–176.
44. Dash, P. Quantifiable predictive features define epitope-specific T-cell receptor repertoires / P. Dash, A.J. Fiore-Gartland, T. Hertz et al. // *Nature*. - 2017. – Vol. 547, № 7661 - P. 89-93.
45. Davis, M. M. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition / M. M. Davis, P. J. Bjorkman // *Nature*. – 1988. – Vol. 334, № 6181 – P. 395–402.
46. De Bouteiller O. Recognition of double-stranded RNA by human Toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH / O. de Bouteiller , E. Merck, U.A. Hasan et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, № 46 – P. 38133–38145.

47. De Smet, C. Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene / C. De Smet, C. Lurquin, P. van der Bruggen et al. // *Immunogenetics*. - 1994. – Vol. 39, № 2. – P. 121–129.
48. Derouazi, M. Novel cell-penetrating peptide-based vaccine induces robust CD4+ and CD8+ T cell-mediated antitumor immunity / M. Derouazi, W. Di Bernardino-Besson, E. Belnoue et al. // *Cancer Research*. – 2015. - Vol.75, № 15. - P. 3020-3031.
49. Dhodapkar, M.V. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205 / M.V. Dhodapkar, M. Sznol, B. Zhao et al. // *Science Translational Medicine*. - 2014. – Vol. 6, № 23. – P. 232ra25.
50. Dillon, P. M. A pilot study of the immunogenicity of a 9-peptide breast cancer vaccine plus poly-ICLC in early stage breast cancer / P. M. Dillon, G. R. Petroni, M. E. Smolkin et al. // *Journal for Immunotherapy of Cancer*. – 2017. – Vol. 5, № 1 – P. 92.
51. Disis, M. L. Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer / M. L. Disis, D. R. Wallace, T. A. Goole et al. // *Journal of Clinical Oncology*. - 2009. – Vol. 27, № 28. – P. 4685–4692.
52. Domingos-Pereira, S. Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T- cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice / S. Domingos-Pereira, L. Decrausaz, L. Derre et al. // *Mucosal Immunology*. - 2013. – Vol. 6, № 2. – P. 393–404.
53. Duan, F. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity / F. Duan, J. Duitama, S. Al. Seesi et al. // *Journal of Experimental Medicine*. - 2014. – Vol. 211, № 11. – P.2231–2248.
54. Eisen, H.N. Promiscuous binding of extracellular peptides to cell surface class I MHC protein / H.N. Eisen, X.H. Hou, C. Shen et a.. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2012. – Vol. 109, № 12 - P. 4580-4585.

55. Esplugues, E. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69 / E. Esplugues, D. Sancho, J. Vega-Ramos et al. // *Journal of Experimental Medicine*. - 2003. – Vol. 197, № 9. – P. 1093-1106.
56. Fidler, I.J. Selection of successive tumour lines for metastasis / I.J. Fidler // *Nature: New biology*. – 1973. – Vol. 242, № 118 – P.148–149.
57. Fillatreau, S. Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus / S. Fillatreau, B. Manfroi, T. Dörner. // *Nature Reviews Rheumatology*. - 2021. – Vol. 17, № 2 – P. 98-108.
58. Finn, O. J. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas / O. J. Finn, K. R. Gantt, A. J. Lepisto et al. // *Immunology*. – 2011. – Vol.50, № 2-3 – P. 261–268.
59. Forghani, P. Poly (I: C) modulates the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells in a murine model of breast cancer / P. Forghani, E. Waller // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2015. – Vol. 153, № 1. – P.21-30.
60. Fritsche, J. Translating immunopeptidomics to immunotherapy-decision-making for patient and personalized target selection / J. Fritsche, B. Rakitsch, F. Hoffgaard et al. // *Proteomics*. – 2018. – Vol. 18, № 12. - P. e1700284.
61. Gajewski, T.F. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment / T.F. Gajewski, S.R. Woo, Y. Zha et al. // *Current Opinion in Immunology*. – 2013. – Vol. 25, № 2 - P. 268–76.
62. Gajewski, T.F. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment / T.F. Gajewski, H. Schreiber, Y.X. Fu // *Nature Reviews Immunology*. – 2013. – Vol. 14, № 10 - P.1014–1022.
63. Gee, M.H. Antigen identification for orphan T-cell receptors expressed on tumor-infiltrating lymphocytes / M.H. Gee, A. Han, S.M. Lofgren et al. // *Cell*. – 2017. – Vol.172, № 3. – P.549–563.e16.
64. Giannakis, M. Genomic correlates of immune-cell infiltrates in colorectal carcinoma / M. Giannakis, X. J. Mu, S. A. Shukla et al. // *Cell Reports*. – 2016. – Vol. 15, № 4 – P. 857–865.

