

РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ СИНТЕТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ МЕЛАНОМЫ

© 2019 г. Е. А. Боробова*, Д. В. Антонец, Е. В. Старостина

*E-mail: borobova-elena@rambler.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 01.04.2019

Меланома является наиболее опасным злокачественным новообразованием кожи, отличается быстрыми темпами роста и высокой частотой формирования метастазов. Для клеток меланомы характерно присутствие раковых антигенов на поверхности. В связи с этим существует возможность разработки вакцины против меланомы. Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были созданы ДНК-конструкции, кодирующие искусственные полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI, содержащие Т-клеточные эпитопы из шести антигенов меланом. В данной статье представлены результаты исследования способности созданных ДНК-конструкций индуцировать противоопухолевый иммунный ответ.

Ключевые слова: меланома, ДНК-конструкции, Т-клеточные эпитопы, искусственные иммуногены, цитотоксические Т-лимфоциты

DOI: 10.31857/S102872210006491-5

Адрес: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», отдел биоинженерии, Боробова Елена Александровна. Тел.: +7913 397 1093 (моб.).

E-mail: borobova-elena@rambler.ru

Авторы:

Боробова Е. А., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

Антонец Д. В., канд. биол. наук, старший научный сотрудник теоретического отдела, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

Старостина Е. В., научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., Россия.

Меланома является наиболее опасным злокачественным новообразованием кожи. На долю меланомы приходится всего 1% от всех злокачественных новообразований, но до 80% летальных исходов [1]. Низкая эффективность лечения связана с ранним метастазированием и формированием резистентности к классическим методам терапии. Высокая иммуногенность меланомных опухолей, обусловленная специфическими антигенами (Melan-A/MART-1, gp100, тирозиназа, MAGE-3 и NY-ESO-1 и др.), дает надежду на создание эффективной терапевтической вакцины [2]. Многообещающим

подходом к лечению больных с онкологическими заболеваниями является ДНК-вакцинация, направленная на активацию цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, главных эффекторных клеток противоопухолевого иммунитета [3]. Ранее нами был проведен теоретический дизайн последовательностей двух искусственных иммуногенов, содержащих цитотоксические (CD8⁺ CTL) и хелперные (CD4⁺ Th) Т-клеточные эпитопы шести меланомных антигенов (NY-ESO-1, MART-1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1). Иммуноген MEL-TCI содержит эпитопы, рестриктированные наиболее распространенными аллельными вариантами молекул HLA I класса. MEL-A0201 содержит эпитопы, рестриктированные молекулами HLA-A*02:01. Спроектированные гены были синтезированы и клонированы в составе плазмиды pсDNA3.1. В качестве положительного контроля использовалась плазида, кодирующая полноразмерный антиген клеток меланомы MART-1. Экспрессия целевых генов в составе плазмидных ДНК была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими МКА 29F2 к белку-маркеру p24 [4].

Цель исследования: оценить способность ДНК-конструкций pMEL-TCl и pMEL-A0201, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены меланомы, индуцировать противоопухолевый ответ в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Способность полученных плазмидных ДНК индуцировать противоопухолевый иммунный ответ изучалась *ex vivo* с использованием мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови человека. МНК HLA-A*02:01⁺ доноров выделяли из лейкомаксы на градиенте плотности фикола. Прилипшую фракцию клеток культивировали в присутствии коктейля цитокинов до стадии зрелых дендритных клеток (ДК) [5]. На стадии незрелых ДК проводилась процедура магнитной трансфекции. Зрелые ДК, трансфицированные плазидами pMEL-TCl, pMEL-A0201, pcDNA-MART1, pcDNA3.1, подвергались совместному культивированию с неприлипшей фракцией МНК (в соотношении ДК: МНК = 1:10). Уровень продукции гранзима В аутологичными CD8⁺ Т-лимфоцитами в совместной культуре МНК+ДК изучался с помощью метода проточной цитофлюориметрии. Анализ цитотоксической активности эффекторных клеток проводился с помощью измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемой из поврежденных клеток-мишеней, в качестве которых использовались клетки меланомы линии Mel Is.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что дендритные клетки HLA-A*02:01⁺ доноров, трансфицированные ДНК-конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCl, способны стимулировать цитотоксическую активность аутологичных МНК по отношению к клеткам меланомы Mel Is. При этом, как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по стимуляции продукции гранзи-

ма В, pMel-A0201 достоверно превзошла ДНК-конструкцию, кодирующую белок MART-1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что искусственные полиэпитопные антигены способны индуцировать иммунный ответ в отношении клеток меланомы человека. Обнаружение в совместных культурах МНК и трансфицированных ДК популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим, позволяет предположить, что цитотоксическая активность эффекторных лимфоцитов, опосредована активностью гранзима В. Данный подход может использоваться не только для разработки иммунотерапевтических вакцин от меланомы, но и от других онкологических заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer Statistics, 2018. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2018, 68(1), 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
2. Pitcovski J., Shahar E., Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017, Vol. 115, P. 36–49.
3. Liu M. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological reviews*. 2011. Vol. 239. P. 62–84
4. Боробова Е. А., Антонец Д. В., Старостина Е. В., Смирнова О. Ю., Щербаков Д. Н., Волкова О. Ю., Орешкова С. Ф., Карпенко Л. И., Ильичев А. А., Бажан С. И. Кандидаты ДНК-вакцины против меланомы: дизайн, конструирование и оценка экспрессии целевых генов в эукариотических клетках. Новосибирский государственный университет. 2012, 10(5), 23–30. [Borobova E. A., Antonets D. V., Starostina E. V., Smirnova O. Yu., Shcherbakov D. N., Volkova O. Yu., Oreshkova S. F., Karpenko L. I., Ilyichev A. A., Bazhan S. I. Candidates of dna vaccine against melanoma: design, engineering and estimating the expression of target genes in eukaryotic cells. NSU. 2012, 10(5), 23–30].
5. Park M., Yang D., Kim M., Jang J., Jang Y., Lee Y., Jin C., Pham T., Thi T., Lim M., Lee H., Hong C., Yoon J., Lee J. Alpha-type 1 polarized dendritic cells loaded with apoptotic allogeneic breast cancer cells can induce potent cytotoxic t lymphocytes against breast cancer. *Cancer Res Treat*. 2011, 43(1), 56–66.

DEVELOPMENT OF A CANDIDATE SYNTHETIC VACCINE FOR IMMUNOTHERAPY OF MELANOMA

© 2019 E. A. Borobova*, D. V. Antonets, E. V. Starostina

*E-mail: borobova-elena@rambler.ru

Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology
and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 01.04.2019

Melanoma is the most dangerous skin cancer. It's characterized by rapid growth rates and high incidences of metastasis. Melanoma cells have tumor antigens on their surfaces. Thereby, it's possible to create an effective vaccine against melanoma. Earlier in the Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» DNA-constructs, encoding artificial poly-epitope immunogens MEL-A0201 and MEL-TCI, that consist of cytotoxic and helper T-cell epitope form six melanoma antigens, were created. This article includes the results of evaluation of the capability of designed DNA-constructs to induce antitumor immune response.

Key words: melanoma, DNA-constructs, T-cell epitope, artificial immunogens, cytotoxic T-lymphocytes

Authors:

Borobova E. A., ✉ researcher in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. **E-mail:** borobova-elena@rambler.ru;

Antonets D. V., PhD, senior researcher in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

Starostina E. V., researcher in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia.