

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

На правах рукописи

ЦАРАПАЕВ ПАВЕЛ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**АДЬЮВАНТ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДНОЙ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Косоруков Вячеслав Станиславович

Москва – 2025 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Подходы к вакцинотерапии опухолей	12
1.2 Пептидные противоопухолевые вакцины	16
1.3 Роль адъювантов в вакцинотерапии рака	20
1.4 Адъюванты – системы доставки антигенов	23
1.5 Адъюванты стимуляторы иммунного ответа.....	28
1.5.1 Адъюванты нацеленные на TLR рецепторы	28
1.5.2 Адъюванты нацеленные на cGAS-STING путь.....	32
1.5.3 Адъюванты, нацеленные на рецепторы лектина С-типа	33
1.5.4 Адъюванты нацеленные на паттерн-распознающие рецепторы.....	34
1.5.5 Цитокины как адъюванты	35
1.6 Исследования безопасности адъювантов	36
1.7 Клиническое применение адъювантов в противоопухолевых вакцинах ..	37
1.8 Оценка эффективности Ридостина Про	41
Заключение	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1 Адъюванты и пептиды для формирования вакцин.....	44
2.2 Мыши.....	46
2.3 Схемы вакцинации животных.....	46
2.4 Выделение спленоцитов	49
2.5 ELISpot	50
2.6 Метод проточной цитофлуориметрии для оценки иммунофенотипа спленоцитов мышей	51
2.7 Получение сывороток крови мышей.....	53
2.8 Метод оценки воспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей	53
2.9 Культивирование клеток in vitro.....	55

2.10 Перевивка опухолевых клеток мышам и последующая оценка противоопухолевого эффекта	56
2.11 Статистическая обработка данных	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	58
3.1 Иммуногенность адъювантов	58
3.2 Иммуногенность адъювантов в составе вакцин.....	61
3.2.1 Иммуногенность пептидной неоантигенной вакцины	61
3.2.2 Иммуногенность вакцин с пептидом TRP2 или с овальбумином.....	64
3.2.3 Индукция цитокинов <i>in vivo</i> введением Poly(I:C) или Ридостина Про ..	67
3.2.4 Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на иммунофенотип спленоцитов ..	69
3.3 Противоопухолевый эффект	74
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
ВЫВОДЫ	88
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень её разработанности

За последние несколько десятилетий иммунотерапия произвела революцию в лечении многих видов рака, сведя к минимуму побочные эффекты, воздействуя на микроокружение опухоли и увеличивая общую выживаемость пациентов. Целью иммунотерапии является повышение собственного Т-клеточного иммунитета пациента для распознавания и уничтожения опухоли. Противоопухолевые вакцины являются привлекательным альтернативным вариантом иммунотерапии, при котором антигены из опухоли отбираются и вводятся обратно пациенту, чтобы вызвать высоконаправленную противоопухолевую иммунную реакцию. Хотя за последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в разработке эффективных противоопухолевых вакцин, по-прежнему существуют серьезные препятствия на пути к терапевтическому успеху. Предполагается, что одной из причин низкой клинической эффективности вакцинотерапии может быть выбор неиммуногенных адъювантов, в результате чего не удастся усилить иммуногенность антигенов и преодолеть иммуносупрессию у больных.

Адъювант – это вещество, которое усиливает реакцию иммунной системы на присутствие антигена. Цель добавления адъювантов в вакцины состоит в том, чтобы усилить реакцию иммунной системы и обеспечить возможность введения меньшего количества вакцины. Первым адъювантом, который с 1926 года использовали для усиления эффективности вакцин были алюминиевые соли, с тех пор с использованием алюминиевых адъювантов были разработаны многочисленные вакцины, такие как против гепатита А, гепатита В, дифтерийно-столбнячной, и пневмококковой вакцины. Существует целый ряд различных видов адъювантов, которые успешно используются для разработки новых вакцин, в том числе и противоопухолевых. В настоящее время описаны адъюванты на масляной основе, виросомы, адъюванты, являющиеся агонистами toll-подобных

рецепторов (TLRs). Синтетические аналоги вирусной двуцепочечной РНК, такие как полирибоинозиново-полирибоцитидиловая кислота (poly(I:C)) и её производные — poly-ICLC (Хилтонол, Hiltonol) и poly-IC12U (Амплиген), выступают агонистами TLR3 и применяются в качестве адъювантов в составе противоопухолевых вакцин. Эти соединения активируют врождённый иммунитет через механизмы, имитирующие реакцию на вирусную инфекцию. Их влияние на иммунные и опухолевые клетки подтверждено результатами многочисленных исследований как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 8].

Ранее в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» была создана модель персонализированной пептидной неоантигенной вакцины против меланомы мышей B16-F10. В качестве адъюванта при исследовании модели пептидной вакцины у мышей использовался агонист TLR-3, синтетический имитатор двуцепочечной РНК Poly(I:C) [9]. Однако, этот адъювант не имеет разрешения для применения у людей в связи с токсичностью, которая проявляется лихорадкой, гипотензией, снижением количества клеток крови, гриппоподобными симптомами, почечной недостаточностью, болью в костях, изменениями в печени, костном мозге и центральной нервной системе, а также из-за короткого времени полувыведения.

Для дальнейшей разработки персонализированных пептидных неоантигенных вакцин необходим эффективный и безопасный адъювант.

Цель исследования

Провести сравнительную оценку иммуногенности и противоопухолевой эффективности ряда потенциальных адъювантов для включения в состав пептидной противоопухолевой вакцины.

Задачи исследования

1. Оценить иммуногенность Ридостина Про, Poly(I:C) и Полного адьюванта Фрейнда и выбрать наиболее перспективный адьювант для включения в состав пептидной противоопухолевой вакцины.
2. Изучить изменение иммунофенотипа клеток селезенки мышей, иммунизированных выбранными адьювантами.
3. Изучить цитокиновый профиль сыворотки крови мышей, иммунизированных выбранными адьювантами.
4. Сравнить противоопухолевую эффективность выбранных адьювантов на мышинных моделях меланомы B16-F10 и лимфомы EG7-OVA.
5. Оценить противоопухолевую эффективность вакцин с выбранными адьювантами на мышинных моделях в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме.
6. Оценить противоопухолевую эффективность вакцин с выбранными адьювантами на мышинных моделях в терапевтическом режиме.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в том, что впервые проводится сравнение иммуногенности и противоопухолевой активности таких адьювантов, как Ридостин Про и Poly(I:C), в составе пептидной противоопухолевой вакцины на экспериментальных животных. Впервые было проведено сравнение адьювантов Ридостин Про и Poly(I:C) по их влиянию на иммунофенотип клеток селезенки, цитокиновый профиль сыворотки крови и общую противоопухолевую эффективность. Особое внимание уделяется выбору наиболее перспективного адьюванта, что закладывает основу для будущих разработок вакцин на основе пептидов в онкологии. Полученные данные позволяют лучше понять механизмы активации иммунного ответа и его модуляцию различными адьювантами, что

открывает новые возможности для создания более эффективных противоопухолевых вакцин.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая и практическая значимость данного исследования заключается в расширении знаний о роли адъювантов в составе пептидных вакцин против опухолевых заболеваний. В рамках работы впервые осуществлен анализ иммуногенности и противоопухолевой эффективности ряда потенциальных препаратов, применяемых в качестве адъювантов, что позволяет глубже понять механизмы их воздействия на иммунный ответ, активацию клеток иммунной системы и взаимодействие с опухолевыми клетками. Эти результаты способствуют развитию концепции использования пептидных вакцин в онкологии и уточняют их потенциальную эффективность в комбинации с различными адъювантами, что может оказать влияние на дальнейшие разработки в области противоопухолевой иммунотерапии. Сравнительный анализ исследуемых адъювантов предоставит рекомендации по выбору наиболее перспективного для клинической разработки пептидных вакцин, помогая выявить оптимальные варианты, способные усилить иммунный ответ и замедлить рост опухолей. Эти данные будут полезны для дальнейших предклинических и клинических исследований, направленных на создание новых терапевтических средств для лечения онкологических заболеваний.

Методология и методы исследования

Исследовали иммуногенность ряда потенциальных адъювантов Poly(I:C) Ридостин Про и Полный адъювант Фрейнда и выбирали наиболее перспективные в состав пептидной противоопухолевой вакцины. Эти вещества были выбраны на основании их известных иммуномодулирующих свойств и их потенциальной

способности усиливать иммунный ответ на введение пептидной противоопухолевой вакцины.

Для изучения иммунного ответа и противоопухолевой эффективности пептидных вакцин использовались модели опухолей: меланома B16-F10 и лимфома EG7-OVA, а также лабораторные мыши C57Bl/6. Животные были разделены на группы и подвергались вакцинации с использованием различных адъювантов. В процессе эксперимента оценивались изменение иммунофенотипа клеток, цитокиновый профиль сыворотки крови и общая противоопухолевая эффективность. Противоопухолевая эффективность пептидных вакцин с адъювантами оценивалась путем мониторинга динамики роста опухолей у мышей.

Для оценки клеточного иммунного ответа, вызванного введением адъювантов, использовался метод ELISpot. Этот метод позволил количественно определить количество клеток, продуцирующих специфические цитокины в ответ на стимуляцию. ELISpot применялся для выявления Т-клеточных ответов на вакцинацию.

Изменения иммунофенотипа клеток селезенки мышей оценивались методом проточной цитофлуориметрии. Этот метод обеспечивал возможность количественного и качественного анализа различных клеточных субпопуляций, что позволило оценить влияние различных адъювантов на иммунный ответ.

Экспериментальные данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение. Для анализа результатов ELISpot использовались программы Excel и GraphPad Prism 5.0; статистическую значимость определяли с помощью непарного t-теста. Значимыми считались различия при $p < 0,05$. Данные проточной цитометрии и показатели противоопухолевой активности обрабатывались с применением критерия Манна–Уитни в программе STATISTICA v.7. Порог значимости также установлен на уровне $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование адъювантов Poly(I:C) и Ридостина Про показало значительное преимущество над полным адъювантом Фрейнда в усилении продукции IFN- γ , благодаря их способности более эффективно стимулировать его выработку.

2. Включение Ридостин Про и Poly(I:C) одинаково усиливают иммуногенность пептидов TRP2 и овалбумина, однако Ридостин Про обладает большей эффективностью в повышении иммуногенности неоантигенных пептидов, что делает его предпочтительным кандидатом для использования в пептидных вакцинах.

3. Ридостин Про и Poly(I:C) вызывают схожие изменения иммунофенотипа спленоцитов, за исключением различий в экспрессии маркера CD69 на Т-клетках, где Ридостин Про проявляет более выраженное действие, что подтверждает его более сильное влияние на активацию Т-клеточного иммунного ответа.

4. Ридостин Про увеличивает концентрацию сывороточных цитокинов IL-12p70, TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-10 и IL-6 после вакцинации, обеспечивая более продолжительное и интенсивное воспалительное воздействие по сравнению с Poly(I:C), что является важным фактором в формировании мощного противоопухолевого иммунного ответа.

5. Применение адъювантов Poly(I:C) и Ридостина Про в монорежиме приводит к статистически значимому торможению роста опухоли. Это доказывает, что данные адъюванты обладают самостоятельной противоопухолевой активностью и могут использоваться в качестве компонентов для усиления иммунного ответа против опухолей.

6. Вакцинация с применением адъювантов и пептида TRP2 для меланомы B16-F10 и овалбумина для лимфомы E.G7-OVA в смешанном (профилактическом/терапевтическом) показала значительное торможение роста

опухоли и увеличение продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой.

7. Вакцинация с адъювантами и пептидом TRP2 для меланомы B16-F10 и овальбумином для лимфомы E.G7-OVA в терапевтическом режиме продемонстрировала замедление роста опухолей, что указывает на определённый противоопухолевый эффект вакцины. Однако, несмотря на значительное торможение опухолевого процесса, полное излечение опухоли не было достигнуто.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в диссертации результатов подтверждается использованием сертифицированного современного оборудования и передовых методик, что обеспечивает высокую точность и надежность данных. Современные статистические подходы в анализе данных позволяют объективно оценить и точно интерпретировать полученные выводы, минимизируя воздействие внешних факторов.

Апробация диссертации состоялась совместной научной конференции лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной

медицины, лаборатории биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей, лаборатории клеточного иммунитета, лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории химического синтеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, состоявшейся 27 декабря 2024 года.

Результаты диссертационного исследования были представлены на научных конференциях, включая VIII Всероссийскую конференцию по молекулярной онкологии в 2023 году и VII Всероссийскую конференцию с международным участием в 2022 году. Работа также была представлена в виде доклада на ученом совете НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей в июне 2024 года.

Публикации по теме диссертации

Соискатель является автором 21 публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 печатных работы в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации основных результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», главы «Результатов собственных исследований», обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и указателя цитируемой литературы. Общий объем диссертации на 114 страницах, содержит 14 рисунков и 11 таблицы, список литературы включает 212 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Подходы к вакцинотерапии опухолей

Рак остается одной из главных причин смертности в мире, и научное сообщество приложило значительные усилия для поиска эффективных методов борьбы с этим заболеванием. Традиционные методы борьбы с онкологическими заболеваниями, такие как хирургия, лучевая терапия и химиотерапия, обладают своими ограничениями. Особенно это касается более поздних стадий заболевания, когда появляются метастазы. В таких случаях, эти методы часто оказываются менее успешными, и риск повторного появления болезни остается высоким. Более того, эти методы могут негативно влиять на здоровые ткани, вызывая серьезные побочные эффекты.

Следовательно, существует неотложная необходимость в разработке новых терапевтических стратегий, способных специфически атаковать опухолевые клетки и обеспечивать продолжительную защиту.

Иммунная система представляет собой природный механизм защиты организма от болезней. Интересно, что наблюдения показали, что иногда внутриопухолевые инфекции могут привести к самопроизвольной регрессии опухолей [131]. Это наблюдение выявило потенциальные противоопухолевые свойства иммунной системы, что стало стимулом для разработки методов иммунотерапии рака.

Активация иммунной системы представляет собой эффективную стратегию для терапии злокачественных новообразований [40].

Значительные достижения в области иммунотерапии были достигнуты за последние десятилетия благодаря использованию эффективных препаратов, которые блокируют контрольные точки иммунной системы - такие как CTLA4 и PD-1. Эти достижения привели к кардинальным изменениям в подходах к лечению многих видов рака. В их список вошли меланома [99], почечно-

клеточный рак [134], немелкоклеточный рак легкого [41] и рак мочевого пузыря [127], а также рак яичников [166].

Иммунные контрольные точки необходимы для поддержания толерантности и защиты тканей от повреждения, связанного с чрезмерной активностью собственных иммунных клеток. При развитии опухоли эти же регуляторные механизмы могут способствовать избеганию иммунного надзора, что позволяет злокачественным клеткам ускользать от уничтожения. Именно поэтому контрольные точки стали важными мишенями в современных противоопухолевых терапиях [2].

Блокаторы контрольных точек доказали свою эффективность в лечении различных видов рака, но успех этой терапии зависит от множества факторов и не является универсальным решением для всех случаев онкологических заболеваний. Одним из недостатков терапии блокаторами иммунных контрольных точек является возникновение резистентности. Исследования показывают, что у некоторых пациентов с меланомой, которые успешно реагировали на терапию в начале лечения, возникает резистентность, вплоть до полного отсутствия ответа на терапию [128]. Еще одним фактором, влияющим на успех лечения блокаторами контрольных точек иммунитета, является микроокружение опухоли, которое может со временем изменяться. Разное соотношение различных типов клеток может привести к снижению или повышению ответа на терапию. Например, увеличение цитотоксических клеток в ткани опухоли положительно коррелирует с ответом на лечение, в то время как увеличение количества регуляторных Т-клеток, опухолиассоциированных фибробластов и M2 макрофагов может снизить эффективность терапии [113, 62].

Иммунотерапия способствует активации и размножению Т-лимфоцитов, способных распознавать опухолевые пептиды, представленные в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на поверхности раковых клеток. Это обеспечивает их прицельное уничтожение иммунной системой [144].

Современные направления иммунотерапии активно развиваются в области создания терапевтических вакцин против опухолей. В отличие от традиционных вакцин, направленных на профилактику инфекционных заболеваний путём стимуляции выработки антител против патогенов, противоопухолевые вакцины ориентированы на активацию клеточного иммунитета для борьбы с уже сформировавшимися опухолями. Однако в последнее время вакцины начали использоваться как терапевтическое средство, мотивируя иммунную систему активировать цитотоксические Т-клетки для атаки на инфицированные клетки и раковые клетки.

Терапевтические противоопухолевые вакцины представляют собой перспективный метод иммунотерапии, направленный на активизацию иммунного ответа против опухолевых антигенов, мобилизуя CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки. Эти антигены делятся на опухолеассоциированные (ОАА) и опухолеспецифические (ОСА).

Опухолеассоциированные антигены — это нормальные антигены клеток человека, экспрессия которых возрастает в несколько раз в опухолевых клетках. Эти антигены могут экспрессироваться у разных пациентов с одним типом опухоли, включая HER2, мезотелин, MUC-1 и другие [61, 52, 98]. Долгое время ОАА являлись главными мишенями при создании противоопухолевых вакцин. Однако с увеличением числа исследований выяснилось, что количество иммунных клеток, способных распознавать аутологичные антигены, ограничено из-за процесса иммунной толерантности в тимусе, что влияет на эффективность таких вакцин [212, 97, 191].

Опухолеспецифические антигены представляют собой уникальные белки, которые проявляются исключительно в тканях определенной опухоли у пациента. Опухолеспецифические антигены часто называют неоантигенами, так как это антигены, в которых произошла мутация, из-за чего аминокислотная последовательность антигена изменилась и может быть распознана иммунными клетками организма [175]. Поскольку эти антигены экспрессируются только в опухолях, то они являются более безопасными мишенями, так как не будут

затрагивать здоровые клетки организма [40], также они являются более иммуногенными мишенями и обладают более высокой аффинностью к главному комплексу гистосовместимости по сравнению с ОАА, так как на них не влияет процесс иммунотолерантности [132]. На широкое изучение и применение ОСА в лечении рака, также повлияло развитие секвенирования нового поколения, что сделало более доступным и быстрым секвенирование опухолей, а также появление новых алгоритмов прогнозирования связывания конкретных эпитопов антигена с молекулами HLA [165]. Ярким примером разработки вакцин на основе ОСА является [149], в которой описана неоантигенная вакцина против меланомы человека, индуцирующая инфильтрацию Т-клеток в опухолевую ткань и неоантиген-специфическое уничтожение аутологичных опухолевых клеток; после вакцинации значительно снизилась частота метастатических событий, что привело к устойчивой выживаемости без прогрессирования заболевания. Хотя персонализированные вакцины против рака, основанные на неоантигенах, показали обнадеживающие результаты, большое количество прогнозируемых неоантигенов, как правило, вызывают очень мало реальных противоопухолевых ответов [135].

Поскольку терапевтические противоопухолевые вакцины нацелены на антигены, преимущественно связанные с опухолевыми клетками, этот метод лечения обещает быть более безопасным по сравнению с блокаторами контрольных точек, так как минимизирует повреждение нормальных тканей и побочные эффекты [117]. Исследования терапевтических противоопухолевых вакцин охватывают широкий спектр антигенов, адъювантов, векторов доставки и методов введения. Однако исторически множество клинических испытаний терапевтических противоопухолевых вакцин, включая десятки ключевых исследований, не доказали их эффективность при терапии опухолей [105]. Это может быть связано с несколькими факторами, такими как выбор неоптимальных антигенов, слабая иммуногенность платформ, ограниченный доступ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) к опухоли из-за иммуносупрессии, связанной с тяжестью заболевания, неадекватной иммунной реакцией или

особенностями микроокружения опухоли [183]. Также одним из важных факторов, влияющих на эффективность вакцин, является выбор правильного адъюванта. В особенности адъювант важен для обеспечения эффективности пептидных противоопухолевых вакцин.

1.2 Пептидные противоопухолевые вакцины

Пептидные противоопухолевые вакцины представляют собой современный и перспективный метод лечения рака, направленный на активацию иммунной системы пациента для уничтожения опухолевых клеток. В основе этого подхода лежит использование пептидов, представляющих собой фрагменты антигенов, специфичных для опухолевых клеток. Эти пептиды стимулируют иммунный ответ, направленный на распознавание и уничтожение опухоли. Пептидные вакцины считаются одними из наиболее популярных направлений среди терапевтических противоопухолевых вакцин благодаря их относительно низкой стоимости производства и высокой безопасности. Эти вакцины нацелены непосредственно на опухолевые клетки, не повреждая здоровые ткани организма, что делает их более щадящим вариантом терапии [46].