65. Gosu, V. Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in Toll-like receptor signaling / V. Gosu, S. Basith, O-P. Kwon, S. Choi // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17, № 11. – P.
66. Gouttefangeas, C. Personalized cancer vaccines: adjuvants are important, too / C. Gouttefangeas, H-G. Rammensee // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2018. – Vol. 67, № 12. – P. 1911-1918.
67. Govindaraj, R.G. Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling / R.G. Govindaraj, B. Manavalan, G. Lee, S. Choi // *PLOS One*. – 2010. – Vol.5, № 9. – P.e12713.
68. Gutiérrez-Martínez, E. Cross-presentation of cell-associated antigens by MHC class I in dendritic cell subsets / E. Gutiérrez-Martínez, R. Planès, G. Anselmi et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol. 6. – P.363.
69. Gutzmer, R. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study / R. Gutzmer, L. Rivoltini, E. Levchenko et al. // *ESMO Open*. – 2016. – Vol. 1, № 4. – P. e000068.
70. Hafner, A.M. Particulate formulations for the delivery of poly(I:C) as vaccine adjuvant / A.M. Hafner, B. Corthésy, H. P. Merkle // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65, № 10 – P. 1386–1399.
71. Hafner, A.M. Surface assembly of poly(I:C) on PEGylated microspheres to shield from adverse interactions with fibroblasts / A.M. Hafner, D. Burschowsky, B. Corthesy et al. // *Journal of Controlled Release*. - 2012. – Vol. 159, № 2 – P. 204–214.
72. Hamanishi, J. Safety and antitumor activity of anti-PD-1 antibody, nivolumab, in patients with platinum-resistant ovarian cancer / J. Hamanishi, M. Mandai, T. Ikeda et al. // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33, № 34 – P.4015–4022.
73. Hammerich, L. Systemic clinical tumor regressions and potentiation of PD-1 blockade with in situ vaccination / L. Hammerich, T.U. Marron, R. Upadhyay et al. // *Nature Medicine*. - 2019. - Vol. 25, № 5 - P.814–824.

74. Han, Y. CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1 / Han Y., Guo Q., Zhang M. et al. // *Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 182, № 1. – P. 111-120.
75. Hansen, J. CAF05: cationic liposomes that incorporate synthetic cord factor and Poly(I:C) induce CTL immunity and reduce tumor burden in mice / J. Hansen, T. Lindenstrom, J. Lindberg-Levin, et al. // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. - 2012. - Vol. 61, № 6. – P. 893–903
76. Havenar-Daughton, C. Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T-cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection / C. Havenar-Daughton, G.A. Kolumam, K. Murali-Krishna // *Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 176, № 6. – P.3315–3319.
77. Hintzsche, J.D. A survey of computational tools to analyze and interpret whole exome sequencing data / J.D. Hintzsche, W.A. Robinson, A.C. Tan // *International Journal of Genomics*. – 2016. - Vol. 2016. – P. 7983236.
78. Hodge, K. Recent developments in neoantigen-based cancer vaccines / K. Hodge, S. Supabphol, P. Kumar et al. // *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. - 2020. - Vol.38, № 2. – P.91-101.
79. Hodi, S. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma / S. Hodi, S. O’Day, D. McDermott et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 363. – P. 609–619.
80. Hofmann, O. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression / O. Hofmann, O. L. Caballero, B. J. Stevenson et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 51. – P. 20422–20427.
81. Hollingsworth, R.E. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines / R.E. Hollingsworth, K. Jansen // *NPJ Vaccines*. – 2019. – Vol. 4. – P. 7.
82. Hurez, V. Considerations for successful cancer immunotherapy in aged hosts / V. Hurez, Á. Padrón, R. S. Svatek, T. J. Curiel // *Experimental Gerontology*. - 2018. - Vol. 107. – P. 27–36.

