

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

На правах рукописи



**ДОРЖИЕВА АЯНА БАЯРОВНА**

**КСЕНОГЕННЫЕ ТЕСТИКУЛЯРНЫЕ АНТИГЕНЫ В  
ИНДУКЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ИММУННЫХ  
РЕАКЦИЙ**

3.2.7 Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Селедцова Галина Викторовна

Новосибирск 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>3</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>13</b>
1.1 Противоопухолевый иммунитет .....	13
1.2 Микроокружение опухоли и методы избегания противоопухолевого иммунитета .....	19
1.3 Опухоль-ассоциированные антигены .....	25
1.4 Противоопухолевая вакцинация. ....	37
1.5 Ксеногенная вакцинация .....	48
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>57</b>
2.1 Объект и предмет исследования.....	57
2.2 Характеристика клеток опухолевых линий .....	57
2.3 Виды АГ: .....	58
2.4 Варианты иммунизации.....	59
2.5 Оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей. ....	60
2.6 Оценка длительности противоопухолевого иммунитета у мышей- опухоленосителей LLC .....	61
2.7 Оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей LLC при «переносе» противоопухолевого иммунитета интактным мышам .....	61
2.8 Иммунологические исследования .....	61
2.9 Статистическая обработка.....	64
2.10 Этическое заключение .....	64
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>65</b>
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>91</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>99</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>102</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>105</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

По результатам ВОЗ в 2022 году было зарегистрировано около 20 млн новых случаев онкологических заболеваний, в мире каждому пятому поставлен онкологический диагноз, при этом со смертельным исходом сталкиваются каждый девятый мужчина и каждая двенадцатая женщина.

Разработка эффективных препаратов с селективным противоопухолевым действием представляется проблематичной по причине схожести биохимических процессов, протекающих в нормальных и опухолевых клетках [Christofi et al., 2019]. Вместе с тем, клетки тканей организма и опухолевые клетки различаются своими поверхностными структурами [Quail et al., 2013; Klemm, 2015], что нужно использовать при разработке иммунотерапевтической стратегии лечения.

Все опухоли-ассоциированные антигены (ОАА) разделяются на две группы. Первая группа включает в себя вирусные и мутантные антигены, вторая группа включает в себя дифференцировочные антигены, которые экспрессируются как на клетках здоровых тканей, так и на опухолевых клетках [Gordeeva, 2018]. Так называемые тестикулярные антигены (ТАГ), продукты *MAGEA1*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *NY-ESO-1*, *PRAME*, *CT83*, *SSX2* и других генов – это специфичные для сперматозоидов белки, которые связаны с мембраной клетки и находятся в растворимой форме в пределах тканей яичка, оболочки которого непроницаемы для миграции клеток. ТАГ, практически, не экспрессируются нормальными клетками, исключение составляют клетки яичка и плаценты. Таким образом, в норме организм человека толерантен к ТАГ, но при нарушении целостности оболочек яичка, эти АГ, попадая в кровоток, индуцируют в организме появление аутоиммунных реакций, направленных на элиминацию их из организма. Многими исследователями показано, что ТАГ высоко экспрессируются в клетках опухоли печени, молочной железы, поджелудочной железы, кишечника, легких и др.

[Gjerstorff et al., 2015; Strioga et al., 2014; Salmaninejad et al., 2016]. Исходя из этих знаний в настоящее время разрабатываются ДНК, мРНК и пептидные вакцины для индукции специфических противоопухолевых реакций и генерации противоопухолеспецифичных ТАГ *in vivo* [Zhang et al., 2022]. Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований, противоопухолевая эффективность вакцин на основе ТАГ в клинических испытаниях ограничена, что может быть частично объяснено их слабой иммуногенностью, низкой эффективностью процессов доставки и презентации антигена, а также подавляющим иммунные реакции супрессорным опухолевым микроокружением. Для повышения иммуногенности ТАГ предложено использование ксеногенного варианта ТАГ, возможность его применения обосновывается характерной особенностью генов ТАГ – высокой внутри- и межвидовой структурной гомологией, так, в геномах человека, приматов и грызунов была идентифицирована гомология генов семейства *MAGE*, *SSX*, идентичность ортологических последовательностей которых составляла от 40% до 80% [Welters et al., 2016].

Таким образом, теоретические и экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о том, что иммунизация организма ксеногенными аналогами эндогенных молекул может приводить к индукции иммунологических реакций к собственным АГ, исходно к которым организм толерантен, точкой приложения которых будут ТАГ, экспрессирующиеся на опухолевых клетках. В данной диссертационной работе охарактеризованы некоторые аспекты иммунологических противоопухолевых клеточных реакций, индуцируемых у мышей ксеногенными тестикулярными антигенами. Данная работа – важный шаг в создании инструментов противоопухолевой терапии, которые могут быть использованы как для профилактики развития первичной злокачественной опухоли, так и для предотвращения рецидива опухоли после ее условно радикального удаления из организма.

### **Степень разработанности темы исследования**

Присутствие опухоле-ассоциированных антигенов на мембране клеток яичка представляет интерес для исследований в контексте их использования для стимуляции противоопухолевых реакций организма. Наибольшее количество научных статей посвящено исследованию *MAGE*, *GAGE*, *NY-ESO-1* и *SSX* пептидов и белков в качестве основы для разработки противоопухолевых вакцин самостоятельно или в комбинации с иммуностимуляторами. Использование этих АГ наиболее перспективно, т.к. многие опухоли разной гистологической природы содержат тестикулярные АГ (ТАГ), в то время как на клетках здоровых тканей (кроме яичка и плаценты) они отсутствуют. Для усиления иммуногенности ТАГ применяют комплекс адъювантов, цитокинов, ростовых факторов. Ряд работ посвящен использованию ксеногенного варианта различных АГ для усиления иммуногенности вакцинального материала. Показана терапевтическая эффективность использования ксеногенных продуктов в комплексном лечении опухолевых заболеваний собак, кошек, кур [Wei et al., 2000; Su et al., 2003; Kamstock et al, 2007; Seledtsov et al., 2011]. Иммунизация мышей человеческими меланома-ассоциированными гликопротеинами - *gp75* и *gp 100* [Bowne et al, 1999; Monzavi-Karbassi et al, 2006] способна предотвращать развитие в их организме меланомы, клетки которой экспрессируют соответствующие мышинные аналоги. Есть и примеры использования ксеногенных молекул в лечении людей с онкопатологией. В моей диссертационной работе исследованы свойства ТАГ барана в стимуляции противоопухолевых реакций иммунитета и показана терапевтическая эффективность их использования в эксперименте.

### **Цели и задачи исследования**

**Целью** данной работы является исследование параметров иммунитета у мышей - опухоленосителей при иммунизации ксеногенными тестикулярными антигенами в различных экспериментальных условиях.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Исследовать выживаемость мышей-опухоленосителей карциномы LLC и меланомы B16 в терапевтическом и профилактическом вариантах иммунизации мышей ксеногенными ТАГ.
2. Определить уровень пролиферативного ответа спленоцитов, полученных от мышей-опухоленосителей, иммунизированных *in vivo* ксеногенными и сингенными ТАГ, на опухоль-ассоциированные антигены LLC и B16 в системе *in vitro*.
3. Определить уровень IFN $\gamma$  и IL-10 в плазме крови мышей, подвергшихся различным экспериментальным воздействиям.
4. Оценить содержание CD4+CD25+FoxP3+ Т-регуляторных клеток, CD8+Perforin+ Т-клеток и CD4+CD44+62L+ Т-клеток памяти в селезенке мышей, иммунизированных ксеногенными тестикулярными антигенами, подвергшихся различным экспериментальным воздействиям.
5. Исследовать длительность противоопухолевых иммунных реакций при иммунизации мышей ксеногенными тестикулярными антигенами и возможность пассивной передачи противоопухолевого клеточного иммунитета от иммунизированных мышей интактным.

### **Научная новизна**

Впервые проведен детальный анализ результатов использования антигенов, полученных из нормальной тестикулярной ткани барана, в качестве эффективного инструмента противоопухолевой иммунизации.

В работе показано, спленоциты иммунизированных *in vivo* ТАГ мышей, в системе *in vitro* отвечают пролиферацией на АГ, полученные из карциномы LLC и меланомы B16, в геноме которых присутствуют *mage A-1*, *GP100*, *тирозиназа*,

относящиеся к группе ТАГ. Это свидетельствует о структурной гомологии некоторых антигенов LLC и B16 с антигенами тестикулярных клеток и возможности ТАГ индуцировать иммунологические реакции на опухоль-ассоциированные АГ, если они присутствуют на опухолевых клетках. Полученные результаты предполагают, что тестикулярные антигены, полученная из тестикул барана, могут быть использованы в качестве инструмента противоопухолевой терапии в том случае, если опухолевые клетки больного содержат набор тестикулярных антигенов. В работе впервые охарактеризованы иммунные реакции, развивающиеся у мышей-опухоленосителей и мышей, у которых не регистрировался рост опухоли после предварительной иммунизации мышей ксеногенными тестикулярными антигенами. В работе впервые показано, что иммунизация ксеногенными ТАГ сопровождается индукцией цитотоксичного ответа, регистрируемого по повышению генерации CD8+Perforin+ содержащих клеток, по снижению содержания Т-регуляторных клеток и повышению уровня IFN $\gamma$  у иммунизированных ТАГ мышей-опухоленосителей по сравнению с неиммунизированным опухолевым контролем. Впервые в модели пассивного переноса противоопухолевого иммунитета, показана эффективность переноса противоопухолевого иммунитета интактным мышам с помощью спленоцитов, полученных от мышей с неразвившейся опухолью после ксеногенной профилактической иммунизации.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В диссертационной работе найден подход к индукции в организме к собственным опухолевым антигенам иммунных реакций, при которых в организме животного-опухоленосителя создаются условия для активной противоопухолевой защиты, помогающие клеткам иммунной системы распознать опухолевые АГ и, тем самым, усилить формирование эффекторных цитолитических лимфоцитов, результатом действия которых будет распознавание и уничтожение опухолевых клеток в собственном организме. Разработка стратегии использования

ксеногенных тестикулярных АГ при терапевтических или профилактических иммунизациях в онкологии позволит предложить основу для разработки нового метода иммунотерапевтического лечения, в основе которого будет стимуляция специфического эффекторного звена иммунитета, отвечающего за распознавание опухолевых клеток и их элиминацию из организма.

В перспективе метод профилактической ксеногенной иммунизации открывает новый путь в предупреждении развития онкозаболевания у групп людей, риск развития которого может быть связан с профессиональной деятельностью или семейным анамнезом.

### **Методология и методы исследования**

Исследование выполнено на базе лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ. В работе применялись методы культивирования клеточных культур, визуальная оценка роста опухолей, функциональные пролиферативные тесты, иммуноферментный анализ, проточная цитофлуориметрия, использовалась компьютерная программа статистической обработки данных. Объектом исследования были выбраны мыши линии C57Bl/6. Предмет исследования - спленоциты и плазма крови интактных мышей и мышей-опухоленосителей меланомы B16 или карциномы LLC.

Мыши линии C57Bl/6 иммунизировались тестикулярными антигенами (сингенными ТАГ и ксеногенными ТАГ) с применением различных вариантов иммунизации (терапевтическая и профилактическая). Далее мышам вводились опухолевые клетки линии карциномы легких Льюиса (LLC) и меланомы B16. Оценка эффективности иммунизации измерялась по фиксации продолжительности жизни мышей-опухоленосителей с регистрацией 50% выживаемости (сутки, при которых в группах регистрировалась 50% выживших мышей). Параметры клеточного иммунитета экспериментальных групп мышей исследовали с помощью пролиферативного МТТ-теста. Концентрация цитокинов IL-10 и IFN $\gamma$  была



измерена в плазме крови экспериментальных мышей C57Bl/6 иммуноферментным методом, содержание регуляторных Т-клеток, Т-клеток памяти и перфорин-содержащих CD8<sup>+</sup> Т-клеток регистрировалось в спленоцитах с помощью методов проточной цитофлуориметрии. Оценка длительности противоопухолевого эффекта проводилась в модели LLC с профилактической иммунизации мышей C57Bl/6, согласно схеме, по которой мышам после иммунизации ксеногенными ТАГ вводили опухоль LLC через 1, 3, 6 месяцев и в дальнейшем регистрировали их выживаемость. Методику «переноса» противоопухолевого иммунитета проводили с помощью внутривенного введения спленоцитов или лейкоцитов лимфоузлов, полученных от иммунизированных ксеногенными ТАГ мышей без зарегистрированного роста опухоли LLC интактным мышам с регистрацией продолжительности жизни и 50% выживаемостью.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Предварительная иммунизации мышей ТАГ приводит к увеличению 50% выживаемости мышей-опухоленосителей карциномы LLC и изменяет параметры иммунитета: фиксируется уменьшение содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-регуляторных клеток, увеличение содержания CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> Т-клеток в популяции спленоцита, повышение уровня IFN $\gamma$  и снижение уровня IL-10 в плазме крови в сравнении с неиммунизированным опухолевым контролем.

2. Предварительная иммунизация мышей ксеногенными ТАГ индуцирует у них формирование стойкого противоопухолевого иммунитета, проявляющегося в отсутствии роста опухоли LLC у 40% животных после введения опухолевых клеток. У мышей с отсутствием роста опухоли задокументировано изменение параметров иммунитета, выражающееся в повышении уровня IFN $\gamma$  и снижении уровня IL-10 в плазме крови, повышении процентного содержания CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup> Т-клеток и снижении процентного содержания CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Т-

регуляторных клеток в популяции спленоцитов, при сравнении с аналогичными показателями опухолевого контроля.

### **Степень достоверности и апробация материалов диссертации**

Достоверность результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, обеспечивается комплексным подходом, включающим использование современных, научно обоснованных методов, полностью соответствующих поставленным целям и задачам работы. Применение сертифицированного и калиброванного оборудования, а также достаточный объем экспериментальной выборки с участием лабораторных животных гарантируют точность и воспроизводимость данных. Все научные положения и выводы подтверждены фактическим материалом, наглядно представленного в виде графиков и рисунков, что позволяет объективно оценить полученные результаты. Статистическая обработка данных выполнена с применением корректных методов анализа. Проведен детальный анализ экспериментальных данных, включая их сопоставление с актуальными научными публикациями, что подтверждает соответствие результатов современным исследованиям в данной области.

Основные научные положения и выводы диссертационной работы были доложены и обсуждены на:

1. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ в 2021 и 2023 годах;
2. Семинаре НИИФКИ в июле 2022 года;
3. XIV Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых "Авиценна-2023" (Новосибирск, Россия, 2023 г.) – 1 место;
4. XX Международной конференции «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, Россия, 2023 г.).

5. Результаты диссертационного исследования представляют практический интерес и были использованы в учебном процессе при подготовке лекционного материала и проведения научных семинаров для аспирантов и ординаторов, проходящих обучение в НИИФКИ.

### **Публикации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 5 научных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в разработке дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены автором лично. Выделение и культивирование клеток, манипуляции с лабораторными животными, оценка пролиферативного ответа, продукции цитокинов, постановка моделей продолжительности жизни мышей, длительности противоопухолевого иммунитета и переноса противоопухолевого иммунитета у мышей проводились лично соискателем на базе лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ. Автором лично заполнялись все протоколы исследования, выполнена статистическая обработка полученных результатов и интерпретация экспериментальных данных. Подготовка всех публикаций по выполненной работе проведена лично автором.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 120 страницах машинописного текста,

включающего 6 таблиц и 18 рисунков. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 147 литературных источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Противоопухолевый иммунитет

Основная идея о том, что опухолевые клетки являются носителями мутаций и, соответственно, могут быть мишенью для иммунной системы, была высказана еще в начале XX века П. Эрлихом [Ehrlich, 1909]. Далее эта теория развилась в концепцию иммунологического надзора высказанной Ф.М. Бернетом в 1957г [Burnet, 1957]. Данная концепция предполагает, что признаками клеток, подвергшихся трансформации и несущих мутации, являются некие антигены, на которые должна реагировать иммунная система, то есть по сути реагировать на «измененное свое». Созданию концепции иммунологического надзора способствовали более ранние открытия: обнаружение специфических трансплантационных антигенов (HLA) и роль Т-клеток в реакциях трансплантационного иммунитета. Количество ошибок, возникающих во время деления клеток организма, насчитывают около миллиона за сутки, но появление структур с потенциальным опухолевым ростом не соответствуют числу мутаций. Данное явление Ф.М. Бернет связал с участием иммунной системы, а точнее с наличием Т-клеток, распознающих и элиминирующих эти, уже антиген-чужеродные клетки.

Формирование специфического противоопухолевого Т-клеточного иммунитета подтверждали и многие эксперименты с ростом опухолей, связанных с химическим или вирусным канцерогенезом. Эксперименты с удалением тимуса у экспериментальных животных сопровождались восприимчивостью к возникновению и прогрессированию опухолей вирусного происхождения. Но эти результаты относились только к опухолям, индуцированным у экспериментальных животных, а данные о возникновении роста спонтанных опухолей у безтимусных

мышей не отличались от интактных групп, что звучало как противовес к концепции Ф.М. Бернета. У пациентов после операции по трансплантации органов или тканей и подвергшихся иммуносупрессивной терапии (что значило снижение активности Т-клеток) также не возникало спонтанного роста самых распространенных видов опухоли (рак желудка и толстого кишечника, рак легких, рак молочной железы ит.д.). Только после открытия в 70-е гг. XX века неспецифической цитотоксической активности макрофагов и NK-клеток смогли объяснить роль неспецифической естественной защиты иммунной системы против опухоли без участия Т-клеточной системы, а значит концепция иммунологического надзора изначально имела право на существование только с дополнением противоопухолевого ответа со стороны естественного иммунитета [Ярилин, 2021].

Таким образом, концепция иммунологического надзора дала новый шаг в изучении иммунологии опухоли и на данный момент явление противоопухолевого иммунитета определяют как постоянный контроль иммунной системой антигенного состава организма и дальнейшее уничтожение клеток, подвергшихся трансформации.

Формирование понятия «противоопухолевый иммунитет» дал толчок для изучения механизмов его реализации и изучения самой иммунологии опухоли. Наиболее важным аспектом в понимании противоопухолевого иммунитета стало то, что данные механизмы можно индуцировать и регулировать.

**NK и NKT-клетки.** NK-клетки (CD3-CD56+CD16+) – это популяция клеток, которая содержит в цитоплазме гранулы с перфорином и гранзимами, способствующими лизису опухолевых клеток. Именно NK-клетки являются ключевыми клетками в защите организма против опухоли со стороны врожденного иммунитета. NK1.1<sup>+</sup> T (NKT) - специализированные клетки популяции  $\alpha/\beta$  Т-клеток, которые одновременно экспрессируют некоторые рецепторы линии NK-клеток [Lanier, 2003].

На мышинных моделях была показана роль клеток НК и NKT в защите организма против новообразований и метастазов. На этих экспериментальных моделях с удалением субпопуляций лимфоцитов или специфических генов (имбредные мыши с нокаутом генов) было показано, что именно клетки НК CD3+ клетки участвуют в реакции отторжения тканей опухоли при распознавании стрессорных молекул MICA и MICB. Эти молекулы экспрессируются клетками опухоли, на которые НК-клетки без предварительной дифференцировки начинают производить клоны [Mark J. Smyth, 2000].

Клетки NKT обладают особым потенциалом секреции больших количеств цитокинов Th1 и Th2, но также могут опосредовать лизис через Т-клеточные рецепторы/TCR, NK1.1 или CD16 и элиминировать классические НК-чувствительные мишени.

**Макрофаги.** Макрофаги относятся к клеткам как естественного, так и приобретенного иммунитета. Данная популяция клеток известна своей фенотипической гетерогенностью и функциями (которые могут быть совершенно противоположны друг другу). Широкий спектр их функций включает фагоцитоз, презентацию антигена, секрецию цитокинов и компонентов комплемента и т.д. Макрофаги типа M1 обладают цитотоксичностью, которая играет значительную роль при уничтожении опухолевых клеток. Например, одним из механизмов является выделение макрофагами молекул, таких как ROS и NO, которые оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки в течение 1-3 суток. Другим механизмом является антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity/ADCC), которая требует меньше времени для уничтожения опухолевых клеток (обычно в течение нескольких часов) и требует участия противоопухолевых антител [Ковалева и др., 2022].

**γδТ-клетки.** γδТ-клетки являются Т-клетками, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR), состоящий из γ и δ цепей с разной структурной и функциональной

гетерогенностью. Свойства  $\gamma\delta$ T-клеток отражают свойства естественных киллеров (NK) клеток, экспрессирующих рецептор NKG2D и проявляющих цитотоксичность в отношении аномальных клеток, таких как инфицированные вирусом клетки и опухолевые клетки. Несколько исследований показали, что  $\gamma\delta$ T-клетки могут эффективно уничтожать широкий спектр опухолевых клеток как солидных, так и гемопоэтических злокачественных новообразований и что их проникновение в опухоли является наиболее положительным прогностическим маркером при многих видах рака [Yazdanifar et al., 2020].

Ключевую роль в адаптивном противоопухолевом иммунитете несет клеточный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов/CTL.

Для адаптивного иммунного ответа необходимо наличие Т-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие TCR, и дендритных клеток, которые являются главными антиген-презентирующими клетками (АПК) организма. При реализации противоопухолевого иммунитета происходит захват, процессинг опухолевого антигена и его дальнейшая презентация на поверхности АПК.

Распознавание пептидов (молекул антигена опухоли), их презентация дендритными клетками в составе молекул МНС-I и связывание их с переменными доменами TCR в комплексе инициирует активацию наивных Т-клеток, что, по сути, считается первым сигналом. Далее необходимо наличие второго сигнала - коstimуляторных молекул, которые инициируют иммунную реакцию. Если же коstimуляторные сигналы отсутствуют, взаимодействие Т-клеток с комплексом «МНС-опухолевый пептид» может привести к игнорированию, анергии или даже апоптотической смерти Т-клеток [Ярилин, 2021].

После удачного захвата, процессинга, презентации и активации первого и второго сигнальных путей необходимо присутствие определенных цитокинов для поддержания противоопухолевого иммунного ответа, что является активацией третьего сигнального пути. Наличие цитокинов играет ключевую роль в развитии, продолжительности или прекращении противоопухолевого иммунного ответа.



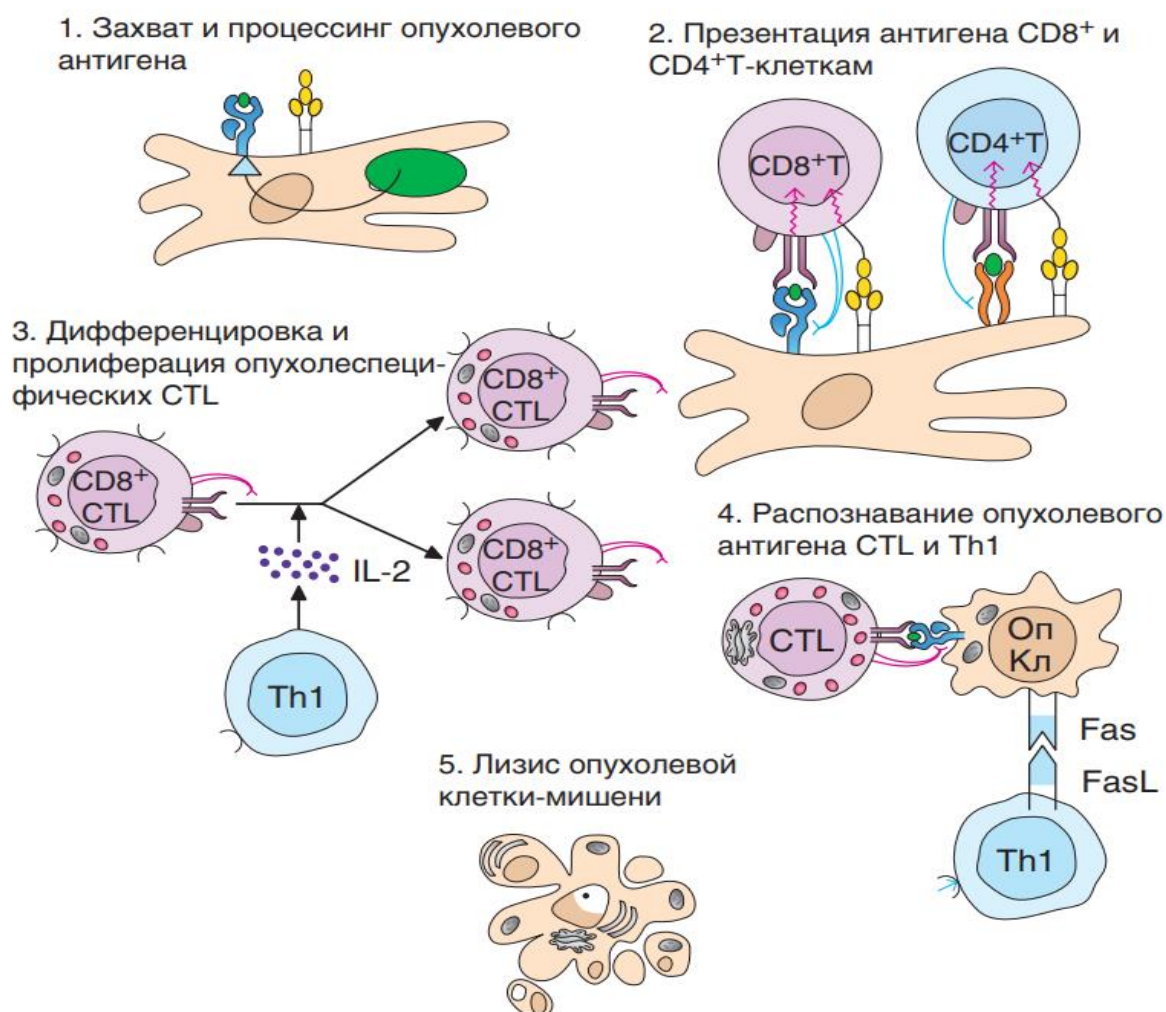


Рис. 1. Стадии эффективного адаптивного иммунного ответа на антигены опухолевой клетки Т-клетками. [Ярилин, 2021].

В активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток и экспансии их клонов принимают участие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты (Т-хелперы 1 типа) и вырабатываемый ими IL-2. Механизм действия цитотоксических Т-лимфоцитов сходен с НК-клетками: они используют классический перфорин-гранзимовый механизм контактного цитолиза, но в отличие от них CTL также используют Fas-зависимую индукцию апоптоза опухолевых клеток.

В реализации самого Т-клеточного перфорин-гранзимового цитолиза можно выделить 4 этапа: распознавание опухолевой клетки, формирование конъюгата

CTL – клетка-мишень с их поляризацией, экзоцитоз гранул CTL, индукция апоптоза клетки-мишени.

Существует еще один механизм контактного цитолиза CTL, который происходит не за счет экзоцитоза гранул, а реализуется через Fas-зависимый цитолиз. Если на поверхности трансформированной опухолевой клетки присутствует Fas-рецептор, то происходит его распознавание Fas-лигандом, экспрессируемого CTL, что активирует необратимый рецепторный механизм апоптоза с участием каспазы 8 [Ярилин, 2021].

После выполнения своих функций CTL сами подвергаются апоптозу, и в то же время происходит формирование популяции адаптивного иммунитета – CD8+ Т-клеток памяти, которые могут в дальнейшем активироваться как цитотоксические Т-клетки при повторной встрече со специфическим антигеном опухоли.

## **1.2 Микроокружение опухоли и методы избегания противоопухолевого иммунитета**

Опухолевая прогрессия представляет собой многоступенчатый процесс, проходящий от единственной трансформированной клетки до целого множества неконтролируемо пролиферирующих клеток с целой серией молекулярно-генетических и морфологических изменений, в результате которого образуется устойчиво сформированная опухоль. В результате многочисленных исследований онкологических процессов было сформулировано понятие о опухолевом микроокружении (tumor microenvironment/TME) или опухолево-иммунном микроокружении (tumor-immune microenvironment/TIME) [Ramos et al., 2022].