Для достижения эффективного иммунного ответа пептидные вакцины требуют представления пептидов на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Одновременно с этим необходимо применение адъюванта для активации иммунной системы и целенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих эти пептиды [45]. Эффективность пептидной вакцины определяется правильным выбором пептидов и адъюванта, что обеспечивает адекватный локальный иммунный ответ и оптимальную транспортировку антигена в дренирующие лимфатические узлы.

Создание пептидной вакцины всегда начинается с подбора пептидов. Из-за ограничения полиморфизма МНС и небольшого размера самих антигенных эпитопов иммуногенность вакцин на основе пептидов слабая. Часто бывает трудно вызвать устойчивый иммунный ответ, что приводит к иммунной

толерантности. Не все области белковых антигенов одинаково иммуногенны для В-клеток и Т-клеток. По сравнению с вакцинами на основе инактивированных опухолевых клеток пептидные вакцины вызывают более целенаправленный иммунный ответ против критически важных эпитопов [46]. Важным моментом для поддержания эффективного иммунного ответа является параллельная активация как CD4 Т-клеток, так и CD8 Т-клеток [184].

Эффективность пептидной вакцины в значительной степени определяет длина пептидной цепи. Отличительной особенностью коротких пептидов длиной 8-12 аминокислот, является короткий период полураспада и презентация их на поверхности всех ядродержащих клеток без участия АПК. Отсутствие костимулирующих молекул, необходимых для оптимальной активации CD8+ Т-клеток, ограничивает провоцирование ЦТЛ [50]. Поэтому короткие пептиды часто лишь временно активируют ЦТЛ и даже могут индуцировать толерантность к ЦТЛ [179]. Кроме того, более короткие пептиды также, как правило, ограничены типами HLA.

Главной особенностью длинных пептидов длиной в 20 аминокислот и более является их презентация АПК на поверхности молекул МНС I и II класса, что значительно увеличивает иммуногенность противоопухолевых иммунных ответов, как с участием CD4+ Т-клеток, так и CD8+ Т-клеток и В-клеток [190]. Такой подход хорошо себя зарекомендовал в работе [66] где было показано, что использование синтетических длинных пептидов во много раз увеличивает иммуногенность вакцины, по сравнению с использованием цельных белков, из которых были образованы длинные пептиды. Поскольку вакцина должна стимулировать как CD4+, так и CD8+ специфические Т-клетки, в большинстве пептидных вакцин используются длинные пептиды длиной 20-30 аминокислот. Они, вероятно, содержат эпитопы CD8+ Т-клеток, так и CD4+ Т-клеток. Кроме того, часто используются мультипептидные вакцины, которые могут быть нацелены на различные антигены, увеличивая эффективность иммунного ответа, связанную с потерей антигена опухолевыми клетками [47].

Для успешной разработки вакцины критически важно правильно выбрать необходимые эпитопы, что напрямую зависит от типа антигена, лежащего в основе вакцины. Если вакцина разрабатывается на базе неоантигенов, выбор эпитопов зависит от уникальных мутаций в раковых клетках пациента. В случае вакцин, основанных на опухолеассоциированных антигенах (ОАА), ключевым этапом является подтверждение высокой экспрессии целевого белка на поверхности опухолевых клеток. Обычно это достигается с помощью масс-спектрометрии, позволяющей точно идентифицировать и количественно оценить белки, экспрессируемые опухолью [122].

При успешном подборе эпитопа и комплекса HLA, следует установить, насколько иммуногенным является комплекс, что достигается методом ELISPOT [158].

Хотя на сегодняшний день ни одна пептидная противоопухолевая вакцина не получила одобрения международных или российских организаций, многие из них уже находятся на стадии клинических испытаний. Одной из таких вакцин является вакцина на основе ОАА NY-ESO – это широко известный опухолевый антиген, который не экспрессируется нормальными клетками организма, однако его экспрессируют многие опухоли разного типа [211]. Во 2 стадии клинического испытания было показано, что вакцина на основе только пептида NY-ESO не продемонстрировала клинической эффективности, однако при использовании данной вакцины в комбинации с другими методами иммунотерапии, например с анти-CTLA4 терапией наблюдался иммунный ответ у 80% испытуемых [158, 21].

При создании пептидной вакцины на основе неоантигена, отдельной задачей является выявление мутированных эпитопов, высоко экспрессирующихся на поверхности опухоли и отсутствующих в нормальной ткани. После открытия неоантигенов, повышения доступности высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа количество изучаемых пептидных вакцин увеличилось. Для определения пептидов, способных связываться с молекулами МНС I или II класса обычно используются биоинформатические приложения и программа прогнозирования алгоритмов.

Идентификация пептидов, связанных с молекулами МНС на поверхности клетки, может также осуществляться с помощью масс-спектрометрического (MS) анализа. Объединение данных MS-анализа, алгоритмов прогнозирования эпитопов и данных об экспрессии генов помогает предсказать наилучшие пептиды-кандидаты для включения в вакцину [38].

Несколькими группами был разработан ряд пептидных персонализированных вакцин, нацеленных на неоантигены в индивидуальной опухоли пациента. Ott и его коллеги применили полноэкзомное секвенирование (WES) и РНК-секвенирование (RNA-Seq) для выявления неоантигенов у шести пациентов, страдающих меланомой III/IV стадии. С помощью инструмента NetMHCpan (версия 2.4) был создан список пептидов, способных связываться с МНС класса I. Синтезированные пептиды, длиной от 15 до 30 аминокислот, были разработаны так, чтобы стимулировать как CD4+, так и CD8+ Т-клетки. Вакцинация пациентов производилась с использованием 30 пептидов в комбинации с poly-ICLC, что стимулировало полифункциональные реакции CD4+ и CD8+ Т-клеток, нацеленных на 58 из 97 и 15 из 97 неоантигенов соответственно [47]. Спустя 25 месяцев после вакцинации четверо пациентов не показали признаков рецидива, в то время как у двоих наблюдалось прогрессирование заболевания, которое впоследствии было успешно остановлено с помощью анти-PD-1 терапии [31].

Ряд ранних испытаний противоопухолевых вакцин на основе пептидов в основном были сосредоточены на коротких пептидах из ОСА и не включали какую-либо систему доставки или более длинные пептидные составы [198]. Большинство этих исследований завершились неудачей при переходе к испытаниям 3-й фазы, к причинам этих неудач относятся неверный выбор адъюванта, сроков вакцинации или состава пептидов [29]. Данные вакцины действительно способствовали возникновению иммунного ответа, но в качестве монотерапии им было трудно продемонстрировать эффективность в клинике. Эти исследования показали необходимость дальнейшей оптимизации пептидных вакцин, либо за счет лучшей направленности, лучших адъювантов, либо за счет

использования в комбинации для преодоления иммуносупрессивного эффекта [198].

Одним из наиболее распространенных методов усиления эффективности пептидных противоопухолевых вакцин являются адъюванты. Адъюванты являются одним из важнейших компонентов современных вакцин и успешно используются для усиления врожденных и адаптивных иммунных реакций, направленных на вакциноспецифические антигены.

1.3 Роль адъювантов в вакцинотерапии рака

Использование адъювантов для усиления иммунного ответа на вакцины представляет собой одно из самых значительных достижений в вакцинологии [208]. Введение вакцин без адъювантов может не только быть неэффективным способ активации иммунной системы, но и вызывать толерантность иммунитета в условиях отсутствия воспаления или микробной активации [123]. Для эффективной вакцинотерапии необходимо применение адъювантов, которые привлекают иммунные клетки к месту инъекции, обеспечивают транспорт антигенов к дренирующим лимфатическим узлам и активируют антиген-презентирующие клетки (АПК).

Первым адъювантом, используемым в вакцинах, был алюминий (соли алюминия), и он до сих пор остается одним из наиболее распространенных адъювантов среди ограниченного количества традиционных адъювантов, разрешенных к клиническому применению. Данное соединение было впервые использовано в качестве адъюванта в 1926 году в Лондоне, что дало начало многолетним исследованиям роли адъювантов в вакцинах. [140].

Считалось, что механизм действия солей алюминия обусловлен постепенным высвобождением антигена в месте введения инъекции. Однако в 2011 году, было продемонстрировано, что соли алюминия вызывают клеточную гибель, в результате которой высвобождается ДНК, функционирующая как молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением, который в свою

очередь дополнительно активирует врожденную иммунную систему, что увеличивает эффективность вакцинации [72].

Известно, что производные алюминия очень эффективны в обеспечении гуморальных иммунных ответов, но не индуцируют клеточный иммунитет, наиболее важный для элиминации опухоли [43]. В 2018 году было показано, что алюмининевые адъюванты индуцируют продукцию интерлейкина-10, подавляющего Th1 иммунный ответ, поэтому они практически не эффективны в составе противоопухолевых вакцин [189].

Новаторским открытием в области адъювантов стала идентификация рецепторов распознавания патогенов (PRRs), которая была предсказана С. Janeway в 1989 году [106]. PRR преимущественно экспрессируются эпителиальными клетками и клетками врожденной иммунной системы, такими как дендритные клетки, моноциты, макрофаги. Основная функция PRR заключается в идентификации двух основных типов молекулярных паттернов: PAMPs (паттерны, связанные с патогенами) и DAMPs (паттерны, связанные с повреждением). PAMPs обычно происходят от различных микроорганизмов, включая вирусы, бактерии и грибки, тогда как DAMPs высвобождаются при клеточном стрессе или повреждении и служат сигналами для иммунной системы. При распознавании этих молекул PRR инициируют врожденный иммунный ответ, провоцируя выработку провоспалительных цитокинов. Это стимулирует активацию адаптивных иммунных механизмов, направленных на борьбу с опухолью. В дополнение, активация сигнальных путей PRR может помочь преодолеть иммунную толерантность антигенпрезентирующих клеток к антигенам, ассоциированным с опухолями, путем повышения экспрессии ко-стимулирующих молекул, таких как CD80, CD86, и CD40, а также через индукцию интерферона типа I [1].

Как только были обнаружены PRR, оказалось, что многие из наиболее известных адъювантов могут быть идентифицированы как PAMPs. Но с момента своего открытия PRR также стали очень привлекательной мишенью для разработки новых адъювантов, являющихся PAMPs или DAMPs, для включения в

вакцины. Большинство PAMP, которые в настоящее время используются в качестве адъювантов, нацелены на Toll-подобные рецепторы (TLR), которые экспрессируются на клетках врожденного иммунитета, например, на ДК. За открытие TLR, понимание того, как они модулируют иммунный ответ, а также за открытие ключевой роли ДК Бойтлер, Хоффман и Штейнман были удостоены Нобелевской премии в 2011 году [141]. Кроме того, было показано, что DAMPs играют важную роль в механизмах действия TLR-независимых адъювантов, как в случае с солями алюминия, такие же эффекты вызывают эмульсии «масло-в-воде» MF59 и AS03 [164].

Адъюванты усиливают адаптивный иммунитет путем активации клеток врожденного иммунитета. Основная концепция заключается в том, что адъюванты способствуют презентации антигена. Для эффективной презентации антигена необходим сигнал от молекулы MHC при связывании с антигеном и дополнительный сигнал от молекул CD40, CD80, CD86, экспрессирующихся на поверхности АПК. Действие этих двух сигналов вызывает активацию наивных Т-клеток, которая в свою очередь приводит к эффективному иммунному ответу [153].

Иммуностимуляторы, такие как PAMP, DAMP, низкомолекулярные агонисты TLRs, цитокины, сапонины способны активировать как основной, так и дополнительный сигналы при распознавании антигена. Некоторые системы доставки антигенов, например липидные наночастицы (ЛНЧ), поли(молочно-гликолевая кислота) (PLGA) и каркасные белковые наночастицы облегчают презентацию антигенов на молекулах MHC (основной сигнал) [35, 157].

Разные типы иммуностимуляторов воздействуют на разные PRRs, приводя к секреции различных цитокинов, которые являются основными факторами адаптивных иммунных реакций [200, 209].

В целом адъюванты можно разделить по механизму действия на системы доставки антигена и иммуностимуляторы [1].

1.4 Адьюванты – системы доставки антигенов

Системы доставки представляют собой материалы-носители, в которые загружают антигены с целью улучшения поглощения и презентации антигенов АПК. Основная задача таких систем заключается в облегчении процесса презентации антигена, который включает в себя распознавание, поглощение, интернализацию антигенов АПК и представление на поверхности АПК с использованием молекул МНС [163]. Системы доставки могут усиливать сигналы антигена, необходимые для его презентации на поверхности АПК.

Системы доставки могут нацеливаться на АПК, обеспечивая эффективное поглощение антигенов. Повышенное поглощение антигена, в свою очередь, увеличивает количество связанных с МНС пептидов, представленных на поверхности АПК, что приводит к более сильному адаптивному иммунному ответу.

Системы доставки могут способствовать поглощению, имитируя размеры и пространственную структуру патогенов [180]. В исследовании, проведённом Т. Tokatljan и соавт. [82], было продемонстрировано, что инкапсуляция антигенов в липосомальные наночастицы значительно улучшает их распознавание и эндоцитоз антигенпрезентирующими клетками (АПК). Это улучшение связано с тем, что липосомальные наночастицы способствуют более эффективному захвату антигенов клетками по сравнению с растворимыми антигенами. В результате этого процесса увеличивается презентация антигена и выработка антител с высоким сродством, что существенно повышает эффективность иммунного ответа. Другие исследования продемонстрировали эффективность системы доставки, основанной на микрочастицах гидрогеля, содержащих антиген гриппа H5N1. Эта система доставки улучшала гуморальные реакции и активировала Т-клетки более эффективно, чем традиционные методы. Микрочастицы гидрогеля увеличивают размер антигена, что улучшает его распознавание и поглощение антигенпрезентирующими клетками. Это увеличение размера антигена способствует более интенсивной активации иммунной системы, улучшая тем самым общую эффективность вакцины [139]. Одной из перспективных стратегий

систем доставки антигенов при создании противоопухолевых вакцин является использование электропорации – небольших электрических импульсов, которые вызывают образование временных пор в клеточной мембране. В процессе дестабилизации мембраны, вызванного электропорацией, плазмидная ДНК, находящаяся в внеклеточной среде вокруг клетки-мишени, проникает в внутриклеточные компартменты. Этот процесс начинается с создания временных пор в клеточной мембране под воздействием электрического поля, что позволяет ДНК проникнуть внутрь клетки. После проникновения плазмидной ДНК мембрана восстанавливается, возвращаясь к своему нормальному состоянию [37]. Электропорация значительно увеличивает проницаемость клеточной мембраны, что способствует более эффективному поглощению ДНК. В условиях временного увеличения проницаемости клетки могут усваивать плазмидную ДНК в существенно больших количествах, что делает процесс трансфекции более эффективным. Электропорация может увеличить поглощение ДНК более чем в 1000 раз по сравнению с традиционными методами [173]. Благодаря этому вызывается локальный воспалительный ответ, приводя к активации врожденного иммунного ответа, что также увеличивает иммунный ответ на введенную ДНК и может улучшить эффективность вакцин [79, 205]. В ряде ДНК-вакцин, которые в настоящее время проходят клинические испытания, используется электропорация для доставки ДНК-плазмид; способность этих плазмид вызывать иммунный ответ была продемонстрирована при раке простаты и меланоме [73]. Другая аналогичная стратегия – использование генной пушки для доставки плазмидной ДНК, покрытой тяжелым металлом [87]. Некоторые многообещающие доклинические данные привели к клиническим испытаниям фазы 1 и 2 при плоскоклеточном раке головы и шеи и раке шейки матки [60].

Широко используются в качестве адъювантов систем доставки эмульсии «вода в масле», такие как Монтанид ISA 720 и Монтанид ISA-51. Они формируют депо в месте введения вакцины, что способствует задержке растворимых антигенов и предотвращает их быстрое перемещение в лимфатические узлы. Это вызывает воспалительные реакции и постепенное высвобождение антигена. В

клинических исследованиях было показано, что Монтанид ISA-51 способствует индукции как CD4+, так и CD8+ Т-клеточного ответа у пациентов, которым вводили длинные пептиды онкопротеинов E6 и E7 против интрезпителиальной неоплазии, вызванной вирусом папилломы человека [109, 202].

Давно известны неполный и полный адьювант Фрейнда. Неполный адьювант Фрейнда, который в отличие от полного, не содержит микобактерий, можно отнести к адьювантам, обеспечивающим доставку антигена. Он представляет собой маслянистый антигенный депозит, из которого происходит постоянное высвобождение антигена в месте инъекции. Это способствует продлению времени жизни антигена и вызывает сильную локальную стимуляцию врожденного иммунитета, включая фагоцитоз, рекрутирование и инфильтрацию лейкоцитов, а также продукцию цитокинов [192]. Впервые неполный адьювант Фрейнда был использован в 1950-х годах в качестве адьюванта в вакцинах против гриппа человека [116].

Полный адьювант Фрейнда содержит убитые нагреванием микобактерии, эмульгированные в минеральном масле, благодаря чему помимо обеспечения депо для вакцинных антигенов способствует активации иммунной системы. Он используется в экспериментах *in vivo* для индукции сильной иммунной активации и аутоиммунных реакций, таких как увеит и экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит у мышей. Однако полный адьювант Фрейнда может вызывать значительное и продолжительное местное воспаление, что может привести к сильным болям и даже возможному образованию язвы в месте инъекции [179]. Была исследована эффективность полного адьюванта Фрейнда на мышинных моделях рака молочных желез, мастоцитомах у мышей и собак и меланоммах лошадей [172]. Наблюдали увеличение выживаемости мышей с моделями опухолей P815 и 4T1. Также наблюдали признаки системного иммунного ответа (регрессия неинъекционных метастазов). Анализ иммунных клеток, инфильтрирующих опухоли мастоцитомы у мышей, показал, что ранняя нейтрофильная инфильтрация предсказывает эффективность лечения. Анализ места регрессии мастоцитомы у собак через несколько недель или месяцев после

лечения продемонстрировал увеличение инфильтрации В- и Т-клеток. Таким образом, активации только врожденной иммунной системы может быть достаточно для регрессии некоторых инъецированных опухолей с последующей активацией адаптивной иммунной системы, которая может опосредовать регрессию неинъекционных метастазов.

В качестве систем доставки также исследуют различные наночастицы. Среди них особое внимание уделяется полимерным наночастицам, липосомам, мицеллам, углеродным нанотрубкам, мезопористым наночастицам кремнезема, наночастицам золота и вирусным наночастицам. Эти наноструктуры могут использоваться как в одиночку, так и в комбинации для доставки активных компонентов [130]. Липосомы, в частности, зарекомендовали себя как одна из наиболее популярных систем доставки, благодаря своей универсальности и возможности модификации. Их липидный состав, заряд, размер и поверхностные характеристики могут быть точно адаптированы под конкретные задачи, что позволяет оптимизировать доставку вакцин [26, 182, 159]. Применение липидных носителей, таких как DOTMA, DOTAP, DOPE и холестерол, позволяет точно настроить отрицательный заряд наночастиц для обеспечения эффективной доставки активных молекул. Катионные липосомы, собранные на основе DOTMA и DOPE, формируют устойчивые наночастицы диаметром 200–400 нм с выраженным положительным зарядом, что предотвращает их агрегацию [102]. Такие липосомы усиливают иммунный ответ на антигены, используемые в составе противоопухолевых вакцин, а также подходят для транспортировки нуклеиновых кислот (РНК, ДНК) и пептидов. Это делает их перспективной платформой для терапии онкологических заболеваний. Гидрофильные и липофильные антигены могут быть загружены в липосомы, гидрофильные антигены удерживаются во внутреннем водном пространстве, а липофильные компоненты вводятся в липидный бислой путем адсорбции или химического присоединения [47].

Компания BioNTech разработала липидосодержащую формулу на основе наночастиц, называемую липоплекс (Lipoplex), которая используется для эффективной доставки РНК к АПК. Липосомы не только способствуют

направленной доставке к антигенпрезентирующим клеткам (АПК), но и обеспечивают защиту РНК от деградации внеклеточными рибонуклеазами. Они также способствуют активному захвату и экспрессии транспортируемой информации дендритными клетками и макрофагами, локализованными в лимфоидных тканях. Установлено, что липоплексы, содержащие РНК, кодирующую опухолевые антигены, способны вызывать мощный эффекторный Т-клеточный ответ и формировать популяции Т-клеток памяти. Кроме того, наблюдается отторжение прогрессирующих опухолей, опосредованное через IFN- α -зависимые механизмы. Такие вакцинные платформы активируют как адаптивный, так и врождённый иммунитет, по механизму, сходному с антивирусным ответом [181].