83. Isvoranu, G. Natural killer cell monitoring in cutaneous melanoma - new dynamic biomarker / G. Isvoranu, M. Surcel, R. Huica et al. // *Oncology Letters*. - 2019. – Vol. 17, № 5. – P. 4197-4206.
84. Iwasaki, A. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Science*. – 2010. – Vol. 327, № 5963. – P. 291–295.
85. Iwasaki, A. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Nature Reviews Immunology*. – 2004. – Vol. 5, № 10 – P. 987–995.
86. Janeway, C.A. Innate immune recognition / C.A. Janeway, R. Medzhitov // *Annual Review of Immunology*. – 2002. – Vol. 20. – P. 197-216.
87. Jennings, L.J. Guidelines for validation of next-generation sequencing e based oncology panels: A joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of american pathologists / L.J. Jennings, M.E. Arcila, C. Corless et al. // *Journal of Molecular Diagnostics*. – 2017. – Vol. 19, № 3. – P.341–365.
88. Jongbloed, S.L. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens / S.L. Jongbloed, A.J. Kassianos, K.J. McDonald et al. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2010. – Vol. 207, № 6 – P. 1247–60.
89. Joyce, J.A. T-cell exhaustion, immune privilege, and the tumor microenvironment / J.A. Joyce, D.T. Fearon // *Science*. - 2015. – Vol. 348, № 6230 – P. 74–79.
90. Kamran, N. Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation / N. Kamran, Y. Li, M. Sierra et al. // *Oncoimmunology*. - 2017. – Vol. 7, № 3. – P. e1408750.
91. Karbach, J. Efficient in vivo priming by vaccination with recombinant NYESO-1 protein and CpG in antigen naive prostate cancer patients / J. Karbach, A. Neumann, A. Atmaca et al. // *Clinical Cancer Research*. - 2011. – Vol. 17, № 4. – P. 861–870.

92. Kartikasari, A.E.R. Therapeutic cancer vaccines – T-cell responses and epigenetic modulation / A.E.R. Kartikasari, M.D. Prakash, M. Cox et al. // *Frontiers in Immunology*. - 2019. - Vol.9. – P. 3109
93. Kawai, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – Vol. 11, № 5 – P. 373–384.
94. Kawakami, Y. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection / Y. Kawakami, S. Eliyahu, C. H. Delgado et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1994. – Vol. 91, № 4. – P. 6458–6462.
95. Keskin, D.B. Neoantigen vaccine generates intratumoral T-cell responses in phase Ib glioblastoma trial / D. B. Keskin, A. J. Anandappa, J.Sun et al. // *Nature*. – 2019. – Vol. 565, № 7738 - P. 234–239.
96. Kim, B.K. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection / B.K. Kim, K.H. Han, S.H. Ahn // *Oncology*. – 2011. – Vol. 81, № 1. – P. 41–49.
97. Kim, T.K. Defining and understanding adaptive resistance in cancer immunotherapy / T. K. Kim, R. S. Herbst, L. Chen// *Trends in Immunology*. - 2018. - Vol.39, № 8. – P. 624–631.
98. Kimura, T. MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study / T. Kimura, J.R. McKolanis, L.A. Dzubinski et al. // *Cancer Prevention Research*. - 2013. – Vol. 6, № 1. – P.18–26.
99. Kiyotani, K. Comparison of exome-based HLA class I genotyping tools: identification of platform-specific genotyping errors / K. Kiyotani, T.H. Mai, Y. Nakamura // *American Journal of Human Genetics*. – 2016. – Vol. 62, № 3 – P. 1–9.
100. Knutson, K.L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy / K.L. Knutson, M.L. Disis // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2005. – Vol. 54, № 8. – P. 721-728.
101. Kobe, B. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif / B. Kobe, J. Deisenhofer // *Trends in Biochemical Sciences*. - 1994. – Vol. 19, № 10 – P. 415–421.