Опухолево-иммунное микроокружение – это сложная система, состоящая из опухолевых клеток, иммунных клеток, стромальных клеток, фибробластов, внеклеточного матрикса и кровеносных сосудов, в которой между клетками различных типов происходят динамические и двунаправленные взаимодействия посредством коммуникационных сигналов, таких как секретируемые молекулы, белки или везикулы. Сосуществующие и конкурирующие взаимодействия между опухолевыми клетками, окружающей тканью и проникающими врожденными и адаптивными иммунными клетками приводят к созданию уникальной среды, которая варьируется в зависимости от типа опухоли и высоко адаптирована к поведению опухоли.

Различные механизмы, которыми располагают опухолевые клетки, позволяют им избегать иммунологического надзора и направлены на затруднение распознавания чужеродности клеток и запуска иммунологических процессов, поддерживающих жизнедеятельность опухоли.

Опухолевые клетки в результате различных модификаций перестают экспрессировать РАР, что приводит к снижению иммуногенности опухоли. Поскольку презентация АГ опухоли Т-клеткам происходит через DC, которые не

стимулировались в провоспалительных условиях, индуцированного PAMP, такие клетки секретируют мало IL-12, слабо экспрессируют молекулы CD80 и CD86 и могут вырабатывать IL-10. Происходит прерывание первого сигнала (презентации АГ Т-клеткам), что вызывает анергию, а не активацию Т-клеток [Ferrone et al., 2007].

Слабая иммуногенность опухолевых антигенов также относится к процессу затруднения распознавания опухоли. На поверхности опухолевых клеток происходит модификация и модуляция эпитопов антигенов. В результате клетка может «потерять» антиген полностью, либо может стать «неклассическим» антигеном. Примером «неклассического» антигена являются комплексы МНС-I. При потере МНС-I (А, В и С) , но сохранении неклассических (G или E) на поверхности опухолевой клетки, ни CD8+-Т-клетки (комплекс антигена с молекулой МНС-I отсутствует), ни NK-клетки (блокировка неклассическими МНС-I) не могут распознать их [Ярилин, 2021].

Другие механизмы относятся к модификации рецепторов на поверхности опухолевых клеток, связанных с запуском/блокировкой иммунологических процессов.

Блокировка гуморального иммунитета может происходить из-за другого механизма избегания - секреции растворимых форм антигенов, которые способны нейтрализовать антитела против опухоли. Экспрессия рецепторов к ростовым факторам на поверхности опухолевых клеток приводит к неконтролируемому росту опухоли, потеря рецептора к TNF - к резистентности к апоптозу опухолевых клеток (иммортализация), повышенная экспрессия FasL – к апоптозу CTL, NK-клеток [Цыган, 2004].

Двойственность функций клеток естественного и адаптивного систем иммунитета проявляется именно в микроокружении опухоли и в ней преобладают клетки с проопухолевой активностью.

**Макрофаги.** Ассоциированные с опухолью макрофаги (tumor-associated macrophages/ТАМ) — это макрофаги, которые участвуют в формировании микроокружения опухоли. ТАМ способствуют росту опухоли, инвазии, метастазированию и лекарственной устойчивости. MDSCs (связанные с моноцитами клетки-супрессоры миелоидного происхождения) в настоящее время известны как другой основной циркулирующий предшественник ТАМ. MDSCs представляют собой тип миелоидных лейкоцитов, который связан с иммуносупрессией.

Основываясь на поверхностных маркерах Ly6C+/Ly6C- и Ly6C-/Ly6G+, MDSC можно разделить на MDSC, связанные с моноцитами (M- MDSC), и MDSC, связанные с гранулоцитами (G-MDSC). M-MDSCs индуцируются в ТАМ различными хемокинами. Кроме того, M-DSCs воздействует на Treg посредством молекулярных взаимодействий клеточной поверхности, способствуя индукции Treg, включая CD40/CD40L, PD-1/ PD-L1 и CD80/CTLA-4. Экспрессия CD40 на M-DSCs необходима для индуцирования толерантности к Т-клеткам и накопления Tregs [Pan et al., 2020].

M2-макрофаги (M2-МФ) экспрессируют большое количество рецепторов-мусорщиков, что связано с интенсивной экспрессией IL-10, IL-1 $\beta$ , VEGF и матриксного металлопротеина (MMP). M2-МФ выполняют функцию удаления остатков, чем способствуют ангиогенезу, реконструкции тканей и восстановлению повреждений, а также способствуют онкогенезу. Многие исследования показали, что TAMs могут экспрессировать различные цитокины, которые стимулируют пролиферацию и выживание опухолевых клеток, включая эпителиальный фактор роста (EGF), фактор роста тромбоцитов (PDGF), TGF- $\beta$ 1, фактор роста гепатоцитов (HGF), лиганды роста эпителия семейства рецепторов факторов (EGFR) и основной фактор роста фибробластов (BFGF) [DeNardo et al., 2019].

**Т-регуляторные клетки.** Регуляторные Т-клетки (Treg) являются важным механизмом регуляции гомеостаза иммунной системы и иммунной толерантности

организма, играют решающую роль в регуляции опухолевого иммунитета и могут ингибировать активацию и дифференцировку Т-клеток-хелперов CD4<sup>+</sup> и цитотоксических Т-клеток CD8<sup>+</sup> [Josefowicz et al., 2012].

В микроокружении опухоли Treg клетки обладают иммуносупрессивной способностью, ингибируют противоопухолевый иммунитет и способствуют развитию опухоли. Treg подавляют функцию иммунных эффекторных клеток с помощью различных механизмов и являются одним из ключевых факторов ускользания опухоли из-под иммунного надзора организма [Budhu et al., 2017]. В соответствии с их биологическими характеристиками Treg можно разделить на две группы: естественные регуляторные Т-клетки (естественные Treg, nTreg) и индуцируемые регуляторные Т-клетки (iTregs). Обе группы Tregs могут универсально экспрессировать Foxp3. nTregs естественным образом развиваются в тимусе, и их ингибирующий эффект достигается за счет межклеточного контакта. Их основная функция заключается в поддержании нормальной иммунной толерантности и контроле воспалительной реакции, которая может быть активирована и стабилизирована NF-κB. Тимические nTreg генерируются с помощью двух различных путей развития, включающих предшественники CD25<sup>+</sup> Treg (CD25<sup>+</sup> TregP-клетки) и предшественники Foxp3<sup>lo</sup> Treg (Foxp3<sup>lo</sup> TregP-клетки). CD25<sup>+</sup> TregP-клетки демонстрируют более высокие показатели апоптоза и взаимодействуют с аутоантигенами с большей аффинностью, чем клетки Foxp3<sup>lo</sup> TregP, и имеют репертуар TCR и транскриптом, отличные от таковых у клеток Foxp3<sup>lo</sup> TregP. CD25<sup>+</sup> TregP-клетки и Foxp3<sup>lo</sup> TregP-клетки образуются путем отрицательной и положительной селекции соответственно [Wing et al., 2019].

iTregs являются периферическими наивными Т-клетками, индуцированными сигналами микроокружения опухоли (включая опухолевые антигены, цитокины (такие как TGF-β) и другие растворимые молекулы). TCR опухолевых резидентных iTreg различается, но совпадает с TCR циркулирующих Treg. TCR, выделенные из

Tregs, проявляют специфическую реактивность против аутологичных опухолей и мутировавших неоантигенов, что приводит к их активации и экспансии в ТМЕ. iTreg экспрессируют GzmB (гранзим В), что приводит к элиминации эффекторных клеток с помощью гранзимов. nTreg могут убивать клетки-мишени с помощью гранзима А (GzmA) и перфорины. Кроме того, Tregs управляют состоянием покоя Т-клеток памяти путем подавления эффекторных программ и программ пролиферации через ингибирующий рецептор CTLA-4 [Kalia et al., 2015].

Tregs влияют на функцию эффекторных клеток, вмешиваясь в клеточный метаболизм, то есть конкурируя с эффекторными Т-клетками и потребляя большое количество IL-2, что приводит к дефициту IL-2 в ТМЕ, тем самым ингибируя рост эффекторных Т-клеток. Tregs способствуют выработке аденозина в ТМЕ путем продуцирования внеклеточных ферментов CD39 и CD73. CD39 и CD73 являются нуклеазами, конституционально экспрессируемыми в Treg человека и мыши. Они могут гидролизовать внеклеточную АТФ или АДФ в АМФ и продуцировать аденозин. Аденозин является известной ингибирующей молекулой, которая передает ингибирующие сигналы через различные рецепторы аденозина (A1, A2A, A2B и A3). Tregs индуцируют ингибирующие и антипролиферативные эффекты путем связывания с рецептором аденозина A2A на поверхности эффекторных клеток [Ohta et al., 2012]. Дифференцировка и пролиферация Tregs оказывает регуляторное воздействие на DC. Treg-экспрессирующий CTLA-4 объединяется с CD80 и CD86 на поверхности DC, подавляя передачу сигналов. Молекулы гена активации лимфоцитов 3 (LAG3), экспрессируемые Tregs, могут ингибировать экспрессию молекул МНС II в DC. Толерантность DC может быть индуцирована любым из этих двух методов, причем последний дополнительно ингибирует способность Т-клеток посредством IDO. Кроме того, Tregs индуцируют анергию CD4<sup>+</sup> NKT-клеток и подавляют цитотоксические функции NKT-клеток посредством межклеточного контакта и опосредуются нарушением созревания DC [Kalia et al., 2015]. В микроокружении опухоли наблюдается высокая экспрессия

IDO, что приводит к снижению уровня триптофана и накоплению кинуренина, ингибирует активацию Т-клеток и индуцирует продукцию Tregs.



### 1.3 Опухоль-ассоциированные антигены

В начале 20 века шотландский эмбриолог Джон Брэд впервые предположил, что рак возникает в результате миграции зародышевых клеток, которые никогда не достигали гонад во время эмбриогенеза, что стало основой трофобластической теории рака [Gurchot, 1975]. Придерживаясь модели трофобластической теории рака можно провести множество параллелей между процессами эмбриогенеза, сперматогенеза и онкогенеза. В подтверждение теории Дж. Брэда было доказано, что выработка хорионического гонадотропина и других гормонов трофобластов происходит не только при беременности, но и при онкологических заболеваниях. Эти данные указывают на связь между развитием зародышевых клеток и прогрессированием опухоли. Последующие исследования позволили идентифицировать группу белков, которые экспрессируются исключительно в трофобластах, зародышевых клетках и опухолевых клетках – тестикулярные антигены (ТАГ) или cancer/testis antigens (СТА).

ТАГ были впервые идентифицированы с помощью аутологичного генотипирования. Появление высокопроизводительной ПЦР и методов секвенирования позволило идентифицировать группу ТАГ. В настоящее время существует теория, согласно которой реактивация обычно подавляемой программы гаметогенеза в соматических клетках может быть движущей силой онкогенеза, и ТАГ могут играть роль в передаче сигналов по путям, ведущих к определенному фенотипу рака [Old, 2001; Hanahan, 2022].

В зависимости от расположения в хромосоме ТАГ делятся на две группы: X-ТАГ антигены, расположенные на X-хромосоме, и не-X-ТАГ, расположенные на аутосомах. Большинство антигенов, распределенных вдоль X-хромосомы (область Xq21-q28), организованы в кластеры генов, состоящие из различного числа прямых и инвертированных повторов, тогда как гены, отличные от X-ТАГ, в основном являются генами с одной копией [Shuvalov et al., 2020].

Гены, кодирующие антигены Х-ТАГ, обычно экспрессируются в сперматогониях и состоят из нескольких смежных дубликатов небольших участков генома с более 99% сходством копий и являются ампликоническими генами. При этом 31% человеческих Х-ампликонических генов являются ортологичными генами у мышей. Примерно 10% генов на Х-хромосоме принадлежат к семействам Х-ТАГ [Gordeeva, 2018].

Аутосомные не-Х ТАГ гены распространены по всему геному и, как правило, не образуют семейства генов и не находятся в геномных повторах. Не-Х ТАГ экспрессируются преимущественно на более поздних стадиях сперматогенеза (в сперматоцитах) [Aurrière et al., 2021].

База данных CTD (Comparative Toxicogenomics Database/ база данных сравнительной токсикогеномики) идентифицировала в общей сложности 276 генов ТАГ, из которых 127 (46%) расположены на Х-хромосоме, тогда как остальные распределены по аутосомам и Y-хромосоме [Gordeeva, 2018]. Антигены, которые могут использоваться в разработке противораковых вакцин, в основном являются Х-ТАГ.

Экспрессия некоторых ТАГ начинается на самых ранних стадиях развития [De Plaen et al., 1999]. Экспрессия генов *PRAME*, *SSX*, *GAGE* и *MAGEA* была обнаружена в ооцитах человека, а также в пре- и постимплантационных эмбрионах [Lifantseva et al., 2011]. Экспрессия генов семейства *MAGE* была обнаружена в ооцитах и эмбрионах мышей на стадиях морулы, бластоцисты и гаструлы [De Plaen, 1999]. Однако большинство ТАГ экспрессируются в эмбриональных клетках и экстраэмбриональных структурах (трофобласт и эктоплацентарный конус).

Плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека и мыши, выделенные из ранних эмбрионов на стадии бластоцисты, были использованы в качестве моделей раннего развития *in vitro* и спецификации линии для анализа паттернов экспрессии ТАГ в плюрипотентных клетках и их дифференцированных

клеточных производных [Gaspar et al., 2017]. Недифференцированные ЭСК человека экспрессировали несколько ТАГ, такие как *MAGE-A3*, *-A6*, *-A4*, *-A8*, *POTE-2* и *GAGEs* [Bera et al., 2008]. Профили экспрессии ТАГ ЭСК человека и мыши остаются стабильными во время пассирования клеток. По крайней мере, экспрессия *MAGE-A3*, *MAGE-A6* и *MAGE-A4* может быть характерна для недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Аналогичным образом, недифференцированные ЭСК мыши экспрессируют гены *Mage-a* и *Mage-b*, которые могут быть вовлечены в самообновление и дифференцировку [Gaspar et al., 2017]. Экспрессия ТАГ была также обнаружена у мультипотентных предшественников зародышевых и соматических линий во время развития человека и животных. Первыми ТАГ, обнаруженными в мужских и женских половых железах плода, были белки *GAGE*, которые экспрессировались в половых клетках с 5 по 8 неделю беременности. Экспрессия *MAGE-A1*, *MAGE-A4* и *NY-ESO-1* в семенниках и яичниках плода начинается позже, чем экспрессия *GAGE*, и заканчивается на разных стадиях развития в мужских и женских половых железах плода [Gjerstorff et al., 2007]. Более того, *MAGE-A4*, *MAGE-A1* и *NY-ESO-1* демонстрируют различные временные паттерны экспрессии в процессе развития мужских и женских половых клеток. Паттерны экспрессии *Mage-a*, *Mage-b* и *Mage-d* в эмбриональных гонадах мыши также демонстрируют участие ТАГ в развитии зародыша мыши. *Mage-b4* демонстрирует различные паттерны экспрессии в мужских и женских половых клетках плода: он подавляется на мейотических стадиях сперматогенеза, но продолжает экспрессироваться в женских половых клетках на протяжении всего мейоза [Osterlund et al., 2000]. При этом нокаут кластера генов *Mage-a* (*Magea1*, *Magea2*, *Magea3*, *Magea5*, *Magea6* и *Magea8*) не оказывает существенного влияния на развитие и фертильность взрослых мышей, хотя семенники мышей были меньше, а уровень апоптоза был выше среди мужских половых клеток [Hou et al., 2016]. Дифференциальная экспрессия *Mage-a2,4,6,8,10* и *Mage-b1,3,16,18* была обнаружена при развитии соматических органов мыши

эктодермального (мозг), мезодермального (сердце) и энтодермального (печень) происхождения, но их экспрессия была подавлена в этих органах у взрослых животных.

Опухолевые клетки быстро делятся, и результат их деления важен для выживания и продолжения клеточного цикла. Многие ТАГ вовлечены в процесс отбора и выживания опухолевых клеток благодаря участию в предотвращении катастрофических митотических или геномных событий. ТАГ абберрантно экспрессируются в раковых клетках, повторно активируя гаметогенную программу во время аномального гистогенеза раковых тканей. Опухолевые клетки часто повторно активируют экспрессию генов, регулирующих нормальное развитие соматической и зародышевой линий [Simpson et al., 2005].

Не-Х ТАГ *TTK* (*CT96*) преимущественно экспрессируется в яичке и тимусе, где клетки быстро пролиферируют. Повышенная экспрессия *TTK* была обнаружена при опухоли молочной железы, поджелудочной железы, печени и легких. При исследовании гомолога *TTK* у земноводных выяснили, что данный антиген необходим для поддержания целостности контрольной точки митоза, а именно для активного удержания специальных белковых структур, к которым крепятся волокна веретена деления, что обеспечивает переход клеточного цикла в анафазу и защиту от анеуплоидии. Ингибирование *TTK* в клетках рака легких приводило к индукции полиплоидии и апоптозу [Mills et al., 1992].

С помощью скрининга РНК-интерференции были идентифицированы ТАГ, регулирующие клеточный цикл: *ACRBP* (белок, связывающий акрозин); формирующий биполярные веретена вследствие его регуляции ядерного митотического аппарата (*NUMA*); *BAP31* (белок 31, связанный с В-клеточным рецептором), участвующий в клеточном цикле и сборке цитоскелета; centrosomal белок *55-CER55* и *фосфотеин1-MPHOSP1*, участвующий в разрушении клеток во время цитокинеза ит.д [Whitehurst et al., 2010].

Кроме митотического клеточного деления ТАГ также участвуют в мейозе, так как экспрессируются в зародышевых клетках, где происходит исключительно мейотическое клеточное деление. Было показано, что такие ТАГ, как *SPO11*, *TEX15*, *SYCP1/3*, *HORMAD1/2* и *TEX1* необходимы для мейоза. Экспрессия же этих генов в соматических или опухолевых клетках коррелирует с онкогенезом, прогрессированием опухоли и с резистентностью к противоопухолевой терапии.

Такие антигены как *SPO11*, *TEX15*, *SYCP1/3* и *HORMAD1/2* вовлечены в процессы повреждения ДНК и репарации во время мейотического деления. Например: *SPO11* является компонентом синаптонемного комплекса, и его роль включает образование двухцепочечных разрывов для облегчения событий рекомбинации во время мейоза. Неправильная экспрессия *TEX12* в соматических клетках может способствовать патологической амплификации и дисфункции centrosom, что приводит к нестабильности генома и прогрессированию рака [Sandhu et al., 2021]. *SYCP1/3* и *HORMAD1/2* напрямую влияют на реакцию повреждения ДНК. *SYCP1/3* нарушает функцию *BRAC2* (ген рака молочной железы 2) и инактивирует гомологичную рекомбинацию, приводящую к хромосомной нестабильности, а *HORMAD1/2* поддерживает репарацию ДНК и клеточное деление при немелкоклеточном раке легких [Keeney et al., 1997; Yang et al., 2008; Lin et al., 2017; Liu et al., 2022].

Комбинированное воздействие ТАГ на митоз, мейоз и репарацию ДНК подразумевает, что их экспрессия в опухолевых клетках может приводить к нестабильности генома и канцерогенным мутациям. В дополнение к стимулированию онкогенеза, ТАГ, участвующие в репарации ДНК, или реакции повреждения ДНК (DNA-damage response/DDR), также повышают устойчивость раковых клеток к препаратам или терапевтическим методам, нацеленным на DDR [Luo et al., 2021]. Например, было установлено, что уровень экспрессии *GAGE* был значительно выше в опухолях пациентов, резистентных к лучевой терапии. Таким

образом, изучение роли ТАГ может быть использовано при разработке диагностических тест-систем и в разработке стратегий повышения чувствительности к терапии [Nin et al., 2021].

При идентификации новых генов ТАГ и классификации семейств ТАГ опираются на гомологию их геномных и белковых последовательностей, а также паттерны экспрессии генов [Huang, 2021]. Характерной особенностью генов ТАГ является высокая внутри- и межвидовая гомология членов семейства ТАГ. Например, в геномах человека, приматов и грызунов было идентифицировано более 30 белок-кодирующих генов *MAGE*, а идентичность ортологических последовательностей составляла от 40% до 80%. Гомология между представителями человеческих семейств *MAGEA*, *MAGEB* и *MAGEC* колеблется от 60% до 83% для последовательностей кДНК и от 47% до 69% для белковых последовательностей. Идентичность кДНК и белковых последовательностей между представителями мышинных семейств *Mage-a* и *Mage-b* шире: 57-99% и 36-99% соответственно (таблица 1) [Gordeeva, 2018].

Большинство белков *MAGE* включают консервативный домен гомологии *MAGE* (MHD), содержащий 200 аминокислот, за исключением белков *MAGED*, которые состоят из двух MHD [Yang et al., 2020]. Основываясь на данных из HomoloGene Resource NCBI, представители *MAGED* считаются наследственными и наиболее консервативными с наивысшей гомологией последовательностей генов и белков между человеком и другими видами. Но в то же время высокая гомология членов семейства ТАГ затрудняет анализ паттернов экспрессии отдельных генов и создает проблемы для разработки таргетной иммунотерапии, основанной на отдельных антигенах. Структурное разнообразие членов семейств ТАГ позволяет им участвовать в регуляции различных клеточных процессов во время развития, поддержании тканевого гомеостаза и онкогенеза.

Таблица 1. Гомология членов семейства MAGE у человека и мыши [Gordeeva, 2018].

Ген человека	Локация	Идентичность РНК/белка между первым и другими членами подсемейства	Ген мыши	Локация	Идентичность РНК/белка между первым и другими членами подсемейства
MAGEA1 /CT1.1	Xq28		Magea1	X F3; X 72.38 cM	
MAGEA2 /CT1.2	Xq28	83% / 67%	Magea2	X F3; X 72.38 cM	99% / 98%
MAGEA3 /CT1.3	Xq28	83% / 67%	Magea3	X F3; X 72.38 cM	97% / 94%
MAGEA4 /CT1.4	Xq28	85% / 75%	Magea4	X A7.3; X 37.2 cM	85% / 71%
MAGEA5 /CT1.5	Xq28	85% / 68%	Magea5	X F3; X 72.38 cM	96% / 96%
MAGEA6 /CT1.6	Xq28	83% / 68%	Magea6	X F3; X 72.38 cM	95% / 94%
MAGEB1 /CT3.1	Xp21.2		Mageb1	X C2; X 40.59 cM	
MAGEB2 /CT3.2	Xp21.2	82% / 63%	Mageb2	X C1; X 40.35 cM	99% / 100%

MAGEB3 /CT3.5	Xp21.2	73% / 53%	Mageb3	2 E5; 2	98% / 97%
MAGEB4 /CT3.6	Xp21.2	81% / 69%	Mageb4	X C1; X	62% / 46%
MAGED1	Xp11.22		Maged1	X C3; X 41.56cM	
MAGED2	Xp11.22	50% / 67%	Maged2	X; X F3	55% / 66%
MAGED3/TRO	Xp11.21	55% / 69%	Maged3/ Tro	X; X F3	50% / 67%

Экспрессия некоторых ТАГ (*PAGE2*, *PAGE2* и *SPANX-B*) может повышаться в результате деметилирования их промоторов во время дифференцировки опухолевых клеток, что приводит к модуляции экспрессии ТАГ. Повышенную регуляцию экспрессии ТАГ связывают с более быстрым ростом опухоли, более продвинутой стадией опухоли и агрессивным типом [Scanlan et al., 2004]. Исследования сверхэкспрессии и нокдауна показали, что экспрессия ТАГ может влиять на прогрессирование опухоли *in vivo*. Усиленный рост опухоли и большое количество метастазов в легких наблюдались в мышинных ксенотрансплантатах клеток рака щитовидной железы человека, сверхэкспрессирующих *MAGEA3*. Нокдаун *MAGEC2* и *Mage-b* в клетках меланомы человека и мыши приводил к снижению образования опухоли и роста *in vivo* у мышей nude и сингенных мышей [Bhatia et al., 2013].

Отличительная роль ТАГ в канцерогенезе заключается в их способности стимулировать спонтанный иммунный ответ у онкологических больных. Белки ТАГ обрабатываются протеасомой, а некоторые эпитопы представлены молекулами МНС класса I на поверхности раковых клеток [Schooten et al., 2018]. Иммуногенные свойства (т.е. распознавание CD4 и CD8 Т-лимфоцитами и синтез антител) были определены для 19 из 44 семейств ТАГ [Scanlan et al., 2004]. Как



гуморальный, так и Т-клеточный иммунные реакции были обнаружены для антигенов *MAGEA*, *NY-ESO-1* и *SSX*. Таким образом, хотя ряд исследований предполагает, что ТАГ могут обладать онкогенными функциями, вклад различных семейств ТАГ в инициацию и прогрессирование опухоли требует дальнейшего изучения.

Частота экспрессии ТАГ сильно варьируется в зависимости от типа опухоли и, таким образом, обладает диагностической и прогностической значимостью. Меланома, опухоли печени, легких и яичников демонстрируют высокую частоту экспрессии ТАГ, опухоли молочной железы и предстательной железы демонстрируют умеренную частоту экспрессии ТАГ, а опухоли толстой кишки, почек и поджелудочной железы демонстрируют низкую частоту экспрессии ТАГ [Scanlan et al., 2004]. Эти различия могут указывать на специфичность паттернов экспрессии ТАГ в опухолях различного гистологического происхождения и гистопатологии. При исследовании механизма действия *COX6B2* (белок, аберрантно экспрессирующийся при НМРЛ) было показано, что *COX6B2* усиливает окислительное фосфорилирование митохондрий в опухолевых клетках. Эта активность ускоряет пролиферацию *in vitro* и *in vivo*. Важно отметить, что гипоксия усиливает экспрессию *COX6B2*, что дает селективное преимущество при пролиферации в условиях низкого содержания кислорода. В совокупности это исследование демонстрирует способность опухолевых клеток интегрировать первичные генные продукты в свою регуляторную среду в качестве средства, способствующего пролиферации [Cheng et al., 2020].

Многочисленные исследования демонстрируют, что экспрессия ТАГ в различных типах опухолей может быть ценным прогностическим параметром в отношении выживаемости пациентов [Yang et al., 2020]. Они указывают на то, что высокая экспрессия одного или нескольких ТАГ в определенных опухолях была связана с неблагоприятным прогнозом (таблица 2).

Таблица 2. Экспрессия ТАГ, клинико-патологические параметры и прогноз при различных типах опухоли [Gordeeva, 2018].