В 2020 году группа исследователей под руководством Шахина [32] представила результаты первой фазы клинического испытания вакцины FixVac (BNT111), разработанной для пациентов с меланомой. Исследование, зарегистрированное под номером NCT02410733, включало введение пациентам липосомально инкапсулированной РНК (RNA-LPX), нацеленной на четыре опухолевых ассоциированных антигена — NY-ESO-1, MAGE-A3, тирозиназу и TPTE. Согласно данным промежуточного анализа, вакцина FixVac, используемая как самостоятельно, так и в комбинации с терапией анти-PD-1, показала способность вызывать долгосрочные иммунные реакции у пациентов с неоперабельной меланомой, которые ранее применяли ингибиторы PD-1.

Кроме того, особый интерес представляют самособирающиеся пептиды, которые могут функционировать в качестве эффективной системы доставки антигенов к целевым клеткам. Эти пептиды обладают способностью спонтанно формировать упорядоченные структуры под воздействием изменений различных факторов, таких как уровень pH, тип растворителя, присутствие сопутствующих молекул, температура и ионная сила [120]. Благодаря этим свойствам, они могут быть адаптированы для формирования различных наноструктур, включая наномицеллы, нановезикулы, нановолокна, нанотрубки, наноленты и гидрогели. В отличие от липосом или наночастиц, системы доставки, основанные на

самосборных пептидах, имеют ряд значительных преимуществ, таких как высокая емкость по загрузке лекарственного препарата, минимальная утечка препарата, способность к биологическому разложению, а также высокая проницаемость через клеточные мембраны. Более того, самособирающиеся пептиды могут быть специально модифицированы для обеспечения оптимальных характеристик вакцин, необходимых для эффективной доставки в клетки-мишени [24].

1.5 Адьюванты стимуляторы иммунного ответа

Также в доклинических и клинических исследованиях терапевтических противоопухолевых вакцин широко используются адьюванты, нацеленные на специфические компоненты иммунной системы, чтобы обеспечить более стойкий и продолжительный иммунный ответ.

1.5.1 Адьюванты нацеленные на TLR рецепторы

Очень часто в качестве адьювантов вакцин применяются агонисты TLR, поскольку они имитируют микробную стимуляцию и повышают эффективность вакцинации [201], особенно против онкологических заболеваний [148, 155]. Исследования показали связь уровня CD8⁺ Т-клеточного ответа и количества агониста TLR, накопленного в дренирующих лимфатических узлах, что подчеркивает важность обеспечения адекватных воспалительных сигналов во время вакцинации [178]. Ряд агонистов TLR в настоящее время проходят клинические испытания в качестве адьювантов для терапевтических противоопухолевых вакцин.

Интересно, что различные типы иммуностимуляторов опосредуют различные адаптивные иммунные реакции, передавая сигналы через различные TLR [160]. Так как TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6 экспрессируются на поверхности клеток, они в основном распознают компоненты микробной мембраны, такие как липиды, липопротеины и белки. Активация TLR на

поверхности АПК соответствующими иммуностимуляторами обычно приводит к образованию провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , TNF- α и IL-6, и, в конечном итоге, к формированию иммунных ответов типа Th1 или Th2 [118, 156]. TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 являются внутриклеточными TLR, экспрессирующимися во внутриклеточных везикулах и реагирующими с нуклеиновыми кислотами [108]. Активация внутриклеточных TLR соответствующими типами иммуностимуляторов обычно приводит к выработке интерферонов I типа [103, 143]. Интерфероны I типа стимулируют дифференциацию Th1-клеток и регулируют их функцию. Кроме того, интерфероны I типа способствуют перекрестной презентации антигена CD8⁺ Т-клеткам через ДК и могут напрямую стимулировать пролиферацию CD8⁺ Т-клеток [69]. Описаны конкретные механизмы, посредством которых иммуностимуляторы воздействуют через TLR.

В частности, при связывании с лигандом TLR2 формируются гетеродимеры с TLR1 или TLR6. TLR2/TLR1 и TLR2/TLR6 взаимодействуют с различными липопептидами [104]. Иммуностимуляторы, нацеленные на гетеродимеры TLR2 (TLR2/1 или TLR2/6), инициируют передачу сигналов через путь MyD88 и активируют NF- κ B. Этот процесс индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как IL-12. IL-12, в свою очередь, участвует в дифференцировке наивных Т-клеток в Th1-клетки [199, 186]. Также иммуностимуляторы, нацеленные на TLR2, вызывают усиление передачи сигналов через внеклеточную сигнальную киназу ERK1/2, что приводит к повышению экспрессии белка c-Fos. Этот белок, в свою очередь, подавляет экспрессию IL-12 и усиливает экспрессию IL-10, стимулируя тем самым поляризацию наивных Т-клеток в клетки Th2-типа [156].

Агонисты TLR3 являются наиболее часто используемыми адьювантами в исследованиях противоопухолевых вакцин. Еще до обнаружения TLR было замечено, что синтетическая полирибоизоинозин:полирибоцитидиловая кислота (Poly(I:C)) обладает высокой способностью индуцировать продукцию интерферона (IFN) [100]. TLR3, расположенный в эндосомах и обнаруживающий вирусную двуцепочечную РНК, распознает Poly(I:C), вызывая выработку IFN

типа I и типа III и стимулируя цитокиновый ответ типа Th1. IFN типа I, продуцируемый после взаимодействия TLR3 с Poly (I:C) [67, 18], особенно важен для ДК и эффективной активации CD8⁺ Т-клеток [193]. Кроме того, IFN типа I, продуцируемый Poly(I:C), стимулирует клональную экспансию Т-клеток, увеличивая соотношение эффекторных Т-клеток и количество антигенспецифических В-клеток [28]. По всем этим причинам Poly(I:C) широко исследовался в качестве потенциального адъюванта. Однако он характеризовался выраженной токсичностью, но быстро разрушался в организме, что мешало его клиническому применению.

Один из наиболее часто встречающихся в доклинических и клинических исследованиях агонист TLR3 полиинозин-полицитидиловая кислота с полилизином и карбоксиметилцеллюлозой (Poly-ICLC) [154, 146, 31, 22, 147]. Показано, что Poly(ICLC) способен вызывать более сильный иммунный ответ Th1 по сравнению с другими агонистами TLR [150].

Для уменьшения токсичности Poly(I:C) был разработан его аналог Poly(IC12U) за счет несоответствия между остатками урацила и гуанозина [80, 121]. Это модификация позволила снизить токсичность препарата, но привела к более низкой выработке IFN I, чем у Poly(I:C). В отличие от Poly(I:C) и Poly(ICLC), было показано, что Poly(IC12U) связывается с TLR3, но не взаимодействует с MDA5. Тем не менее, подобно Poly(ICLC), Poly(IC12U) использовался в качестве адъюванта в ряде исследований, направленных на разработку противораковых вакцин [16].

Созданный новый агонист TLR3 под названием ARNAX представляет собой TLR3-специфичный лиганд, разработанный с учетом снижения токсичности [168].

Токсичность Poly(I:C) объясняется его способностью активировать путь MAVS через активацию RIG-I и/или MDA5. В связи с этим Matsumoto и его коллеги разработали лиганд, состоящий из фосфоротиоат-олигодезоксинуклеотиды GpC и двуцепочечной РНК – ARNAX, который обнаруживается TLR3 и интернализуется в эндосому [65]. ARNAX способен активировать TLR3, избегая обнаружения MDA5 за счет относительно короткой

длины РНК. Адьювант не вызвал значительного увеличения уровней воспалительных цитокинов в сыворотке у мышей, но способствовал кросс-представлению антигена дендритными клетками и вызывал профиль Th1 [25].

Иммуностимуляторы, нацеленные на TLR4 и TLR5, инициируют передачу сигналов через путь MyD88 для активации NF-κB. Это приводит к секреции провоспалительных цитокинов и поляризации наивных T-клеток в Th1. Не менее важно то, что иммуностимуляторы, активирующие адаптивный иммунитет через TLR4, также могут передавать сигнал через TRIF, что приводит к активации IRF3 и выработке интерферонов I типа [91]. В исследовании [126] в качестве адьюванта использовали агонист TLR4 монофосфорил липид А (MPLA), являющийся модифицированным производным липополисахарида. Результаты показали, что в составе противоопухолевой нановакцины MPLA индуцирует захват антигена дендритными клетками (ДК) и способствует активации ДК и T-клеток, тем самым оптимизируя соотношение CD8⁺ T/Treg в опухолях и способствуя трансформации иммунного микроокружения опухоли из «холодного» в «горячее». В составе вакцины направленной на лечение рака шейки матки в качестве адьювантов использовали комбинацию MPLA с солями алюминия, что обеспечивало усиление иммунного ответа [96].

Наконец, иммуностимуляторы, направленные на TLR7/8/9, расположенные в эндосомах, активируют NF-κB и регуляторный фактор интерферона 7 (IRF7) по пути MyD88, вызывая выработку провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа в АПК. Это в свою очередь индуцирует сильные ответы Th1 и CTLs. Опубликованы исследования агонистов TLR7/TLR8 в качестве адьювантов противоопухолевых вакцин. TLR7 распознает вирусную одноцепочечную РНК и производные имидазоквинолина, к которым относятся препараты ресиквимод и имиквимод [1].

Имиквимод – модификатор иммунного ответа и индуктор цитокинов *in vitro* и *in vivo*, обладает мощной противовирусной и противоопухолевой активностью [101]. В доклинических исследованиях изучили потенциал имиквимода в качестве адьюванта ДНК-вакцины. Было обнаружено, что имиквимод увеличивает

количество и созревание ДК в дренирующих лимфатических узлах, антигенспецифические реакции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Наблюдали более существенное увеличение количества CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN- γ , по сравнению с IL-4, это позволило предположить, что имиквимод смещает иммунный ответ в сторону преобладания клеток Th1 [95].

TLR9 — это эндосомальный рецептор из семейства Toll-подобных рецепторов, который идентифицирует ДНК микробного происхождения внутри клетки по характерным неметилованным CpG последовательностям. Синтетический лиганд TLR9, известный как CpG ODN, содержит эти специфические последовательности и активирует два ключевых сигнальных пути: TLR9-MyD88-IRF7 и TLR9-MyD88-NF κ B. Активация пути TLR9-MyD88-IRF7 приводит к индукции ИНФ типа I, играющего роль в противовирусной защите, тогда как путь TLR9-MyD88-NF κ B стимулирует выработку провоспалительных цитокинов, которые способствуют развитию иммунного ответа [1].

1.5.2 Адьюванты нацеленные на cGAS-STING путь

С открытием роли пути циклической гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфатсинтазы cGAS-STING в координации врожденного и адаптивного иммунитета, ученые начали использовать агонисты cGAS-STING в качестве адьювантов вакцин [206]. cGAS представляет собой цитоплазматический ДНК-рецептор, активируемый двуцепочечной ДНК. При активации cGAS трансформирует цитоплазматический аденозинмонофосфат и гуанозинмонофосфат в циклический гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфат (cGAMP) [152]. Затем cGAMP связывается с димером STING (белка-стимулятора гена интерферона) — трансмембранного белка, расположенного в эндоплазматическом ретикулуме в v-образном кармане, вызывая конформационные изменения, агрегацию и активацию STING [76]. После этого активируются NF- κ B и IRF3, способствуя выработке провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа [51].

Интерфероны I типа, такие как IFN- α/β , могут индуцировать созревание АПК, усиливать ко-стимулирующие сигналы и повышать их способность презентировать или перекрестно презентировать антигены [71]. Таким образом, иммуностимуляторы, направленные на путь cGAS-STING, не только поляризуют наивные Т-клетки в клетки Th1-типа, но и стимулируют выработку CTLs. Известно, что митохондриальная ДНК в цитоплазме также может активировать cGAS, активируя тем самым путь STING [115].

Агонисты STING являются новым классом потенциальных адъювантов. Наиболее известны синтетические производные циклического динуклеотида и циклический дигуанозинмонофосфат, которые показали противоопухолевую активность у мышей [177]. Экспрессия STING высока на Т-клетках, и активация STING может привести к апоптозу Т-клеток, в то время как макрофаги и дендритные клетки не проявляют такого эффекта [170]. Для использования агонистов STING в противоопухолевой вакцине необходимо их сочетание с адъювантом или системой доставки, нацеленными только на миелоидные клетки *in vivo*, чтобы предотвратить апоптоз Т-клеток [129]. Агонисты STING могут вызывать системную токсичность, поэтому предпочтительным путем введения является внутриопухолевая инъекция. Предварительные доклинические исследования с применением агонистов STING, введенных непосредственно в опухоль на моделях меланомы B16, показали многообещающие результаты, выявив высокий потенциал для их клинического применения [63]. Однако, отсутствие специфической направленности и потенциальная токсичность могут ограничить использование агонистов STING в качестве адъювантов в вакцинах против рака.

1.5.3 Адъюванты, нацеленные на рецепторы лектина С-типа

Рецепторы лектина С-типа (CLR) представляют из себя обширное семейство, включающее такие ключевые компоненты как Dectin-1, Dectin-2, MINCLE, DC-SIGN, CD206, и CD205 [111]. Эти рецепторы, преимущественно

расположенные на клеточных мембранах, играют важную роль в антигенном узнавании, участвуя в процессах захвата и презентации антигенов. Углеводные структуры в иммуностимуляторах часто служат триггерами для активации CLR, что позволяет антигенпрезентирующим клеткам (АПК) более эффективно обрабатывать и представлять антигены, тем самым усиливая адаптивные иммунные ответы [188]. Иммуностимуляторы, способные активировать CLR, могут инициировать разнообразные сигнальные каскады, которые способствуют экспрессии определённых цитокинов и направляют дифференциацию наивных Т-клеток [86]. Примером такой активации является взаимодействие Dectin-1 с β -глюканом, которое приводит к активации Syk-киназы, последующему запуску NF- κ B и выработке провоспалительных цитокинов: IL12, IL-1 β , IL6 и IL23. Эти цитокины играют ключевую роль в преобразовании наивных Т-клеток в Th1 и Th17 клетки [44]. Th1 клетки стимулируют сильный ответ цитотоксических Т-лимфоцитов и способствуют переходу иммуноглобулинов в В-клетках в IgG2a, в то время как Th17 клетки производят IL-17, IL-17F и IL-22, инициируя воспалительные процессы и привлекая нейтрофилы к месту инфекции или повреждения [94].

1.5.4 Адьюванты нацеленные на паттерн-распознающие рецепторы

Выявлено, что иммуностимуляторы могут активировать несколько других семейств рецепторов, таких как NOD1, NOD2, NLRP3, RIG-I, MDA5 [137]. NOD1, NOD2 и NLRP3 принадлежат семейству нуклеотидсвязывающих домен-подобных рецепторов олигомеризации (NLRs). Активация этих рецепторов адьювантами усиливает регуляцию MHC II на АПК и способствует усиленной презентации антигена. Также отмечается, что активация NLRP3 приводит к выработке провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-18, что приводит к смещению поляризации наивных Т-клеток в сторону Th2-типа [136].

Мурамилдипептид и полный адьювант Фрейнда способны активировать NOD1 и NOD2, что стимулирует активацию транскрипции NF- κ B и образование

IL1, IL18 и предшественников IL33 [201]. В присутствии активированного инфламмосомного комплекса NLRP3, каспаза 1 расщепляет эти факторы до их активных форм [133]. В целом активация NOD1, NOD2 и NLRP3 приводит к генерации преимущественно Th2-типа иммунного ответа.

RIG-I и MDA5 являются членами семейства индуцируемых ретиноевой кислотой геноподобных рецепторов (RLRs), которые распознают РНК [161]. Активация RIG-I и MDA5 приводит к активации IRF3 и IRF7, индуцирующих экспрессию интерферонов I типа [107]. Таким образом, иммуностимуляторы, нацеленные на эти рецепторы, смещают ответ в сторону продуцирования Th1-клеток и CTL [162].

1.5.5 Цитокины как адъюванты

Цитокины могут выступать в роли адъювантов, усиливая эффект вакцин за счет стимуляции иммунной системы. В этом контексте, особое внимание уделяется таким цитокинам, как IL-2 [112], IFN [64], IL-12 [78] и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [74], каждый из которых играет свою уникальную роль в модуляции иммунного ответа.

В доклинических моделях GM-CSF продемонстрировал способность привлекать и активировать дендритные клетки в зоне введения, усиливая презентацию антигена и тем самым повышая эффективность адаптивного иммунного ответа [74]. Однако, результаты клинических испытаний GM-CSF оказались неоднозначными: лишь некоторые из них продемонстрировали его клиническую эффективность, в то время как другие противоречивы [29]. В частности, было обнаружено, что GM-CSF может активировать миелоидные супрессорные клетки (MDSCs), которые в свою очередь могут подавлять клеточные противоопухолевые иммунные реакции. В клинических условиях низкие дозы GM-CSF стимулировали рост миелоидных клеток с низким или отрицательным уровнем HLA-DR и высоким содержанием CD14, что могло негативно сказаться на T-клеточной активности [92]. В другом исследовании

было показано, что использование GM-CSF вместе с неполным адьювантом Фрейнда может даже снижать Т-клеточный ответ по сравнению с использованием адьюванта без GM-CSF [77]. Тем не менее, в настоящее время проводятся множество клинических исследований, где GM-CSF рассматривается как потенциальный адьювант, подтверждая интерес к его дальнейшему изучению и возможному применению в клинической практике. [19, 20, 57].

1.6 Исследования безопасности адьювантов

Несмотря на предполагаемую безопасность вакцин, в последние годы возникла новая проблема, связанная с возможными негативными эффектами – аутоиммунный/воспалительный синдром, индуцированный адьювантами (ASIA), впервые описанный Shoefeld et al. [169]. Этот синдром объединяет несколько иммуноопосредованных заболеваний, которые могут проявиться у лиц с определенной генетической предрасположенностью после воздействия адьювантов. Характерные признаки ASIA включают появление аутоантител и облегчение симптомов после удаления провоцирующего фактора [210]. Исследования показывают, что некоторые адьюванты, например соли алюминия, могут вызывать ASIA, особенно на фоне определенных генетических маркеров, таких как антигены HLA, которые ассоциированы с аутоиммунными заболеваниями. [42, 54]. Особенно важное значение имеют гены HLA-DRB1 и RPN22, часто встречающиеся у пациентов с ASIA [34]. Состояния, такие как саркоидоз, синдром Шегрена и недифференцированное заболевание соединительной ткани, относят к типичным примерам ASIA. Кроме того, не только адьюванты в вакцинах, но и другие вещества, такие как силикон, парафин, гиалуроновая кислота, акриламиды и метакрилаты, также могут вызывать ASIA [171].

Диагностика ASIA основана на двух группах критериев: основных и вторичных. Основные критерии включают воздействие на организм экзогенных раздражителей, таких как инфекции или контакт с адьювантами, приводящее к симптомам, таким как миалгия, артралгия и хроническая усталость. Вторичные

критерии включают появление аутоантител, наличие определенных HLA паттернов и развитие аутоиммунного заболевания [210].

Среди примеров исследований, освещающих эту проблему, значится работа, связанная с использованием четырехвалентной вакцины против ВПЧ, содержащую соли алюминия в качестве адъюванта, которые могут способствовать развитию аутоиммунных реакций у генетически подверженных лиц в течение нескольких недель после вакцинации [85,194]. С другой стороны, Линнеберг и соавторы [114], обнаружили, что пациенты, проходившие подкожную аллерген-специфическую иммунотерапию с использованием алюминиевых адъювантов в значительно больших дозах, чем входят в стандартные вакцины, демонстрировали более низкий уровень смертности и меньшую заболеваемость аутоиммунными нарушениями по сравнению с контрольной группой, что подчеркивает необходимость более глубокого понимания механизмов воздействия адъювантов на здоровье человека.

Перед клиническим использованием адъювантов необходимо решить такие вопросы, как потенциальная токсичность и отсутствие специфического нацеливания. Для предотвращения нежелательных побочных эффектов и увеличения эффективности вакцин против конкретных агентов требуется детальное исследование различных адъювантов и их комбинаций в вакцинах, в том числе и в вакцинах против опухолей.

1.7 Клиническое применение адъювантов в противоопухолевых вакцинах

Полный адъювант Фрейнда, который отлично себя зарекомендовал в исследованиях на животных моделях, показал серьезные ограничения при применении у людей. Его использование у людей исключено из-за индукции хронических гранулем, часто связанных с образованием абсцессов в месте введения [53,176]. В исследовании [172] было показано, что внутриопухолевая инъекция полного адъюванта Фрейнда безопасна и хорошо переносится. Гистологическое исследование биопсии опухоли, взятой через 4 дня после

инъекции, выявило воспалительные иммунные клетки у 5 из 8 пациентов, и обширный некроз опухоли.

Применение неполного адьюванта Фрейнда у людей также ограничивается сильными побочными эффектами. Высокая токсичность адьювантов Фрейнда обусловлена высоким содержанием небioresлаегаемых масел и их низким качеством [39]. Исследование, проведенное Всемирной организацией здравоохранения в 2005 году, показало, что иммунизация около миллиона человек неполным адьювантом Фрейнда вызвала тяжелые побочные эффекты, такие как стерильные абсцессы, у 40 000 иммунизированных людей [125].

Разработаны более безопасные адьюванты на основе эмульсий. Например, MF59, представляющий из себя эмульсию «масло в воде», отлично показал себя при клиническом применении в вакцинах против гриппа. Однако использование данного адьюванта в противоопухолевых вакцинах ограничено, так как он вызывает преимущественно ответ Th2. Тем не менее, опубликованы результаты исследования комбинации MF59 вакцины с CpG ODN (агонист TLR9), где данная терапия вызывает стойкие иммунные противоопухолевые реакции на мышинных моделях [204, 124].

Монтаниды ISA-51 и ISA-720 – эмульсия «вода в масле» –использовались в клинических испытаниях противоопухолевых вакцин против меланомы и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Они индуцируют антигенспецифические антитела и Т-клеточные реакции, которые были связаны с более длительной выживаемостью пациентов [119, 151].

Было отмечено, что ISA-51 вызывает как CD4+, так и CD8+ Т-клеточные ответы у пациентов, вакцинированных длинными пептидами онкопротеинов E6 и E7 [202]. В результате клинических исследований показано, что комбинация пептидов с ISA-51 или ISA-720 может способствовать более сильному иммунному ответу и более эффективному уничтожению опухолевых клеток.

Агонист TLR7 Имиквимод в форме 5%-ного крема Aldara одобрен для лечения базально-клеточной карциномы и остроконечных кондилом. В экспериментах на эксплантатах кожи человека местное применение Aldara

вызывало значительную активацию и миграцию резидентных в коже дендритных клеток [195]. Имиквимод можно использовать в качестве адъюванта местно либо перед, либо сразу после введения вакцины в место инъекции. В рандомизированном исследовании у пациенток с ВПЧ-16+, страдающих интраэпителиальной неоплазией вульвы и влагалища, применение Aldara не улучшило иммунологические и клинические реакции на длинные пептиды, эмульгированные в Монтаниде [203]. Напротив, в исследовании вакцины на основе мультипептидов у пациентов с раком предстательной железы с биохимическим рецидивом было обнаружено, что применение TLR7-лиганда ассоциируется с улучшением клинического течения. Однако индуцированные Т-клетки были обнаружены только после предварительной сенсibilизации пептидом *in vitro* и не отличались значительно у пациентов, получавших лиганды TLR-7 [138]. В целом, имиквимод, по-видимому, является относительно слабым адъювантом, но может взаимодействовать с другими лигандами TLR.

Poly(I:C) в качестве адъюванта потивоопухолевых вакцин изучают с 1970-х годов. Известно, что он быстро выводится из организма, а в больших дозах оказывает токсическое действие на человека [23]. Однако, опубликованы недавние исследования неоантигенных вакцин с этим адъювантом против гепатоцеллюлярной карциномы [148] и колоректального рака [155].

Из-за недостатков Poly(I:C) внимание ученых было сосредоточено на его производных, таких как Poly(ICLC) и Poly(IC12U), а также на других синтетических агонистах TLR3, таких как ARNAX, IPH 3102 и RGC100 [110].

Вакцины, содержащие адъювант Poly-ICLC, демонстрируют способность значительно усиливать опухолеспецифический Т-клеточный ответ за счет активации сигналов через TLR3. Это способствует предотвращению истощения Т-клеток и повышает эффективность иммунотерапии [88, 58]. Исследование, проведенное Melssen и его коллегами, подтвердило, что Poly-ICLC выступает как мощный адъювант, усиливающий специфический ответ CD8⁺ Т-клеток у пациентов с меланомой, тем самым улучшая направленность и результативность иммунной терапии [18]. Интересным исследованием является работа с тремя

группами пациенток, страдающих раком яичников, которым были проведены повторные подкожные инъекции длинных пептидов опухолевых антигенов. Одна группа получала эти пептиды, эмульгированные в Монтаниде ISA-51, другая – в Монтаниде ISA-51 в сочетании с Poly-ICLC. У всех пациенток, получавших вакцину с адъювантом Монтанид ISA-51, выявлялись CD4⁺ Т-клетки, специфичные к опухолевому антигену NY-ESO-1. Дополнительное включение Poly-ICLC усиливало и ускоряло формирование иммунного ответа, направленного против этого антигена [150].

Poly-ICLC использовался в составе персонализированной неоантигенной пептидной вакцины NeoVax [166, 31]. Клинические испытания показали безопасность и эффективность данной вакцины у пациентов с меланомой.

Опубликованы данные клинических испытаний персонализированной неоантигенной пептидной вакцины NEO-PV-01 с адъювантом Poly-ICLC [148, 22]. Эффективность данной вакцины подтверждена в сочетании с анти-PD-1 иммунотерапией против меланомы, HMPJ и рака мочевого пузыря.

Poly-ICLC в пептидной вакцине GAPVAC-101 против глиобластомы использовался с адъювантом GM-CSF [27, 70]. Показана безопасность и иммуногенность вакцины с данными адъюватами.

Вакцина NeuVax, основанная на пептиде E75 (HER-2/neu369-377) с добавлением адъюванта GM-CSF, продемонстрировала значительные результаты в ранних фазах клинических испытаний, усиливая продукцию специфических CD8⁺ Т-клеток и замедляя прогрессирование рака молочной железы у пациенток, несущих молекулы HLA-A2 и HLA-A3 [56]. Однако последующие испытания III фазы не подтвердили её эффективность в предотвращении рецидивов заболевания. Результаты дальнейших исследований применения рекомбинантного GM-CSF в сочетании с пептидной вакциной оказались противоречивы, как в мышиных моделях, так и в клинических условиях у человека, что может отражать различия в эффективности адъюванта в стимулировании Т-клеточных реакций. Это разнообразие в реакциях может быть обусловлено комплексной ролью GM-CSF, который одновременно способен поддерживать как противовоспалительные,

так и провоспалительные процессы. Более того, динамичное взаимодействие между GM-CSF и факторами микроокружения опухоли может кардинально влиять на его эффективность в усилении или подавлении иммунного ответа, вызванного вакциной [75, 167].

В некоторых исследованиях добавление GM-CSF к пептидам, эмульгированным в Монтаниде, не улучшало иммунные реакции по сравнению с применением одного Монтанида [77, 89]. Важно отметить, что низкие дозы GM-CSF поддерживают иммунные реакции, тогда как высокие дозы (> 100 мкг на одно применение) могут способствовать размножению миелоидных супрессорных клеток и ингибировать функцию Т-клеток [142].

1.8 Оценка эффективности Ридостина Про

Ридостин Про — иммуномодулирующий препарат, разработанный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Он представляет собой инъекционную форму, содержащую смесь двухцепочечных и одноцепочечных РНК, выделенных из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Препарат обладает широким спектром противовирусной активности, стимулирует выработку интерферонов и активизирует различные звенья иммунной системы, помогая организму справляться с воспалительными процессами и инфекциями [7].

В исследовании, проведенном на модели мышей линии BALB/c было продемонстрировано, что при двукратной иммунизации антигенами, такими как овалбумин (ОВА) и пептидная субстанция вакцины «ЭпиВакКорона» (ЭВК), введение ридостина значительно усиливало специфический иммунный ответ. Это выразалось в увеличении титров антител к соответствующим антигенам. Максимальный эффект был достигнут при дозировке ридостина 100 мкг/мышь в сочетании с ОВА (1 мкг/мышь) и 50 мкг/мышь с ЭВК (0,25 человеческой дозы). Полученные данные подтверждают наличие ридостина адьювантных свойств, что делает его перспективным компонентом для усиления эффективности пептидных вакцин [4].

Также эффективность ридостина изучалась на модели тяжелого острого респираторного синдрома у сирийских хомяков. Препарат применяли в двух режимах: профилактическом и экстренном. При использовании профилактической схемы ридостин вводился до предполагаемого заражения, что обеспечило коэффициент лечебного действия в 47,5%. Экстренная схема, предполагающая введение препарата сразу после инфицирования, продемонстрировала более высокую эффективность с коэффициентом 55,0%. Кроме того, у животных, получавших ридостин по экстренной схеме, отмечалось значительное снижение тяжести течения заболевания по сравнению с контрольной группой. Таким образом, ридостин показал высокую эффективность как в профилактике, так и в экстренной терапии, снижая тяжесть заболевания и улучшая клинические показатели у экспериментальных животных [6].

Опубликованы результаты клинических исследований, в которых ридостин продемонстрировал высокую эффективность в лечении хронического сальпингоофорита и урогенитальных инфекций. У пациенток, получавших ридостин совместно с традиционной терапией (антибиотики, анальгетики и пр.), наблюдалось значительное улучшение иммунных показателей: нормализация уровней CD8, HLA-DR и CD16-лимфоцитов, а также снижение воспалительных маркеров, таких как интерлейкин-1 β (IL-1 β) и активность каталазы [13]. При лечении хламидиоза добавление Ридостина к традиционным терапевтическим подходам приводило к значительному снижению провоспалительных реакций, что подтверждалось уменьшением уровня цитокинов ИЛ-6 и ФНО α [15].

В исследовании Назаренко и соавторы [12] анализировали иммунные показатели, включая субпопуляции лимфоцитов, концентрацию иммуноглобулинов, уровень цитокинов и функциональную активность нейтрофилов на фоне применения ридостина у 25 пациентов с отечным панкреатитом (ОП) в возрасте 35–55 лет. Ридостин нормализовал уровни CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ лимфоцитов, частично снижал провоспалительные цитокины (ИЛ-6, ИЛ-4, ФНО α), но не влиял на ИЛ-1 β . Функциональная активность нейтрофилов и

уровень иммуноглобулинов изменялись незначительно, без полной нормализации.

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день известно, что адъюванты усиливают иммунные ответы на вакцинацию и являются необходимым компонентом противоопухолевых вакцин. Однако, на данный момент не так много адъювантов разрешены к использованию в составе вакцин. И в Российской Федерации нет разрешенных к использованию адъювантов, которые эффективно усиливают противоопухолевые пептидные вакцины.

Для пептидных противоопухолевых вакцин критически важны адъюванты, которые активируют противоопухолевый иммунный ответ за счет стимуляции врожденного иммунитета. Это происходит через паттерн-распознающие рецепторы (PRR), которые запускают цепь реакций, ведущих к развитию приобретенного иммунного ответа против опухолевых клеток. Такие адъюванты играют ключевую роль в усилении иммунного ответа и повышении эффективности вакцины.

Ранее в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России была создана модель персонализированной пептидной неоантигенной вакцины против меланомы мышей B16-F10 [9, 59]. В качестве адъюванта при исследовании модели пептидной вакцины у мышей мы использовали Poly(I:C) [11, 5, 10]. Однако, для дальнейшей разработки персонализированных пептидных неоантигенных вакцин необходим адъювант, показавший безопасность и эффективность в клинических испытаниях.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Адьюванты и пептиды для формирования вакцин

Poly(I:C) (полиинозин-полицитидиловая кислота, polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt, P1530-100MG, Sigma). Poly(I:C) представляет собой синтетический аналог двуцепочечной РНК, состоящий из полиинозиновой и полицитидиловой цепей. Используется как иммуномодулятор, который активирует врожденный иммунный ответ путем имитации вирусной инфекции, что приводит к стимулированию выработки интерферонов и других цитокинов. Poly(I:C) был приготовлен в форме лиофилизата хранился при температуре -20°C . Перед использованием навеску растворяли в физиологическом растворе.

Полный адьювант Фрейнда (CFA, Complete Freund's Adjuvant, F-5506, Sigma) — это иммуностимулирующий препарат, используемый в исследованиях для усиления иммунного ответа при введении антигенов. Он состоит из эмульсии минерального масла и убитых микобактерий *Mycobacterium tuberculosis*.

Ридостин Про – рибонуклеинат натрия, индуктор интерферона пролонгированного действия (предоставлен Институтом медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) – комплекс натриевых солей двухцепочечных и одноцепочечных РНК, выделенных из киллерного штамма пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с содержанием нуклеотидного материала от 70 до 90 % и двухцепочечной РНК от 10 до 22 %. В качестве вспомогательного вещества использовался поливинилпирролидон, который выступает в роли стабилизатора, обеспечивающего пролонгацию биологических эффектов РНК. Субстанция для изготовления лекарственных форм (ФСП №002021/01 – 070420090769-08). Лекарственная форма препарата – лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения. Препарат хранился при температуре 4°C в защищенном от света месте.

Пептиды TRP2 180–188 (SVYDFVWL) и OVA 257-264 (SIINFEKL) были предоставлены лабораторией химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [5, 8].

Неоантигенные пептиды, использованные в работе, были синтезированы в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Таблица 1). Для иммунологических экспериментов пептиды разделили на группы «Пептиды1» и «Пептиды2» [59].

Таблица 1 – Неоантигенные пептиды

Название пептида	Ген	Замена	Последовательность
Пептиды 1			
g.101573665	Krt75	p.G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLGGTRRVSIG
g.108075690C>A	Ampd2	p.Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_YLYYLAQIG
g.108814677G>C	Nckipsd	p.K492N	MQTDTDQDHQ_N_LCYSALVLAMVFSMGEA
g.110327865C>T	Pole	p.L1847F	TLHNMMKK_F_FLQLIAEFKRLGSSVVYA
g.142664440A>G	Wipi2	p.T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_VRLPFCGHKNI
Пептиды 2			
g.56226589G>T	Herc2	p.C4450F	GGLAGPDGTKSVFGQM_F_AKMSSFSPDS
g.65813948T>A	Pbk	p.V145D	GSPFPAAVILR_D_ALHMARGGLKYLHQEK
g.66708664A>C	Lins1	p.K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLLYFQL
g.7163330C>T	Pcmt1	p.P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPPC
g.77174891A>C	221040 8I21Rik	p.D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLLNSFPGDLEFK

2.2 Мыши

Исследование проводили на мышах-самках линии C57BL/6 весом 20–22 г. (n=254), предоставленных экспериментально-биологической лабораторией (виварий) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Мышей содержали в конвенциональном виварии при естественном освещении, комнатной температуре воздуха и постоянном доступе к воде и корму. Эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на биологических моделях и экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

2.3 Схемы вакцинации животных

Для оценки иммуногенности полного адьюванта Фрейнда, Poly(I:C) и Ридостина Про мышей делили на 3 группы:

Группа 1 – полный адьювант Фрейнда (200 мкл/мышь) (n=5);

Группа 2 – Poly(I:C) (50 мкл/мышь) (n=5);

Группа 3 – Ридостин Про (100 мкл/мышь) (n=5).

Иммунизацию мышей проводили двукратно, с недельными интервалами, в 0 и 7 дни. На 12 день у мышей забирали селезенки для определения количества интерферон- γ -продуцирующих клеток методом ELISpot с помощью набора для определения мышинового INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech).

Для исследования иммуногенности неоантигенной пептидной вакцины с адьювантами мышей делили на группы:

Группа 1 – пептиды 1 + Poly(I:C) (n=4);

Группа 2 – пептиды 2 + Poly(I:C) (n=4);

Группа 3 – пептиды 1 + Ридостин Про (n=4);

Группа 4 – пептиды 2 + Ридостин Про (n=4).

Одна доза модели вакцины из 5 пептидов (пептиды 1 или пептиды 2) содержала по 100 мкг каждого пептида (всего 500 мкг пептидов) в 500 мкл физиологического раствора с 10% ДМСО. Смесь пептидов вводили подкожно. Адьюванты растворяли в физиологическом растворе. Одна доза Poly(I:C) содержала 50 мкг в 300 мкл физраствора, а одна доза Ридостина Про содержала 100 мкг в 300 мкл физраствора. Адьюванты вводили подкожно за 5 – 10 минут до смеси пептидов.

Иммунизацию мышей проводили двукратно, с недельными интервалами, в 0 и 7 дни. На 12 день у мышей забирали селезенки для определения количества интерферон- γ -продуцирующих клеток методом ELISpot с помощью набора для определения мышиноного INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech).

Для исследования иммуногенности пептидных вакцин с TRP2 и Овальбуминам мышей делили на группы:

Группа 1 – TRP2 с Poly(I:C) (n=3);

Группа 2 – TRP2 с Ридостином-Про (n=3);

Группа 3 – овальбумин с Poly(I:C) (n=3);

Группа 4 – овальбумин с Ридостином-Про (n=3).

Вакцины вводили подкожно в 0 и 7 дни эксперимента. На 12 день у мышей забирали селезенки для определения количества интерферон- γ -продуцирующих клеток методом ELISpot с помощью набора для определения мышиноного INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech).

Для оценки иммунофенотипа спленоцитов после иммунизации адьювантами мышам-самкам C57BL/6 подкожно вводили по 50 мкл физиологического раствора (n=5), 50 мкг Poly(I:C) (n=5) или 100 мкг Ридостин Про (n=5). Через 24 ч забирали селезенки и выделяли из них клетки для проточной цитофлуориметрии.

Для изучения цитокинового профиля сыворотки крови мышам-самкам C57BL/6 подкожно вводили по 50 мкл физиологический раствор (n=3), 50 мкг Poly(I:C) (n=5) или 100 мкг Ридостин Про (n=5). Через 6 ч или 24 ч мышей умерщвляли и собирали кровь для получения сыворотки.

Для оценки противоопухолевого эффекта адъювантов и вакцин с пептидом TRP2 на модели меланомы B16-F10 вакцинацию проводили в двух режимах: смешанном (профилактическом/ терапевтическом), когда вакцинацию начинали до перевивки опухоли и в терапевтическом, когда вакцинацию начинали после перевивки опухоли.

Для оценки эффективности смешанного режима вакцинации против меланомы B16-F10 мышей делили на группы:

Группа 1 – Ридостин Про, 100 мкг/ мышь (n=11);

Группа 2 – Poly(I:C), 50 мкг/мышь (n=10);

Группа 3 – Ридостин Про, 100 мкг/ мышь +TRP2, 100 мкг/ мышь (n=11);

Группа 4 – Poly(I:C), 50 мкг/мышь +TRP2, 100 мкг/ мышь (n=11);

Группа 5 – Контроль (n=16), не получали препараты.

Исследуемые препараты вводили подкожно четырехкратно в 0, 7, 14 и 21-й дни эксперимента, на 10-й день от начала введения препаратом мышам перевивали подкожно опухоль B16-F10. Измеряли рост меланомы от дня перевивки опухоли (0 день), чтобы оценить торможение роста опухоли.

Для оценки терапевтического режима вакцинации против меланомы B16-F10 мышей делили на группы:

Группа 1 – Ридостин Про, 100 мкг/ мышь (n=10);

Группа 2 – Poly(I:C), 50 мкг/мышь (n=10);

Группа 3 – Ридостин Про, 100 мкг/ мышь +TRP2, 100 мкг/ мышь (n=6);

Группа 4 – Poly(I:C), 50 мкг/мышь +TRP2, 100 мкг/ мышь (n=6);

Группа 5 – TRP2, 100 мкг/ мышь (n=6)

Группа 6 – Контроль (n=10), не получали препараты.

Терапевтическую вакцинацию проводили на 4-е и 10-е сутки после подкожной перевивки меланомы B16-F10. Измеряли рост меланомы от дня перевивки опухоли (0 день), чтобы оценить торможение роста опухоли.

Для оценки эффектов вакцины, содержащей Овальбумин, и адъювантов против лимфомы мышей E.G7-OVA вакцинацию проводили также в двух режимах – терапевтическом и смешанном.

Для изучения противоопухолевого эффекта терапевтической вакцинации после перевивки опухолей мышей разделили на группы:

Группа 1 – контроль (без препаратов) (n=11);

Группа 2 – Ридостин Про (n=11);

Группа 3 – Poly(I:C) (n=11);

Группа 4 – Овальбумин и Ридостин Про (n=11);

Группа 5 – Овальбумин и Poly(I:C) (n=11).

Мышам на 7 и на 14 сутки после перевивки E.G7-OVA вводили Овальбумин 100 мкг в 200 мкл физраствора, или Ридостин Про 100 мкг в 300 мкл физраствора, или Poly(I:C) 50 мкг в 300 мкл физраствора, или смесь Овальбумина с Ридостином Про (100 мкг и 100 мкг соответственно) в 500 мкл физраствора, или смесь Овальбумина с Poly(I:C) (100 мкг и 50 мкг соответственно) в 500 мкл физраствора подкожно рядом с опухолью. Измеряли рост лимфомы E.G7-OVA от дня перевивки опухоли (0 день), чтобы оценить торможение роста опухоли.

Для изучения противоопухолевого эффекта смешанного режима вакцинации мышей разделили на группы:

Группа 1 – контроль (без препаратов) (n=10);

Группа 2 – Ридостин Про (n=10);

Группа 3 – Poly(I:C) (n=9);

Группа 4 – Овальбумин и Ридостин Про (n=10);

Группа 5 – Овальбумин и Poly(I:C) (n=10).

Мышей иммунизировали четырехкратно на 0, 7, 14 и 21 дни эксперимента. На 11 день от начала введения препаратов мышам перевивали подкожно лимфому E.G7-OVA. Далее измеряли рост E.G7-OVA от дня перевивки опухоли (0 день), чтобы оценить торможение роста опухоли.

2.4 Выделение спленоцитов

Селезенки мышей переносили в стерильный раствор RPMI-1640 (ПанЭко). Каждую селезенку обрабатывали индивидуально, измельчали с использованием

стерильного гомогенизатора для получения однородной суспензии. Далее суспензию фильтровали через марлевую салфетку и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 7 минут. Процедуру отмывки клеток в среде RPMI-1640 повторяли дважды.

Затем осадок клеток ресуспендировали в обогащенной среде RPMI-1640, которая дополнительно содержала 2 mM L-глутамин (ПанЭко), 25 000 единиц/мл пенициллина, 25 000 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко), а также 10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone). Для подготовки к анализу клеточную суспензию пропускали через стерильный одноразовый фильтр с размером пор 50 мкм (Filcons, BD), после чего осуществляли подсчет клеток с использованием камеры Горяева.

2.5 ELISpot

Для изучения иммуногенных свойств адъювантов и пептидов применялся метод ELISpot. Этот метод позволяет количественно оценить число клеток, продуцирующих интерферон- γ , согласно рекомендациям, предложенным в инструкции к коммерческому набору для определения мышинового INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech).

Спленоциты мышей инкубировали на протяжении 48 часов в присутствии адъювантов или пептидов, использованных для иммунизации, а также с другими адъювантами и пептидами для анализа специфичности их действия. В качестве эталонного стандарта использовали конканвалин А (ПанЭко). Перед началом процедуры планшеты с антителами против INF- γ извлекали из упаковки и четырежды промывали, добавляя по 200 мкл стерильного PBS в каждую лунку. Затем в лунки вносили 200 мкл полной 10% среды RPMI-1640 и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После удаления среды в лунки добавляли суспензию спленоцитов, разведенную до концентрации 4 млн клеток в мл. Затем в каждую лунку планшета с клетками добавляли исследуемые стимуляторы продукции INF- γ (полный адъювант Фрейнда (50 мкл), Poly(I:C)

(250 мкг/мл), Ридостин Про (300 мкг/мл), смесь неоантигенных пептидов 1 или 2 (100 мкг/мл), пептиды TRP2 или OVA(100 мкг/мл), в качестве положительного контроля - конканвалин А) в 100 мкл полной ростовой среды, а в контрольные ячейки добавляли только по 100 мкл полной ростовой среды RPMI-1640. После этого планшеты оставляли в CO₂-инкубаторе при 37°C.

Через 48 часов анализировали наличие INF-γ-продуцирующих клеток. Планшеты промывали пять раз с использованием 200 мкл PBS на лунку. Затем в каждую лунку добавляли биотинилированное антитело R4-6A2 и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. После этого планшеты снова промывали и вводили стрептавидин-ALP, инкубируя в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. После последней промывки вносили субстрат BCIP/NBT-plus для визуализации результатов. Количество спотов определяли с помощью ELISpot reader, и данные фиксировались для дальнейшего анализа [5].

Результаты ELISpot анализировались на основе количества клеток, продуцирующих INF-γ, в каждой ячейке, где менее 30 спотов указывали на отсутствие реактивности, от 30 до 50 спотов на слабую иммуногенность, от 50 до 200 на среднюю, а более 200 спотов на сильную иммуногенность [83].

2.6 Метод проточной цитофлуориметрии для оценки иммунофенотипа спленоцитов мышей

Для оценки состояния дифференцировки CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток использовали маркеры CD44 и CD62L. Наивные CD8⁺ Т-клетки (T_n) характеризуются иммунофенотипом CD44⁻ CD62L⁺. После инфицирования или иммунизации активированные антигеном CD8⁺ Т-клетки начинают экспрессировать CD44 и теряют экспрессию CD62L, превращаясь в эффекторные Т-клетки (T_{eff}). По завершении инфекции количество CD8⁺ T_{eff} клеток сокращается, и начинают формироваться клетки памяти. В популяции CD8⁺ Т-клеток различают Т-клетки центральной памяти (T_{cm}) с фенотипом CD44⁺ CD62L⁺ и Т-клетки эффекторной памяти (T_{em}) с фенотипом CD44⁺ CD62L⁻. У

CD4+ Т-клеток дифференцировка происходит по аналогичной схеме, однако в ходе проточной цитометрии четко выявляются только две популяции – T_n и T_{em} [90].

В ходе работы с суспензией спленоцитов применяли метод гипотонического лизиса эритроцитов. Клетки подвергали центрифугированию, затем удаляли избыточную жидкость и добавляли к осадку 360 мкл дистиллированной воды, аккуратно перемешивая суспензию. Через 10–15 секунд для нейтрализации гипотонического воздействия добавляли 6–8 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), после чего проводили повторное центрифугирование в течение 5 минут при силе 200 g. Завершающим этапом было промывание клеточной суспензии в 5 мл PBS, также на протяжении 5 минут при той же скорости вращения.

После этой процедуры клетки окрашивали антителами (Таблица 2).

Таблица 2 – Антитела, применяемые в работе

Антитела	Флуорохром	Клон
CD3	PE	17A2
CD3	APC	17A2
CD4	PE-Cy7	GK1.5
CD8	FITC	53-6.7
CD19	FITC	6D5
CD44	APC-Cy7	IM7
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11
CD62L	eFluor450	MEL-14
CD69	PE	H1.2F3
PD-1 (CD279)	APC	29F.1A12
NKp46 (CD335)	eFluor450	29A1.4

После окрашивания клетки дважды промывали в PBS в течение 5 минут при 200 g, затем добавляли 350 мкл PBS и проводили подсчет на проточном цитофлуориметре FACS Canto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™ (Becton Dickinson). Для исключения из анализа погибших клеток использовали краситель Fixable Viability Stain 510 (BD Biosciences). Чтобы блокировать неспецифическое связывание антител, применяли Mouse BD Fc Block (2.4G2) (BD Biosciences). Процент интересующих клеток определяли от всех живых CD45⁺ клеток селезенки. Анализ проводили по стратегии гейтирования, описанной в публикациях [5, 3].

2.7 Получение сывороток крови мышей

Для оценки уровня цитокинов использовался метод BD Cytometric Bead Array (CBA), который требует лишь небольшого объема сыворотки (50 мкл на один тест). С этой целью терминальный забор крови осуществляли из сосудов шеи каждой мыши. Кровь сразу же собирали в индивидуальные микропробирки и оставляли при комнатной температуре на 60 минут для формирования сгустка. После отделения сгустка пробирки центрифугировали в течение 30 минут при 3000 g.

Очищенные сыворотки, по возможности, разделяли на аликвоты по 100 мкл и хранили при температуре -80°C , чтобы избежать повторных циклов замораживания и оттаивания, что могло бы негативно повлиять на качество образцов.

2.8 Метод оценки воспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей

Для оценки сывороточных цитокинов использовали набор BD CBA Mouse Inflammation Kit (Catalog No. 552364), разработанный компанией BD Biosciences для количественного измерения различных воспалительных цитокинов и хемокинов в одном образце. Этот набор позволяет проводить мультиплексный

анализ с использованием проточной цитометрии, что обеспечивает высокую чувствительность и точность при одновременном измерении нескольких маркеров воспаления. Набор предназначен для измерения уровней таких воспалительных цитокинов и хемокинов, как IL-6, IL-10, TNF- α , MCP-1 (CCL2), IFN- γ и IL-12p70 в сыворотке, плазме, супернатантах клеточных культур и других биологических образцах мышей.

BD CBA Mouse Inflammation Kit представляет собой шесть популяций шариков со связывающими антителами, специфичными для IL12p70, TNF, IFN- γ , MCP-1, IL10 и IL6. Шесть популяций шариков смешиваются для формирования матрицы, которая видна в красном канале проточного цитометра. Во время исследования частицы смешиваются с рекомбинантными стандартами и образцами сыворотки и инкубируются с детектирующими антителами, мечеными PE, с формированием сэндвич-комплекса. Интенсивность флуоресценции PE каждого сэндвич-комплекса обозначает концентрацию определенного цитокина. Все компоненты набора хранились при температуре 2-8°C, согласно инструкции производителя.

Для исследования образцы сыворотки крови мышей инкубировали с микрочастицами, покрытые антителами к цитокинам IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF и IL-12p70. Образцы мышинной сыворотки были предварительно разведены в соотношении 1:2 с использованием буфера для разведения (Assay Diluent). В пробирки добавляли 50 мкл микрочастиц, покрытых антителами к цитокинам, и к ним добавляли 50 мкл стандартов и образцов мышинной сыворотки. Затем в пробирки, добавляли 50 мкл флуоресцентно меченых детектирующих антител (PE Positive Control Detector). Пробирки инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре в темноте. После инкубации с детектирующими антителами проводили процедуру промывки. В каждую пробирку добавляли 1 мл промывочного буфера (Wash Buffer) и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут, затем удаляли супернатант и повторяли промывку дважды. После последней промывки микрочастицы ресуспендировали в 300 мкл промывочного буфера и переносили в пробирки для анализа на проточном цитометре.

Результаты анализировали на проточном цитометре FACS Canto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™. Полученные данные обрабатывались программным обеспечением FCAP Array (BD), которое обеспечивало количественный анализ уровня цитокинов в образцах. Результаты представляли как средние значения \pm стандартное отклонение (SD).

2.9 Культивирование клеток *in vitro*

Для изучения противоопухолевых эффектов разрабатываемых вакцин и адъювантов были выбраны следующие клеточные линии мышей: меланома B16-F10 и лимфома E.G7-OVA. Линия B16-F10, полученная из меланомы B16, которая спонтанно возникла у мыши породы C57Bl/6 в 1954 году и была выделена в лаборатории Jackson Memorial Laboratory, прошла серию пассажей *in vivo*, что привело к формированию высокометастатического клона B16-F10. [84].

Лимфома мышей E.G7-OVA получена в 1988 году из клеточной линии мышинной лимфомы EL4, трансфицированной плазмидой pAc-neo-OVA, содержащей полную копию мРНК куриного овальбумина и гена устойчивости к неомицину (G418). E.G7-OVA экспрессирует овальбумин (OVA) и растет у мышей C57BL/6, данная линия часто применяется для изучения новых вакцинных адъювантов, так как содержит известный антиген – овальбумин [197].

Клетки для исследований были предоставлены Банком клеточных линий группы криоконсервации биоматериалов и иммунотерапии опухолей из лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Культивирование клеточных культур осуществлялось в среде RPMI-1640 (ПанЭко), дополненной 10% телячьей эмбриональной сывороткой (HyClone), 2 mM L-глутамин (ПанЭко), а также пенициллином (25 000 ед) и стрептомицином (25 000 мкг) (ПанЭко). Условия культивирования поддерживались при температуре 37°C и 5% концентрации CO₂. Когда клетки формировали плотный монослой, их пересеивали. Для этого клетки, прикрепившиеся к стенкам

культурального флакона, отделяли с помощью раствора Версена (ПанЭко), затем их промывали в полной ростовой среде, подсчитывали в камере Горяева и пересаживали в новые флаконы по 400 тыс. клеток на флакон.

Перед перевивкой мышам, необходимое количество клеток наращивали, снимали с культуральных флаконов, промывали в бессывороточной среде, подсчитывали и вводили мышам, также используя бессывороточную среду RPMI-1640 для перевивки [8].

2.10 Перевивка опухолевых клеток мышам и последующая оценка противоопухолевого эффекта

Клетки меланомы B16-F10 перевивали подкожно по 75 тыс. клеток/мышь.

Клетки лимфомы EG7-OVA перевивали подкожно по 2 млн клеток/мышь.

Объем опухоли (V) определяли от дня перевивки опухоли (0 день) у каждого животного с использованием следующей формулы:

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

где L , W , H – это длина, ширина и высота опухоли соответственно. Средний объем опухоли в группе рассчитывали на основе измерений, проводимых 2–3 раза в неделю.

Оценка противоопухолевой активности включала два основных показателя: процент торможения роста опухоли (ТРО, %) и процент увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %). Эти показатели сравнивали с контрольной группой, которая не получала никаких препаратов.

Процент торможения роста опухоли (ТРО, %) вычисляли следующим образом:

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

где V_k – средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3) V_o – средний объем опухолей в экспериментальной группе (мм^3).

Процент увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %) определяли по завершении эксперимента после гибели всех животных, используя формулу:

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

где СПЖ_к – средняя продолжительность жизни в контрольной группе (дни),
СПЖ_о – средняя продолжительность жизни в экспериментальной группе (дни).

2.11 Статистическая обработка данных

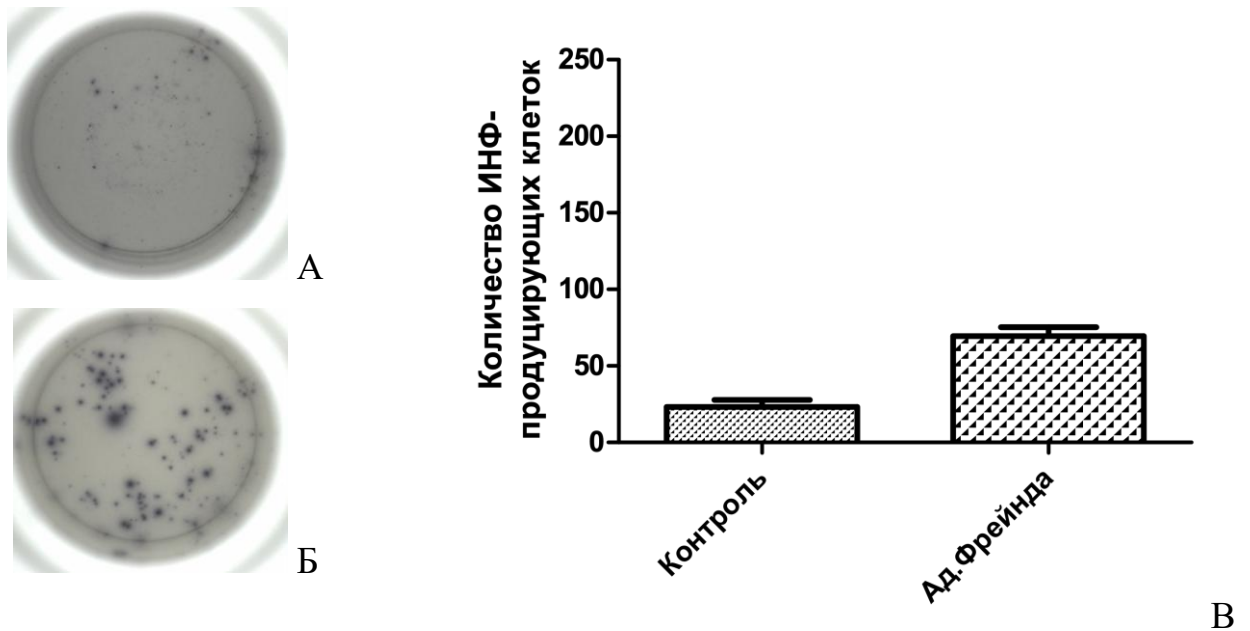
Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения (Mean) с указанием стандартного отклонения (SD) или стандартной ошибки среднего (SEM). Обработка результатов ELISpot-анализа выполнялась с использованием программ Excel и GraphPad Prism 5.0; для оценки различий между группами применялся непарный t-критерий. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Для интерпретации данных, полученных методом проточной цитометрии, а также при анализе противоопухолевой активности, использовался непараметрический критерий Манна–Уитни в среде STATISTICA v.7. Различия также считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Иммуногенность адьювантов

На первом этапе исследования оценили иммуногенность полного адьюванта Фрейнда, Poly(I:C) и Ридостина Про по влиянию на продукцию IFN- γ спленоцитами ранее иммунизированных этими адьювантами мышей без опухолей. Результаты представлены на рисунках 1, 2 и 3.

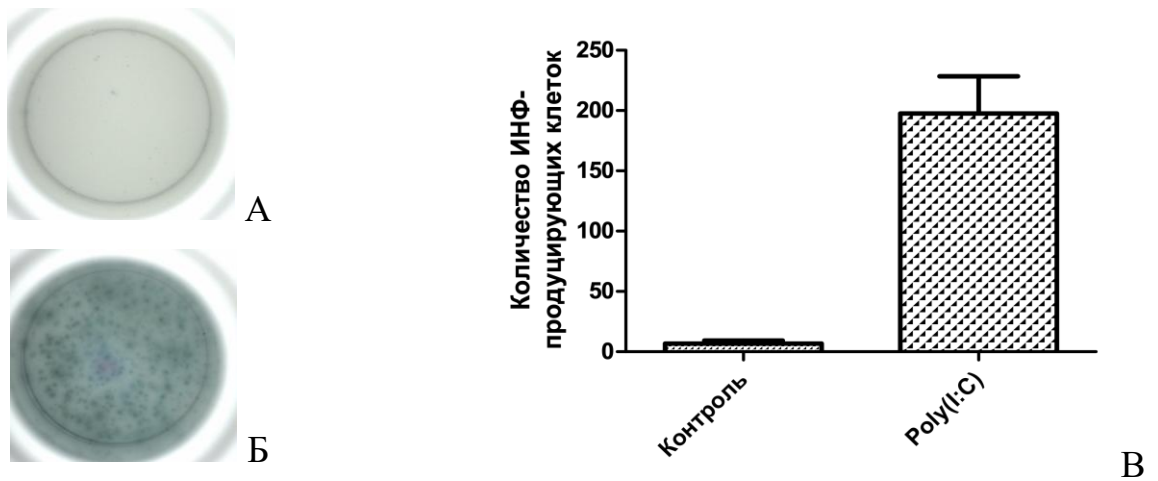


А – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в контрольных лунках (без стимуляции *in vitro*);

Б – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в лунках после 48 ч стимуляции полным адьювантом Фрейнда;

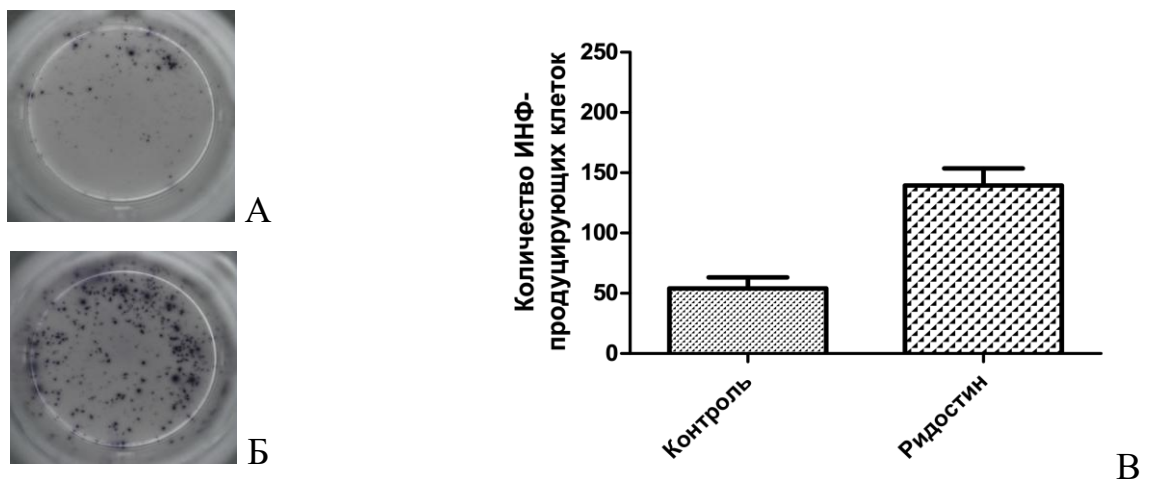
В – изменение IFN- γ -продуцирующих клеток при стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей полным адьювантом Фрейнда (M \pm SEM).

Рисунок 1 – Иммуногенность полного адьюванта Фрейнда



А – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в контрольных лунках (без стимуляции *in vitro*);
 Б – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в лунках после 48 ч стимуляции Poly(I:C);
 В – изменение IFN- γ -продуцирующих клеток при стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей адъювантом Poly(I:C) ($M \pm SEM$).

Рисунок 2 – Иммуногенность Poly(I:C)



А – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в контрольных лунках (без стимуляции *in vitro*);
 Б – количество IFN- γ -продуцирующих клеток в лунках после 48 ч стимуляции Ридостином Про;
 В – изменение IFN- γ -продуцирующих клеток при стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей адъювантом Ридостином Про ($M \pm SEM$).

Рисунок 3 – Иммуногенность Ридостина Про

Количественное изменение IFN- γ -продуцирующих спленоцитов мышей, иммунизированных Полным адьювант Фрейнда, Poly(I:C) и Ридостином представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Количество IFN- γ -продуцирующих спленоцитов мышей

Иммунизация in vivo	Стимуляция in vitro	Количество IFN- γ -продуцирующих спленоцитов (M \pm SD)
Полный адьювант Фрейнда	Без стимуляции	23 \pm 22
	Полный адьювант Фрейнда	69 \pm 28*
Poly(I:C)	Без стимуляции	7 \pm 7
	Poly(I:C)	198 \pm 102*
Ридостин Про	Без стимуляции	54 \pm 16
	Ридостин Про	140 \pm 25*

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем без стимуляции

Все адьюванты усиливали продукцию IFN- γ , но Poly(I:C) и Ридостин Про более эффективно (198 и 140 IFN- γ -продуцирующих клеток), чем полный адьювант Фрейнда (69 IFN- γ -продуцирующих клетки), и мы не использовали полный адьювант Фрейнда в дальнейших исследованиях. Poly(I:C) описан во многих публикациях как адьювант пептидных противоопухолевых вакцин, поэтому мы его использовали как препарат сравнения. Также наблюдали разное количество IFN- γ -продуцирующих клеток в контрольных лунках (без стимуляции), что можно объяснить особенностями реакции спленоцитов на in vivo иммунизацию разными адьювантами.

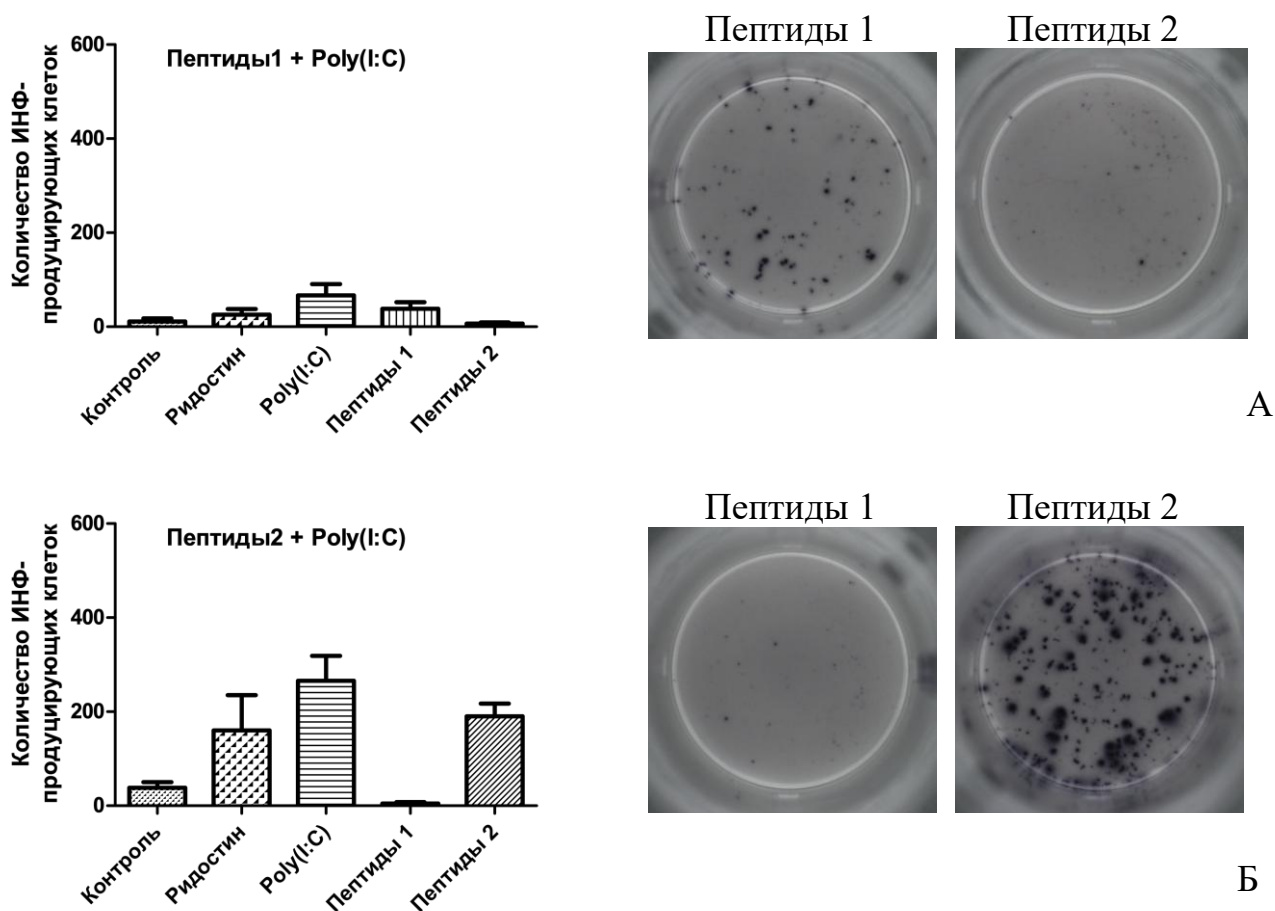
В дальнейших экспериментах оценивали иммуногенность адьювантов Poly(I:C) и Ридостин Про в составе пептидных вакцин.

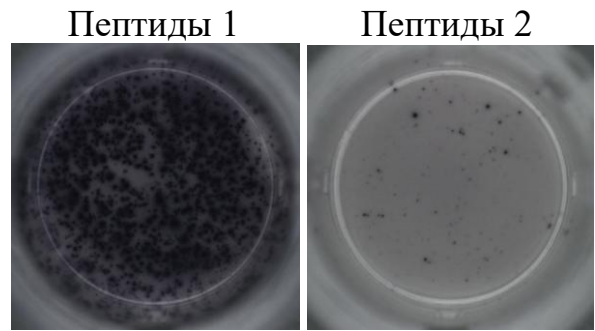
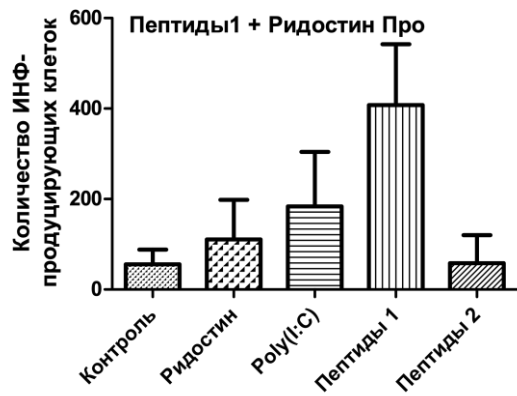
3.2 Иммуногенность адъювантов в составе вакцин

3.2.1 Иммуногенность пептидной неоантигенной вакцины

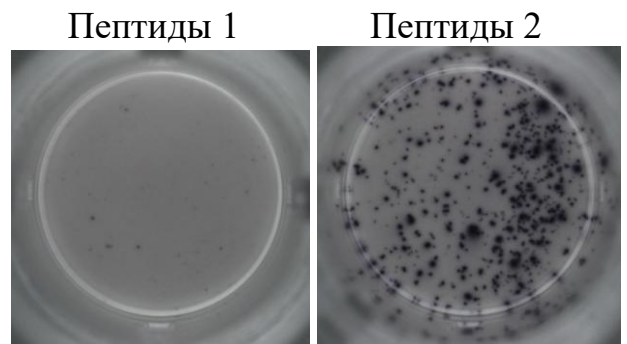
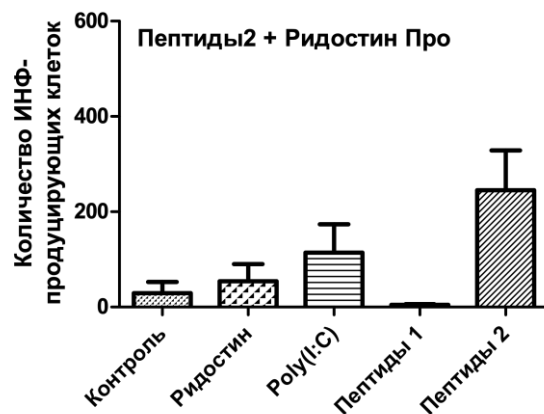
Способность Ридостина Про и Poly(I:C) усиливать Т-клеточный иммунный ответ исследовали при вакцинации мышей неоантигенной пептидной вакциной. Адъюванты включили в состав двух моделей вакцины против меланомы мышей B16-F10, каждая из которых отличалась по пептидному составу (см. таблица 1 в главе Материалы и методы). После двукратной иммунизации изучили изменение продукции IFN- γ спленоцитами мышей.

В качестве адъюванта Ридостин Про эффективнее, чем Poly(I:C) повышал иммуногенность пептидов и в модели вакцины пептиды 1 (408 IFN- γ -продуцирующих спленоцитов против 38), и в модели пептиды 2 (245 против 190) (Рисунок 4 и Таблица 4).





В



Г

- А - пептиды 1 с адьювантом Poly(I:C);
 Б - пептиды 2 с адьювантом Poly(I:C);
 В - пептиды 1 с адьювантом Ридостин Про;
 Г - пептиды 2 с адьювантом Ридостин Про.

Рисунок 4 – Изменение количества IFN- γ -продуцирующих клеток (M \pm SEM) при стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей

Таблица 4 – Изменение количества IFN- γ -продуцирующих спленоцитов мышей, ранее иммунизированных неоантигенными пептидами с адьювантами

Иммунизация <i>in vivo</i>	Стимуляция <i>in vitro</i>	Количество IFN- γ -продуцирующих спленоцитов (M \pm SD)
Пептиды 1 + Poly(I:C)	Без стимуляции	11 \pm 6
	Ридостин	26 \pm 11*
	Poly(I:C)	67 \pm 23*

Пептиды 1 + Poly(I:C)	Пептиды 1	38±13*
	Пептиды 2	7±3
Пептиды 2 + Poly(I:C)	Без стимуляции	38±11
	Ридостин	160±69*
	Poly(I:C)	266±48*
	Пептиды 1	5±3*
	Пептиды 2	190±25*
Пептиды 1 + Ридостин Про	Без стимуляции	56±30
	Ридостин	111±80
	Poly(I:C)	184±110*
	Пептиды 1	408±123*
	Пептиды 2	58±57
Пептиды 2 + Ридостин Про	Без стимуляции	29±22
	Ридостин	54±33
	Poly(I:C)	114±54*
	Пептиды 1	5±2*
	Пептиды 2	245±76*

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем без стимуляции

Показана специфичность действия пептидов, входящих в состав обеих моделей вакцины с обоими адъювантами: в спленоцитах мышей, которых иммунизировали вакциной с пептидами 1, добавление *in vitro* пептидов 2 не вызывало усиления продукции IFN- γ (Рисунок 4А и 4В), а в спленоцитах мышей,

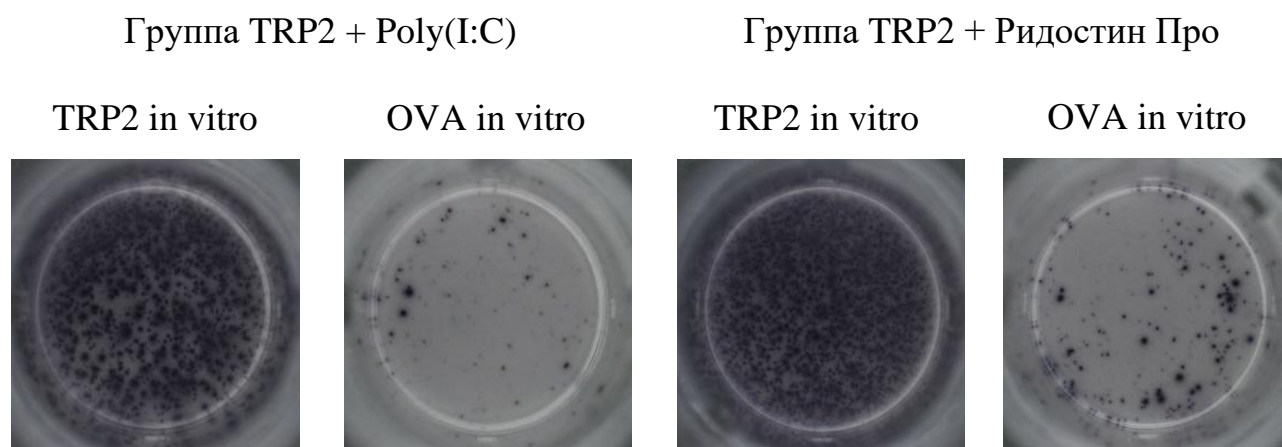
которых иммунизировали вакциной с пептидами 2, добавление в лунки планшета с клетками пептидов 1 также не вызывало увеличения количества IFN- γ -продуцирующих клеток (Рисунок 4Б и 4Г).

Также отмечено, что добавление *in vitro* пептидов 1 в лунки с клетками мышей, иммунизированных пептидами 2 с Poly(I:C) или с Ридостином Про вызывало статистически значимое снижение количества IFN- γ -продуцирующих клеток по сравнению с контролем (клетками без стимуляции *in vitro*) (Таблица 4), однако причины этого явления нами не выяснены.

Интересно, что модель с пептидами 1 при использовании адьюванта Poly(I:C) оказалась слабо иммуногенна, тогда как при использовании в качестве адьюванта Ридостина Про наблюдалось увеличение количества IFN- γ -продуцирующих клеток.

3.2.2 Иммуногенность вакцин с пептидом TRP2 или с овальбумином

Иммуногенность адьювантов Ридостина Про и Poly(I:C) исследовали при двукратной вакцинации с интервалом 7 дней мышей совместно с пептидом TRP2 или с овальбумином. Схема эксперимента представлена в главе Материалы и методы. На 12 день от начала эксперимента оценили изменение продукции IFN- γ в спленоцитах мышей. Результаты представлены на рисунках 5 и 6.



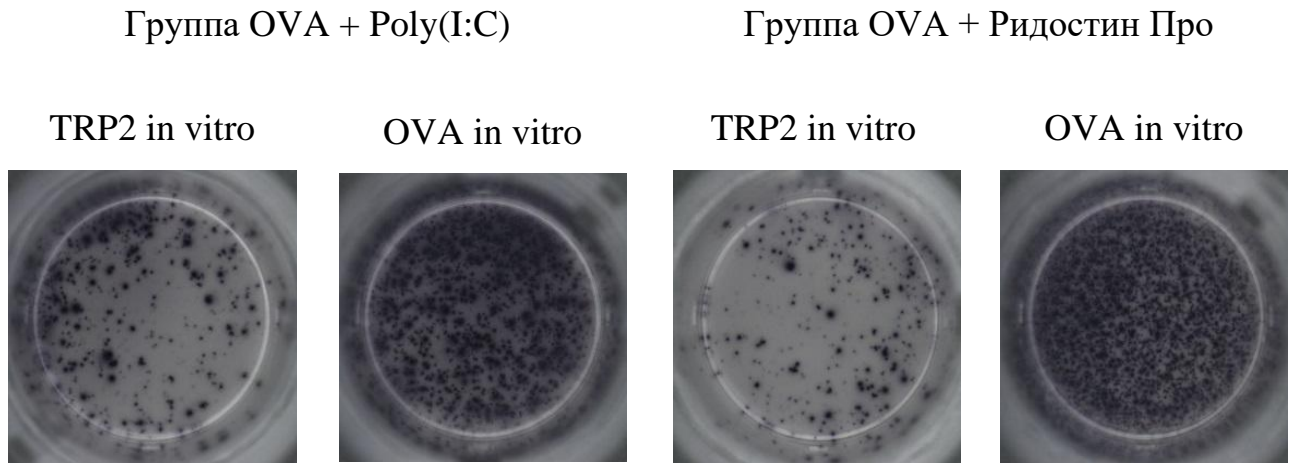
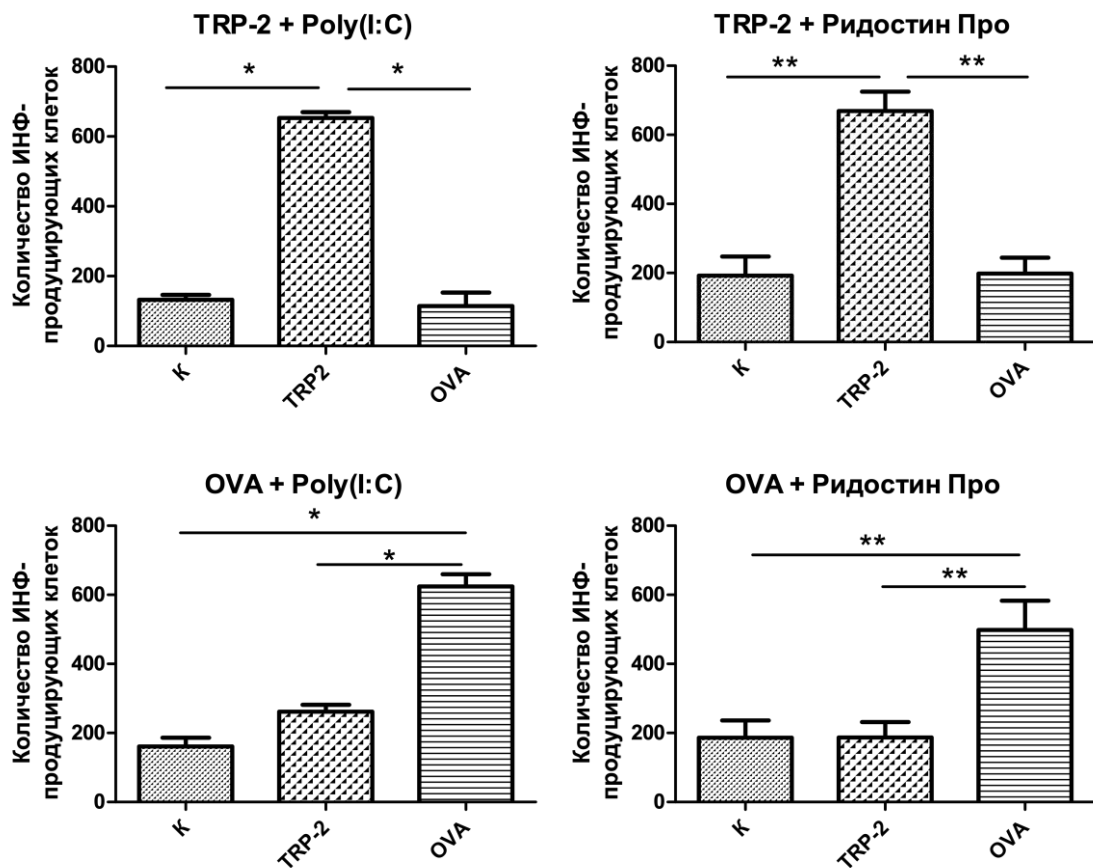


Рисунок 5 – Примеры изменения количества $IFN-\gamma$ -продуцирующих спленцитов мышей из разных групп после *in vitro* стимуляции TRP2 и OVA



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Рисунок 6 – Влияние стимуляции пептидами OVA или TRP2 на продукцию спленocyтaми $IFN-\gamma$ в каждой из групп вакцинированных мышей ($M \pm SEM$)

Адьюванты усиливали иммуногенность пептида TRP2 и овальбумина. Как и в случае с неоантигенной вакциной, в данном эксперименте также показана специфичность действия пептидов (Рисунки 5 и 6, Таблица 5).

Таблица 5 – Изменение количества IFN- γ -продуцирующих спленоцитов мышей, ранее иммунизированных пептидом TRP2 или овальбумином с адьювантами

Иммунизация <i>in vivo</i>	Стимуляция <i>in vitro</i>	Количество IFN- γ -продуцирующих спленоцитов (M \pm SD)
TRP2+Poly(I:C)	Без стимуляции	132 \pm 25
	TRP2	653 \pm 26*
	OVA	114 \pm 67
Группа TRP2 + Ридостин Про	Без стимуляции	192 \pm 51
	TRP2	669 \pm 51**
	OVA	198 \pm 42
Группа OVA + Poly(I:C)	Без стимуляции	161 \pm 44
	TRP2	262 \pm 34
	OVA	624 \pm 61*
Группа OVA + Ридостин Про	Без стимуляции	186 \pm 46
	TRP2	187 \pm 41
	OVA	499 \pm 77**

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем (без стимуляции) и со стимуляцией пептидом, не вводившимся *in vivo*;

** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без стимуляции) и со стимуляцией пептидом, не вводившимся *in vivo*

В спленocyтaх мышей, вакцинированных пептидом TRP2 с адьювантами, добавление пептида OVA *in vitro* не привело к увеличению числа IFN- γ -

продуцирующих клеток. В то же время, в спленоцитах мышей, иммунизированных овальбумином, введение пептида TRP2 также не вызывало повышения продукции IFN- γ . Эти данные подчеркивают строгую специфичность иммунного ответа на каждый пептид.

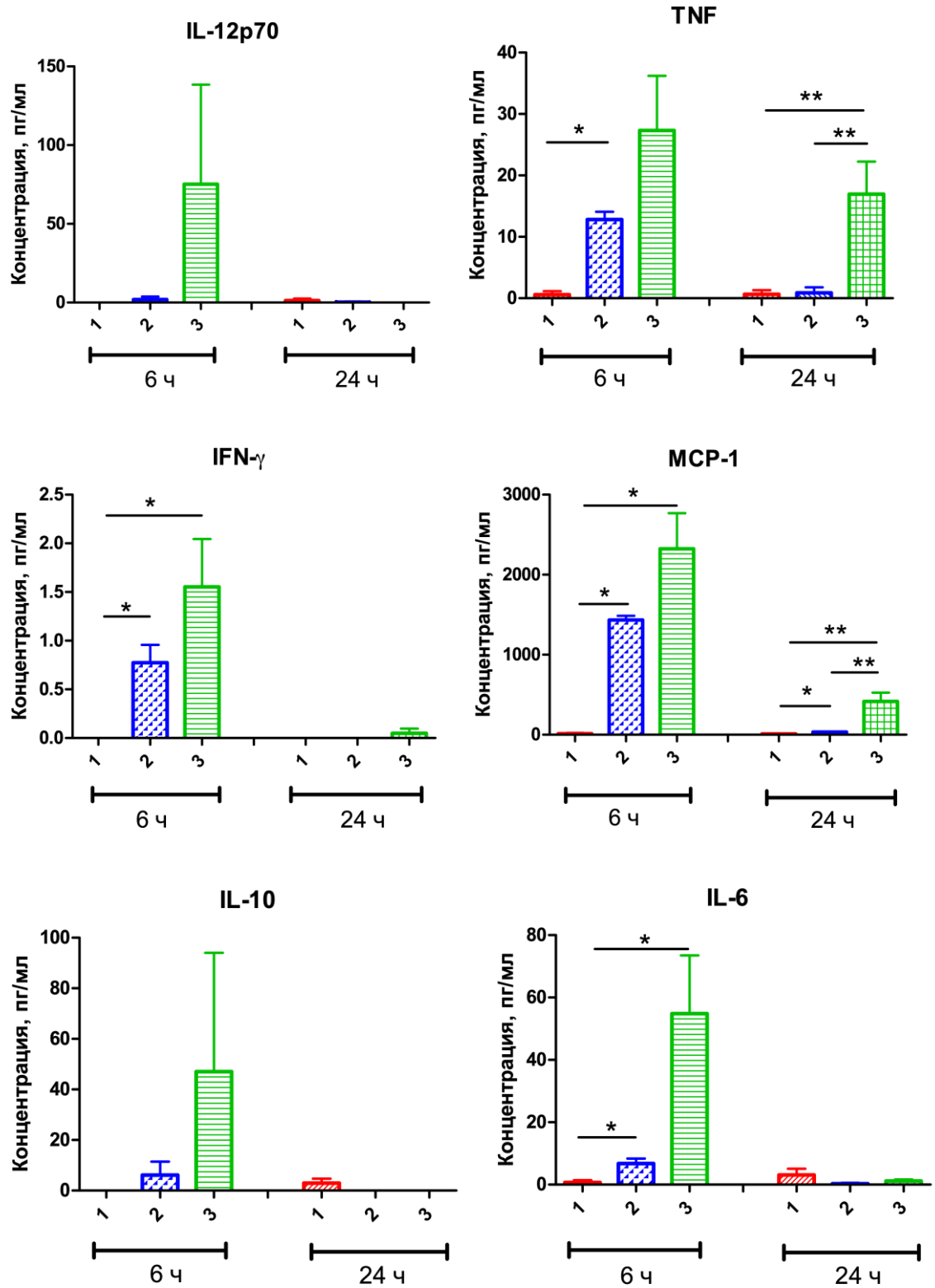
Таким образом, Ридостин Про и Poly(I:C) одинаково усиливали иммуногенность как пептида TRP2 так и овальбумина.

3.2.3 Индукция цитокинов *in vivo* введением Poly(I:C) или Ридостина Про

Далее оценили воздействие Ридостина Про и Poly(I:C) на уровни сывороточных цитокинов через 6 и 24 ч после введения мышам, используя коммерческий набор BD CBA Mouse Inflammation Kit (Catalog No. 552364), IL-12p70, TNF, INF- γ , MCP-1, IL-10, IL-6. Схема эксперимента приведена в главе Материалы и методы. Результаты представлены в таблице 6 и на рисунке 7.

Таблица 6 – Изменение уровня цитокинов в сыворотки крови мышей через 6 ч и 24 ч после иммунизации

Цитокины, пг/мл (M \pm SD)	Физиологический раствор		Poly(I:C)		Ридостин Про	
	6 ч	24 ч	6 ч	24 ч	6ч	24 ч
IL-12p70	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 2,6	1,9 \pm 3,8	0,3 \pm 0,7	75,2 \pm 126,6	0,0 \pm 0,0
TNF	0,6 \pm 0,8	0,7 \pm 1,3	12,8 \pm 2,5	0,9 \pm 1,8	27,3 \pm 17,8	17,0 \pm 10,6
IFN-g	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	1,6 \pm 1,0	0,0 \pm 0,1
MCP-1	14,5 \pm 12,8	10,6 \pm 9,1	1432,6 \pm 107,0	34,9 \pm 7,3	2323,1 \pm 890,2	416,6 \pm 219,9
IL-10	0,0 \pm 0,0	2,9 \pm 3,6	6,1 \pm 10,8	0,0 \pm 0,0	47,0 \pm 94,1	0,0 \pm 0,0
IL-6	0,7 \pm 1,0	3,1 \pm 4,0	6,8 \pm 3,2	0,3 \pm 0,4	54,8 \pm 37,3	1,2 \pm 0,9



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Рисунок 7 – Изменение уровня цитокинов ($M \pm SEM$) в сыворотке крови мышей: 1 – физраствор; 2 – Poly(I:C); 3 – Ридостин Про

Через 6 часов Ридостин Про более выражено по сравнению с Poly(I:C), увеличивал концентрацию всех шести исследованных цитокинов, но статистически значимо по сравнению с контролем Ридостин Про повышал уровни цитокинов INF- γ , MCP-1 и IL-6 (Таблица 6 и Рисунок 7). Poly(I:C) через 6 часов после введения также вызывал повышение уровней всех шести цитокинов, статистически значимо – TNF, INF- γ , MCP-1 и IL-6 (Таблица 6 и Рисунок 7). Через 24 часа после введения адьювантов концентрация цитокинов в сыворотке снижалась, однако после применения Ридостина Про концентрация двух цитокинов – TNF и MCP-1 – не вернулась к контрольным значениям.

Таким образом, Ридостин Про и Poly(I:C) повышают уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей в течение первых часов после введения.

3.2.4 Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на иммунофенотип спленоцитов

Изучили изменение иммунофенотипа спленоцитов мышей через 24 часа после однократного применения Poly(I:C) и Ридостина Про. Мышам в контрольной группе вводили физиологический раствор.

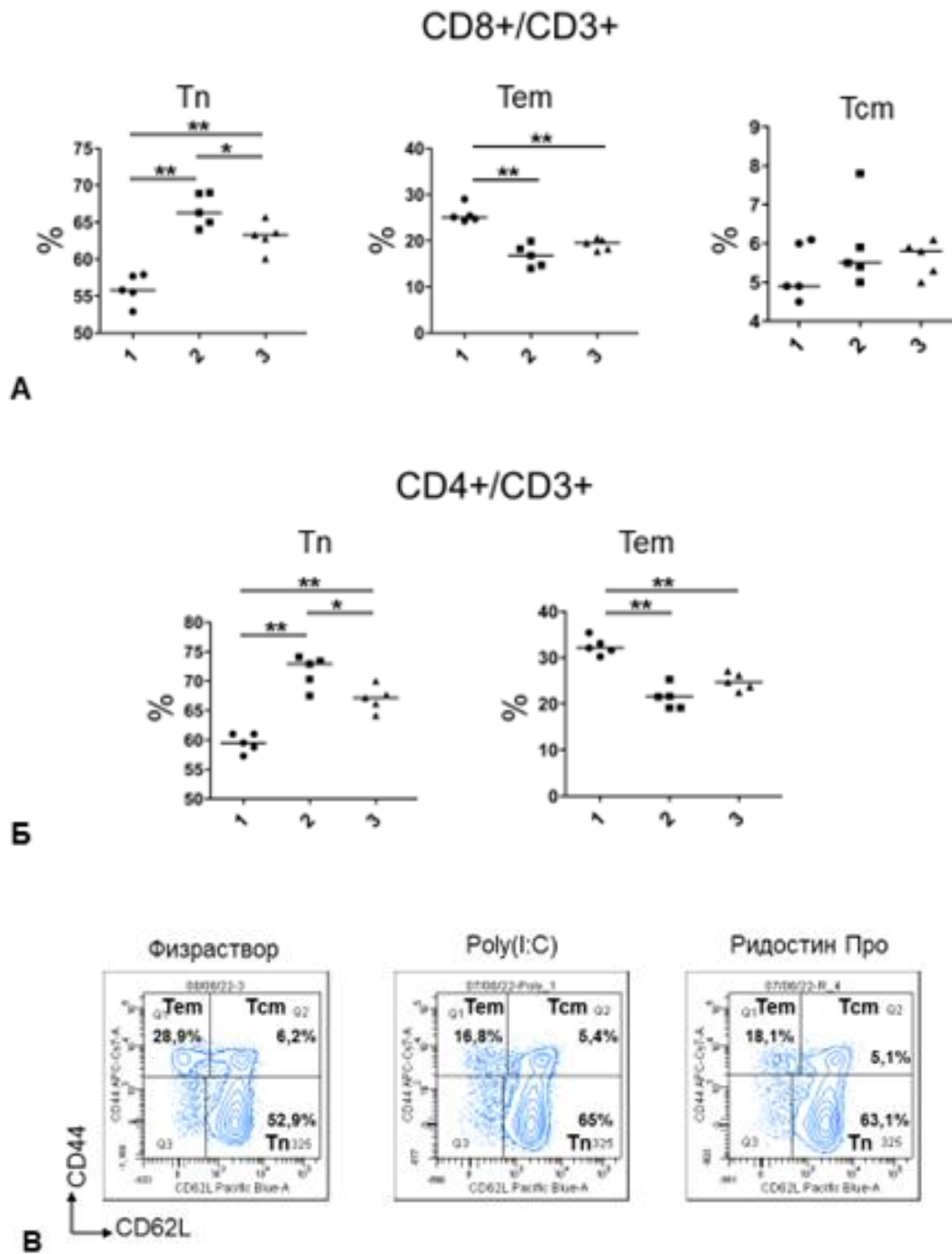
После введения Poly(I:C) было выявлено статистически значимое уменьшение числа клеток эффекторной памяти (T_{em}) и увеличение количества наивных Т-клеток (T_n) среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, по сравнению с контрольной группой, получавшей физраствор (Таблица 7, Рисунок 8). При этом значимых изменений в уровне клеток центральной памяти (T_{cm}) не наблюдалось. Введение Ридостина Про показало аналогичные результаты: также отмечено увеличение количества T_n и снижение T_{em}. Однако Poly(I:C) вызывал более выраженное увеличение T_n и снижение T_{em} по сравнению с Ридостином Про, хотя статистически значимая разница между препаратами наблюдалась только для CD4⁺ и CD8⁺ наивных Т-клеток (T_n) (Таблица 7, Рисунок 8).

Таблица 7 – Субпопуляции исследуемых клеток селезенки после иммунизации (медиана, %)

Маркеры	Физиологический раствор	Poly(I:C)	Ридостин Про
CD69 на CD4	13	13	18,6**
CD69 на CD8	3,7	5,9*	16,5*
CD44- CD62L+ Tn от CD8	52,8	64,2*	60,6**
CD44+ CD62L- Тем от CD8	26	17,6*	21**
CD44+ CD62L+ Tcm от CD8	6,9	7,9	9*
CD44- CD62L+ Tn от CD4	60,2	72,2*	66,9**
CD44+ CD62L- Тем от CD4	34,4	22,8*	27,1**
PD1 на CD4	26,2	27,6	29,1
PD1 на CD8	6,4	9,5*	10,7*
CD19	47,6	54,6*	60,2**
CD3	43,8	39*	34**
NK	2,6	1,8*	1,5*

* $p < 0,05$ по сравнению с группой, получавшей физраствор;

** $p < 0,05$ по сравнению с группами, получавшей физраствор или Poly(I:C)



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

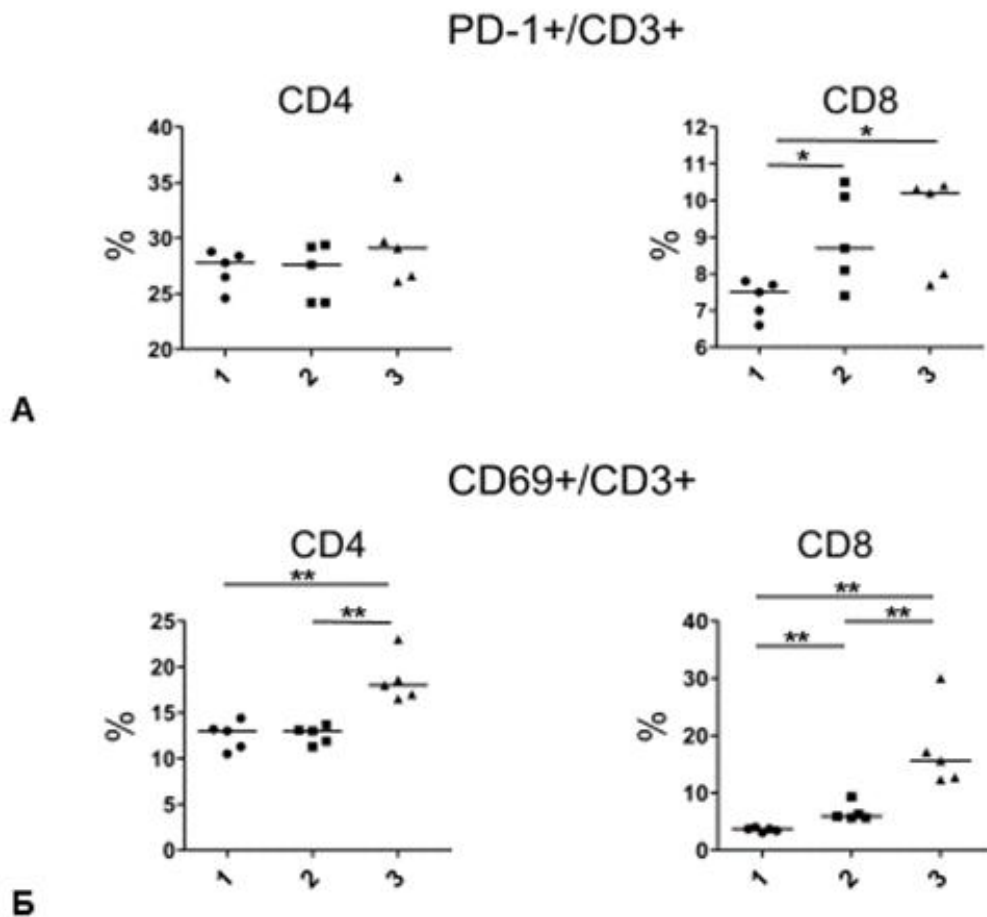
А – количество клеток, выраженное в процентах для Tn, Tem, Tcm от всех CD8⁺/CD3⁺/CD45⁺ клеток селезенки;

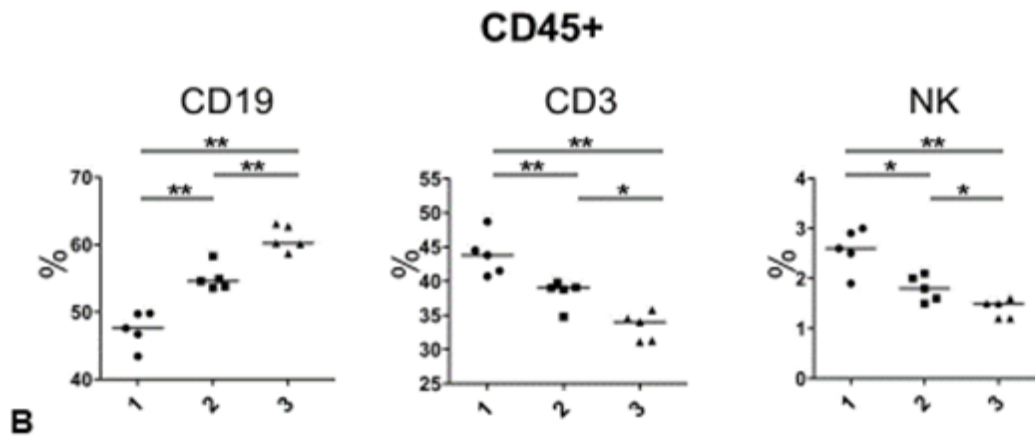
Б – количество клеток, выраженное в процентах для Tn и Tem от всех CD4⁺/CD3⁺/CD45⁺ клеток селезенки;

В – количество CD8⁺ Т-клеток памяти (примеры точечных графиков);

Рисунок 8 – Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на популяции Т-клеток памяти в спленоцитах мышей: 1 – физраствор; 2 – Poly(I:C); 3 – Ридостин Про

После применения адъювантов было выявлено статистически значимое повышение уровня экспрессии PD-1 на CD8⁺ Т-клетках по сравнению с контрольной группой, получавшей физраствор. Poly(I:C) не оказывал влияния на количество CD69⁺ клеток в популяции CD4⁺ Т-клеток, но вызвал небольшое, однако статистически значимое увеличение числа CD69⁺ клеток среди CD8⁺ Т-клеток. Введение Ридостина Про привело к значительному статистически значимому увеличению количества CD69⁺ клеток как в популяции CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток. Более того, после применения Ридостина Про было зафиксировано статистически значимое увеличение количества CD69⁺ клеток среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с эффектом от Poly(I) (Рисунок 9). Помимо этого, оба адъюванта Poly(I:C) и Ридостин Про привели к статистически значимому повышению числа CD19⁺ В-клеток относительно контрольной группы с физраствором, а также вызвали снижение количества Т- и NK-клеток (Рисунок 9).





* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

А – Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на количество $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих PD-1;

Б – Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на количество $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток, экспрессирующих CD69;

В – Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на количество $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток, В-, НК-клеток от всех $CD45^+$.

Рисунок 9 – Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на количество $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток; 1 – физраствор; 2 – Poly(I:C); 3 – Ридостин Про

Таким образом, сравнение иммунофенотипа клеток селезенки после однократного применения Poly(I:C) и Ридостина Про выявило, что оба адьюванта снижали количество T_{em} и повышали T_p . Хотя наблюдаемые эффекты были более выражены после применения Poly(I:C), можно сказать о схожих тенденциях к изменению количества Т-клеток памяти. Оба адьюванта вызвали небольшое увеличение уровня PD-1 на $CD8^+$ Т-клетках, при этом не влияя на его уровень на $CD4^+$ Т-клетках, и статистически значимых различий между препаратами в этом отношении не было выявлено. Однако Ридостин Про значительно сильнее, чем Poly(I:C), способствовал увеличению уровня CD69 на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках. Это можно объяснить тем, что после введения Ридостина Про происходит более выраженное повышение уровня интерферонов в сыворотке, а интерфероны I типа (INF I) стимулируют экспрессию CD69. Кроме того, было установлено, что оба адьюванта вызывали увеличение количества В-клеток в селезенке мышей,

одновременно снижая количество Т- и NK-клеток. Для Ридостина Про эта тенденция была более выраженной, что указывает на его более сильное воздействие на иммунную систему по сравнению с Poly(I:C).