102. Korniluk, A. From Inflammation to Cancer / A. Korniluk, O. Koper , H. Kemonia , V. Dymicka-Piekarska // *Irish Journal of Medical Science*. - 2017. – Vol. 186, № 1 – P. 57–62.
103. Koschella, M. CD40 ligation in vivo induces bystander proliferation of memory phenotype CD8 T cells / M. Koschella, D. Voehringer, H. Pircher // *Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172, № 8. – P. 4804-4811.
104. Kreiter, S. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer / S. Kreiter, M. Vormehr, N. van de Roemer et al. // *Nature*. - 2015. – Vol. 520, № 7549 – P. 692–696.
105. Kumai, T. Cancer immunotherapy: moving forward with peptide T cell vaccines / T. Kumai, A. Fan, Y. Harabuchi, E. Celis // *Current Opinion in Immunology*. – 2017. – Vol. 47. - P. 57-63.
106. Kumar, H. Pathogen recognition by the innate immune system / H. Kumar, T. Kawai, S. Akira // *International Immunology*. – 2011. – Vol. 30, № 1. – P. 16–34.
107. Lazaro, A. Human leukocyte antigen (HLA) typing by DNA sequencing / A. Lazaro, B. Tu, R. Yang et al. // *Methods in Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 1034. – P. 161–195.
108. Le, D. T. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency / D.T. Le, J.N. Uram, H. Wang, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 372, № 26. – P. 2509–2520.
109. Leggett, R.M. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics / R.M. Leggett, R.H. Ramirez-Gonzalez, B.J. Clavijo et al. // *Frontiers in Genetics*. - 2013. – Vol. 4. – P. 288.
110. Leonard, J.N. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization / Leonard J.N., Ghirlando R., Askins J., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105, № 1 – P. 258–263.
111. Löwer, M. Confidence-based somatic mutation evaluation and prioritization / M. Löwer, B.Y. Renard, J. de Graaf et al. // *PLOS Computational Biology*. – 2012. – Vol. 8, № 9. – P. e1002714



112. Luksza, M. A neoantigen fitness model predicts tumor response to checkpoint blockade immunotherapy / M. Luksza, N. Riaz, V. Makarov et al. // *Nature*. – 2017. – Vol. 551, № 7681 – P.517–520.
113. Mansilla, C. Eradication of large tumors expressing human papillomavirus E7 protein by therapeutic vaccination with E7 fused to the extra domain a from fibronectin / C. Mansilla, P. Berraondo, M. Durantez et al. // *International Journal of Cancer*. - 2012. – Vol. 131, № 3. – P. 641–651.
114. Martin, S. D. Low mutation burden in ovarian cancer may limit the utility of neoantigen-targeted vaccines / S. D. Martin, S. D. Brown, D. A. Wick, et al. // *PLOS ONE*. – 2016. –Vol. 11, № 5 - P. e0155189.
115. Marty, R. Evolutionary pressure against MHC class II binding cancer mutations / R. Marty, W.K. Thompson, R.M. Salem et al. // *Cell*. – 2018. – Vol. 175, № 2 - P. 416-428.e13.
116. Matesic, D. Modulating toll-like receptor 7 and 9 responses as therapy for allergy and autoimmunity / D. Matesic, A. Lenert, P. L. Curr // *Current Allergy and Asthma Reports*. - 2012. – Vol. 12, № 1. – P. 8-17.
117. Matsumoto, M. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells / M. Matsumoto, K. Funami, M. Tanabe et al. // *Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 171, № 6 – P. 3154–3162.
118. Matsushita, H. Cancer exome analysis reveals a T-Cell dependent mechanism of cancer immunoediting / H. Matsushita, M.D. Vesely, D.C. Koboldt et al. // *Nature*. - 2013. – Vol. 482, № 7385 – P.400–404.
119. Matsushita, H. Neoantigen load, antigen presentation machinery, and immune signatures determine prognosis in clear cell renal cell carcinoma / H. Matsushita, Y.Sato, T. Karasaki // *Cancer Immunology*. – 2016. - Vol. 4, № 5 – P. 463–471.
120. McBride, S. Cell-associated double-stranded RNA enhances antitumor activity through the production of type I IFN / S. McBride, K. Hoebe, P. Georgel, E. Janssen // *Journal of Immunology*. - 2006. – Vol. 177, № 9. – P. 6122–6128.

121. Meena, N. A bioinformatics pipeline for whole exome sequencing: overview of the processing and steps from raw data to downstream analysis / N. Meena, P. Mathur, K.M. Medicherla, P. Suravakhala // *BIO-PROTOCOL*. – 2017. – P. e2805-e2805
122. Melief, C.J. Therapeutic cancer vaccines / C.J. Melief, T. van Hall, R. Arens et al. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – Vol. 125, № 9 - P. 3401-3412.
123. Merad, M. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting / M. Merad, P. Sathe, J. Helft, et al. // *Annual Review of Immunology*. – 2013. – Vol. 31. – P. 563–604.
124. Migliorini, D. Phase I/II trial testing safety and immunogenicity of the multipeptide IMA950/poly-ICLC vaccine in newly diagnosed adult malignant astrocytoma patients / D. Migliorini, V. Dutoit, M. Allard et al. // *Neuro Oncology*. – 2019. - Vol. 21, № 7. – P. 923-933.
125. Mora, T. Quantifying lymphocyte receptor diversity / T. Mora, A. M. Walczak // *BioRxiv*. – 2016. – P. 046870
126. Morse, M.A. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self-antigens in cancer patients / M.A. Morse, R. Chapman, J. Powderly, et al. // *Clinical Cancer Research*. - 2011. – Vol.17, № 14. – P. 4844–4853
127. Motzer, R.J. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma / R.J. Motzer, B. Escudier, D.F. McDermott et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 373, №19 -P.1803–1813.
128. Myrick, C. Linkage analysis of variations in CD4:CD8 T cell subsets between C57BL/6 and DBA/2 / C. Myrick, R. DiGuisto, J. DeWolfe et al. // *Genes & Immunity*. – 2002. – Vol. 3, № 3. – P. 144-150.
129. Nakamura, T. Incorporation of polyinosine–polycytidylic acid enhances cytotoxic T-cell activity and antitumor effects by octaarginine-modified liposomes encapsulating antigen, but not by octaarginine-modified antigen complex / T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, H. Harashima // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. - Vol. 441, № 1-2 – P. 476–481.

130. Nielsen, M. NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence / M. Nielsen, C. Lundegaard, T. Blicher et al. // PLOS One. – 2007. – Vol. 2, № 8 – P.796.

131. Nielsen, M. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets / M. Nielsen, M. Andreatta // Genome Medicine. - 2016. – Vol. 8, №1 – P. 33.

132. Ogi, C. Approaches to improve development methods for therapeutic cancer vaccines / C. Ogi, A. Aruga // Immunology Letters. – 2015. – Vol. 164, № 2 – P.100–108.

133. Okada, H. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with  $\alpha$ -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic–polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma / H. Okada, P. Kalinski, R. Ueda et al. // Journal of clinical oncology. - 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 330–336.

134. Oldenburg, M. TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification / M. Oldenburg, A. Kruger, R. Ferstl et al. // Science. – 2012. – Vol. 337, № 6098. – P. 1111–1115.

135. Orlacchio, A. The role of Toll-like receptors (TLRs) mediated inflammation in pancreatic cancer pathophysiology / A. Orlacchio, P. Mazzone // International Journal of Molecular Sciences. - 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 12743.

136. Ott, P.A. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus Anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer / P.A. Ott, S. Hu-Lieskovan, B. Chmielowski et al. // Cell. - 2020. – Vol. 183, № 2. – P.347-362.

137. Ott, P.A. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma / P.A. Ott, Z. Hu, D.B. Keskin et al. // Nature. – 2017. – Vol. 547, № 7662. – P. 217-221.

138. Papi, A. Rhinovirus infection induces major histocompatibility complex class I and costimulatory molecule upregulation on respiratory epithelial cells / A. Papi,

L.A. Stanciu, N.G. Papadopoulos et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 181, № 5 – P. 1780–1784.

139. Parkhurst, M. R. Identification of a shared HLA-A\*0201-restricted T cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2) / M. R. Parkhurst, E. B. Fitzgerald, S. Southwood et al. // *Cancer Research*. - 1998. – Vol. 58, № 21. – P. 4895–4901.

140. Pasetto, A. Tumor- and neoantigen-reactive T-cell receptors can be identified based on their frequency in fresh tumor / A. Pasetto, A. Gros, P.F. Robbins et al. // *Cancer Immunology Research*. – 2016. – Vol.4, № 9 - P. 734-743.

141. Paul, S. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells / S. Paul, N. Kulkarni, Shilpi, G. Lal // *Oncoimmunology*. – 2016. – Vol. 5, № 12. – P. e1235106.

142. Powles, T. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer / T. Powles, J.P. Eder, G.D. Fine et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, № 7528 – P.558–562.

143. Pradere, J.P. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer / J.P. Pradere, D.H. Dapito, R.F. Schwabe // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33, № 27. – P. 3485-3495.

144. Pritchard, A.L. Exome Sequencing to Predict Neoantigens in Melanoma / A.L. Pritchard, J.G. Burel, M.A. Neller et al. // *Cancer Immunology Research* . – 2015. – Vol. 3, № 9. – P.992–998.

145. Radulovic, K. CD69 regulates type I IFN-induced tolerogenic signals to mucosal CD4 T cells that attenuate their colitogenic potential / K. Radulovic, C. Manta, V. Rossini et al. // *Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 188, № 4. – P. 2001-2013.

146. Rakoff-Nahoum, S. Toll-like receptors and cancer / S. Rakoff-Nahoum, R. Medzhitov // *Nature Reviews Cancer*. – 2009. – Vol. 9, № 1 – P. 57–63.

147. Richman, L.P. Neoantigen dissimilarity to the self-proteome predicts immunogenicity and response to immune checkpoint blockade / L.P. Richman, R.H. Vonderheide, A.J. Rech // *Cell Systems*. – 2019. – Vol.9, № 4 – P.375–382.

148. Rizvi, N. A. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer / N.A. Rizvi, M. D. Hellmann, A.Snyder // *Science*. – 2015. – Vol. 348, № 6230 – P.124–128.
149. Robbins, P.F. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells / P.F. Robbins, Y.C. Lu, M. El-Gamil et al. // *Nature Medicine*. – 2013. – Vol.19, № 6. - P.747–752.
150. Roden, R.B.S. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer / R.B.S. Roden, P.L. Stern // *Nature Reviews Cancer*. – 2018. – Vol. 18, № 4. – P. 240–254.
151. Rooney, M.S. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity / M.S. Rooney, S.A. Shukla, C.J. Wu et al. // *Cell*. – Vol. 160, № 1-2 - P. 48–61.
152. Rosato, P.C. Virus-specific memory T cells populate tumors and can be repurposed for tumor immunotherapy / P.C. Rosato, S. Wijeyesinghe, J.M. Stolley, et al. // *Nature Communications*. - 2019. – Vol. 10, № 1 - P. 567.
153. Roudko, V. Computational prediction and validation of tumor-associated neoantigens / V. Roudko, B. Greenbaum, N. Bhardwaj // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 27.
154. Roudko, V. Widespread immunogenic poly-epitope frameshift mutations in microsatellite unstable tumors / V. Roudko, C.C. Bozkus, T. Orfanelli et al. // *Bio-protocol*. – 2019. – Vol. 183, № 6 – P. 1–53.
155. Sabbatini, P. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients / P. Sabbatini, T. Tsuji, L. Ferran et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18, № 23. – P. 6497–6508.
156. Sahin, U. Personalized vaccines for cancer immunotherapy / U. Sahin, O. Tureci // *Science*. - 2018. – Vol. 359, № 6382 - P. 1355-1360.
157. Sahin, U. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer / U. Sahin, E. Derhovanessian, M. Miller et al. // *Nature*. - 2017. – Vol. 547, № 7662 – P. 222–226.

158. Salem, M.L. Defining the antigenspecific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity / M.L. Salem, A.N. Kadima, D.J. Cole, W.E. Gillanders // *Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 28, № 3. – P. 220–228.

159. Sameer, A.S. Toll-like receptors (TLRs): structure, functions, signaling, and role of their polymorphisms in colorectal cancer susceptibility / A.S. Sameer, S. Nissar // *BioMed Research International*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1157023.

160. Santambrogio, L. Stern Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells / L. Santambrogio, A.K. Sato, F.R. Fischer et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1999. – Vol. 96, № 26 - P. 15050-15055.

161. Santambrogio, L. The antigen processing and presentation machinery in lymphatic endothelial cells / L. Santambrogio, S.J. Berendam, V.H. Engelhard // *Frontiers in Immunology*. - 2019. – Vol. 10. – P.1033.

162. Saunders, C.T. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs / C.T. Saunders, W.S. Wong, S. Swamy // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28, № 14. – P. 1811–1817.

163. Schumacher, T. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity / T. Schumacher, L. Bunse, S. Pusch et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 512, № 7514 – P. 324–327.

164. Seliger, B. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells / B. Seliger, U. Wollscheid, F. Momburg et al. // *Cancer Research*. - 2001. – Vol. 61, № 3. – P. 1095-1099.

165. Sfanos, K.S. Targeting Toll-like receptors in cancer prevention / K.S. Sfanos // *Cancer Prevention Research*. – 2018. – Vol. 11, № 5. – P. 251-254.

166. Shi, S. Expression profile of Toll-like receptors in human breast cancer / S. Shi, C. Xu, X. Fang et al. // *Molecular medicine reports*. – 2020. – Vol. 21, № 2. – P. 786-794.

167. Shime, H. Double-stranded RNA promotes CTL-independent tumor cytolysis mediated by CD11b+Ly6G+ intratumor myeloid cells through the TICAM-1

signaling pathway / H. Shime, M. Matsumoto, T. Seya // *Cell Death Differ.* – 2016. – Vol. 24, № 3 – P. 385–396.

168. Shime, H. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic: polycytidylic acid treatment in mouse tumor models / H. Shime, A. Kojima, A. Maruyama et al. // *Innate Immunity.* - 2014. – Vol. 6, № 3. – P. 293-305.

169. Shime, H. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors / H. Shime, M. Matsumoto, H. Oshiumi et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2012. – Vol. 109, № 6 - P. 2066–2071.

170. Simon, R. Implementing personalized cancer genomics in clinical trials / R. Simon, S. Roychowdhury // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2013. – Vol. 12, № 5 – P. 358–369.

171. Stronen, E. Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires / E. Stronen, M. Toebes, S. Kelderman et al.// *Science.* - 2016. – Vol. 352, № 6291 - P. 1337-1341.

172. Takeuchi, O. Pattern recognition receptors and inflammation / O. Takeuchi, Akira S. // *Cell.* – 2010. – Vol. 140, № 6. – P.805–820.

173. Tardon, M.C. Peptides as cancer vaccines / M.C. Tardon, M. Allard, V. Duyoit et al. // *Current Opinion in Pharmacology.* – 2019. – Vol. 47. – P. 20-26.

174. Thommen, D. S. T - cell dysfunction in cancer / D. S. Thommen, T. N. Schumacher // *Cancer Cell.* – 2018. – Vol. 33, № 4. – P. 547–562.

175. Topalian, S. Safety, activity, and immune correlates of anti–PD-1 antibody in cancer / S. Topalian, S. Hodi, J. Brahmer et al. // *New England Journal of Medicine.* – 2012. – Vol. 366, № 26 - P. 2443–2454.

176. Tormo, D. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice / D. Tormo, A. Ferrer, P. Bosch et al. // *Cancer Research.* - 2006. – Vol. 66, № 10. – P. 5427–5435.

177. Tough, D. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo / D. Tough, P. Borrow, J. Sprent // *Science*. - 1996. – Vol. 272, № 5270. – P. 1947-1950.

178. Trimble, C. L. Safety, efficacy, and immunogenicity of VGX-3100, a therapeutic synthetic DNA vaccine targeting human papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 proteins for cervical intraepithelial neoplasia 2/3: a randomised, doubleblind, placebo-controlled phase 2b trial / C. L. Trimble, M. P. Morrow, K. A. Kraynyak et al. // *Lancet*. - 2015. – Vol. 386, № 10008 – P. 2078–2088.

179. Tsuji, T. Effect of Montanide and poly-ICLC adjuvant on human self/tumor antigen-specific CD4+ T cells in phase I overlapping long peptide vaccine trial / T. Tsuji, P. Sabbatini, A.A. Jungbluth et al. // *Cancer Immunology Research*. – 2013. – Vol. 1, № 5. – P. 340–350.

180. Tumeh, P.C. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance / P.C. Tumeh, C.L. Harview, J.H. Yearley et al. // *Nature*. – 2014. – Vol. 515, № 7528 – P.568–571.

181. Van Allen, E. M. Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma / E. M. Van Allen, D. Miao, B. Schilling // *Science*. – 2015. – Vol. 350, № 6257 – P. 207–211.

182. Van der Burg, S.H. Correlates of immune and clinical activity of novel cancer vaccines / S.H. Van der Burg // *Seminars in Immunology*. – 2018. – Vol.39. - P. 119-136.