Тип опухоли	ТАГ	Экспрессия (%)	Клинико-патологические корреляции	Прогноз
Опухоли головного мозга				
Астроцитомы	<i>M-TES-14/SCP-1</i>	40	IV стадия астроцитомы / <i>MAGE3, SCP-1</i>	Низкая выживаемость при <i>MAGE, SSX, SCP1</i>
	<i>SSX-4</i>	26		
Глиома, глиобластома	<i>ACTL8</i>	57		Выживаемость выше при <i>ACTL8, OIP5, XAGE3</i> и <i>CTCFL</i> при глиобластомах
	<i>OIP5</i>	54		
	<i>XAGE3</i>	44		
	<i>CTCFL</i>	15		
Нейробластома	<i>NY-ESO-1</i>	25	Стадия опухоли при нейробластоме / <i>NY-ESO-1</i>	Ремиссия при <i>NY-ESO-1</i> при нейробластомах
Опухоль молочной железы	<i>MAGE-A1-4,6,12</i>	6-31	Степень дифференцировки, риск рецидива	Низкая выживаемость
	<i>NY-ESO-1</i>	10		
	<i>SCP-1</i>	34		
	<i>SSX-1,2,4</i>	1-20		

	<i>BAGE</i>	8		
	<i>LAGE-1</i>	3		
Опухоли ЖКТ				
Рак пищевода, желудка, колоректальный рак	<i>MAGEA1-3</i>	21-46	Метастазы	Низкая выживаемость, высокий риск рецидива опухоли
	<i>LAGE-1</i>	3-40		
	<i>NY-ESO-1</i>	2-24		
	<i>SSX-1,2,4</i>	2-21		
	<i>SCP-1</i>	2-24		
	<i>PAGE-4</i>	21-39		
Опухоли легких	<i>MAGEA1,3,4,10</i>	20-55	Стадия опухоли/ <i>MAGE, NY-ESO-1</i>	Низкая выживаемость
	<i>MAGEB1, B2</i>	14-45		
	<i>MAGEC1</i>	19		
	<i>NY-ESO-1</i>	11-27		
	<i>KK-LC-1</i>	33		
	<i>SSX-2,4</i>	10-14		
	<i>LAGE-1</i>	32		
Меланома	<i>MAGEA1-4</i>	11-76	Высокая степень злокачественности опухоли и метастазы/ <i>MAGE</i>  Метастазы/ <i>NY-ESO-1</i>	Низкая выживаемость, прогрессирование опухоли. Нет корреляции между общей выживаемостью и <i>NY-ESO-1</i>
	<i>MAGEB1,2</i>	22		
	<i>MAGEC1,2</i>	17-33		
	<i>NY-ESO-1</i>	13-32		
	<i>SSX-2</i>	50		

Опухоли поздних стадий с метастазированием демонстрируют более высокие частоты экспрессии ТАГ и коэкспрессии нескольких ТАГ, чем опухоли с ранними стадиями. Частота экспрессии генов *MAGEA* была значительно выше на поздних стадиях (II-IV) меланомы, НМРЛ, астроцитомы, карциномы молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы [Brasseur et al., 1995; Otte et al., 2001; Zhao et al., 2004; Sahin et al., 2000]. Коэкспрессия различных СТА при одном типе рака (особенно Х-СТА), наблюдалась в отношении пациентов с множественной миеломой, экспрессирующей более 6 СТА, и которая имеет гораздо более неблагоприятный прогноз, чем у пациентов с экспрессией менее 6 СТА [Makani et al., 2021].

Неблагоприятный прогноз характерен для опухолей, экспрессирующих семейство *MAGE*, у пациентов с опухолями легких, меланомой, внутripеченочной холагиокарциномой, опухолями молочной железы или яичников [Gao et al., 2020]. Экспрессия *NY-ESO-1* коррелирует с плохим прогнозом выживаемости при множественных опухолях, включая меланому и карциному легких, пищевода, печени, желудка, простаты, яичников и мочевого пузыря [Raza et al., 2020]. Лучшие показатели выживаемости были обнаружены у пациентов с аденокарциномами легкого, высоко экспрессирующими *MAGE-A3/4*. Экспрессия *ACTL8*, *OIP5*, *XAGE3* и *CTCF* в глиобластомах была связана со значительно лучшими показателями общей выживаемости.

Переменные и даже противоречивые данные о профилях экспрессии ТАГ в различных опухолях и их корреляции с клинико-патологическими параметрами и общим прогнозом выживаемости, а также предполагаемым исходом иммунотерапии ТАГ могут быть объяснены гетерогенностью проанализированных образцов опухоли.

#### 1.4 Противоопухолевая вакцинация.

Иммунотерапия опухоли была признана журналом Science Magazine научным прорывом в 2013 году. Иммунотерапия опухоли представляет собой радикальное отклонение от классических подходов к терапии опухоли, представленных лучевой терапией, химиотерапией или таргетной терапией. Этот метод терапии воздействует на опухоль лишь косвенно, усиливая или восстанавливая способность различных компонентов иммунной системы распознавать опухолевые клетки как отличные от нормальных клеток.

В зависимости от различных методов создания, противоопухолевые вакцины делятся на четыре категории: вакцины на клеточной основе, вакцины на вирусной основе, вакцины на пептидной основе и вакцины на основе нуклеиновых кислот.

*Вакцинами на клеточной основе* являются вакцины, использующие цельные клетки в качестве носителей антигена и их активность основана на роли клеток в иммунной системе. Например, вакцины на основе DC, которые являются профессиональными АПК в организме. В большинстве случаев DC необходимы для презентации опухолевых антигенов при вакцинации. Следовательно, это эффективный способ для опухолевого иммунитета импортировать связанные с опухолью антигены в DC, чтобы презентировать антиген и активировать Т-клетки.

Для всех клеточных вакцин против опухолевых клеток критически важно повысить иммуногенность. Живые опухолевые клетки обладают низкой иммуногенностью из-за секреции растворимых факторов, которые подавляют функции клеток иммунной системы, поэтому принимаются определенные меры для повышения иммуногенности опухолевых клеток и повышения эффективности вакцин против целых опухолевых клеток. Например, мертвые клетки лучше индуцируют иммунный ответ, чем живые клетки. Гибель опухолевых клеток может спровоцировать адаптивный иммунный ответ. Способы индуцирования иммуногенной клеточной гибели различны: использование онколитических

вирусов, наночастиц, активирующих гены интерферона, мертвых опухолевых клеток, индуцированных фотосенсибилизацией и RAS-индуцированным ферроптозом [Efimova et al., 2020].

Молекулы, связанные с иммунным ответом, также могут принимать участие в усилении презентации антигена. Например, IL-21 и IL-7 являются двумя важнейшими факторами, которые могут синергически усиливать Т-клеточный ответ. Цельноопухолевые клеточные вакцины с генетической модификацией IL-21 и IL-7 продемонстрировали высокую эффективность [Gu, 2016]. Наконец, более распространено сочетание цельной вакцины против опухолевых клеток и ингибиторов контрольных точек иммунитета. Она предназначена для блокирования путей, которые подавляют активность самореактивных Т-клеток. Уже доказано, что PD-L1 и CTLA-4 могут усиливать терапевтическую противоопухолевую вакцинацию на клеточной основе [Srinivasan et al., 2018].

Оптимизация иммуно-клеточных вакцин, особенно DC-вакцин, имеет потенциал за счет разновидностей DC: полученные из моноцитов DC/monocyte-derived DCs (MoDC), обычные DC (CDCs) и миелоидные/плазмоцитоидные DC (mDCs/pDCs). Источниками антигенов являются опухолевые лизаты или мРНК, полученная из опухоли, специфические пептиды на основе ТАГ или мРНК, кодирующей ОАА, и даже вся опухоль. Некоторые неоантигены могут усиливать иммунный ответ и снижать риск аутоиммунитета, что было оценено в вакцинах на основе DC. Кроме того, для дальнейшего повышения эффективности, DC-клеточные вакцины можно было бы использовать с комбинацией адъювантов, цитокинов, химиотерапии или лучевой терапии [Wculek et al., 2020].

О смещении тенденции в Т-клеточной терапии в сторону целевых ТАГ свидетельствует увеличение количества активных клинических испытаний, в которых используются клеточные технологии, основанные на Т-клетках [Okumura et al., 2022]. Планирование исследований с использованием ТАГ в терапии онкозаболеваний представляет особый интерес, поскольку ТАГ в основном

представляют собой внутриклеточные антигены. Как упоминалось ранее, открытие и развитие иммунотерапии стало прорывом в лечении опухоли, чему способствовал успех ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как антитела против PD-1 или его лиганда PD-L1 и цитотоксического Т-лимфоцитарно-ассоциированного антигена 4 (CTLA-4), которые, как было показано, вызывают длительный ответ и улучшают клинический исход при нескольких видах опухоли [Srinivasan et al., 2018].

В настоящее время проводится несколько клинических испытаний на основе вакцинации с использованием антигенных пептидов против *MAGE* и *NY-ESO-1* для стимулирования клеточного или гуморального иммунного ответа против различных типов опухоли [Wei et al., 2019]. Также проводятся исследования с использованием *ex vivo* размноженных аутологичных Т-лимфоцитов, сконструированных для воздействия на внутриклеточные антигены через Т-клеточные рецепторы или антигены клеточной поверхности через химерные антигенные рецепторы (CARs) [Hay et al., 2017].

Следует отметить, что регрессия опухоли с использованием генетически модифицированных Т-лимфоцитов, нацеленных на *NY-ESO-1*, была успешно продемонстрирована у пациентов с метастатической синовиально-клеточной саркомой и меланомой [Robbins et al., 2011]. Среди различных ТАГ *PRAME*, *MAGEA3* и *NY-ESO-1* продемонстрировали наибольший потенциал в качестве иммунотерапевтических мишеней. Получены положительные данные I фазы клинических испытаний по использованию аутологичных Т-клеток, сконструированных на *MAGEA4*, которые показывают многообещающие результаты в уменьшении роста широкого спектра солидных опухолей с управляемым профилем токсичности.

Несмотря на оптимизм по поводу потенциальных терапевтических успехов CAR-T клеточных технологий, этому подходу могут препятствовать такие факторы, как спектр и количество выбранных химерных антигенных рецепторов

для Т-клеток. Необходимое условие для подтверждения противоопухолевой активности CAR-T-клеток – это наличие на гетерогенной опухоли того же спектра ТАГ. В ином же случае иммунная система не распознает химерные антигены CAR-T-клеток даже при наличии на опухолевых клетках семейства ТАГ. Ограничения в экспрессии необходимых ТАГ в опухолевых клетках является основной проблемой в CAR-T терапии, так как получение данных клеток остается на данный момент трудоемким и затратным.

*В противоопухолевых вакцинах на основе вирусов*, в основном, для лечения и профилактики используют вирусы в качестве переносчиков. Одним из основных преимуществ вакцин на основе вирусов является то, что вакцина может заставить врожденный и адаптивный иммунитет работать вместе для достижения эффективного и длительного иммунного ответа. Вакцины на основе вирусов можно разделить на три формы: инактивированные, живые аттенуированные или субъединичные вакцины против вируса, который может вызывать опухоль.

Около 12% случаев рака связано с вирусными инфекциями. Вирусы Эпштейна-Барр, гепатита В, гепатита С и вирус папилломы человека являются наиболее распространенными вирусами, связанными с развитием новообразований.

Онколитический вирус — это новое средство иммунотерапии, которое элиминирует опухолевые клетки и способствует противоопухолевым реакциям. После заражения онколитическим вирусом опухолевых клеток клетки иммунной системы вырабатывают активные формы кислорода и цитокины, что приводит к онколизису. Противоопухолевая эффективность онколитических вирусов уже доказана в различных клинических испытаниях [Hemminki O et al., 2020]. Типы онколитических вирусов включают в себя вирус простого герпеса, аденовирус, вирус кори и оспы, реовирус, вирус везикулярного стоматита и др. Аденовирус часто используется в качестве вектора доставки определенных генов, так как его генная структура ясна и его легко можно модифицировать для переноса генов и



экспрессии опухолевого антигена. Аденовирусы обладают очень широким спектром тропизма к клеткам-хозяевам и могут быть быстро получены в больших количествах. Кроме аденовируса, другие векторы, такие как вирус коровьей оспы, лентивирусный аденоассоциированный вирус, также используются в разработке противораковых вакцин. Одним из преимуществ этих вирусов является уникальная способность стабильно и длительно экспрессировать трансген в неделящихся клетках так же, как и аденовирус [Morante et al., 2021; Guo et al., 2019; Steel et al., 2013].

С ростом знаний о механизмах иммуносупрессии в опухолевом микроокружении стали возможными различные стратегии в сочетании с вирусными вакцинами. Наиболее распространенным является сочетание вакцин на основе вирусов с ингибиторами PD-1. В дополнение к комбинированной терапии вакцины на основе вирусов используются подходы, усиливающие экспрессию иммунорегулирующих молекул, влияющих на опухолевое микроокружение, таких как CTLA4 и GM-CSF (вакцина на основе онколитического вируса BT-001/NCT04725331). При разработке вакцины на основе вирусов-переносчиков необходимо исключить формирование противовирусного иммунного ответа, нейтрализующего вирусный переносчик.

*Вакцины на основе пептидов* состоят из известных или прогнозируемых эпитопов опухолевых антигенов. Вакцины на основе пептидов часто обладают низкой иммуногенностью, поэтому для повышения их иммуногенности требуется комбинация с адъювантами. В настоящее время фокус противоопухолевых вакцин сместился с полных, инактивированных или ослабленных патогенов на вакцины на основе субъединичных компонентов. Часто бывает трудно вызвать устойчивый иммунный ответ, что также приводит к иммунной толерантности. Адъюванты комбинируют с вакцинами на основе пептидов для усиления иммунного ответа в целом. Не все области белковых антигенов одинаково иммуногенны для В-клеток и Т-клеток. По сравнению с вакцинами на основе инактивированных опухолевых

клеток, вакцины на основе пептидов вызывают более целенаправленный иммунный ответ против критических нейтрализующих эпитопов. Это преимущество в иммунитете называется иммунодоминированием. Для противораковых вакцин на основе пептидов обычно требуются как Т-эпитопы CD8<sup>+</sup>, так и эпитопы CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Эпитопы CD8<sup>+</sup> Т-клеток активируют опухолевый иммунитет CTL через путь перекрестной презентации антигенов, в то время как CD4<sup>+</sup> Т-клетки активируют Т-хелперы для поддержания функции CTL [Tay et al., 2021].

Длина пептидной цепи во многом определяет эффективность пептидной вакцины. Короткие пептиды обычно являются наименьшим эпитопом CD8<sup>+</sup> Т-клеток и имеют короткий период полураспада *in vivo*. Эти пептиды не требуют обработки в специализированных АПК и непосредственно загружаются в молекулы МНС I АПК или других ядерных клеток, но отсутствие костимулирующих молекул, необходимых для оптимальной активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, ограничивает активирование CTL и даже может вызвать толерантность [Bijker et al., 2008]. Более того, более короткие пептиды также имеют тенденцию ограничиваться типами HLA. По сравнению с короткими пептидами, длинные пептиды обеспечивают более широкий охват HLA, содержащего множество эпитопов, а также могут способствовать распознаванию и связыванию мотивов для повышения иммуногенности. Длинные пептиды обрабатываются АПК и не внедряются непосредственно в молекулы МНС. После интернализации часть длинных пептидов разлагается эндосомальным путем, загружается в молекулы МНС-II, а затем распознается CD4<sup>+</sup> Т-хелперными клетками [Southwood et al., 2013]. Другие компоненты попадают в цитоплазматический или вакуолярный путь и перекрестно представлены молекулами МНСI для активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, вакцины с длинными пептидами обладают большим потенциалом для индукции устойчивых и эффективных реакций противоопухолевой активности. Короткие пептиды обычно получают химическим синтезом, в то время как длинные пептиды

часто производятся системами экспрессии белка. Иммуногенность вакцин с рекомбинантными белковыми субъединицами различается из-за различных платформ экспрессии. Для производства противоопухолевых вакцин используются несколько платформ экспрессии, включая *Escherichia coli* (*E.coli*), растения, дрожжи, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Белки, экспрессируемые клетками млекопитающих, наиболее близки к естественным опухолевым антигенам [Liu et al., 2022].

Адьюванты в значительной степени определяют тип и степень Т-клеточного ответа после вакцинации. Противоопухолевые вакцины направлены на индуцирование активации и пролиферации CTL, которые требуют иммунного ответа Th1-типа, в котором доминирует IFN $\gamma$ . Новые адьюванты имеют огромный потенциал противоопухолевых эффектов, включая наноматериалы или синтетические лиганды TLRs и цитокины. Эти адьюванты широко используются в исследованиях различных противоопухолевых вакцин, включая вакцины на основе нуклеиновых кислот и клеточные вакцины. Теоретически, эти новые адьюванты способствуют привлечению лейкоцитов к месту вакцинации, поддерживают размножение и активацию Т-клеток и способствуют их миграции в лимфатические узлы и опухолевые очаги [Khong et al., 2016]. Кроме того, наноматериалы широко изучаются как потенциальные системы доставки антигенов, поскольку они защищают белки от быстрого разложения протеазами, тем самым увеличивая период полураспада антигенов. Они могут быть сконструированы таким образом, чтобы воздействовать на определенные типы клеток и органов. Классическим примером является использование полиэтиленгликоля (ПЭГ) или других биосовместимых полимеров, покрытых липосомами, для продления периода полураспада антигенов [Milla et al., 2012]. Однако, некоторые исследования показали, что медленное высвобождение вакцины с коротким пептидом способствует секреции провоспалительных цитокинов, что приводит к

персистенции Т-клеток в месте вакцинации, препятствуя их движению к опухоли [Hailemichael et al., 2013].

*Вакцины на основе нуклеиновых кислот* включают ДНК- и РНК-вакцины, состоящие из кодирующего гена и группы носителей антигенов патогена. ДНК-вакцины против опухоли основаны на бактериальных плазмидах, которые кодируют один или несколько онкологических антигенов, индуцирующих активацию врожденного иммунитета и адаптивные иммунные реакции. Хотя ДНК-вакцины разрабатываются в течение длительного времени, результаты все еще ограничены.

ДНК-вакцины индуцируют как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. ДНК-вакцины должны проникать в ядро для транскрипции, а затем транслироваться в кодируемые антигены в цитоплазме. Антиген обрабатывается и презентуется  $CD8^+$  Т-клеткам и  $CD4^+$  Т-клеткам молекулами МНС I и МНС II для активации специфических иммунных реакций. Способы действия ДНК-вакцин можно разделить на три категории [Tiptiri-Kourpeti et al., 2016]. ДНК поступает непосредственно в соматическую клетку. После трансляции ДНК-кодируемые антигены напрямую доставляются в цитотоксические  $CD8^+$ Т-клетки молекулами МНС-1. Второй путь заключается в том, что антиген, кодируемый ДНК в соматических клетках, высвобождается секретирующими или апоптотическими телами. Эти пептиды фагоцитируются, процессируются АПК и перекрестно презентуются молекулами МНС II  $CD4^+$  Т-клеткам [Cavallo et al., 2014]. Третий путь заключается в прямой трансфекции ДНК в АПК. Эндогенные антигены, продуцируемые АПК, обрабатываются и презентуются  $CD8^+$  Т-клеткам и  $CD4^+$  Т-клеткам МНС I и МНС II, соответственно. Активация  $CD4^+$  Т-клеток индуцирует гуморальный иммунитет.  $CD8^+$  Т-клетки дифференцируются в CTL для индукции клеточного иммунитета. Прямая трансфекция ДНК-плазмид в АПК происходит главным образом с помощью подкожной инъекции, которая считается

наиболее оптимальным способом доставки противоопухолевых ДНК-вакцин [Rezaei et al., 2020].

ДНК-вакцины могут кодировать множественные или крупные антигены. ДНК-вакцины высокоспецифичны и безопасны, их производство обходится дешевле, а транспортировка и хранение упрощены. Частота инсерционных мутаций ДНК-вакцин ниже, чем частота спонтанных мутаций, и ДНК редко связывается с хромосомами хозяина. Более того, опухолевый антиген, экспрессируемый ДНК-противоопухолевыми вакцинами, имеет ту же видовую модификацию, что и природный опухолевый антиген. Однако ДНК-вакцины достигли лишь незначительного прогресса в клинических испытаниях из-за их низкой иммуногенности [Suschak et al., 2017].

Существует несколько подходов повышения иммуногенности ДНК-вакцин. Одной из стратегий является оптимизация плазмидных элементов. Например, следует учитывать последовательность Козака перед иницирующим кодоном, видоспецифичные кодоны и последовательность интронов. Для обеспечения эффективной транскрипции необходима мощная промоторная последовательность. Кроме того, для повышения иммуногенности ДНК-вакцин часто используются адъюванты, такие как CpG-мотивы, полимеры, наночастицы, липосомы и низкомолекулярные агонисты [Rezaei et al., 2020].

Кроме того, создание вакцины с многоэпитопной ДНК также является способом повышения иммуногенности. ДНК-вакцины, содержащие множество генов антигенов, могут индуцировать широкий спектр CTL-ответов, специфичных к множеству антигенов. Проведенное доклиническое исследование вакцины с множественной неоантигенной ДНК показало, что вакцина может индуцировать преимущественный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ на моделях опухоли мышей [Duperret et al., 2019]. Многоэпитопная ДНК-вакцина может в определенной степени преодолеть мутацию или потерю опухолевого антигена, что является

потенциальным подходом к устранению гетерогенности опухоли и потери иммуногенности, связанной с ОАА [Bae et al., 2015].

мРНК-вакцины являются другим подходом для создания противоопухолевых вакцин на основе нуклеиновых кислот. Экзогенную синтетическую мРНК вводят в клетки для получения шаблонов синтеза антигенов. Экспрессированные антигены доставляются на поверхность АПК через молекулы МНС для активации противоопухолевого иммунитета.

мРНК-вакцины обладают рядом преимуществ. мРНК-вакцины позволяют одновременно кодировать множественные антигены и полноразмерные опухолевые антигены. Кодирование множественных антигенов индуцирует более широкий гуморальный и клеточный иммунитет, повышая шансы преодоления резистентности к противоопухолевым вакцинам. Одновременное кодирование опухолевых антигенов и перекрестная презентация множественных эпитопов HLA с помощью АПК могут индуцировать более широкий Т-клеточный ответ [Van Nuffel, 2012]. Кроме того, вакцину с мРНК можно производить быстро и эффективно. Таким образом, мРНК является идеальной платформой для персонализированного приготовления неоантигенной вакцины. Наконец, вакцина с мРНК обладает высокой безопасностью, поскольку они не интегрируются в геном. мРНК-вакцина эффективно индуцирует реакции  $CD8^+$  Т-клеток, опосредованные МНС I, что подходит для лечения опухоли [Beck et al., 2021].

Хотя мРНК–вакцина обладает рядом преимуществ, ее разработка ограничена ее нестабильностью, врожденной иммуногенностью и неэффективностью доставки *in vivo* [Pardi et al., 2020]. Еще одним критическим фактором, ограничивающим разработку вакцин с мРНК, является активация врожденного иммунитета. мРНК активирует врожденный иммунный ответ через различные РНК-сенсоры, такие как TLR, RIG-I и PKR. Эта иммуностимуляция может быть полезной для вакцин в качестве адъюванта. Однако такая иммуностимуляция также может препятствовать

трансляции мРНК [Alexopoulou et al., 2001; Rehwinkel et al., 2010; Nallagatla et al., 2007].

Разработка противоопухолевых вакцин является важным прорывом в лечении солидных опухолей. Кроме того, объектами терапевтических испытаний противоопухолевых вакцин в основном являются пациенты с опухолями, у которых традиционные методы лечения оказались неэффективными или пациенты с большим риском рецидива. Однако еще предстоит проделать большую работу по разработке и оптимизации вакцинных платформ, прежде чем противоопухолевые вакцины станут одним из методов иммунотерапии.

## 1.5 Ксеногенная вакцинация

Большинство ОАА относятся к категориям дифференцировочных антигенов, которые происходят из встречающихся в природе белков. Это создает значительные препятствия в разработке эффективной иммунотерапии из-за возникновения состояния иммунной толерантности к «своему». Т-клетки, которые реагируют на эти антигены, отбраковываются во время селекции в тимусе для поддержания ауто толерантности. Поэтому преодоление этой толерантности является серьезной проблемой. Подход, который может оказаться полезным в данной ситуации, заключается в использовании ортологичных белков или пептидов других видов (ксеноантигенов) в качестве иммуногенов. Считается, что ксеноантигены действуют как «измененные собственные» белки, то есть белки, несущие аминокислотные изменения в одном или нескольких эпитопах и, таким образом, способные нарушать толерантность посредством Т-клеточных ответов, перекрестно реагирующих на эндогенный ОАА.

Первые доказательства лучшей иммуногенности ксеноантигена по сравнению с аутоантигеном были получены в ходе исследований вакцинации, сравнивающих на мышах иммуногенность *гликопротеина 75 (gp75)*, экспрессируемого клетками мышинной меланомы B16, с иммуногенностью соответствующего человеческого белка [Naftzger et al., 1996]. Авторы показали, что только вакцинация человеческим *gp75*, но не мышинным *gp75*, способна индуцировать антитела против мышинного антигена *gp75*, продемонстрировав тем самым, что толерантность к «собственному» можно легче нарушить введением «чужого» гомолога, и что полученные антитела смогли вызвать отторжение опухоли. Впоследствии на мышинной модели *ErbB2 (Her2/neu)* [Disis et al., 1998] было показано, что вакцинация сегментом внутриклеточного домена человеческого белка может вызывать сильные перекрестно-реактивные ответы.



В последующие годы опубликовано несколько других исследований, показывающих эффективность ксеногенной вакцинации на грызунах. В большинстве случаев ксеногенные вакцины были получены благодаря использованию генетических векторов, в основном плазмидной ДНК, а также вирусных векторов, подход, который можно назвать ксеногенной вакцинацией.

В целом, ксеногенные вакцины смогли сильно повлиять на рост опухоли за счет индукции мощных иммунных ответов против аутоантигенов. Интересно, что в зависимости от используемого антигена и модели заболевания вклад CD8<sup>+</sup> по сравнению с CD4<sup>+</sup> Т-клетками или по сравнению с ответами антител был различным. В то время как для ОАА с внутриклеточной локализацией роль CD8<sup>+</sup> Т-клеток очевидна, в случае ОАА, экспрессируемых на клеточной мембране, вклад антител может быть определяющим. Это становится особенно очевидным, когда в качестве доклинических моделей используются предрасположенные к раку мыши, трансгенные и, следовательно, толерантные к онкогенам [Jacob J et al., 2006; Jacob JB et al., 2010; Quaglino et al., 2011].

Технологии для получения трансгенных мышей позволила протестировать различные типы ксеногенных вакцин [Gallo et al., 2005] и сравнить эффективность аутологичных и ксеногенных вакцин. Эти исследования продемонстрировали, что ксеногенные ДНК-вакцины в целом превосходят активирующие аутореактивные Т-клетки, но не способны индуцировать аутологичные антитела, которые вместо этого индуцируются аутологичной вакцинацией, что отражает исключительную специфичность к родственному антигену антител, индуцированных ДНК-вакцины [Jacob J et al., 2006]. Как следствие, ксеногенная вакцинация продемонстрировала противоопухолевый ответ к трансплантируемой опухоли, чувствительной к CD8<sup>+</sup> Т-клеткам.

Различные ОАА, онкофетальные и тестикулярные антигены (СТА) представляли большой интерес в контексте иммунотерапии опухолей. У мышей-опухоленосителей экспрессировались антитела против белка эмбриона цыпленка

(*CEP*), еще до введения вакцины, что указывало на наличие данных антигенов на различных типах опухолей, включая карциному легкого Льюиса (LLC), карциному Эрлиха и саркому 37 (S37). Мыши-опухоленосители LLC, получавшие ксеногенную вакцину *CEP*, сохраняли 100% выживаемость в течение периода наблюдения, продолжительность жизни мышей была значительно увеличена по сравнению с контрольной группой. Группа животных с ксеногенной вакцинацией *CEP* характеризовалась высоким содержанием  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в циркулирующей крови из всех исследованных групп (18,8% Т-лимфоцитов против 11,2% в контрольной группе). Этот процент был выше по сравнению со значением, указанным в предыдущих исследованиях с сингенной вакцинацией, где сообщалось о 16,6%  $CD8^+$  Т-лимфоцитов для аутологичной вакцины. На основе полученных данных был сформулирован вывод о значительном вкладе цитотоксических Т-лимфоцитов, которые были представлены ключевым элементом противоопухолевого иммунного ответа, индуцированного ксеногенной вакциной [Krasko et al., 2018].

Адаптивный иммунитет к патогенам и опухолям в основном зависит от антигенспецифических Т-клеток. Подсчитано, что репертуар  $\alpha\beta$ TCR в пуле наивных Т-клеток составляет  $<10^8$ . Это число на несколько порядков меньше, чем количество потенциальных антигенных пептидов. Проблема распознавания решается благодаря способности каждого TCR распознавать и активироваться множеством комплексов пептид-МНС. Это явление называется перекрестной реактивностью [Petrova et al., 2012]. Перекрестная реактивность также объясняет тот факт, что в отличие от распознавания антитело-антиген, которое характеризуется высоким сродством связывания, сродство связывания TCR/пептида МНС обычно на несколько порядков ниже [Cole et al., 2007]. Со стороны Т-клеток продуктивное взаимодействие TCR с комплексом МНС-пептид происходит, когда критические аминокислоты присутствуют в определенных положениях пептида. Однако было продемонстрировано, что остатки, которые не

находятся в контактных положениях TCR, могут также влиять на распознавание и модулировать функциональный результат Т-клеточного ответа [Evavold et al., 1995; Kersh et al., 1996]. Произойдет ли активация Т-клеток, зависит от ряда факторов: сродства TCR к комплексу МНС-пептид, доли специфических комплексов МНС-пептид на АПК, а также экспрессии корецепторов, молекул адгезии и костимулирующих молекул на взаимодействующих клетках.

CD4<sup>+</sup> Т-клетки через свои TCR распознают пептиды длиной 13-17 аминокислот, полученные из экзогенных источников и представленные молекулами МНС класса II на АПК [Germain et al., 1994]. Это взаимодействие приводит к активации эффекторных функций Т-хелперов с секрецией цитокинов/хемокинов, которые имеют решающее значение для активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также для продукции антител.

CD8<sup>+</sup> Т-клетки и их TCR распознают более мелкие пептиды, представленные молекулами МНС класса I на поверхности клетки, полученные в результате внутриклеточного процессинга и презентации антигенов. Пептиды для эпитопов CD8<sup>+</sup> человека имеют длину от 7 до 14 аминокислот и обычно имеют длину 9-10 аминокислот. Распознавание TCR комплексов молекул пептид-МНС класса I на клеточной поверхности запускает цитолитическую активность эффекторных CD8<sup>+</sup> Т-клеток и CTL. На животных моделях было показано, что вакцины с ограниченным эпитопом МНС класса I обеспечивают защиту [Germain et al., 1994].

Первоначальные исследования механизма действия ксеногенных вакцин предположили зависимость от гетероклитических эпитопов CD8<sup>+</sup> Т-клеток между ксеноантигеном и аутоантигеном. Эти гетероклитические эпитопы преодолевают толерантность, индуцируя популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые перекрестно реагируют как на ксеноантиген, так и на нативный антиген.

Были проведены исследования с *гликопротеином 100 (gp100)*, антигеном дифференцировки меланомы. Рекombинантный вирус осповакцины, кодирующий мышинный (*m*)*gp100*, не был иммуногенным у мышей C57Bl/6, но при иммунизации

аналогичным вектором, кодирующим гомолог (*h*)*gp100* человека, индуцировался специфический CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ. Эти CD8<sup>+</sup> лимфоциты обладали перекрестной реактивностью против мышиногo *gp100* *in vitro* и противоопухолевой активностью в модели меланомы В16 у мышей. Эти эффекторные Т-клетки были дополнительно охарактеризованы и было показано, что они распознают 9-аминокислотный эпитоп *gp100* (*gp100/25-33*), ограниченный МНС класса I H-2Db, который отличается в трех положениях (аминокислоты 25-27) между двумя видами. Различия в этих трех NH<sub>2</sub>-концевых аминокислотах привели к увеличению способности *hgp100/25-33* стабилизировать «пустые» молекулы H-2Db на клетках и увеличению продукции IFN $\gamma$  [Overwijk et al., 1998]. Никакие другие различия в двух белках не были ответственны за «эффект ксеновакцинации». В другом исследовании использовался подход иммунизации плазмидной ДНК [Gold et al., 2003]. У мышей C57Bl/6, иммунизированных ксеногенной полноразмерной ДНК *hgp100* не наблюдалось развитие меланомы В16. Мыши, иммунизированные конструкциями ДНК *hgp100*, в которых аминокислоты в положениях 25-27 были из мышиной последовательности (образуя таким образом эпитоп *gp100/25-33* со слабой способностью или без способности связывать H-2Db) не наблюдалась активация противоопухолевого иммунитета. Более того, у мышей, вакцинированных минигенной конструкцией *hgp100/25-33*, не наблюдалось развитие меланомы В16, тогда как у мышей, иммунизированных минигеном *mgp100/25-33*, не развивался противоопухолевый иммунитет. Следовательно, в этом случае ксеногенной вакцинации один гетероклитический эпитоп *hgp100* с более высоким сродством к МНС класса I по минорным якорным остаткам был необходим и достаточен для индукции защитного противоопухолевого иммунитета, характеризующегося образованием Т-клеток, перекрестно реагирующих на «своих».

Однако существует еще один механизм «ксеногенного эффекта» с участием гетероклитического эпитопа МНС класса II. Это было показано в исследованиях по

еще одному антигену - антигену дифференцировки меланомы *Trp2* (белок 2, родственная тирозиназа). Вакцинация мышей человеческим *Trp2* привела к более сильному противоопухолевому иммунитету, чем вакцинация мышинным гомологом, что послужило дополнительной моделью для изучения ксеноиммунизации [Bowne et al., 1999]. Интересно, что защитный эффект полностью зависел от CD8<sup>+</sup> Т-клеток и был обусловлен развитием цитотоксического ответа на пептид (SVYDFFVWL), который на 100% консервативен у мышей и людей, но при этом наблюдалось нарушение толерантности посредством ксеновакцинации против негетероклитического эпитопа МНС класса I. В дальнейшем исследования показали, что сниженная иммуногенность мышинного *Trp2* была следствием недостаточного функционирования CD4<sup>+</sup> Т-клеток [Kianizad et al., 2007]. Исследователи картировали гетероклитический эпитоп МНС класса II в человеческом *Trp2*, который был способен индуцировать перекрестно-реактивные CD4<sup>+</sup> Т-клеточные ответы. При этом происходило нарушение толерантности к доминантному эпитопу МНС, ограниченному классом I, при вставке в мышинный ген *Trp2*. Таким образом, эти результаты выявили новый механизм, с помощью которого ксеноантигены могут преодолевать толерантность, и позволяют предположить, что высокоаффинные аутореактивные Т-клетки CD8<sup>+</sup> все еще могут сохраняться во взрослых организмах, но периферическая толерантность держит их под контролем.

Ксеногенная вакцинация применяется в ветеринарных испытаниях. Домашние животные, в основном собаки и кошки, становятся прогностическими доклиническими моделями в онкологии, а в последнее время и в онкоиммунологии. Опухоли домашних животных и человека имеют много общих характеристик, включая гистологический фенотип, развитие рецидивов и метастазов, а также, зачастую, весьма сопоставимые программы экспрессии генов [Uva et al., 2009] и, таким образом, могут точно прогнозировать поведение опухоли и реакцию на иммунотерапию у людей.

Важный прорыв в области вакцинации против опухолей и лечения меланомы собак был достигнут благодаря созданию ДНК-вакцины, кодирующей тирозиназу человека (*TYR*). Компания Merial разработала вакцину Онсерт в сотрудничестве с Мемориальным центром Слоана-Кеттеринга и Медицинским центром животных в Нью-Йорке. В настоящее время это единственная ветеринарная терапевтическая противоопухолевая вакцина, лицензированная Министерством сельского хозяйства США для лечения меланомы полости рта у собак. Реакция антител против человеческого *TYR* присутствовала у трех из девяти протестированных животных, причем двое из них также были положительными на антитела против собачьего *TYR* [Liao et al., 2006]. Наблюдалась корреляция между реакцией антител и клиническим ответом. Следует отметить, что *TYR* является внутриклеточным белком, и ожидалось, что он не будет распознан для синтеза АТ. Но вскоре было обнаружено, что пептидный фрагмент *TYR* в высокой степени представлен молекулами МНС класса I на поверхности клеток меланомы [Michaeli et al., 2009].

Первое исследование на людях с использованием ксеноантигена было проведено Dendreon Corp. у пациентов с аденокарциномой простаты с повышенным уровнем ПСА в сыворотке. Вакцина создавалась на основе DC с рекомбинантным белком простатической кислой фосфатазы (*PAP*) мыши [Fong et al., 2001]. В доклинических исследованиях только иммунизация ксеногенным *PAP* (человеческий *PAP* у крысы) была способна генерировать CTL. Двадцать один пациент с метастатическим раком предстательной железы (как гормоночувствительным, так и гормонорефрактерным) был вакцинирован двумя ежемесячными дозами DC. Вакцина хорошо переносилась и вызывала Т-клеточный ответ против мышинового *PAP* у всех вакцинированных пациентов. Самое главное, что у 11 из 21 пациента развились перекрестно-реактивные Т-клеточные реакции против *PAP* человека, которые были связаны с выработкой Th1-связанных цитокинов. У шести пациентов, у которых развилась аутоиммунная реакция на *PAP* человека, наблюдалась стабилизация заболевания. Этот результат впервые показал,

что ксеновакцинация способна нарушить толерантность к аутоантигену у людей с соответствующим клиническим эффектом.

При другом исследовании провели оценку иммунного ответа у восемнадцати пациентов с меланомой, которым вводили внутримышечно плазмидную ДНК, кодирующую *gp100* мыши или человека [Yuan et al., 2009]. У шести пациентов (33%) развились Т-клеточные ответы, измеряемые либо по HLA A\*0201-рестриктивному тетрамеру пептидов *gp100*, либо по окрашиванию внутриклеточных цитокинов. Иммунологическая характеристика привела к выводу, что антиген-специфические Т-клеточные ответы *gp100* относятся к эффекторной памяти. После этого исследования было проведено испытание фазы I с использованием только мышинной ДНК *gp100*, доставляемой либо внутримышечно, либо с помощью генной пушки [Ginsberg et al., 2010]. Использование генной пушки показало, что можно сильно снизить дозу плазмидной ДНК с 1000 мкг в/м до 2 мкг генной пушки при сохранении той же степени иммуногенности. У 8 из 27 вакцинированных пациентов (всего 30%) развились иммунные ответы против опухоли, что оценивалось либо по тетрамеру, либо по окрашиванию внутриклеточных цитокинов.

Доклинические эксперименты на мышах, ветеринарные испытания и ранние клинические испытания I/II фазы на людях продемонстрировали, что ксеногенная вакцинация является осуществимым иммунотерапевтическим подходом, который заслуживает дальнейшего изучения. Ксеноантигены способны эффективно запускать Т-клеточный ответ (с участием CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов), перекрестно реагирующим на антигены опухоли, поскольку в их аминокислотную последовательность встроены эпитопы с гетероклитическими свойствами.

Основная проблема этого подхода заключается в том, что для определенного вида нелегко предсказать, какой из ксеноантигенов будет наиболее иммуногенным. К настоящему времени полученные данные позволяют вывести некоторые правила, которые могут помочь в разработке эффективного подхода к ксеновакцинации.

Прежде всего, ксеноантиген должен иметь степень гомологии в пределах от 85 до 95%. Меньшая гомология, вероятно, приведет к усилению Т-клеточного ответа, который вряд ли будет перекрестно реагировать с антигеном опухоли. При более высокой степени гомологии уменьшится вероятность наличия достаточного количества гетероклитических эпитопов. Другое соображение заключается в том, что использование ксеноантигена увеличит вероятность наличия гетероклитических эпитопов, где гетерологичная часть отвечает за обход иммунной толерантности, а гомологичная последовательность стимулирует активацию специфических иммунных реакций.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объект и предмет исследования

В качестве объекта исследования были использованы мыши линии C57Bl/6, полученные из питомника Томского национального исследовательского центра Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томский НИМЦ). Предметом исследования служили спленоциты и плазма крови крови интактных мышей и мышей-опухоленосителей меланомы B16 или карциномы LLC.

### 2.2 Характеристика клеток опухолевых линий

Клетки опухолевых линий мышинной меланомы B16 (H-2b) и легочной карциномы Льюиса LLC (H-2b) были получены из Онкологического научного центра РАМН (г. Москва). Опухолевые клетки сохраняли методом криоконсервации в жидком азоте (при  $-80^{\circ}\text{C}$ ). После разморозки клетки дважды отмывали центрифугированием при 1500 об/мин 10 минут в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия). Основу культуральной среды составляла питательная среда RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной сыворотки плода коровы (FCS, Biowest, США), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия), 1% амфотарицина (Синтез, Россия),  $5 \times 10^{-5}$  2-меркаптоэтанола (Fluka Chemie AG, Швейцария), 0,1% гентамицина (Мосхимфармпрепараты, Россия). Жизнеспособность клеток поддерживалась в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе во 100%-влажной атмосфере с добавлением 5%  $\text{CO}_2$  при  $37^{\circ}\text{C}$ . Ежедневно рост культур клеток контролировался с помощью микроскопа. Клеточные культуры прилипающей к пластику меланомы B16 и

полуприлипающей карциномы LLC снимали с поверхности флакона 0,25% раствором трипсина (Биолот, Россия), дважды отмывали центрифугированием при 1500 об/мин 10 минут в среде RPMI 1640, количество и жизнеспособность клеток опухолевых линий определяли с использованием камеры Горяева с добавлением красителя эритрозина (Диаэм, США) и использовали для дальнейших экспериментов.

**Карцинома LLC:** Культура клеток состоит из полиморфных клеток, большинство которых имеет округлую форму. Значительная часть клетки занята ядром с крупными ядрышками и крупными конденсированными зернами хроматина. Фигуры митозов наблюдается в 36,7% клеток. Цитоплазма не гомогенная. В ДНК определено наличие генов *tage A-1*, *GP100*, *тирозины*, *her2/neu*, *раково-эмбрионального антигена*, на мембране клеток определены рецепторы тирозиназы и GP100.

**Меланома B16.** Культура представлена двумя типами клеток: эпителиоидные – 23,3%, фибробластоподобные – 76,7%. Эпителиоидные клетки имеют полиморфное строение, ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в сторону цитоплазмы. Хроматин в ядре слабо конденсирован, распределен равномерно. Цитоплазма негомогенная. Фибробластоподобные клетки имеют полиморфное строение. Значительная часть клетки занята ядром с мелко конденсированными зернами хроматина. 43,5% клеток содержат пигмент. В ДНК определено наличие генов *tage A-1*, *GP100*, *тирозины*, *her2/neu*, *раково-эмбрионального антигена*, на мембране клеток определены рецепторы Her2/neu, тирозиназы и GP100.

### 2.3 Виды АГ:

1. **Ксеногенный (по отношению к мышам) ТАГ барана, сингенный (мышинный ТАГ), спленоциты барана.**

Клетки яичка и селезенки были выделены из кусочков ткани в охлажденную среду с использованием стеклянного гомогенизатора, недиссоциированные клеточные конгломераты удаляли центрифугированием. Клетки фиксировали 1% раствором параформальдегида в течение 15 мин, трижды отмывали центрифугированием от консерванта, подсчитывали клеточность и хранили в замороженном состоянии. Для экспериментов образцы размораживали и использовали в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток /мышь в 200 мкл физиологического раствора.

## **2. Антигены, приготовленные из опухолевых линий LLC и B16.**

Клетки опухолевых линий были заморожены методом криоконсерванта (10% DMSO+FCS) в жидком азоте (при  $-80^{\circ}\text{C}$ ). После разморозки использовались в экспериментах в различных концентрациях.

## **2.4 Варианты иммунизации**

**Терапевтический вариант иммунизации.** Мышам C57Bl/6 имплантировали  $10^5$  кл/мышь клетки карциномы LLC или меланомы B16 подкожно в область передней брюшной стенки. На 7 и 14 день после введения опухолевых клеток проводили иммунизацию мышей различными видами АГ (ксеногенный, сингенный) путем введения по 5 млн клеток внутримышечно в область бедра, далее фиксировали продолжительность жизни.

**Профилактический вариант иммунизации.** Мышей C57Bl/6 иммунизировали 3-кратно с периодичностью в 7 дней различными видами АГ (ксеногенный, сингенный) внутримышечно в область бедра (5 млн клеток/мышь). Через 28 дней после начала иммунизации мышам имплантировали  $10^5$  кл/мышь клетки карциномы LLC или меланомы B16 подкожно в область передней брюшной стенки и далее фиксировали продолжительность жизни.

## 2.5 Оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей.

Продолжительность жизни мышей-опухоленосителей после терапевтической или профилактической иммунизации сравнивали с продолжительностью жизни неиммунизированного опухолевого контроля. Группой контроля являлись мыши C57Bl/6, которым производилась имплантация клеток опухолевых линий меланомы B16 или карциномы Льюиса LLC (100 тысяч кл. на мышь) подкожно в область передней брюшной стенки мышей. Регистрировалась как 50% выживаемость (количество суток, в момент которых количество выживших мышей соответствовало 50% группы), так и максимальная продолжительность жизни мышей (количество суток, в момент которых наступала 100% смертность животных экспериментальных групп мышей). Анализ выживаемости мышей проводился методом Каплана - Мейера, достоверность отличий показателей выживаемости регистрировалась с помощью the Mantel-Cox Log-Rank test.

Для исследования параметров иммунитета в различных экспериментальных ситуациях и после имплантации опухолевых клеток линий B16 и LLC мышам, на 14 сутки у них забиралась селезенка и плазма крови. Клеточную суспензию получали из селезенки методом мягкого выдавливания из кусочков ткани в охлажденную среду с использованием стеклянного гомогенизатора, недиссоциированные клеточные конгломераты осаждали путем отстаивания в течение 2-3 мин. Собранный надосадок 2-кратно отмывали центрифугированием, полученную фракцию клеток разводили средой RPMI 1640 в концентрации  $1-2 \times 10^6$ /мл и использовали в тестах.

## **2.6 Оценка длительности противоопухолевого иммунитета у мышей-опухоленосителей LLC**

Длительность противоопухолевого иммунитета оценивалась на модели опухоли LLC по сроку жизни мышей после профилактического варианта иммунизации через 1 мес, 3 мес и 6 месяцев. Регистрировалась как 50% выживаемость (количество суток, в момент которых количество выживших мышей соответствовало 50% группы), так и максимальная продолжительность жизни мышей от дня привития опухоли LLC (количество суток, в момент которых наступала 100% смертность животных экспериментальных групп мышей).

## **2.7 Оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей LLC при «переносе» противоопухолевого иммунитета интактным мышам**

У мышей, иммунизированных ксеногенными ТАГ, у которых не зафиксирован рост опухоли вообще, был произведен забор селезенки, подмышечных и паховых лимфоузлов. Полученные клетки были подсчитаны и от каждой пробы спленоцитов 1-7 взяли по 2 млн клеток и объединили в общую суспензию клеток. Все лимфоциты лимфоузлов объединили в одну пробу и подсчитали количество клеток. Далее интактным мышам в/в вводили спленоциты или лимфоциты по 1 млн клеток на мыш. В каждой группе было 10 мышей. Через 3 дня после введения клеток мышам прививали карциному LLC и фиксировали продолжительность жизни.

## **2.8 Иммунологические исследования**

### **1. Пролиферативный тест**

Клетки селезенки (концентрация клеток -  $10^6/\text{мл}$ ) культивировали в присутствии 5 мкг/мл КонА и АГ, полученного из клеток опухолевых линий LLC и B16 в концентрации  $1 \times 10^5$  кл/лунку и  $2 \times 10^5$  кл/лунку в течение 72 час. По окончании культивирования, планшеты центрифугировали 5 мин при 1000 g,  $4^\circ\text{C}$ , затем удаляли надосадок и в каждую лунку добавляли 50 мкл МТТ-реagenta (набор МТТ-assay kit (cell proliferation), Abcam, США). После культивирования в течение 3ч в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора к пробам добавляли 150 мкл растворителя МТТ. Через 15 мин пребывания планшета на орбитальном шейкере, степень окрашивания лунок регистрировали на планшетном ридере TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия) при длине волны 590 нм и выражали в оптических единицах – о.е. Интенсивность окрашивания была пропорциональна количеству живых клеток в лунках.

## **2. Определение концентрации цитокинов IL-10 и IFN $\gamma$**

Концентрация цитокинов IL-10 и IFN $\gamma$  была измерена в плазме крови экспериментальных мышей C57Bl/6 иммуноферментным методом с помощью наборов компании Cloud-Clone Corp., США согласно инструкции производителя. Для построения калибровочной кривой использовались пробы с известной концентрацией исследуемого вещества. Образцы и стандарты вносили в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 1 часа при  $37^\circ\text{C}$ . Далее удаляли жидкость без промывания, добавляли 100 мкл детектирующего реagenta А и инкубировали в течение 1 часа при  $37^\circ\text{C}$ . После промывали лунки 3-кратно промывающим раствором и добавляли 100 мкл детектирующего реagenta В с последующей инкубацией в течение 30 мин при  $37^\circ\text{C}$ . После отмывки добавляли в лунки 90 мкл ТМБ и инкубировали 20 мин при  $37^\circ\text{C}$  в темноте, после чего вносили 50 мкл стоп-реagenta. Оптическую плотность окрашенных образцов в лунках измеряли при длине волны 450 нм с помощью аппарата TriStar LB 941 (Berthold Technologies, Германия). Количество цитокинов определялось с использованием стандартной калибровочной кривой и выражалось в пкг/мл.

### 3. Проточная цитофлуориметрия

Фенотипирование CD4+CD25+Foxp3+ и CD4+CD44+CD62L+ клеток проводилось методом многоцветной проточной цитометрии. Спленоциты окрашивали конъюгированными с флуорохромами FITC, PE, APC (Biolegend, США) мышинными моноклональными антителами. После чего клетки отмывали 1 мл раствора PBS с 0,02% ЭДТА и 0,5% FCS. Окрашивание проводили комбинацией антител согласно протоколу, рекомендованному производителем. Содержание клеточных популяций определяли цитофлуориметрически на аппарате FACS-CAlibur (BD Biosciences, США).

### 4. Определение содержания лимфоцитов, несущих внутриклеточный перфорин

Свежевыделенные клетки селезенки мышей C57Bl/6 отмывали и ресуспендировали в концентрации  $10 \times 10^6$ /мл, 100 мкл клеточной взвеси помещали в цитометрические пробирки и добавляли к ним APC/Cy7 – меченные моноклональные антитела (МАТ) к CD3 и FITC – меченные МАТ к CD8. Клетки инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре, затем отмывали раствором ЗФР и фиксировали 1% раствором параформальдегида в ЗФР с 0,02% ЭДТА. Далее клетки осаждали, отмывали и добавляли пермеабилизирующий раствор 0,2% Tween 20 в ЗФР с 0,02% ЭДТА. После 30-минутной инкубации в темноте при температуре 37°C, к осажденным и отмытым клеткам добавляли меченные PE МАТ к перфорину. В контрольный образец каждой пробы (изотип-контроль) добавляли крысиный IgG 2α карра, меченный PE. В работе использовались МАТ фирмы Biolegend, США. Клетки инкубировали с антителами 20 минут в темноте при комнатной температуре, а после окончания инкубации отмывали, ресуспендировали в ЗФР и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, USA).

## 2.9 Статистическая обработка

Результаты исследования подтверждены в двух экспериментах по продолжительности жизни мышей в условиях терапевтической иммунизации и в 3 однотипных экспериментах в условиях профилактической иммунизации. Эксперименты *in vitro* повторяли 2 раза. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Graph prism 8 (GraphPad Software, США), используя непараметрические критерии Манна-Уитни. Анализ выживаемости мышей проводился методом Каплана – Мейера, достоверность отличий показателей выживаемости регистрировалась с помощью the Mantel-Cox Log-Rank test.

## 2.10 Этическое заключение

Все животные содержались в виварии в условиях, соответствующих международному стандарту. Работы с животными проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации и положениями директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных. Все протоколы и методы исследования были утверждены этическим комитетом НИИФКИ, Новосибирск, Россия (Протокол № 143 от 29.11.2023г).



### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### Пролиферативный ответ спленоцитов на ТАГ *in vitro*

Поскольку трудности лечения опухолевых заболеваний связаны, в основном, с трудностями распознавания опухолевых клеток, которые по структуре мало чем отличаются от клеток здоровых тканей, то поиск методов воздействия, основанных на стимуляции распознавания АГ опухолевых клеток клетками иммунной системы организма, является одной из главных задач онкоиммунологии. Во взрослом здоровом организме дифференцировочные тестикулярные антигены, экспрессирующиеся только в клетках яичка, являются специфическими маркерами опухолей разного генеза и играют важную роль в поддержании высокой ростовой и инвазивной активности опухолевых клеток. Согласно нашей гипотезе, иммунизация мышей ксеногенными ТАГ будет приводить к индукции иммунных реакций, направленных не только на вводимый АГ, но и, перекрестным образом, на имеющиеся в организме опухолевые клетки, если они несут на своей поверхности какие-либо ТАГ. Для проверки этого предположения параметры иммунитета были исследованы *in vitro* у мышей 3 – кратно, с интервалом в 7 дней, иммунизированных ксеногенными ТАГ барана (рис. 2).

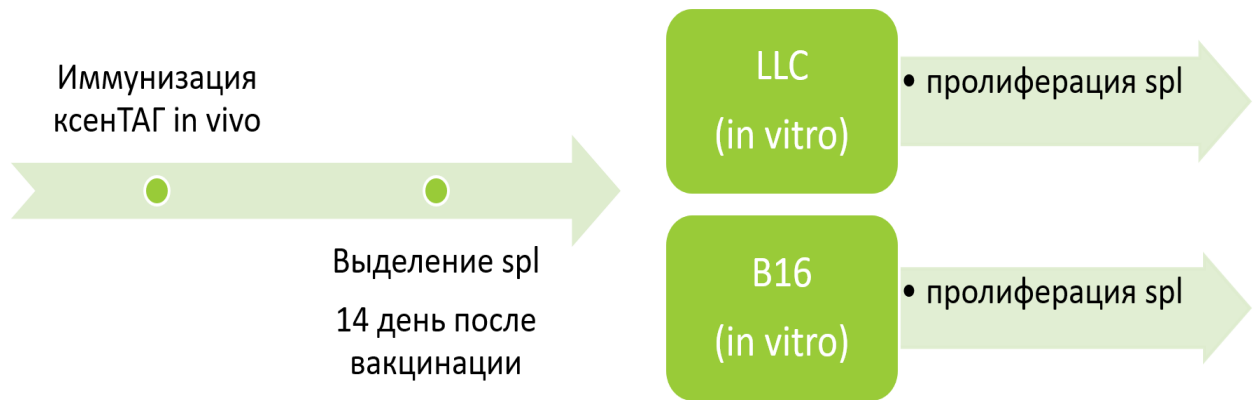


Рис 2. Пролиферативный ответ спленоцитов мышей, полученных от предварительно иммунизированных ксеногенными ТАГ мышей, на АГ опухоли LLC и B16.

Через 14 дней после последней иммунизации у мышей забирали селезенки и не фракционированную популяцию клеток культивировали 72 час в присутствии АГ, полученных из клеток опухолевых линий B16 и LLC в двух концентрациях  $1 \times 10^5$  кл/лунку и  $2 \times 10^5$  кл/лунку (или без них в контроле) (рис. 3). В качестве неспецифического активатора был использован конканавалин А (5 мкг/мл КонА). Зарегистрировано достоверное увеличение пролиферации лимфоцитов селезенки в ответ на все используемые варианты опухолевых АГ. Высота ответа была сравнима с неспецифической стимуляцией митогеном КонА.