183. Verdegaal, E. M. E. Neoantigen landscape dynamics during human melanoma–T cell interactions / E. M. E. Verdegaal, N. F. C. C. De Miranda, M. Visser // *Nature*. – 2016. – Vol. 536., № 7614 – P. 91–95.

184. Verdijk, R.M. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid Poly(I:C) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells / R.M. Verdijk, T. Mutis, B. Esendam et al. // *Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 163., № 1 – P. 57–61.

185. Vergati, M. Strategies for cancer vaccine development / M. Vergati, C. Intrivici, N.Y. Huen et al. // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. - 2010. – Vol. 2010. – P. 596432.



186. Vonderheide, R. H. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes / R. H. Vonderheide, W. C. Hahn, J. L. Schultze, L. M. Nadler // *Immunity*. – 1999. – Vol. 10, № 6. – P. 673–679.
187. Vormehr, M. Harnessing Tumor Mutations for Truly Individualized Cancer Vaccines / M. Vormehr, Ö. Türeci, U. Sahin // *Annual Review of Medicine*. – 2019. – Vol. 70. – P. 395-407.
188. Walzer, T. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46 / T. Walzer, M. Blery, J. Chaix et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104, № 9. – P. 3384-3389.
189. Wang, Q. J. Identification of T cell receptors targeting KRAS-mutated human tumors / Q. J. Wang, Z. Yu, K. Griffith et al. // *Cancer Immunology Research*. – 2016. – Vol. 4, № 3. – P. 204–214.
190. Wang, X. Cancer immunotherapy: comprehensive mechanism analysis of mesoporous-silica-nanoparticle-induced cancer immunotherapy / X. Wang, X. Li, K. Yoshiyuk et al. // *Advanced Healthcare Materials*. – 2016. – Vol. 5, № 10. – P. 1169-1176.
191. Wick, D.A. Profound CD8+ T cell immunity elicited by sequential daily immunization with exogenous antigen plus the TLR3 agonist poly(I:C) / D.A. Wick, S.D. Martin, B.H. Nelson, J.R. Webb // *Vaccine*. - 2011. – Vol. 29, № 5. – P.984–993.
192. Wiesel, M. Type I IFN substitutes for T-cell help during viral infections / M. Wiesel, W. Kratky, A. Oxenius // *Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186, № 2. – P.754–763.
193. Worah, K. Proteomics of human dendritic cell subsets reveals subset-specific surface markers and differential inflammasome function / K. Worah, T.S.M. Mathan, T.P. Vu Manh et al. // *Cell Reports*. – 2016. – Vol. 16, № 11 – P. 2953–2966.
194. Xiao, H. Local administration of TLR ligands rescues the function of tumor-infiltrating CD8 T cells and enhances the antitumor effect of lentivector immunization / H. Xiao, Y. Peng, Y. Hong, et al. // *Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 190, № 11 – P. 5866–5873.

195. Xu, M.M. Dendritic cells but not macrophages sense tumor mitochondrial DNA for cross-priming through signal regulatory protein  $\alpha$  signaling / M.M. Xu, Y. Pu, D. Han et al. // *Immunity*. – 2017. – Vol. 47, № 2 – P. 363–373.
196. Yadav, M. Predicting immunogenic tumor mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing / M. Yadav, S. Jhunjhunwala, Q.T. Phung et al. // *Nature*. – 2014. - Vol. 515, № 7528 – P.572-576.
197. Yang, W. Immunogenic neoantigens derived from gene fusions stimulate T cell responses / W. Yang, K. Lee, R.M. Srivastava et al. // *Nature Medicine*. – 2019. – Vol. 25, № 5 – P. 767–775.
198. Zheng, R. Paired Tolllike receptor agonists enhance vaccine therapy through induction of interleukin-12 / R. Zheng, P.A. Cohen, C.A. Paustian et al. // *Cancer Research*. - 2008. – Vol. 68, № 1. – P. 4045–4049.
199. Zheng, X. Roles of Toll-Like Receptor 3 in Human Tumors / X. Zheng, S. Li, H. Yang // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 667454.
200. Zhu, X. Toll like receptor-3 ligand poly-ICLC promotes the efficacy of peripheral vaccinations with tumor antigen-derived peptide epitopes in murine CNS tumor models / X. Zhu, F. Nishimura, K. Sasaki et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2007. – Vol. 5. – P. 10.