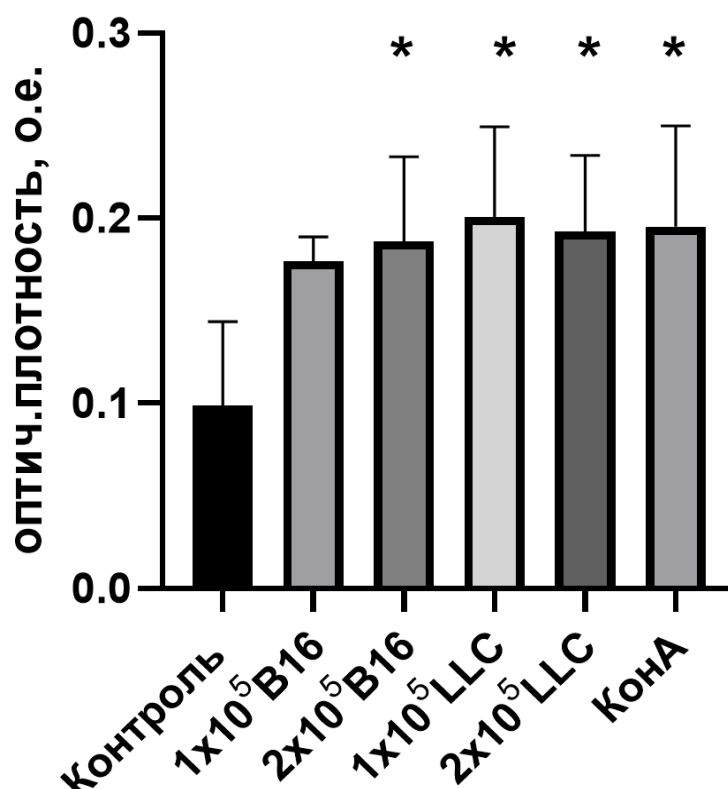


Рис 3. Пролиферативный ответ спленоцитов мышей, полученных от предварительно иммунизированных тестикулярными АГ барана животных. В качестве АГ - B16 и LLC в  $1 \times 10^5$  кл/лунку и  $2 \times 10^5$  кл/лунку и неспецифический стимулятор - Кона (5 мкг/мл).  $n=5$ ,  $*p < 0,05$ .

Таким образом, иммунизация мышей ТАГ барана приводит к формированию в организме животного популяции лимфоцитов, перекрестным образом реагирующих на опухолевые АГ, полученные из B16 и LLC, что регистрировалось по показателям оптической плотности проб, соответствующих пролиферации клеток. Показатели оптической плотности спленоцитов на опухолевые АГ повышены более чем в 2 раза по сравнению с контролем без добавления АГ и сравнимы с ответом на неспецифический стимулятор Кона.

Ранее было показано присутствие в B16 и LLC некоторых генов, относящихся к группе ТАГ [Селедцова и др., 2023]. В ДНК опухолевых клеток линии LLC определено наличие генов *mage A-1*, *GP100*, *тирозины*, *her2/neu*,

*раково-эмбрионального антигена*, на мембране клеток определены рецепторы тирозиназы и GP100. В ДНК клеток линии B16 определено наличие генов *mage A-1*, *GP100*, *тирозины*, *her2/neu*, *раково-эмбрионального антигена*, на мембране клеток определены рецепторы Her2/neu, тирозиназы и GP100. Таким образом, пролиферативный ответ *in vitro* иммунизированных ТАГ мышей может быть стимулирован по вторичному типу именно этими АГ, часть из которых принадлежит к семейству тестикулярных АГ.

### **Оценка продолжительности жизни мышей-опухоленосителей LLC и B16 при различных типах иммунизации**

Следующим этапом работы было исследование продолжительности жизни мышей-опухоленосителей карциномы LLC или меланомы B16 в различных вариантах постановки эксперимента, в основе которого была иммунизация мышей ксеногенными ТАГ. Типы иммунизации включали в себя терапевтический и профилактический вариант. Терапевтический вариант иммунизации представлен на рис. 4, когда мышам вначале прививается опухоль и через неделю начинается иммунизация, в профилактическом варианте (рис. 5) вначале проводится иммунизация, а затем прививается опухоль. Результаты экспериментов представлены в виде кривых выживаемости Каплан-Мейер, достоверность отличий сроков выживаемости анализировали с использованием the Mantel-Cox Log-Rank test. Для иммунизации были использованы поликлональные АГ, приготовленные из тестикул барана (ксеногенный вариант по отношению к мышам) и тестикул мыши (сингенный вариант по отношению к мышам).



Рис 4. Терапевтическая иммунизация ТАГ в/м в 1 точку (5 млн клеток/мышь) мышей C57Bl/6 и результаты по продолжительности мышей-опухоленосителей.



Рис 5. Профилактическая иммунизация ТАГ в/м в 1 точку (5 млн клеток/мышь) мышей C57Bl/6 и результаты по продолжительности жизни мышей-опухоленосителей.

На рис. 6 представлены кривые выживаемости мышей - опухоленосителей меланомы B16 (А) и карциномы LLC (В), полученные в результате выполнения терапевтического варианта иммунизации мышей. В качестве контроля были использованы мыши, которым вводились клетки опухолевых линий (B16 и LLC) и

иммунизации не проводилось, а также группа мышей с сингенной иммунизацией ТАГ (клетки яичка мышей).

Медиана времени жизни у мышей-опухоленосителей B16 при терапевтической иммунизации в группах контроля и сингенной группе составила 28 и 30 дней, соответственно (Рис. 6А), а у мышей-опухоленосителей LLC 30 и 26 дней, соответственно (Рис. 6В). Медиана времени жизни мышей, подвергшихся ксеногенному варианту иммунизации, составила 29 суток у опухоленосителей B16 и 23 дня у опухоленосителей LLC (Рис. 6 А, В). Таким образом, иммунизация мышей в терапевтическом варианте исполнения не оказывала какого-либо влияния на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

Наиболее значимые результаты были получены в модели карциномы LLC при профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ. Зафиксировано достоверное увеличение продолжительности жизни мышей - опухоленосителей LLC на 60% (медиана жизни мышей-опухоленосителей - 20 дней, при введении ксеногенных ТАГ - 32,2 дня) по сравнению с группой мышей-опухоленосителей и мышей, иммунизированных сингенным ТАГ и ксеногенными спленоцитами (рис. 7В). Продолжительность жизни мышей, иммунизированных сингенными ТАГ и ксеногенными спленоцитами не отличалась от продолжительности жизни мышей-опухоленосителей (рис.7). В некоторых экспериментах профилактической иммунизации ТАГ барана в модели карциномы LLC у 40 % мышей опухоль не развивалась вообще и эти мыши были далее задействованы в экспериментах по пассивному переносу иммунитета и у них были изучены параметры Т-клеточного иммунитета (рис 13, табл 5, 6). Обнаружено увеличение продолжительности жизни у мышей-опухоленосителей меланомы B16 с ксеногенной иммунизацией на 20% по сравнению с мышами-опухоленосителями меланомы B16 без иммунизации и иммунизацией сингенными ТАГ и ксеногенными спленоцитами.

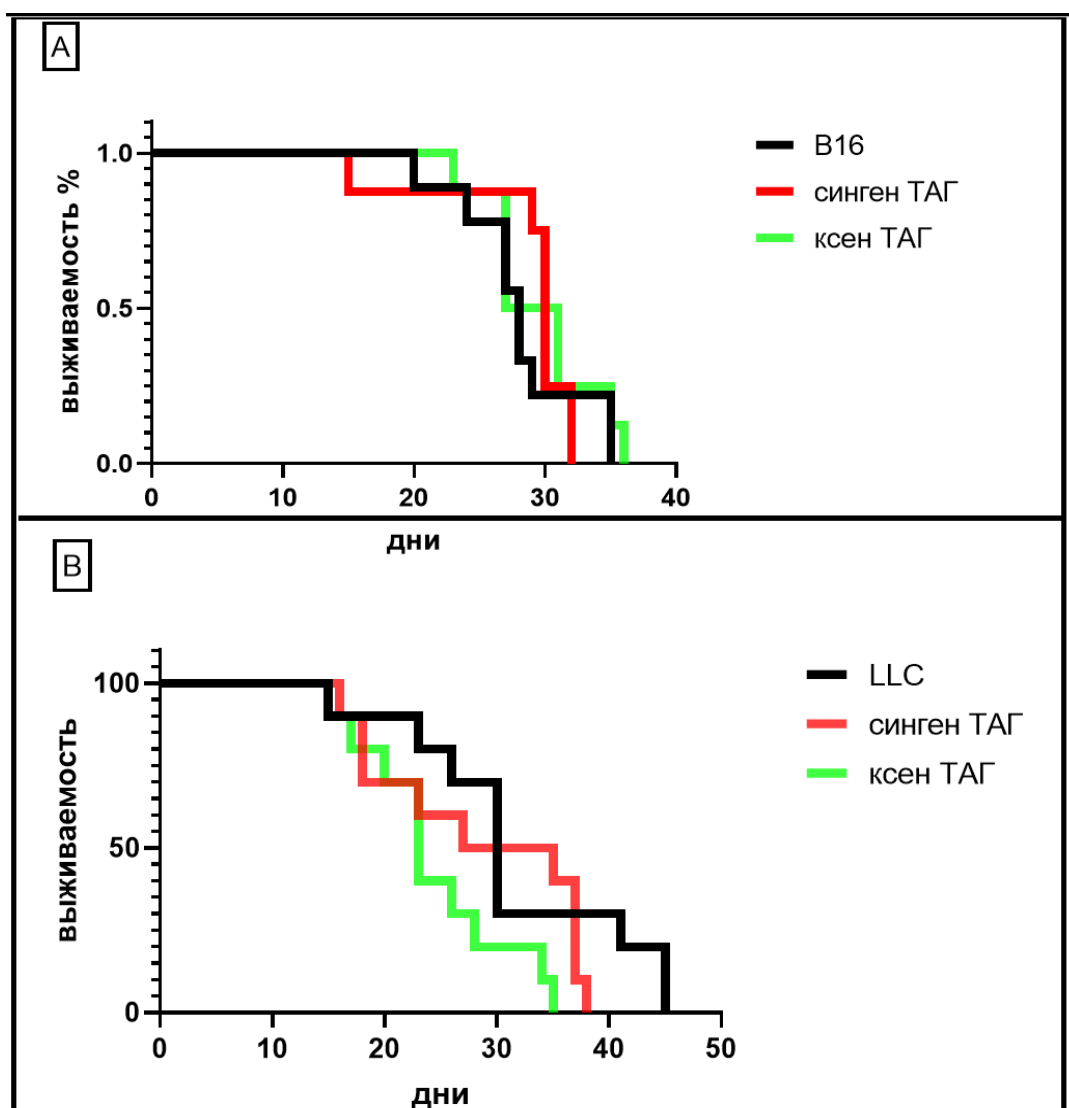


Рис. 6. Продолжительность жизни мышей-опухоленосителей меланомы B16 (A) и карциномы LLC (B) в режиме терапевтической иммунизации. Мышам вводили клетки опухолевых линий B16 или LLC п/к в концентрации  $10^5$  кл/мышь. Через неделю, с интервалом в 7 дней мышей дважды иммунизировали ксеногенным (ксен ТАГ) или сингенным (синген ТАГ) тестикулярным АГ в/м в 1 точку (5 млн клеток/мышь), далее фиксировали продолжительность жизни мышей. В контрольной группе мышей (B16 и LLC) иммунизации не проводилось.  $n=10$ .

При профилактической иммунизации медиана выживаемости опухолевого контроля меланомы B16 составила 22 дня, при ксеногенной иммунизации ТАГ продолжительность жизни мышей достоверно увеличилась на 20% и составила 27,5 дней. Иммунизация сингенным вариантом ТАГ и спленоцитами барана не изменила продолжительность жизни мышей - носителей карциномы LLC и меланомы B16 (рис. 7А, В). Таким образом, было показано, что наибольшей противоопухолевой эффективностью обладают ксеногенные тестикулярные антигены. Только при комплексном использовании ксеногенности и ТАГ получается синергичный эффект, по-отдельности ни сингенные ТАГ, ни ксеногенные спленоциты не были способны увеличивать продолжительность жизни мышей - опухоленосителей меланомы B16 и карциномы LLC.



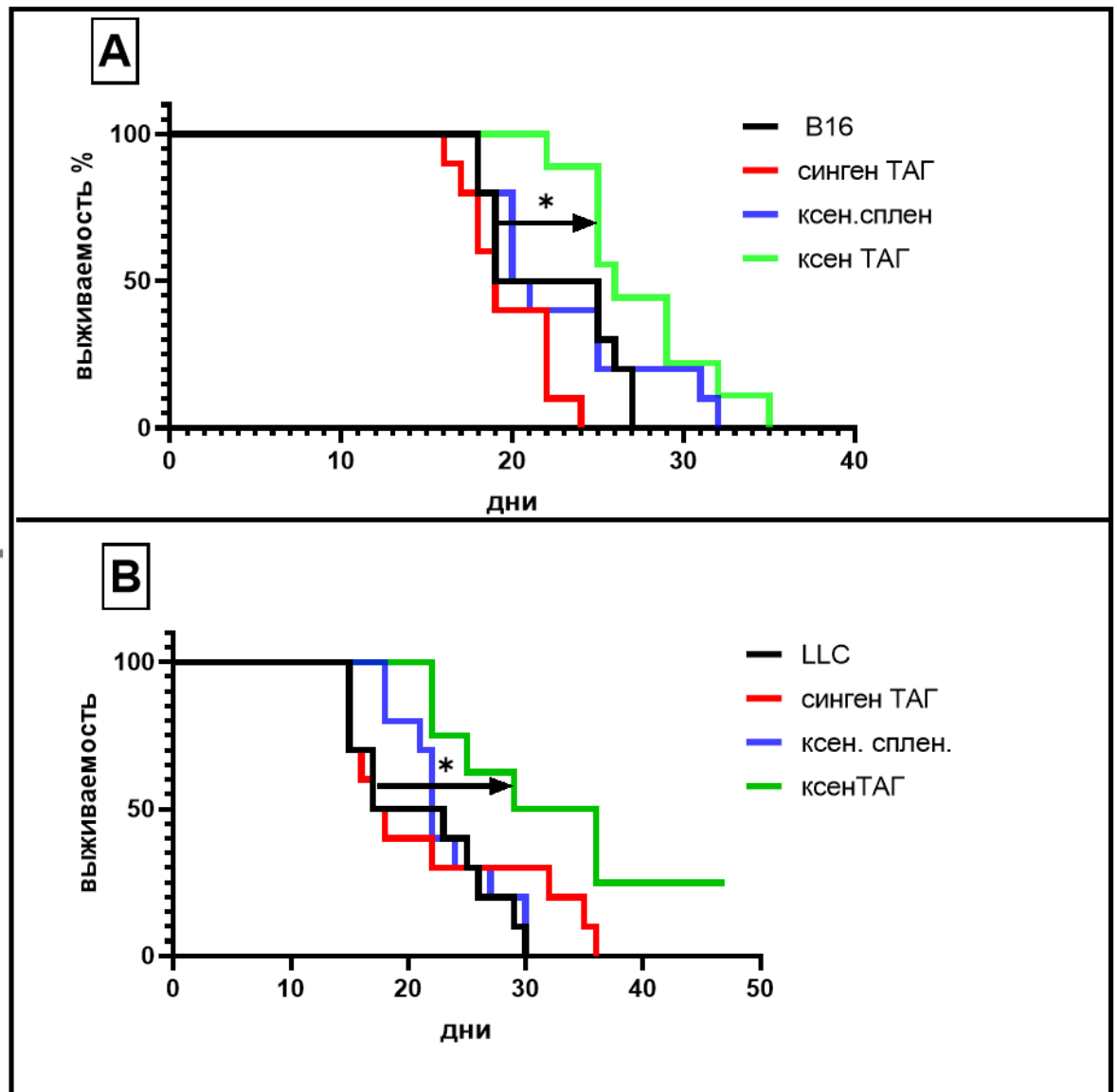


Рис. 7. Продолжительность жизни мышей-опухоленосителей меланомы B16 (A) и карциномы LLC (B) в режиме профилактической иммунизации. Мышей иммунизировали ксеногенным (ксен ТАГ), сингенным (синген ТАГ) тестикулярным АГ и АГ, полученным из клеток селезенки барана (ксен. сплен.) 3 раза с интервалом в 7 дней в/м в 1 точку (5 млн клеток/мышь), через 14 дней после последней иммунизации мышам вводили клетки опухолевых линий B16 или LLC п/к в область передней брюшной стенки в концентрации  $10^5$  кл/мышь, далее

фиксируют продолжительность жизни. В контрольной группе мышей (B16 и LLC) иммунизации не проводилось.  $n=10$ ,  $*p < 0,05$ .

### Изучение иммунологических механизмов при иммунизации мышей ТАГ

Следующая серия экспериментов посвящена анализу иммунологических механизмов при проведении профилактической иммунизации мышей C57Bl/6. На рис. 8 отображены этапы исследования.

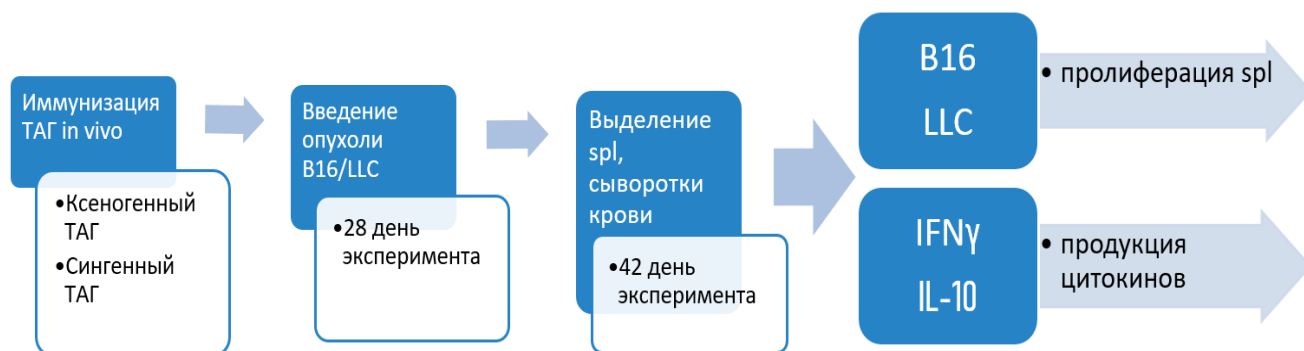


Рис 8. Показатели иммунитета мышей - опухоленосителей через 14 дней после введения опухолевых клеток в режиме профилактической иммунизации ксеногенными и сингенными ТАГ в моделях LLC и B16.

Мышей иммунизировали 3 раза с интервалом в 7 дней ксеногенными (обозначение группы - **В** на рис. 9 и 10) и сингенными ТАГ (обозначение группы - **С** на рис. 9 и 10). Контролем иммунизации служила группа мышей, которым вводили физиологический раствор (обозначение группы - **А** на рис. 9 и 10). Через 14 дней после последней иммунизации мышам прививали клетки опухолевых линий LLC (рис. 9) и B16 (рис. 10). Для оценки влияния опухолевого процесса на величину и перекрестную реактивность иммунного ответа, мышей выводили из эксперимента на 14 день после введения опухолевых клеток и оценивали

пролиферацию спленоцитов на опухолевые АГ, полученные из В16 и LLC, для чего спленоциты культивировали 72 часа в присутствии опухолевых АГ в концентрациях  $1 \times 10^5$  кл/лунку и  $2 \times 10^5$  кл/лунку или без них в контроле.

С помощью такого экспериментального подхода мы исследовали параметры клеточного звена иммунитета в условиях начала развития опухолевой процесса. Обнаружено достоверное увеличение пролиферативной активности спленоцитов в ответ на опухолевые АГ у иммунизированных ранее различными ТАГ мышей с карциномой LLC (контроль LLC- 0,1 о.е., при добавлении АГ: +  $1 \times 10^5$  В16-0,14 о.е. ( $p=0,004$ ), +  $2 \times 10^5$  В16-0,15 о.е. ( $p=0,002$ ), +  $1 \times 10^5$  LLC-0,15 о.е. ( $p=0,004$ ), +  $2 \times 10^5$  LLC-0,19 о.е. ( $p=0,002$ ) (рис. 9) .

Сплелоциты, полученные от предварительно иммунизированных ксеногенными ТАГ мышей с меланомой В16, также отвечали пролиферацией на разные концентрации опухолевых АГ, ответ достоверно отличался от неиммунизированного опухолевого контроля (контроль В16-0,1 о.е., при добавлении АГ: +  $1 \times 10^5$  В16-0,2 о.е. ( $p=0,002$ ), +  $2 \times 10^5$  В16-0,2 о.е. ( $p=0,002$ ), +  $1 \times 10^5$  LLC-0,23 о.е. ( $p=0,004$ ), +  $2 \times 10^5$  LLC- 0,26 о.е. ( $p=0,002$ ) (рис. 10).

Величина пролиферативного ответа спленоцитов при ксеногенной иммунизации была выше ответа, зафиксированного в условиях сингенной иммунизации, и в сравнении с ответом спленоцитов неиммунизированного опухолевого контроля в модели мышей-опухоленосителей LLC (рис. 9). Аналогичная картина пролиферативного ответа зарегистрирована в модели мышей-опухоленосителей В16 (рис. 10).

Нужно отметить, у контрольных мышей-опухоленосителей опухолей LLC и В16 зафиксировано наличие в спленоцитах популяции лимфоцитов, реагирующей на опухолевые АГ, что говорит об иммуногенности прививаемых опухолевых клеток. Таким образом, было доказано, что при иммунизации мышей ксеногенным (но не сингенным!) ТАГ формируется популяция лимфоцитов, которая реагирует

перекрестным образом на опухолевые АГ по вторичному типу, и в организме иммунизированных мышей могут индуцироваться протективные противоопухолевые реакции, которые позволяют защитить животных от развития сингенных опухолей или способствовать замедлению опухолевого процесса.

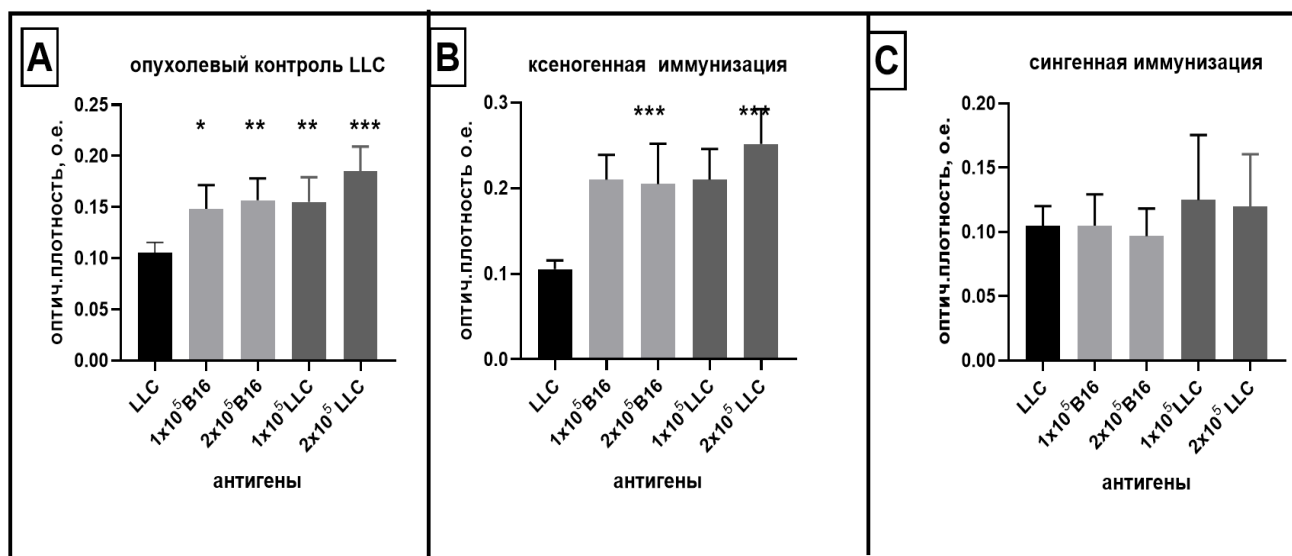


Рис. 9. Пролиферация лимфоцитов селезенки мышей, полученных от носителей карциномы LLC (А) через 14 дней после введения опухолевых клеток в режиме профилактического варианта иммунизации. Профилактическая иммунизация ксеногенными (В) и сингенными (С) ТАГ. Контроль - без добавления АГ. Антигены, полученные из клеток опухолевых линий B16 и LLC в концентрациях  $1 \times 10^5$  кл/лунку и  $2 \times 10^5$  кл/лунку.  $n=6$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

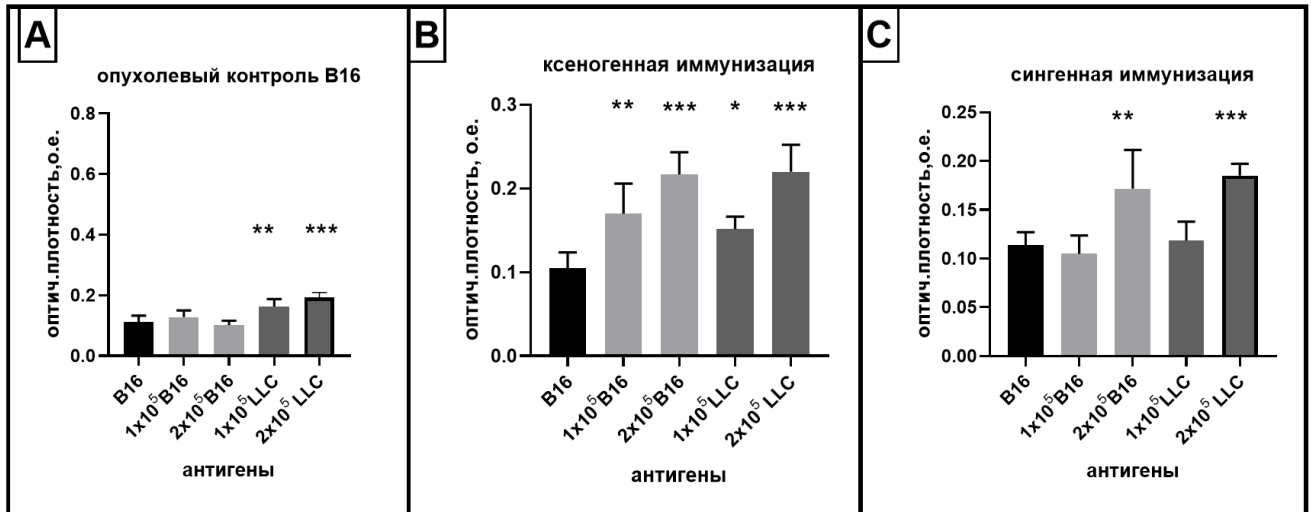


Рис. 10. Проплиферация лимфоцитов селезенки мышей, полученных от носителей меланомы B16 (А) через 14 дней после введения опухолевых клеток в режиме профилактического варианта иммунизации. Профилактическая иммунизация ксеногенными (В) и сингенными (С) тестикулярными АГ. Контроль - без добавления АГ. Антигены, полученные из клеток опухолевых линий B16 и LLC в концентрациях  $1 \times 10^5$  кл/лунку и  $2 \times 10^5$  кл/лунку.  $n=6$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .

В условиях ксеногенной иммунизации у опухоленосителей B16 и LLC (рис. 11) в плазме крови мышей, полученной на 14 сутки эксперимента, определен уровень  $IFN\gamma$  и IL-10. Зафиксирован достоверно повышенный уровень  $IFN\gamma$  как у мышей-опухоленосителей B16 (рис. 11А), так и у мышей-опухоленосителей LLC (рис. 11С) по сравнению с мышами-опухоленосителями без иммунизации ТАГ. Значения  $IFN\gamma$  у мышей-опухоленосителей в сингенном варианте иммунизации не были повышены по сравнению с мышами-опухоленосителями без иммунизации ТАГ. Отмечено также достоверное снижение продукции IL-10 в ксеногенном варианте предварительной иммунизации по сравнению с контролем (рис. 11 В, D).

Сингенный вариант иммунизации мышей с LLC сопровождался достоверным снижением концентрации  $IFN\gamma$  и IL-10 ниже значений, зафиксированных у мышей-опухоленосителей без иммунизации. Снижение уровня IL-10 в сингенной группе иммунизации ТАГ может свидетельствовать о распознавании иммунитетом сингенных ТАГ и ответе на них, но учитывая снижение  $IFN\gamma$  и результаты экспериментов по продолжительности жизни мышей-опухоленосителей LLC – уровень перекрестного ответа против опухолевых ТАГ ниже, чем в группе ксеногенной иммунизации ТАГ.

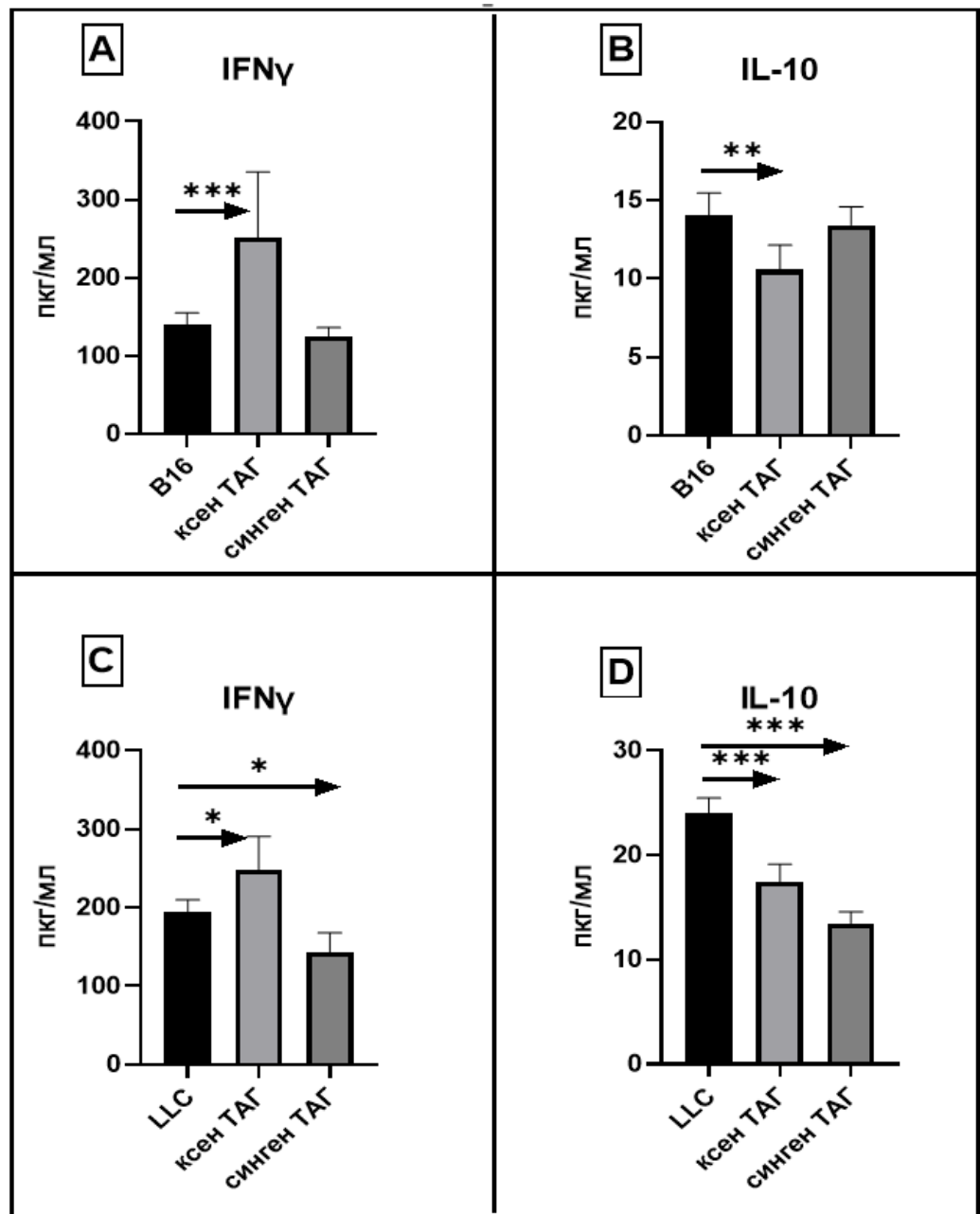


Рис. 11. Концентрация IFN $\gamma$  и IL-10 в плазме крови мышей, подвергшихся профилактическому варианту иммунизации ТАГ мышей с последующим введением клеток меланомы B16 (А, В) и карциномы LLC (С, D). Забор плазмы крови на 14 сутки после введения опухолевых клеток.  $n=6$ , \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,005$ , \*\*\* $p<0,0001$ .

Далее были исследованы некоторые характерные показатели иммунитета,

определяющие эффективность формирования Т-клеточных противоопухолевых реакций у мышей – опухоленосителей, подвергшихся профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ. На рис. 12 представлены этапы работы и исследуемые параметры иммунитета.

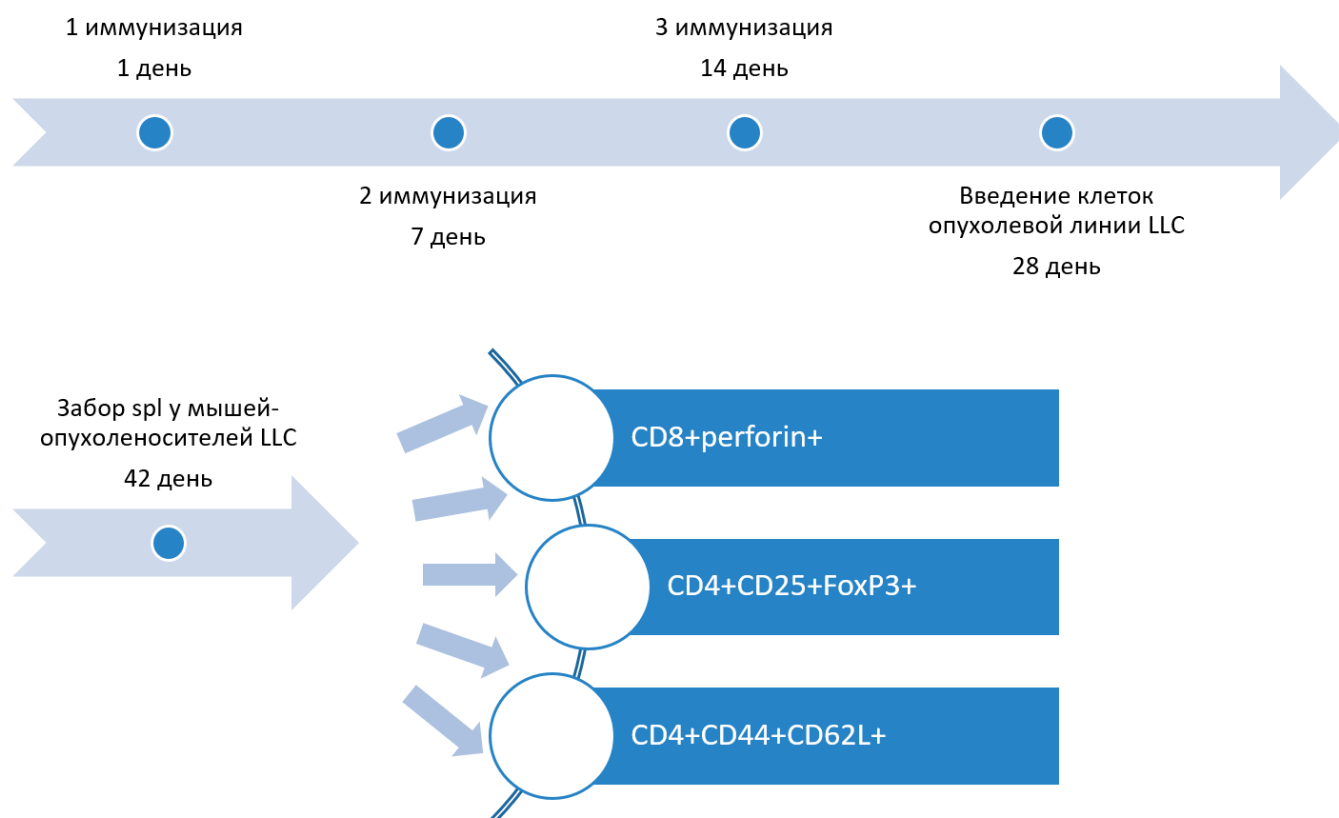


Рис 12. Оценка параметров иммунитета мышей-опухоленосителей LLC при профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ.

Для определения клеток, несущих перфорины, были исследованы группы мышей-опухоленосителей LLC, которые были предварительно иммунизированы ксеногенными ТАГ, контролем выступали мыши-опухоленосители LLC без иммунизации. Учитывая данные литературы, перфорин-содержащие клетки обладают противоопухолевой активностью, поэтому было произведено сравнение



вышеперечисленных групп. Таким образом, было обнаружено достоверное увеличение содержания клеток, несущих перфорины (CD8+) при иммунизации ксеногенными ТАГ по сравнению с группой мышей-опухоленосителей LLC (табл. 3).

Табл. 3. Содержание CD8+perforin+ Т-клеток в спленоцитах мышей-опухоленосителей LLC при профилактической иммунизации ТАГ и мышей-опухоленосителей LLC (контроль LLC).

Содержание (%)	Контроль (LLC)	Ксеногенная группа (опухоленосители LLC)
CD8+perforin+	4,37±0,53	8,39±1,90**

n=6, \*\*p <0,005.

Для определения Т-регуляторных клеток и Т-клеток памяти были исследованы группы мышей-опухоленосителей LLC, которые были иммунизированы ксеногенными ТАГ, контролем выступали интактные мыши. Обнаружено достоверное снижение содержания CD4+CD25+FoxP3+ Т-регуляторных клеток по сравнению с интактным контролем (табл. 4).

Табл. 4. Содержание Т-регуляторных клеток и Т-клеток памяти в спленоцитах мышей-носителей опухоли LLC при профилактической иммунизации ТАГ и интактных мышей.

Содержание (%)	Интактный контроль	Ксеногенная группа (опухоленосители LLC)
CD4+CD25+FoxP3+	1,72±0,35	1,2±0,17 **
CD4+CD44+CD62L+	4,6±2,4	4,8±2,4

n=6, \*\*p <0,005.

Таким образом, убедительно доказано, что при ксеногенной иммунизации мышей запускаются Т-клеточно-опосредованные механизмы противоопухолевой защиты, проявляющиеся в увеличении не только продолжительности жизни мышей, но и в 40% случаев способствующие защите мышей от развития опухолевого процесса при введении живых сингенных опухолевых клеток карциномы LLC.

Далее были исследованы параметры иммунитета у мышей, у которых не развилась опухоль LLC и которые ранее были подвергнуты профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ. На рис. 13 представлены этапы работы и исследуемые параметры иммунитета.

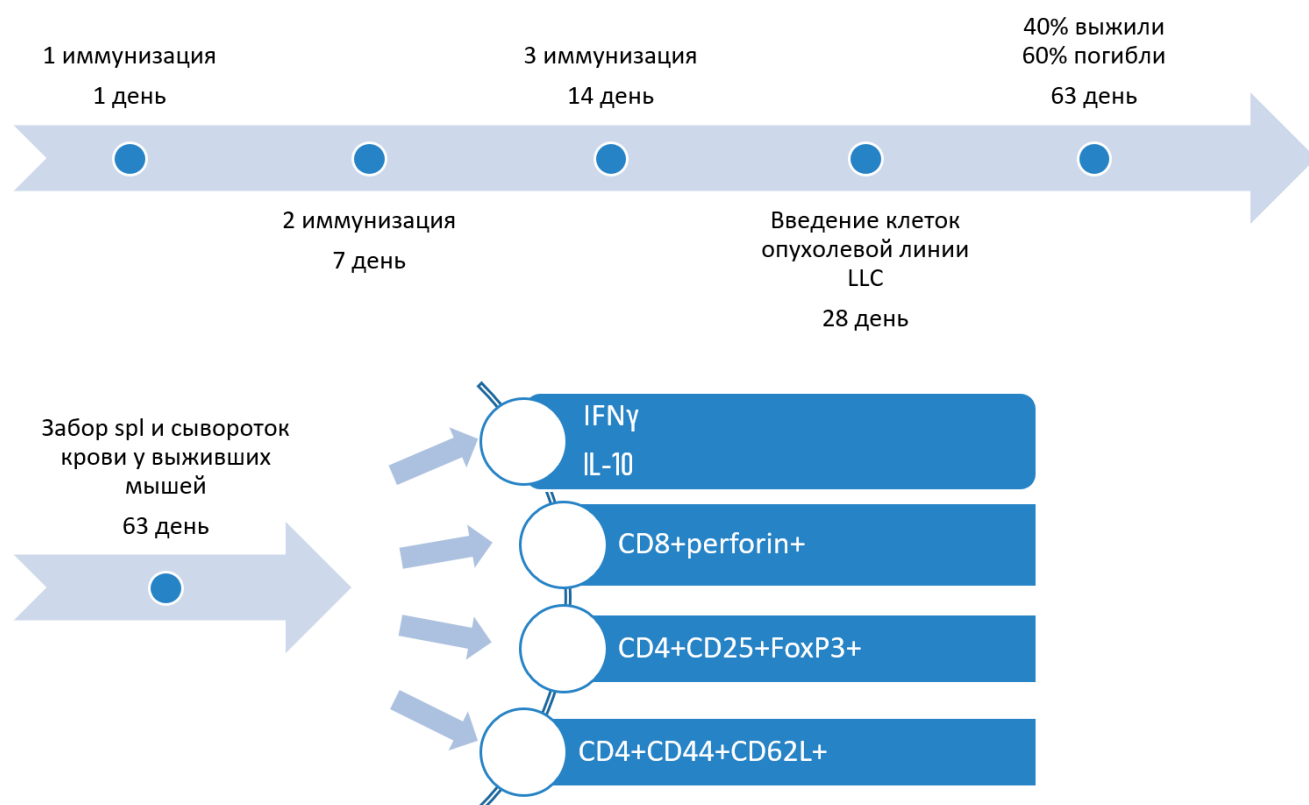


Рис 13. Оценка параметров иммунитета мышей, у которых не развилась опухоль при профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ.

Для оценки противоопухолевого иммунитета мышей, у которых не развилась опухоль при профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ было решено исследовать продукцию цитокинов  $\text{IFN}\gamma$  и  $\text{IL-10}$  и содержание  $\text{CD8+perforin+}$ ,  $\text{CD4+CD25+FoxP3+}$ ,  $\text{CD4+CD44+CD62L+}$  клеток. Контрольной группой при исследовании цитокинов  $\text{IFN}\gamma$  и  $\text{IL-10}$ ,  $\text{CD8+perforin+}$  клеток являлись мышитонохолоносители LLC, а при исследовании  $\text{CD4+CD25+FoxP3+}$ ,  $\text{CD4+CD44+CD62L+}$  клеток контролем выступали интактные мыши.

После 3-кратного введения ксеногенного ТАГ мышам с дальнейшим введением опухоли LLC на 28 день эксперимента, на 63 день производился забор плазмы крови и спленоцитов мышей, у которых не развилась опухоль.

Продукция  $\text{IFN}\gamma$  в группе мышей, у которых не развилась опухоль была достоверно выше, чем в группе контроля мышей - опухоленосителей LLC, в то время как уровень  $\text{IL-10}$  был достоверно ниже (рис. 14).

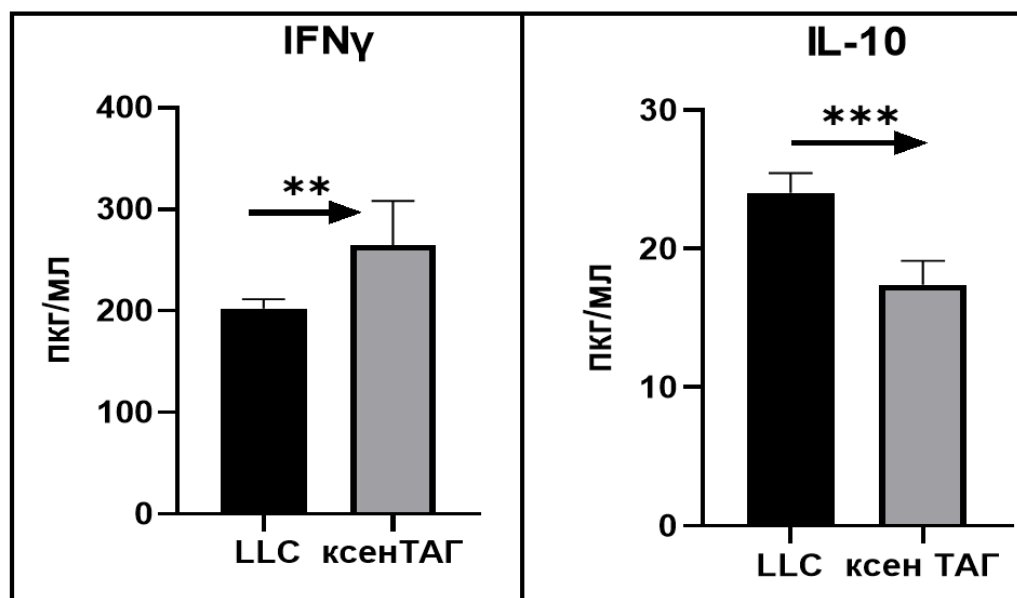


Рис. 14. Продукция  $\text{IFN}\gamma$  и  $\text{IL-10}$  лимфоцитами мышей, предварительно иммунизированных ксеногенными ТАГ, у которых не развилась/регрессировала

LLC после ее введения в сравнении с опухолевым контролем.  $n=4$ ,  $**p < 0,005$ ,  $***p < 0,0001$ .

При анализе содержания перфорин - позитивных клеток было выявлено достоверное повышение содержания CD8+perforin+ клеток в спленоцитах мышей ксеногенной группы иммунизации, у которых не развилась опухоль LLC, по сравнению с группой контроля (мышь-опухоленоситель LLC без иммунизации ТАГ) (табл. 5).

Табл. 5. Содержание популяционного состава Т-клеток мышей, у которых не развилась LLC после ее введения.

Содержание (%)	Контроль (LLC)	Ксеногенная группа (без развития LLC)
CD8+perforin+	4,37±0,53	16,29±6,95***

$n=6$ ,  $*** p < 0,0001$ .

Содержание Treg (CD4+CD25+FoxP3+) достоверно снижалось в группе мышей, у которых не развилась LLC при ксеногенной иммунизации по сравнению с интактным контролем (табл. 6). При этом отмечается, что в группе мышей, у которых не развилась опухоль, количество Т-регуляторных клеток меньше, чем у мышей-опухоленосителей LLC с профилактической иммунизацией ТАГ.

При анализе Т-клеток памяти (CD4+CD44+CD62L+) были получены данные свидетельствующие о повышении содержания клеток в группе мышей-опухоленосителей LLC по сравнению с группой интактного контроля. В группе мышей, у которых не развилась опухоль LLC, отмечается снижение содержания этих клеток. Возможно, это можно объяснить тем, что Т-клетки памяти

активировались и преобразовались в эффекторные Т-клетки для участия в противоопухолевом иммунном ответе, что и привело снижению их количества.

Табл. 6. Содержание популяционного состава Т-клеток мышей, у которых не развилась LLC после ее введения.

Содержание (%)	Интактный контроль	Ксеногенная группа (без развития LLC)
CD4+CD25+FoxP3+	1,70± 0,12	1.20±0.06 **
CD4+CD44+CD62L+	4.35±0.59	4,003± 0,08

n=6, \*\*p <0,005.

### **Изучение продолжительности противоопухолевой профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ и возможности пассивного переноса иммунитета интактным реципиентам**

Для исследования длительности протективной противоопухолевой защиты при профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ, иммунизированным животным прививали опухоль LLC через 3 и 6 мес и сравнивали продолжительность жизни с группой животных, которым опухоль LLC вводили через 1 мес после иммунизации (рис. 15).

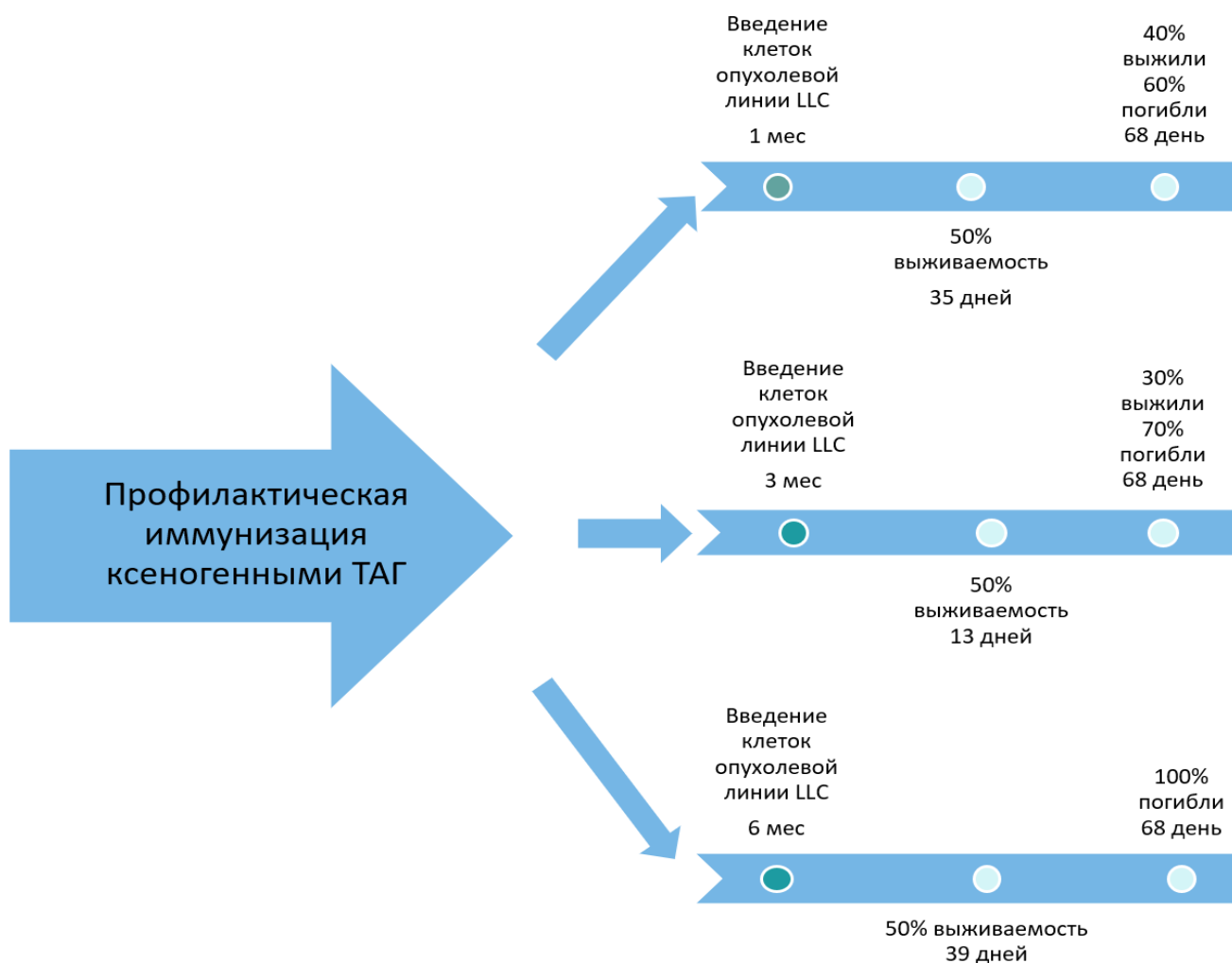


Рис 15. Исследование длительности протективных противоопухолевых реакций по увеличению продолжительности жизни мышей-опухоленосителей.

При анализе выживаемости мышей-опухоленосителей LLC было выявлено достоверно значимое увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, подвергшихся ксеногенной иммунизации ТАГ в группах «1 мес» и «6 мес» по сравнению с группой опухолевого контроля (рис. 16). В течение 3 месяцев защита была более выраженной - у 40% мышей опухоль не развивалась вообще. Увеличение периода введения опухолевых клеток LLC до 6 месяцев после иммунизации приводит к снижению эффективности иммунизации, поскольку в этой группе животных не было мышей, у которых не развивалась опухоль, но тем не

менее продолжительность жизни мышей - опухоленосителей LLC увеличилась в 1,8 раз по сравнению с контролем (гибель мышей-опухоленосителей LLC с профилактической иммунизацией ТАГ происходила на 53 сутки, в то время как у неиммунизированного контроля на 30 сутки).

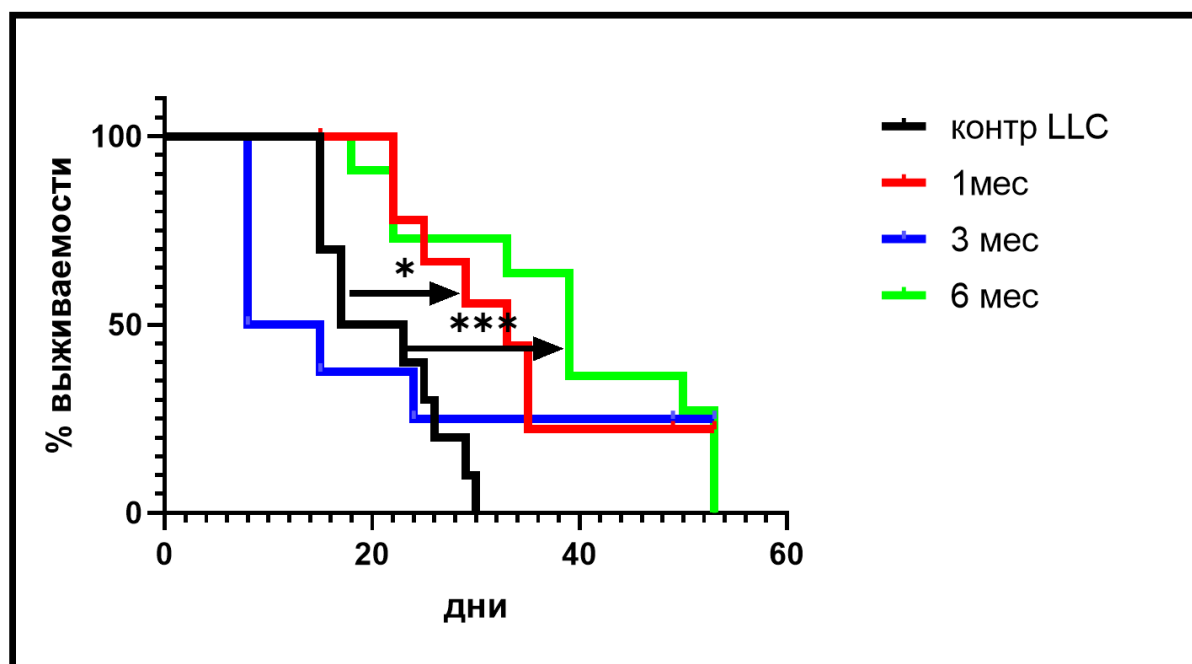


Рис. 16. Анализ длительности протективных противоопухолевых реакций, представленный в виде кривых выживаемости мышей-опухоленосителей карциномы LLC в режиме профилактической иммунизации. Мышей иммунизировали ксеногенным ТАГ 3 раза с интервалом в 7 дней в/м в 1 точку (5 млн клеток/мышь), через 1 месяц (красная линия), 3 месяца (синяя линия) и 6 месяцев (зеленая линия) после последней иммунизации мышам вводили клетки опухолевой линии LLC п/к в концентрации  $10^5$  кл/мышь, далее фиксировали продолжительность жизни. В контрольной группе мышей - опухоленосителей LLC иммунизации не проводилось.  $n=10$ ,  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .

Исследование возможности пассивного переноса противоопухолевого протективного иммунитета от иммунизированных ксеногенным ТАГ животных, у которых не развилась опухоль, intactным мышам было выполнено в модели карциномы LLC. Этапы проведения эксперимента представлены на рис. 17.

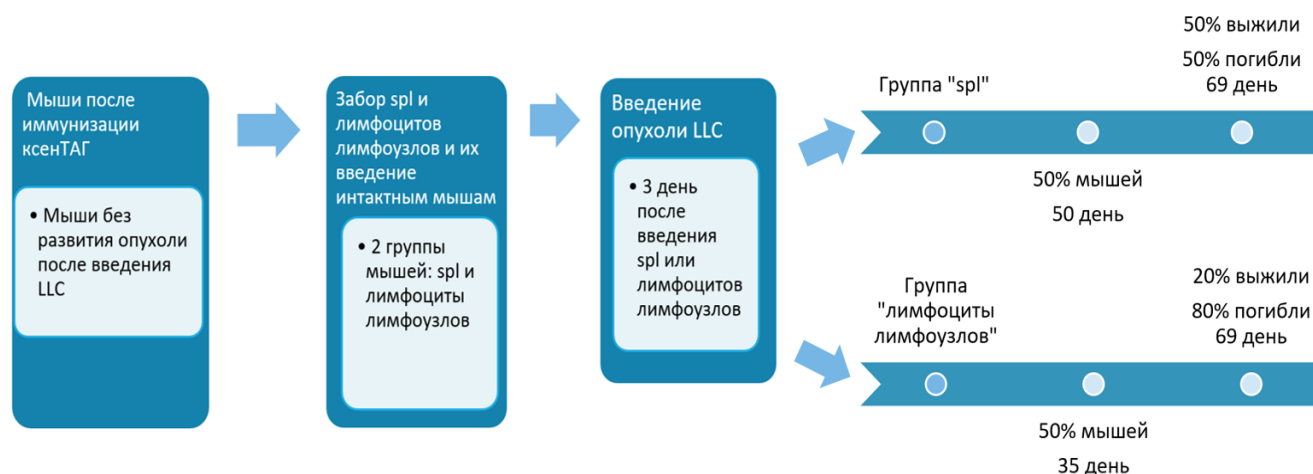


Рис. 17. Пассивный перенос протективного противоопухолевого иммунитета intactным мышам.

В качестве материала для пассивного переноса иммунитета были использованы спленоциты и лимфоциты лимфоузлов иммунизированных ксеногенным ТАГ мышей, у которых не развилась опухоль при ее введении после исследования длительности профилактической иммунизации ксеногенными ТАГ.

У мышей, иммунизированных ксеногенными ТАГ, был произведен забор селезенки, подмышечных и паховых лимфоузлов. Полученные клетки были подсчитаны и от каждой пробы спленоцитов 1-7 взяли по 2 млн клеток и объединили в общую суспензию клеток. Все лимфоциты лимфоузлов объединили в одну пробу и подсчитали количество клеток. Далее intactным мышам в/в вводили спленоциты или лимфоциты по 1 млн кл. на мыш. В каждой группе было 10 мыш. Через 3 дня после введения клеток мышам прививали карциному LLC и фиксировали продолжительность жизни. На рис. 18: черная линия -



продолжительность жизни мышей опухолевого контроля, зеленая линия - продолжительность жизни интактных мышей, которым ввели в/в лимфоциты лимфоузлов, синяя линия - продолжительность жизни интактных мышей, которым ввели в/в ввели спленоциты.

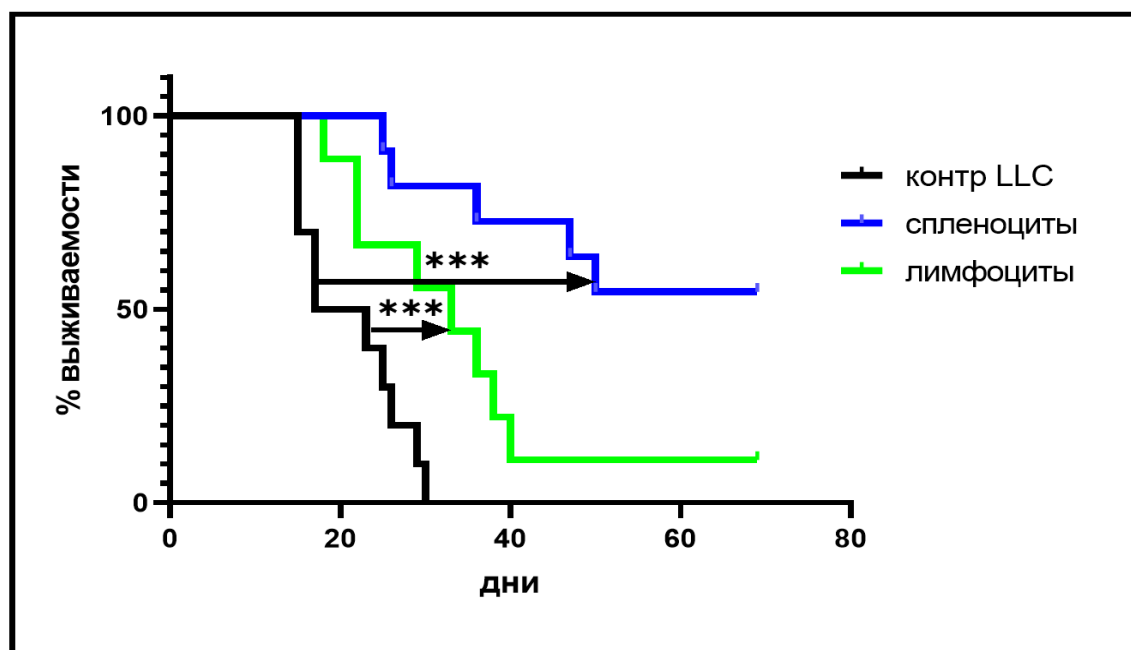


Рис. 18. Продолжительность жизни мышей-опухоленосителей LLC при переносе спленоцитов или лимфоцитов лимфатических узлов от мышей, у которых не развилась карцинома LLC интактным реципиентам с последующей инокуляцией им опухолевых клеток линии LLC.  $n=10$ ,  $***p < 0,0001$ .

Показано достоверное увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей LLC, получивших инъекцию сингенных спленоцитов и лимфоцитов лимфоузлов по сравнению с контролем (мыши-опухоленосители LLC без иммунизации). На 69 сутки после введения клеток LLC привитая опухоль не развилась вообще у 20% животных в группе мышей, которым ввели в/в лимфоциты лимфоузлов и у 50% животных в группе мышей, которым ввели в/в ввели спленоциты.

Мы считаем, что данные результаты являются результатом наличия клеток, обладающих противоопухолевым эффектом после иммунизации ксеногенными ТАГ. В селезенке и лимфоузлах находятся цитотоксические Т-клетки, НК клетки, Т-клетки памяти, но стоит учитывать процент содержания этих клеток. В селезенке содержится до 25% от общего числа лимфоцитов организма, а во всех лимфоузлах до 20%. Количество введенных интактным мышам клеток, обладающих противоопухолевым эффектом после иммунизации ксеногенными ТАГ, в суспензии спленоцитов больше, чем лимфоцитов лимфоузлов.

Таким образом, мы наблюдаем большую выживаемость при введении спленоцитов интактным мышам после привития опухоли LLC, чем при введении лимфоцитов лимфоузлов.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В поддержании опухолевого роста задействованы центральные и периферические механизмы толерантности. Гены *rMAGE-A4*, *NY-ESO-1*, *PRAME*, *CT83*, *SSX2* и др., относящиеся к ТАГ, высоко экспрессируются в клетках опухолей различного происхождения (печень, молочная железа, поджелудочная железа, кишечник, легкие и др.) и практически не экспрессируются нормальными клетками, за исключением клеток яичка и плаценты [O'Donnell et al., 2022].

Причина, по которой ТАГ обычно экспрессируются в опухоли, не совсем понятна, но может быть связана с тем фактом, что белки, из которых строятся сперматозоиды, обеспечивают конкурентное преимущество при перепрофилировании их в опухолевые клетки. Многие ТАГ являются по своей природе неупорядоченными белками, которые могут иметь множество функций и которые могут быть полезны для пролиферации и миграции опухолевых клеток. В диссертационном исследовании были использованы ТАГ ксеногенного происхождения для усиления их иммуногенности. Возможность использования такого подхода обосновывается тем, что тестикулярные АГ являются эволюционно консервативными молекулами, следствием этого является высокая степень гомологии между дифференцировочными антигенами человека и животных.

Согласно текущей информации в CTD Database (<http://www.cta.lncc.br>) и GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), геном человека включает более 200 генов ТАГ, классифицированных в 44 семейства генов. Некоторые из этих семейств имеют несколько членов, ортологи и паралоги генов ТАГ были обнаружены у различных организмов, включая приматы, грызуны, рыбки данио, плодовые мухи, нематоды и даже дрожжи. Например, в геномах человека, приматов и грызунов было идентифицировано более 30 белок-кодирующих генов *MAGE*, а идентичность ортологических последовательностей составляла от 40% до 80% [De Plaen et al., 1999]. Гомология между представителями человеческих семейств *MAGEA*, *MAGEB*

и *MAGEC* колеблется от 60% до 83% для последовательностей кДНК и от 47% до 69% для последовательностей белков, идентичность кДНК и последовательностей белков между представителями мышинных семейств *Mage-a* -57-99% и *Mage-b* - 36-99% соответственно. Большинство белков *MAGE* включают консервативный домен гомологии *MAGE* (MHD), содержащий 200 аминокислот, белки *MAGED* состоят из двух MHD [Stevenson et al., 2007].

Инфильтрация клетками иммунной системы ксеногенных тканей начинается с нейтрофилов как наиболее ранней ответной реакции, за ней реагируют на АГ макрофаги и Т-клетки. Врожденная иммунная система, которая состоит в основном из фагоцитарных клеток (моноцитов, макрофагов и нейтрофилов), естественных клеток-киллеров (NK), а также воспалительных медиаторов, высвобождаемых гранулоцитами, распознает ксеногенные клетки через связь с молекулярными паттернами (Pamps), и приводит к активации врожденные клетки иммунной системы [Sioud et al., 2003]. Нейтрофилы непосредственно активируются ксеногенными клетками и в комплексе с ксенореактивными естественными антителами и комплементом уничтожают ксеногенные клетки. В этом процессе уничтожения ксеногенного АГ задействованы Т-, В- и NK-клетки. Т-клеточно-опосредованные реакции являются критичными для отторжения ксеногенных клеток.

Эффективность использования ксеногенного ТАГ была подтверждена в экспериментах *in vivo*. Терапевтический вариант иммунизации не сопровождался увеличением продолжительности жизни мышей - опухоленосителей меланомы B16 и карциномы LLC. Мы полагаем, что это связано с особенностями экспериментальной модели. Введение мышам 100 тыс. клеток вызывает у мышей формирование опухоли с летальным исходом животных в течение 31-44 дней, что соответствует 4 стадии заболевания у человека (рис. 6). В этих условиях иммунная система не успевает запустить все свои противоопухолевые механизмы отторжения, кроме того, иммуносупрессорное значение самой опухоли в этом

случае может быть значимым. В профилактическом варианте иммунизации (3-кратная иммунизация ТАГ, затем привитие опухоли) мы зарегистрировали достоверное увеличение медианы продолжительности жизни мышей на 60% у мышей-опухоленосителей LLC и на 20% у носителей меланомы B16 (рис 7). В качестве контрольных групп были использованы лимфоциты селезенки барана и клетки яичка мышей. Изменения продолжительности жизни мышей контрольных групп в сравнении с неиммунизированными опухоленосителями не зарегистрировано. Разницу в продолжительности жизни мышей-опухоленосителей карцины LLC и меланомы B16 мы связываем с разным количеством АГ на опухолевых клетках линий B16 и LLC и их гомологией с тестикулярными АГ.

Терапевтическая эффективность использования ксеногенных продуктов в комплексном лечении опухолевых заболеваний собак, кошек, кур подтверждается литературными данными [Wei et al., 2000; Su et al., 2003; Kamstock et al, 2007; Seledtsov et al., 2011]. Есть и примеры использования ксеногенных молекул в лечении людей с онкопатологией. В ряде последних работ авторы показали, что интравезикальная имплантация ксеногенных клеток мочевого пузыря индуцирует противоопухолевые эффекты против собственных опухолевых клеток по принципу *bystander anti-tumor effects*, а их комбинация с химиотерапией наиболее эффективна в лечении прогрессирующей опухоли мочевого пузыря [Huang et al., 2019, 2021].

Более тщательное исследование показало, что ксенотерапия способствует инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами и их активацией. Иммунизация мышей человеческими меланома-ассоциированными гликопротеинами - *gp75* и *gp 100* [Bowne et al, 1999; Monzavi-Karbassi et al, 2006] способна предотвращать развитие в их организме меланомы, клетки которой экспрессируют соответствующие мышинные аналоги. Ингибция роста меланомы ассоциировалась с развитием очагов аутоиммунной депигментации [Monzavi-Karbassi, 2006].

В другой работе [Hawkins, 2000] было установлено, что иммунизация мышей ДНК, кодирующей человеческий *gp100*, приводила к формированию у них

устойчивого иммунитета против клеток мышинной меланомы. Вакцинация ДНК, кодирующей мышинный *gp100*, оказалась полностью неэффективной в этом отношении.

Ксеновакцинация, нацеленная на прерывание толерантности к антигену *gp100*, была использована при лечении 34 собак с меланомой. В качестве вакцины были использованы клетки собачей меланомы 17СМ98, трансфецированные фрагментом ДНК, кодирующим человеческий *gp100*. В результате вакцинотерапии, полный или частичный противоопухолевый ответ был зарегистрирован у 17% животных. Стабилизация болезни продолжительностью более 6 недель была отмечена у 35% животных. Группа собак, ответивших на вакцинацию торможением опухолевого роста, демонстрировала заметно более длительный период выживания в сравнении с не ответившей группой. Клинический ответ коррелировал с реакцией ГЗТ на вакцинальные клетки, но в то же время не коррелировал с уровнем сывороточных антивакцинальных антител, а также с активностью вакцина-специфичных ЦТЛ [Alexander, 2007].

В диссертационном исследовании длительность эффективности протективных противоопухолевых реакций проверялась в течение 6 месяцев (рис. 16). Мышей иммунизировали ТАГ и через 1, 3 и 6 месяцев мышам прививали карциному LLC. У мышей со сроком иммунизации 1 и 3 месяца опухоли развивались значительно медленнее, у 40% животных опухоли не возникли вообще. Удлинение периода после иммунизации и до введения опухоли до 6 месяцев приводит к снижению эффективности иммунизации, поскольку в этой группе животных не было мышей, у которых не развилась опухоль, но тем не менее, медиана продолжительности жизни группы мышей удвоилась по сравнению с контролем (до 39 суток против 20 суток у неиммунизированного контроля) (рис 16).

В экспериментах с «пассивным переносом иммунитета» спленоциты и лимфоциты лимфоузлов, полученные от иммунизированных ТАГ мышей, у

которых не развилась опухоль LLC, вводили интактным животным, затем им прививали клетки опухоли LLC и отслеживали продолжительность жизни животных - опухоленосителей. Зафиксировано достоверное увеличение медианы продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, которым были внутривенно введены лимфоциты лимфоузлов, на 60%, причем у 20% животных опухоль не развилась вообще. При переносе спленоцитов среднюю продолжительность жизни определить нельзя, т.к. у 50% мышей рост опухоли не регистрировался (рис 18).

В работах Symchych et al. мышей с карциномой легкого Льюиса (LLC), карциномой Эрлиха или саркомой 37 иммунизировали ксеногенной противоопухолевой вакциной на основе белков куриных эмбрионов (*CEP*) и исследовали ее противоопухолевую активность [Symchych et al., 2014, 2018]. Иммунизация приводила к значительному ингибированию роста LLC (индекс ингибирования роста опухоли составлял 42,10-53,13% в зависимости от дня роста опухоли) и карциномы Эрлиха (продление жизни на 34,48%), но не оказывала влияния на рост саркомы 37. Иммунизация *CEP* после хирургического удаления первичной LLC также приводила к формированию защитных противоопухолевых реакций, проявляющиеся полным отсутствием метастатического процесса, в отличие от sham-оперированных мышей [Symchych, 2018]. Авторы показали, что протективность связана с наличием АТ к *CEP* и активацией NK-клеток.

Исследованиями в диссертационной работе подтверждена Т-клеточная зависимость формирования противоопухолевых реакций (рис. 9, 10, 11). Показано увеличение концентрации IFN $\gamma$ , пролиферирующих лимфоцитов в ответ на АГ, полученных от иммунизированных ранее животных. В группах иммунизированных мышей с привитой опухолью, у которых не развилось опухолевое заболевание, было обнаружено повышенное содержание ЦТЛ (CD8+perforin+) и снижение количества Т-регуляторных клеток (табл. 3, 4, 5, 6). В работе Zhong et al. показано, что вакцинация мышей растворимыми белками свиной плаценты приводила к формированию эффективного поликлонального

иммунного ответа против меланомы. При этом обе основные субпопуляции Т-лимфоцитов (CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>) были вовлечены в индуцируемые ксеноантигенами иммунные процессы [Zhong et al., 2006]. В исследовании Gritzapis et al., 2006 показано, что вакцинация мышей человеческим пептидом *HER-2/neu* (435-443) стимулирует генерацию ЦТЛ, которые эффективно распознавали сингенные *HER-2/neu*-позитивные опухолевые клетки. Сервивин (survivin) – протеин, один из ингибиторов апоптоза, который подобно *HER-2/neu* может в высокой степени экспрессироваться клетками различных опухолей и, соответственно, может быть использован в качестве вакцинальной мишени. Установлено, что дендритическая вакцинация мышей человеческим сервивином индуцирует иммунный ответ, опосредуемый Т-хелперами 1 типа. Противоопухолевый эффект вакцинации мышей человеческим сервивином продемонстрирован в экспериментальной моделях глиомы [Cho et al., 2007; Ciesielski et al., 2006], лимфомы [Zhu et al., 2007], а также рака поджелудочной железы [Zhu et al., 2007]. В работе Hawkins WG, 2000 было установлено, что иммунизация мышей ДНК, кодирующей человеческий *gp100*, приводила к формированию у них устойчивого иммунитета против клеток мышинной меланомы. Вакцинация ДНК, кодирующей мышинный *gp100*, оказалась полностью неэффективной в этом отношении. Показано, что иммунизация крыс человеческим, но не крысиным HGP приводила к ингибции роста глиомы. Противоопухолевый эффект ассоциировался с инфильтрацией опухолевой ткани CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетками [Sioud et al., 2003].

Таким образом, экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о том, что иммунизация организма ксеногенными аналогами эндогенных молекул может приводить к индукции иммунологических реакций к собственным АГ, исходно к которым организм толерантен. Большой вклад в поддержание опухолевого роста вносят регуляторные клетки. CD4<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки (Tregs), экспрессирующие транскрипционный фактор FoxP3, обладают высокой иммуносупрессивной способностью и играют центральную роль в поддержании



толерантности и иммунного гомеостаза, однако при злокачественных опухолях они способствуют прогрессированию опухоли, подавляя эффективный противоопухолевый иммунитет. Высокая инфильтрация Tregs наблюдается в опухолевых тканях и их истощение ассоциируется с усилением противоопухолевых иммунных реакций на животных моделях. Кроме того, повышенное количество Tregs и, в частности, сниженное соотношение CD8<sup>+</sup> T-клеток к Tregs среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, коррелирует с плохим прогнозом при различных типах рака человека [Qin, 2009; Takeuchi et al., 2016].

Содержание Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) достоверно снижалось при ксеногенной иммунизации в обеих группах по сравнению с контролем. Также отмечались более низкие значения в группе мышей, у которых опухоль не развивалась (табл. 4, 6). Таким образом, свой вклад в противоопухолевый эффект вносят и регуляторные клетки при ксеногенной иммунизации. Предварительная иммунизация ксеногенными антигенами тесно связана с формированием популяции Т-клеток памяти. Формирование иммунологической памяти является отличительной чертой адаптивного иммунитета, с помощью которой иммунная система “запоминает” предыдущую встречу с антигеном, экспрессируемым патогенами, опухолями или нормальными тканями, и при повторных встречах вырабатывает более быстрые и эффективные ответные реакции [Mondino et al., 2020; Liu et al., 2020].

При анализе Т-памяти (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) были получены данные свидетельствующие о повышении количества клеток в группе мышей-опухоленосителей LLC по сравнению с группой контроля (табл. 4). Но в группе мышей, у которых не развивалась опухоль LLC, отмечается снижение содержания этих клеток (табл. 6). Возможно, это можно объяснить тем, что Т-клетки памяти активировались и преобразовались в эффекторные Т-клетки для участия в противоопухолевом иммунном ответе, что и привело снижению их количества. Мы

предполагаем, что при ксеногенной иммунизации в организме животного формируется популяция Т-клеток памяти, специфично реагирующая на В16 или LLC при привитии опухоли. Скорость формирования противоопухолевых Т-эффекторных клеток будет зависеть и от количества противоопухолевых клеток памяти, которые являются их предшественниками. Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что ксеногенный ТАГ — это источник антигенов, против которых в организме экспериментальных мышей-опухоленосителей формируются эффективные противоопухолевые защитные механизмы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Решение проблемы распознавания опухолевых клеток клетками иммунной системы на основании их рецепторного репертуара является важнейшей задачей онкоиммунологии. В настоящее время невыполнимой задачей является запуск процесса индукции специфичных к собственным опухолевым АГ эффекторных Т-лимфоцитов, Т-клеток памяти и специфичных АТ, которые способны сформировать эффективную противоопухолевую защиту и вылечить онкологического больного. Выполненная диссертационная работа поможет найти эффективный путь для разработки и модификации АГ структур, запуска специфичных противоопухолевых реакций в организме онкологического больного и будет той ступенью, которая приблизит нас к излечению больного от онкологической болезни.

Использование ксеногенного варианта ТАГ в качестве стимулятора противоопухолевого иммунитета обоснованно результатами диссертационной работы, будет предложено в качестве высокоиммуногенного материала, способного индуцировать формирование эффекторного звена иммунитета, направленного на ТАГ, представленных на собственных опухолях. Основываясь на вышеизложенном и используя вышеуказанные в работе подходы иммунизации, мы полагаем, что сможем кратно усилить эффективность протективных иммунных реакций в организме опухоленосителя и, таким образом, увеличить продолжительность его жизни или излечить - в перспективе.

## ВЫВОДЫ

1. Предварительная иммунизация мышей ксеногенными ТАГ приводит к увеличению 50% выживаемости мышей-опухоленосителей B16 и LLC, что свидетельствует о том, что ксеногенный компонент АГ является значимым иммуногенным инструментом в формировании эффективного противоопухолевого иммунитета.

2. Пролиферативный ответ спленоцитов, полученных от мышей-опухоленосителей иммунизированных *in vivo* ксеногенными и сингенными ТАГ мышей на антигены LLC и B16, достоверно выше в группе мышей, иммунизированных ксеногенным ТАГ по сравнению с группой мышей, иммунизированных сингенным ТАГ, что указывает на наличие ортологичных антигенных структур между ТАГ барана, ТАГ меланомы B16 и ТАГ карциномы LLC.

3. Обнаружено повышение уровня IFN $\gamma$  и снижение IL-10 в плазме крови как в группе мышей-опухоленосителей B16 и LLC, иммунизированных ксеногенными ТАГ, так и в группе мышей, у которых не развилась опухоль LLC после предварительной иммунизации ксеногенными ТАГ, в сравнении с неиммунизированным опухолевым контролем, что свидетельствует о вовлечении этих цитокинов в формирование противоопухолевых иммунологических реакций.

4. Спленоциты, выделенные от иммунизированных ксеногенным ТАГ мышей-опухоленосителей LLC, и мышей, у которых не развилась опухоль LLC после предварительной иммунизации ксеногенными ТАГ, содержат в своем составе повышенную, по сравнению с опухолевым контролем, долю CD8+Perforin+ клеток, что свидетельствует о вовлечении клеток с цитолитическим потенциалом в механизмы формирования противоопухолевых иммунных реакций.

5. Спленоциты, выделенные от иммунизированных ксеногенным ТАГ мышей-опухоленосителей LLC, и животных, у которых не развилась опухоль LLC,

содержат в своем составе пониженную, по сравнению с опухолевым контролем, долю CD4+CD25+FoxP3+ регуляторных клеток, что свидетельствует о влиянии ксеногенной иммунизации на изменение супрессорного звена иммунитета.

6. Таким образом, предварительная иммунизация мышей ксеногенным вариантом ТАГ индуцирует в организме животного формирование длительных противоопухолевых реакций, проявляющихся удлинением жизни мышей – опухоленосителей, и пассивно передающихся интактным мышам с помощью спленоцитов и лимфоцитов лимфоузлов, полученных от предварительно иммунизированных ТАГ животных.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

APC	Allophycocyanin, аллофикоцианин
BFGF	Basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов
CAR	Chimeric antigen receptor, химерный антигенный рецептор
CD	Cluster of differentiation, кластер дифференцировки
CTA	Cancer/testis antigens, раково-семенниковые антигены
CTL	Cytotoxic T lymphocyte, цитотоксические Т-лимфоциты
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC	Dendritic cells, дендритные клетки
DDR	DNA-damage response, реакция повреждения ДНК
DMSO	Dimethylsulfoxide, диметилсульфоксид
EGF	Epidermal Growth Factor, эпидермальный фактор роста
EGFR	Epidermal growth factor receptor, рецептор эпидермальный фактор роста
FCS	Fetal calf serum, фетальная бычья сыворотка
FGF	Fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов
FITC	Fluorescein isothiocyanate, изотиоцианат флуоресцеина
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GzmA	Granzyme A, гранзим А
GzmB	Granzyme B, гранзим В
HGF	Hepatocyte growth factor, фактор роста гепатоцитов
HLA	Human leukocyte antigens
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN $\gamma$	Interferon gamma, интерферон гамма
IL	Interleukin, интерлейкин
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
LLC	Lewis lung carcinoma, карцинома легкого Льюиса
MC	Mast cell, тучные клетки
MDSC	Myeloid derived suppressor cells, миелоидные супрессорные клетки

MHC	Major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости
MMP	Matrix metalloproteinase, матричная металлопротеиназа
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, 3-(4,5- диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид
MoDC	monocyte-derived DCs, полученные из моноцитов DC
NETs	Neutrophil Extracellular Traps, нейтрофильные внеклеточные ловушки
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, транскрипционный фактор "каппа-би"
NGF	Nerve growth factor, фактор роста нервов
NK cell	Natural killer cells, естественные киллеры
NKT cell	Natural killer T-cells, натуральные киллерные Тклетки
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns, патогенассоциированные молекулярные пат-терны
PAP	Prostatic acid phosphatase, белок простатической кислой фосфатазы
PBS	Phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер
PD-1	Programmed cell death protein 1, белок программируемой клеточной смерти 1
PDGF	Platelet-derived growth factor, фактор роста тромбоцитов
PE	Phycoerythrin, фикоэритрин
PRAME	Preferentially expressed antigen of melanoma
SCF	Stem-cell growth factor, фактор стволовых клеток
TAA	Tumor-associated antigen, опухоль-ассоциированный антиген
TAM	Tumor-associated macrophages; макрофаги, ассоциированные с опухолью
TCR	T-cell receptor, Т-клеточный рецептор
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ , трансформирующий фактор роста $\beta$
Th	T-helpers, Т-хелперные клетки, Т-хелперы
TLR	Toll-like receptor, толл-подобный рецептор
TME/TIME	Tumor microenvironment, tumor-immune microenvironment, опухолевое микроокружение
TNF	Tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли

Treg	T-regulatory cells, T-регуляторные клетки
Trp2	Tyrosinase-related protein-2, белок-2, родственник тирозиназе
TYR	Tyrosinase, тирозиназа
VEGF	Vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов
АГ	Antigen, антиген
АДФ	Аденозиндифосфат
АМФ	Аденозинмонофосфат
АПК	Антиген-презентирующие клетки
АТФ	Аденозинтрифосфат
ВПЧ	Вирус папилломы человека
ГЗТ	Гиперчувствительность замедленного типа
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗФР	Забуференный физиологический раствор
ИЛ	Интерлейкин
КонА	Конкавалин А
МАТ	Моноклональные антитела
НМРЛ	Немелкоклеточный рак легких
ОАА	Опухоль-ассоциированные антигены
ПСА	Простатический специфический антиген
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ТАГ	Тестикулярный антиген
ТМБ	Тетраметилбензидин
ХТ	Химиотерапия
ЦТЛ	Цитотоксический Т-лимфоцит
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭСК	Эмбриональная стволовая клетка



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alexander A. N., Huelsmeyer M. K., Mitzey A., et al. Development of an allogeneic whole-cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2006. – Vol. 55. – P. 433-442.
2. Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. // *Nature.* – 2001. – Vol. 413. – № 6857. – P. 732–8.
3. Aurrière J., Goudenège D., Baris O.R., et al. Cancer/Testis Antigens into mitochondria: A hub between spermatogenesis, tumorigenesis and mitochondrial physiology adaptation. // *Mitochondrion.* – 2021. – Vol. 56. – P. 73–81.
4. Bae J., Prabhala R., Voskertchian A., Brown A., et al. A multiepitope of XBP1, CD138 and CS1 peptides induces myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes in T cells of smoldering myeloma patients. // *Leukemia.* – 2015. – Vol. 29. – № 1. – P. 218–29
5. Beck J.D., Reidenbach D., Salomon N., Sahin U., et al. mRNA therapeutics in cancer immunotherapy. // *Mol Cancer.* – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 69.
6. Bera T.K., Saint Fleur A., Ha D., et al. Selective POTE paralogs on chromosome 2 are expressed in human embryonic stem cells. // *Stem Cells Dev.* – 2008. – Vol. 17. – P. 325–332.
7. Bergman P.J. Canine oral melanoma. // *Clin Tech Small Anim Pract.* – 2007. – Vol. 22. – P. 55-60.
8. Bergman P.J., McKnight J., Novosad A., et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial // *Clin Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 1284-1290.
9. Bhatia N., Xiao T.Z., Rosenthal K.A., et al. MAGE-C2 promotes growth and tumorigenicity of melanoma cells, phosphorylation of KAP1, and DNA damage repair. // *J. Invest. Dermatol.* – 2013. – Vol. 133. – P. 759–767.

10. Bijker M.S., van den Eeden S.J., Franken K.L., et al. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. // *Eur J Immunol.* – 2008. – Vol. 38. – № 4. – P. 1033–42.
11. Bowne W.B., Srinivasan R., Wolchok J.D., et al. Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. // *J Exp Med.* – 1999. – Vol. 190. – № 11. – P. 1717–22.
12. Brasseur F., Rimoldi D., Liénard D., et al. B. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. // *Int. J. Cancer.* 1995. – Vol. 63. – P. 375–380.
13. Budhu S., Schaer D.A., Li Y., et al. Blockade of surfacebound TGF-beta on regulatory T cells abrogates suppression of effector T cell function in the tumor microenvironment. // *Sci Signal.* – 2017. – Vol. 10. – № 494. – eaak9702.
14. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications // *Br Med J.* – 1957. – Vol. 1. – № 5023. – P. 841–7.
15. Cavallo F., Aurisicchio L., Mancini R., et al. Xenogene vaccination in the therapy of cancer. // *Expert opinion on biological therapy* – 2014. – Vol. 14. – P. 1427–1442.
16. Cheng C.-C., Wooten J., Gibbs Z.A., et al. Sperm-specific COX6B2 enhances oxidative phosphorylation, proliferation, and survival in human lung adenocarcinoma. // *eLife.* – 2020. – Vol. 9. – e58108.
17. Cho H.I., Kim E.K., Park S.Y., et al. Enhanced induction of anti-tumor immunity in human and mouse by dendritic cells pulsed with recombinant TAT fused human survivin protein // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 258. – P. 189–198.
18. Christofi T., Baritaki S., Falzone L., Libra M., Zaravinos A. Current perspectives in cancer immunotherapy. // *Cancers (Basel).* – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 1472.

19. Ciesielski M.J., Apfel L., Barone T.A., et al. Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine GL261 gliomas // *Cancer Immunol Immunother.* – 2006. – Vol.55. – P. 1491-1503.
20. Cole D.K., Pumphrey N.J., Boulter J.M., et al. Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction. // *J Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – № 9. – P. 5727-34.
21. De Plaen E., De Backer O., Arnaud D., et al. A New Family of Mouse Genes Homologous to the Human MAGE Genes. // *Genomics.* – 1999. – Vol. 55. –P. 176-184.
22. DeNardo D.G., Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. // *Nat Rev Immunol.* – 2019. – Vol. 19. – № 6. – P. 369–82.
23. Disis M.L., Shiota F.M., Cheever M.A. Human HER-2/neu protein immunization circumvents tolerance to rat neu: a vaccine strategy for 'self' tumour antigens. // *Immunology.* – 1998. – Vol. 93. – № 2. – P. 192-199.
24. Duperret E.K., Perales-Puchalt A., Stoltz R., et al. A synthetic DNA, multi-neoantigen vaccine drives predominately MHC class I CD8(+) T-cell responses, impacting tumor challenge. *Cancer Immunol Res.* – 2019. – Vol. 7. – № 2. – P. 174–82.
25. Efimova I., Catanzaro E., Van der Meeren L., et al. Vaccination with early ferroptotic cancer cells induces efficient antitumor immunity. // *J Immunother Cancer.* – 2020. Vol. 8. – P. 2.
26. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung // *Ned Tijdschr Geneesk.* – 1909. – Vol. 5. – P. 273–90.
27. Evavold B.D., Sloan-Lancaster J., Wilson K.J., et al. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. // *Immunity.* – 1995. – Vol. 2. – № 6. – P. 655-63.
28. Ferrone S., Whiteside T.L. Tumor microenvironment and immune escape. // *Surg Oncol Clin North Am.* – 2007. – Vol. 16. – P. 755–74.

29. Fong L., Brockstedt D., Benike C., et al. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – № 12. – P. 7150-6.

30. Gallo P., Dharmapuri S., Nuzzo M., et al. Xenogeneic immunization in mice using HER2 DNA delivered by an adenoviral vector. // *Int J Cancer.* – 2005. – Vol. 113. – № 1. – P. 67-77.

31. Gao X., Li Q., Chen G., et al. MAGEA3 promotes proliferation and suppresses apoptosis in cervical cancer cells by inhibiting the KAP1/p53 signaling pathway. // *Am. J. Transl. Res.* – 2020. – Vol. 12. – P. 3596–3612.

32. Gaspar J.A., Srinivasan S.P., Sureshkumar P., et al. Depletion of Mageb16 induces differentiation of pluripotent stem cells predominantly into mesodermal derivatives. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 14285.

33. Germain R.N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. // *Cell.* – 1994. – Vol. 76. – № 2. – P. 287-99.

34. Ginsberg B.A., Gallardo H.F., Rasalan T.S., et al. Immunologic response to xenogeneic gp100 DNA in melanoma patients: comparison of particle-mediated epidermal delivery with intramuscular injection. // *Clin Cancer Res.* – 2010. – Vol. 16. – № 15. – P. 4057-65.

35. Gjerstorff M. F., Andersen M. H., Ditzel H. J. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6. – № 18. – P. 15772-87.

36. Gjerstorff M.F., Kock K., Nielsen O., Ditzel H.J. MAGE-A1, GAGE and NY-ESO-1 cancer/testis antigen expression during human gonadal development. // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22. – P. 953–960.

37. Gold J.S., Ferrone C.R., Guevara-Patino J.A., et al. A single heteroclitic epitope determines cancer immunity after xenogeneic DNA immunization against a tumor differentiation antigen. // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 170. – № 10. – P. 5188-94.

38. Gordeeva O. Cancer-testis antigens: unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. *Seminars in cancer biology*. // *Semin Cancer Biol.* – 2018. – Vol. 53. – P. 75-89.
39. Gritzapis A.D., Mahaira L.G., Perez S.A., et al. Vaccination with human HER-2/neu (435-443) CTL peptide induces effective antitumor immunity against HER-2/neu-expressing tumor cells in vivo. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 5452-5460.
40. Gu Y.Z., Fan C.W., Lu R., et al. Forced co-expression of IL-21 and IL-7 in whole-cell cancer vaccines promotes antitumor immunity. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 32351.
41. Guo Z.S., Lu B.F., Guo Z.B., et al. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. // *J Immunother Cancer.* – 2019. – Vol. 7.
42. Gurchot, C. The Trophoblast Theory of Cancer (John Beard, 1857–1924) Revisited. // *Oncology.* – 1975. – Vol. 31. – P. 310–333.
43. Hailemichael Y., Dai Z.M., Jaffar zad N., et al. Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion. // *Nat Med.* – 2013. – Vol. 19. – № 4. – P. 465.
44. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. // *Cancer Discov.* – 2022. – Vol. 12. – P. 31–46.
45. Hawkins W.G., Gold J.S., Dyllal R., et al. Immunization with DNA coding for gp100 results in CD4 T-cell independent antitumor immunity. // *Surgery.* – 2000. – Vol. 128. – P. 273-280.
46. Hay K.A., Turtle C.J. Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells: Lessons Learned from Targeting of CD19 in B-Cell Malignancies. // *Drugs.* – 2017. – Vol. 77. – P. 237–245.
47. Hemminki O., Dos Santos J.M., Hemminki A. Oncolytic viruses for cancer immunotherapy. // *J Hematol Oncol.* – 2020. – Vol. 13. – № 1. – 84.

48. Hou S., Xian L., Shi P., et al. The Magea gene cluster regulates male germ cell apoptosis without affecting the fertility in mice. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol.6 – P. 26735.
49. Huang C. P., Chen C. C., Shyr C. R. Xenogeneic cell therapy provides a novel potential therapeutic option for cancers by restoring tissue function, repairing cancer wound and reviving anti-tumor immune responses. // *Cancer Cell Int.* – 2018. – Vol. 18. – P.9.
50. Huang C.P., Chen C.C., Tsai Y.T., et al. Intravesical Administration of Xenogeneic Porcine Urothelial Cells Attenuates Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Mice. // *Cell Transplant.* – 2019. – Vol. 28. – № 3. – P. 296-305.
51. Huang C.P., Yang C.Y., Shyr C.R. Utilizing Xenogeneic Cells as a Therapeutic Agent for Treating Diseases. // *Cell Transplant.* – 2021. – Vol. 30 (9636897211011995).
52. Huang J., Wang Y., Liu J., et al. TFDP3 as E2F Unique Partner, Has Crucial Roles in Cancer Cells and Testis. // *Front. Oncol.* – 2021. – Vol. 11. – P. 742462.
53. Jacob J., Radkevich O., Forni G., et al. Activity of DNA vaccines encoding self or heterologous Her-2/neu in Her-2 or neu transgenic mice. // *Cell Immunol.* – 2006. – Vol. 240. – № 2. – P. 96-106.
54. Jacob J.B., Quaglino E., Radkevich-Brown O., et al. Combining human and rat sequences in her-2 DNA vaccines blunts immune tolerance and drives antitumor immunity. // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – № 1. – P. 119-28.
55. Josefowicz S.Z., Lu L.F., Rudensky A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. // *Annu Rev Immunol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 531–64.
56. Kalia V., Penny L.A., Yuzefpolskiy Y., et al. Quiescence of memory CD8(+) T cells is mediated by regulatory T cells through inhibitory receptor CTLA-4. // *Immunity.* – 2015. – Vol. 42. – P. 1116–29.
57. Kamstock D., Elmslie R., Thamm D., Dow S. Evaluation of a xenogeneic VEGF vaccine in dogs with soft tissue sarcoma. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2007. – Vol. 56. – P. 1299-1309.

58. Keeney S., Giroux C.N., Kleckner N. Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. // *Cell*. – 1997. – Vol. 88. – P. 375–384.

59. Kersh G.J., Allen P.M. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. // *Nature*. – 1996. – Vol. 380. – № 6574. – P. 495-8.

60. Khong H., Overwijk W.W. Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. // *J Immunother Cancer*. – 2016. – Vol. 4. – P. 56.

61. Kianizad K., Marshall L.A., Grinshtein N., et al. Elevated frequencies of self-reactive CD8+ T cells following immunization with a xenoantigen are due to the presence of a heteroclitic CD4+ T-cell helper epitope. // *Res*. – 2007. – Vol. 67. – № 13. – P. 6459-67.

62. Klemm F., Joyce J. A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. // *Trends Cell Biol*. – 2015. – Vol. 25. – № 4. – P. 198-213.

63. Krasko J.A., Zilionyte K., Darinskas A., et al. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs survival in a murine Lewis lung carcinoma model. // *Oncol Lett*. – 2018. – Vol. 15. – № 4. – P. 5098–5104.

64. Lanier L. L. Natural killer cell receptor signaling // *Curr Opin Immunol*. – 2003. – Vol. 15. – P. 308–14.

65. Liao J.C., Gregor P., Wolchok J.D., et al. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. // *Cancer Immun*. – 2006. – Vol. 6. – P. 8.

66. Lifantseva N., Koltsova A., Krylova T., et al. Expression patterns of cancer-testis antigens in human embryonic stem cells and their cell derivatives indicate lineage tracks. // *Stem Cells Int*. – 2011. – 7952392011.

67. Lin X., Chen Z., Gao P., et al. TEX15: A DNA repair gene associated with prostate cancer risk in Han Chinese. // *Prostate*. – 2017. – Vol. 77. – P. 1271–1278.

68. Liu J., Fu M., Wang M., et al. Cancer vaccines as promising immunotherapeutics: platforms and current progress. // *J Hematol Oncol.* – 2022. – Vol. 15. – P. 28.

69. Liu K., Cheng L., Zhu K., et al. The cancer/testis antigen HORMAD1 mediates epithelial–mesenchymal transition to promote tumor growth and metastasis by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in lung cancer. // *Cell Death Discov.* – 2022. – Vol. 8. – P. 136.

70. Liu Q., Sun Z., Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. // *Protein Cell.* – 2020. – Vol. 11. – № 8. – P. 549-564.

71. Lu Y., Wei Y.Q., Tian L., et al. Immunogene therapy of tumors with vaccine based on xenogeneic epidermal growth factor receptor. // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 170. – P. 3162-3170.

72. Luo S., Wang W., Feng J., Li R. TEX10 Promotes the Tumorigenesis and Radiotherapy Resistance of Urinary Bladder Carcinoma by Stabilizing XRCC6. // *J. Immunol. Res.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 5975893.

73. Makani V.K.K., Mendonza J.J., Edathara P.M., et al. BORIS/CTCF expression activates the TGF $\beta$  signaling cascade and induces Drp1 mediated mitochondrial fission in neuroblastoma. *Free Radic. // Biol. Med.* – 2021. – Vol. 176. P. 62–72.

74. Michaeli Y., Denkberg G., Sinik K., et al. Expression hierarchy of T cell epitopes from melanoma differentiation antigens: unexpected high-level presentation of tyrosinase-HLA-A2 Complexes revealed by peptide-specific, MHC-restricted, TCR-like antibodies. // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – № 10. – P. 6328-41.

75. Milla P., Dosio F., Cattel L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. // *Curr Drug Metab.* – 2012. – Vol. 13. – № 1. – P. 105–19.



76. Mills G.B., Schmandt R., McGill M., et al. Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 16000–16006.

77. Mondino A., Manzo T. To Remember or to Forget: The Role of Good and Bad Memories in Adoptive T Cell Therapy for Tumors. // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11.

78. Monzavi-Karbassi B., Pashov A., Jousheghany F., et al. Evaluating strategies to enhance the anti-tumor immune response to a carbohydrate mimetic peptide vaccine. // *Int J Mol Med.* – 2006. – Vol. 17. – P. 1045-1052.

79. Morante V., Borghi M., Farina I., et al. Integrase-defective lentiviral vector is an efficient vaccine platform for cancer immunotherapy. // *Viruses-Basel.* – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 355.

80. Naftzger C., Takechi Y., Kohda H., et al. Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: a study of tumor rejection and autoimmunity. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1996. – Vol. 93. – № 25. – P. 14809-14.

81. Nallagatla S.R., Hwang J., Toroney R., Zheng X., Cameron C.E., Bevilacqua P.C. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. // *Science.* – 2007. – Vol. 318. – № 5855. – P. 1455–8.

82. Nin D.S., Wujanto C., Tan T.Z., et al. GAGE mediates radio resistance in cervical cancers via the regulation of chromatin accessibility. // *Cell Rep.* – 2021. – Vol. 36. – P. 109621.

83. O'Donnell L., Smith L.B., Rebourcet D. Sperm-specific proteins: new implications for diagnostic development and cancer immunotherapy. // *Curr Opin Cell Biol.* – 2022. – Vol. 77. – P. 102104.

84. Ohta A., Kini R., Ohta A., et al. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. // *Front Immunol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 190.

85. Okumura S., Ishihara M., Kiyota N., et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy targeting a MAGE A4 peptide and HLA-A\*02:01 complex for unresectable advanced or recurrent solid cancer: protocol for a multi-institutional phase 1 clinical trial. // *BMJ Open*. – 2022. – Vol. 12. – № 11. – e065109.

86. Old, L.J. Cancer/Testis (CT) antigens—A new link between gametogenesis and cancer. // *Cancer Immun. Arch*. – 2001. – Vol. 1. – P. 1.

87. Osterlund C., Töhönen V., Forslund K.O., Nordqvist K. Mage-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation. // *Cancer Res*. – 2000. – Vol. 60. – P. 1054–1061.

88. Otte M., Zafrakas M., Riethdorf L., et al. MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61. – P. 6682–6687.

89. Overwijk W.W., Tsung A., Irvine K.R., et al. gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of “self”-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. // *J Exp Med*. – 1998. – Vol. 188. – № 2. – P. 277-86.

90. Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. // *Front. Immunol*. – 2020. Vol. 11. – P. 583084.

91. Pardi N., Hogan M.J., Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*. – 2020. – Vol. 65. – P. 14–20.

92. Petrova G., Ferrante A., Gorski J. Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. // *Crit Rev Immunol*. – 2012. – Vol. 32. – № 4. – P. 349-72.

93. Pupa S.M., Iezzi M., Di Carlo E., et al. Inhibition of mammary carcinoma development in HER-2/neu transgenic mice through induction of autoimmunity by xenogeneic DNA vaccination. // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65. –P. 1071-1078.

94. Qin F.X. Dynamic behavior and function of Foxp3+ regulatory T cells in tumor bearing host. // *Cell Mol Immunol*. – 2009. – Vol. 6. – № 1. – P. 3-13.

95. Quaglino E., Riccardo F., Macagno M., et al. Chimeric DNA vaccines against ErbB2+ carcinomas: from mice to humans. // *Cancers (Basel)*. – 2011. – Vol. 3. – № 3. – P. 3225-41.

96. Quail D. F., Joyce J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. // *Nat Med.* – 2013. – Vol. 19. – № 11. – P. 1423-1437.

97. Ramos R. N., Amano M. T., Paes Leme A. F., et al. Tumor microenvironment (TME) and tumor immune microenvironment (TIME): New perspectives for prognosis and therapy. // *Front Cell Dev Biol.* – 2022. – Vol. 22. – № 10. – P. 971275.

98. Raza A., Merhi M., Inchakalody V.P.; et al. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy. // *J. Transl. Med.* – 2020. – Vol. 18. – P. 140.

99. Rehwinkel J., Tan C.P., Goubau D., Schulz O., et al. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. // *Cell.* – 2010. – Vol. 140. – № 3. – P. 397–408.

100. Ren S., Zhang Z., Li M., et al. Cancer testis antigen subfamilies: Attractive targets for therapeutic vaccine (Review). // *Int J Oncol.* – 2023. – Vol. 62. – № 6. – P. 71.

101. Rezaei T., Davoudian E., Khalili S., et al. Strategies in DNA vaccine for melanoma cancer. // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2020.

102. Robbins P.F., Morgan R.A., Feldman S.A., et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 917–924.

103. Sahin U., Koslowski M., Türeci O., et al. Expression of cancer testis genes in human brain tumors. // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – Vol. 6. – P. 3916–3922.

104. Salmaninejad A., Zamani M. R., Pourvahedi M., Golchehre Z., Bereshneh A.H., Rezaei N. Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. // *Immunol Invest.* – 2016. – Vol. 45. – № 7. – P. 619-40.

105. Sandhu S., Sou I.F., Hunter J.E., et al. Centrosome dysfunction associated with somatic expression of the synaptonemal complex protein TEX12. // *Commun. Biol.* – 2021. – Vol. 4. – P. 1371.

106. Scanlan M.J., Simpson A.J.G., Old L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. // *Cancer Immun.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1.
107. Scanlan M.J., Simpson A.J.G., Old L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. // *Cancer Immun.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1.
108. Schooten E., Di Maggio A., van Bergen En Henegouwen P.M.P., Kijanka M.M. MAGE-A antigens as targets for cancer immunotherapy. // *Cancer Treat. Rev.* – 2018. – Vol. 67. – P. 54–62.
109. Seledtsov V.I., Shishkov A.A., Seledtsova G.V. Xenovaccinotherapy for cancer, current cancer treatment. // *InTech.* – 2011. – P. 416-428.
110. Shuvalov O., Kizenko A., Petukhov A., et al. SEMG1/2 augment energy metabolism of tumor cells. // *Cell Death Dis.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1047.
111. Simpson A.J.G., Caballero O.L., Jungbluth A., et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – P. 615–625.
112. Sioud M., Sørensen D. Generation of an effective anti-tumor immunity after immunization with xenogeneic antigens. // *Eur J Immunol.* – 2003. – Vol. 33. – P. 38-45.
113. Smyth M. J., Thia K. Y. T., Street S. E. A., et al. Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (NK) and NKT Cells. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 191. – № 4. – P. 661–668.
114. Southwood S., Sidney J., Kondo A., et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – № 7. – P. 3363–73.
115. Srinivasan P., Wu X., Basu M., et al. PD-L1 checkpoint inhibition and anti-CTLA-4 whole tumor cell vaccination counter adaptive immune resistance: a mouse neuroblastoma model that mimics human disease. // *PLoS Med.* – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. e1002497.
116. Steel J.C., Di Pasquale G., Ramlogan C.A., et al. Oral vaccination with adeno-associated virus vectors expressing the neu oncogene inhibits the growth of murine breast cancer. // *Mol Ther.* – 2013. – Vol. 21. – № 3. – P. 680–7.

117. Stevenson B.J., Iseli C., Panji S, et al. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. // *BMC Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 129.

118. Strioga M. M., Darinskas A., Pasukoniene V., Mlynska A., Ostapenko V., Schijns V. Xenogeneic therapeutic cancer vaccines as breakers of immune tolerance for clinical application: to use or not to use? // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. – № 32. – P. 4015-24.

119. Su J.M., Wei Y.Q., Tian L., et al. Active immunogene therapy of cancer with vaccine on the basis of chicken homologous matrix metalloproteinase-2. // *Cancer Res*. – 2003. – Vol. 63. – P. 600-607.

120. Suschak J.J., Williams J.A., Schmaljohn C.S. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. // *Hum Vaccin Immunother*. – 2017. – Vol. 13. – № 12. – P. 2837-48

121. Symchych T.V., Fedosova N.I., Karaman O.M., et al. The anticancer efficiency of the xenogeneic vaccine and the indication for its use. // *Exp Oncol*. – 2014. – Vol. 36. – № 2. – P. 79-84.

122. Symchych T.V., Fedosova N.I., Karaman OM, et al. The effects of early postoperative immunization with xenogeneic embryo proteins on Lewis lung carcinoma model. // *Exp Oncol*. – 2018. – Vol. 40. – № 4. – P. 275-281.

123. Takeuchi Y., Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. // *Int Immunol*. – 2016. – Vol. 28. – № 8. – P. 401-9.

124. Tay R.E., Richardson E.K., Toh H.C. Revisiting the role of CD4(+)T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. // *Cancer Gene Ther*. – 2021. – Vol. 28. – № 1-2. – P. 5-17.

125. Tiptiri-Kourpeti A., Spyridopoulou K., Pappa A., Chlichlia K. DNA vaccines to attack cancer: strategies for improving immunogenicity and efficacy. // *Pharmacol Ther*. – 2016. – Vol. 165. – P. 32-49.

126. Uva P., Aurisicchio L., Watters J., et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. // BMC Genomics. – 2009. – Vol. 10. – P. 135.
127. Van Nuffel A.M., Wilgenhof S., Thielemans K., Bonehill A. Overcoming HLA restriction in clinical trials: immune monitoring of mRNA-loaded DC therapy. // Oncoimmunology. – 2012. – Vol. 1. – № 8. – P. 1392–4.
128. Wculek S.K., Cueto F.J., Mujal A.M., et al. Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. // Nat Rev Immunol. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 7–24.
129. Wei X., Chen F., Xin K., et al. Cancer-Testis Antigen Peptide Vaccine for Cancer Immunotherapy: Progress and Prospects. // Transl. Oncol. – 2019. – Vol. 12. – P. 733–738.
130. Wei Y.Q., Wang Q.R., Zhao X., et al. Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. // Nat Med. – 2000. – Vol. 6. – P. 1160-1166.
131. Welters M. J., van der Sluis T. C., van Meir H., et al. Vaccination during myeloid cell depletion by cancer chemotherapy fosters robust T cell responses. // Sci. Transl. Med. – 2016. – Vol. 8. – № 334.
132. Whitehurst A.W., Xie Y., Purinton S.C., et al. Tumor Antigen Acrosin Binding Protein Normalizes Mitotic Spindle Function to Promote Cancer Cell Proliferation. // Cancer Res. – 2010. – Vol. 70. – P. 7652.
133. Wing J.B., Tanaka A., Sakaguchi S. Human FOXP3(+) regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and Cancer. // Immunity. – 2019. – Vol. 50. – P. 302–16.
134. Yang F., Eckardt S., Leu N.A., et al. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. // J. Cell Biol. – 2008 – Vol. 180. – P. 673–679.

135. Yang S.W., Huang X., Lin W., et al. Structural basis for substrate recognition and chemical inhibition of oncogenic MAGE ubiquitin ligases. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 4931.
136. Yang X., Potts P.R. CSAG2 is a cancer-specific activator of SIRT1. // *EMBO Rep.* – 2020. – Vol. 21. – e50912.
137. Yazdanifar M., Barbarito G., Bertaina A., et al.  $\gamma\delta$  T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – P. 1305.
138. Yuan J., Ku G.Y., Gallardo H.F., et al. Safety and immunogenicity of a human and mouse gp100 DNA vaccine in a phase I trial of patients with melanoma. // *Cancer Immun.* – 2009. – Vol. 9. – P. 5.
139. Zhang X., Cui H., Zhang W., Li Z., Gao J. Engineered tumor cell-derived vaccines against cancer: The art of combating poison with poison. // *Bioact Mater.* – 2022. Vol. 22. – P. :491-517.
140. Zhao L., Mou D., Leng X., et al. Expression of cancer-testis antigens in hepatocellular carcinoma. // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 10. – P. 2034–2038.
141. Zhong Z., Kusznierek K.P., Popov I.A., et al. Induction of antitumor immunity through xenoplacental immunization. // *J Transl Med.* – 2006. – Vol. 4. – P. 22.
142. Zhu K., Qin H., Cha S.C., et al. Survivin DNA vaccine generated specific antitumor effects in pancreatic carcinoma and lymphoma mouse models. // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 7955-7961.
143. Ковалева О.В., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Цитотоксическая активность макрофагов и ее роль в патогенезе опухолей. // *Альманах клинической медицины.* – 2022. – Т. 50. – № 1. – С. 13–20.
144. Селедцова Г.В., Доржиева А.Б., и др. Использование ксеногенных тестикулярных антигенов в индукции противоопухолевых реакций. // *Сибирский онкологический журнал.* – 2023. – Т. 22. – № 6. – С. 111–120.

145. Цыган В.Н. Иммунная система против рака. // Обзоры по клин, фармакол. и лек. терапии. — 2004. — Т. 3. — № 3. — С. 68-74.

146. Шубина И.Ж., Сергеев А.В., Мамедова Л.Т., и др. Современные представления о противоопухолевом иммунитете. // Российский биотерапевтический журнал. — 2015. — Т. 14. — № 3.

147. Ярилин А.А. Иммунология. // А.А. Ярилин. ГЭОТАР-Медиа, 2021.