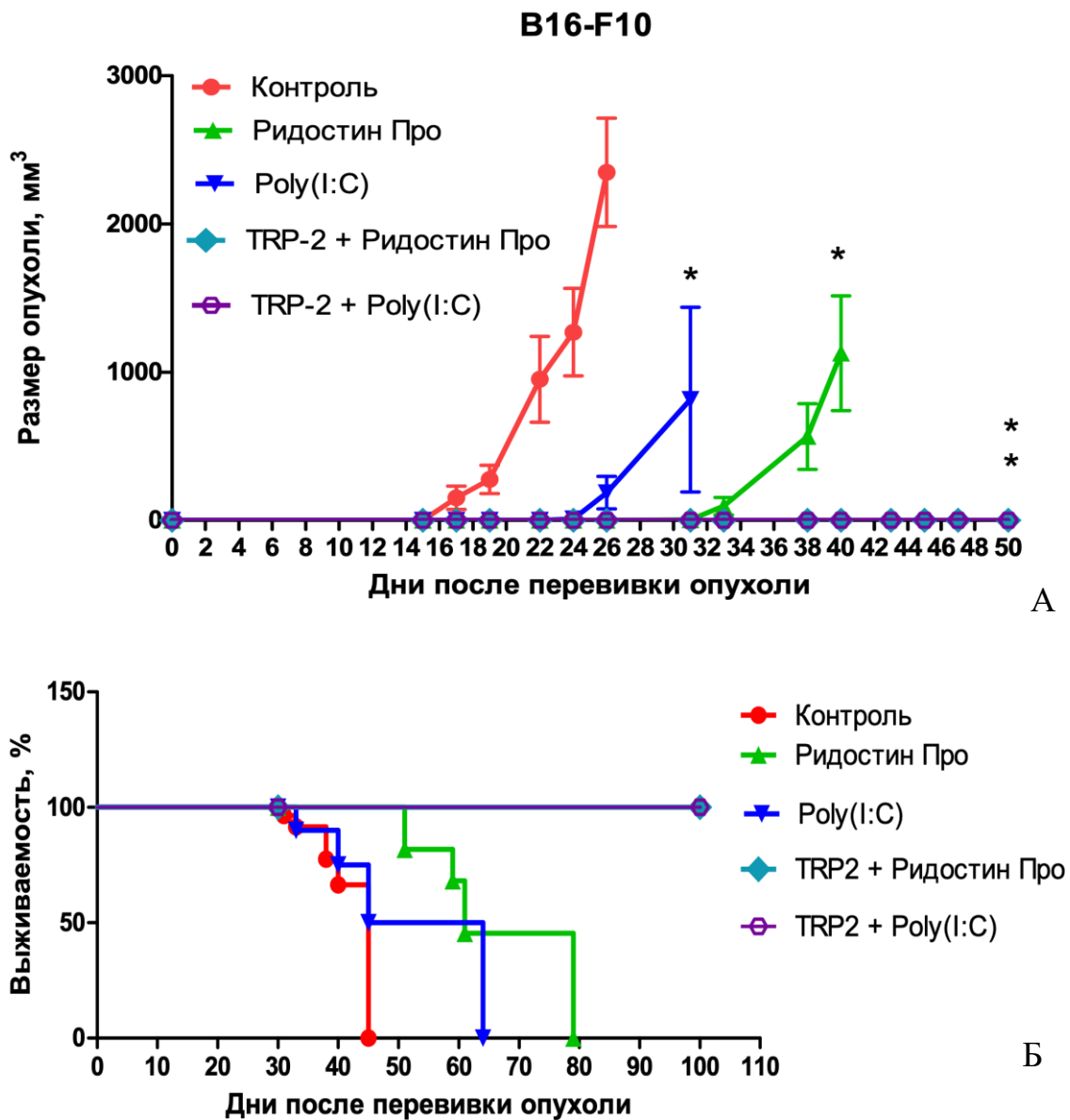
3.3 Противоопухолевый эффект

На первом этапе исследования сравнивали противоопухолевый эффект адъювантов в составе вакцины с пептидом TRP2 против меланомы мышей B16-F10. После вакцинации в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме, при котором два введения препаратов были до перевивки опухоли, а два – после перевивки, обнаружили торможение роста опухолей и увеличение продолжительности жизни мышей по сравнению с контролем (Таблица 8, Рисунок 10). Торможение роста опухоли рассчитывали по сравнению с контрольной группой с перевитой меланомой, не получавшей лечения, до 26 суток эксперимента, так как далее мыши в контрольной группе начали погибать. При введении без пептида Ридостин Про и Poly(I:C) тормозили рост опухолей по сравнению с контролем статистически значимо ($p < 0,01$) (Рисунок 10А), а при введении адъювантов с TRP2 ни у одной мыши в этих группах не развились опухоли. После применения адъювантов детектировали увеличение продолжительности жизни мышей, при этом положительный эффект был более выражен для Ридостина Про, чем для Poly(I:C) (Рисунок 10Б). После вакцинации TRP2 с Ридостином Про и с Poly(I:C) у мышей наблюдали отсутствие опухолей более 100 дней.

Таблица 8 – Влияние смешанного режима вакцинации пептидом TRP2 с адъювантами на торможение роста меланомы B16-F10 и увеличение продолжительности жизни мышей

Воздействие	ТРО, %						УПЖ, %	Излечение
	15	17	19	22	24	26		
Ридостин Про	100	100	100	100	100	100	53	нет

Poly(I:C)	100	100	100	100	99	92	16	нет
TRP2 + Ридостин	100	100	100	100	100	100	max	100%
TRP2 + Poly(I:C)	100	100	100	100	100	100	max	100%



* $p < 0,01$ по сравнению с контролем

А – размер опухоли \pm SEM;

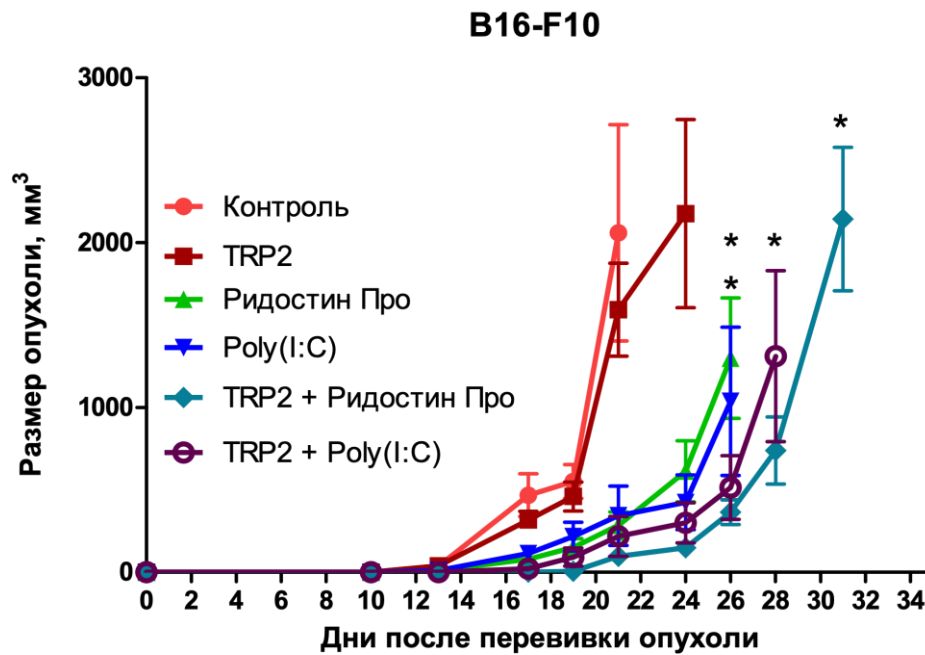
Б – выживаемость мышей.

Рисунок 10 – Противоопухолевый эффект при смешанном режиме вакцинации мышей с меланомой B16-F10

Далее исследовали эффективность вакцинации пептидом TRP2 с адьювантами в терапевтическом режиме, когда после перевивки мышам клеток меланомы B16-F10 на 4 и 10 сутки вводили адьюванты с пептидом TRP2 или без него, а также один TRP2 без адьювантов. Результаты представлены в таблице 9 и на рисунке 11.

Таблица 9 – Влияние терапевтического режима вакцинации пептидом TRP2 с адьювантами на торможение роста меланомы B16-F10 и увеличение продолжительности жизни мышей

Воздействие	ТРО, %				УПЖ, %	Излечение
	13 сут	17 сут	19 сут	21 сут		
TRP2	0	32	17	23	8	нет
Ридостин Про	71	83	73	86	30	нет
Poly(I:C)	70	75	61	83	45	нет
TRP2 + Ридостин Про	100	100	99	95	43	нет
TRP2 + Poly(I:C)	100	96	83	89	46	нет



* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

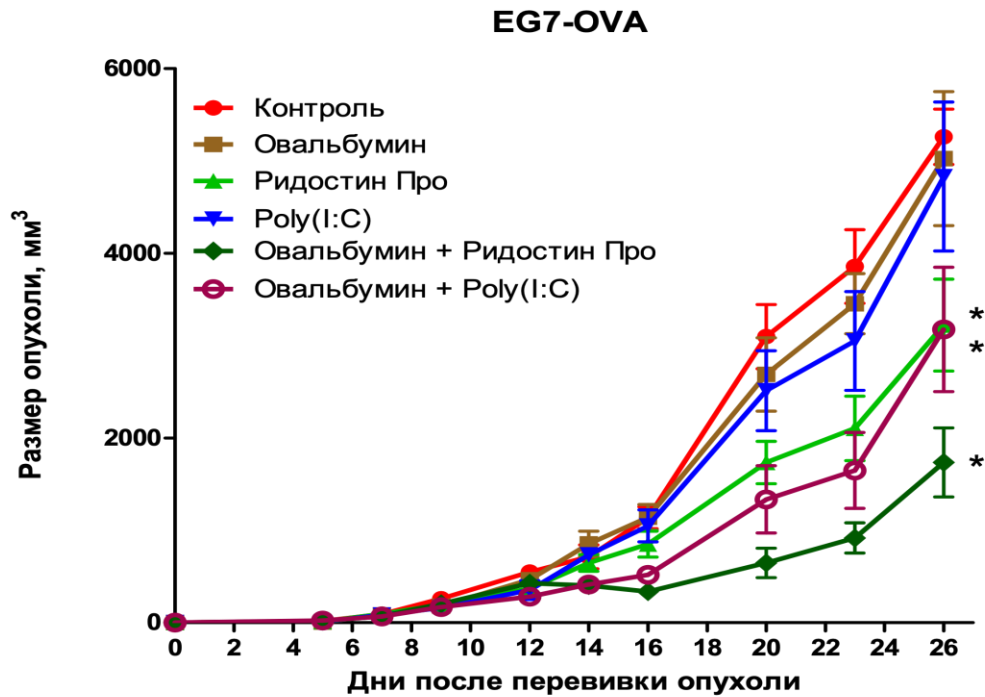
Рисунок 11 – Противоопухолевый эффект при терапевтическом режиме вакцинации мышей с меланомой B16-F10: размер опухоли \pm SEM

Вакцинация только пептидом TRP2 без адъювантов не имела противоопухолевого эффекта. Вакцинация только адъювантами и адъювантами с пептидом TRP2 статистически значимо тормозила рост опухоли у мышей, по сравнению с контрольной группой и с группой, получавшей только TRP2 ($p < 0,05$). Наблюдали увеличение продолжительности жизни мышей в группах, вакцинированных адъювантами (30% для Ридостина Про и 45% для Poly(I:C)) и TRP2 с адъювантами (43% и 46%), тем не менее, терапевтический режим вакцинации, в отличие от смешанного режима, не приводил к излечению мышей в группах, получавших пептид TRP2 с адъювантами.

Таким образом, начало вакцинации пептидом TRP2 с обоими исследованными адъювантами до перевивки меланомы B16-F10 эффективнее подавляет рост опухоли, чем начало вакцинации после перевивки меланомы.

Далее оценивали противоопухолевый эффект адъювантов в составе вакцины с овальбумином против лимфомы мышей EG7-OVA также при разных режимах вакцинации: в одном случае лечение начинали после перевивки опухоли (терапевтический режим), а в другом случае – до перевивки опухоли (смешанный режим).

При терапевтическом режиме вакцинировали мышей двукратно на 7-й и на 14-й дни после перевивки лимфомы E.G7-OVA. Результаты представлены на рисунке 12 и в таблице 10.



* $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

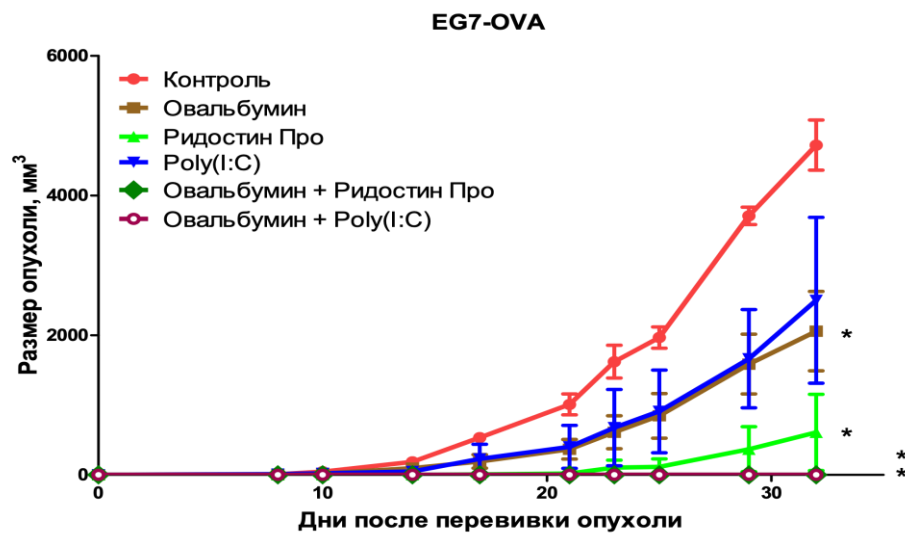
Рисунок 12 – Противоопухолевый эффект при терапевтическом режиме вакцинации мышей с лимфомой EG7-OVA: размер опухоли \pm SEM

Таблица 10 – Влияние терапевтического режима вакцинации овальбумином с адьювантами на торможение роста лимфомы EG7-OVA и увеличение продолжительности жизни мышей

Воздействие	ТРО, %							УПЖ, %	Излечение
	5 сут	9 сут	12 сут	16 сут	20 сут	23 сут	26 сут		
Овальбумин	54	31	15	0	13	10	4	12	нет
Ридостин Про	33	25	33	25	44	45	39	14	нет
Poly(I:C)	39	39	36	8	19	21	8	9	нет
Овальбумин + Ридостин Про	0	21	22	70	79	76	67	24	нет
Овальбумин + Poly(I:C)	0	35	49	54	57	57	40	23	нет

Овальбумин, применяемый без адъювантов, а также Poly(I:C), не демонстрировали статистически значимого эффекта на торможение роста опухоли. Ридостин Про значительно тормозил рост опухоли статистически значимо по сравнению с контролем ($p=0,01$). Применение адъювантов в комбинации с овальбумином также приводило к торможению роста опухоли, что было статистически значимым по сравнению с контрольной группой. При этом вакцинация с использованием овальбумина в сочетании с Ридостин Про показала более высокую эффективность ($p=0,004$) по сравнению с вакцинацией овальбумином в сочетании с Poly(I:C) ($p=0,03$).

На следующем этапе исследовали влияние вакцинации овальбумином с адъювантами в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме применения. Результаты представлены на рисунке 13 и в таблице 11.



* $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

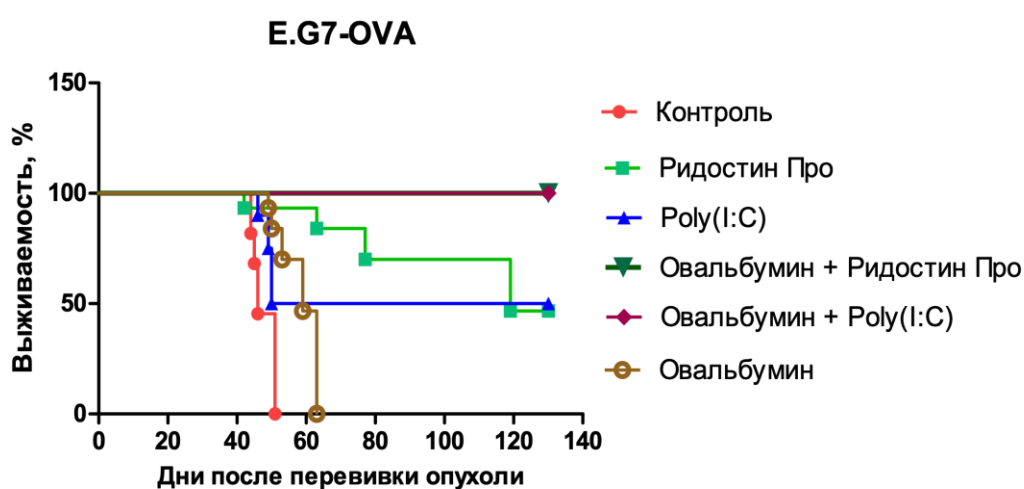
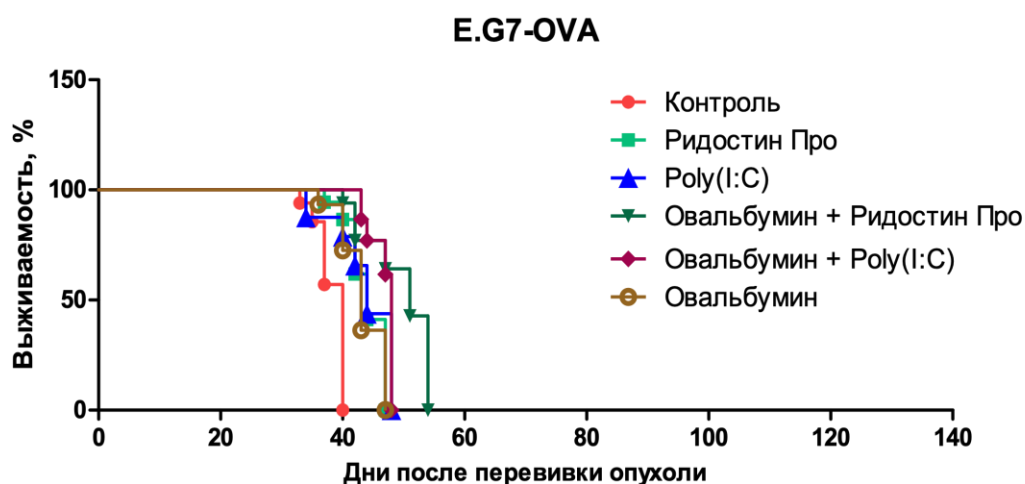
Рисунок 13 – Противоопухолевый эффект при смешанном режиме вакцинации мышей с лимфомой EG7-OVA: размер опухоли \pm SEM

Таблица 11 – Влияние смешанного режима вакцинации овальбумином с адьювантами на торможение роста лимфомы EG7-OVA и увеличение продолжительности жизни мышей

Воздействие	ТРО, %								УПЖ, %	Излечение
	10 сут	14 сут	17 сут	21 сут	23 сут	29 сут	36 сут	39 сут		
Овальбумин	58	48	64	64	62	57	61	56	41	нет
Ридостин Про	100	100	99	98	94	90	87	89	64	20%
Poly(I:C)	51	74	57	60	58	55	52	51	8	25%
Овальбумин + Ридостин Про	100	100	100	100	100	100	100	100	max	100%
Овальбумин + Poly(I:C)	100	100	100	100	100	100	100	100	max	100%

При вакцинации в смешанном режиме наблюдали торможение роста опухоли во всех группах по сравнению с контролем, статистически значимое для групп, вакцинированных овальбумином, Ридостином Про, овальбумином с Poly(I:C) и овальбумином с Ридостином Про. В группах, вакцинированных овальбумином с Poly(I:C) и овальбумином с Ридостином Про, опухоли не выросли ни у одной из мышей.

На рисунке 14 представлена выживаемость мышей при терапевтическом и смешанном режиме вакцинации.



А – после перевивки опухоли;

Б – вакцинация до перевивки опухоли.

Рисунок 14 – Выживаемость мышей с лимфомой E.G7-OVA

Проведенные исследования показали, что адъюванты Ридостин Про и Poly(I:C) значительно усиливают иммунный ответ на пептидные вакцины, способствуя повышению продукции интерферона-гамма и цитокинов, а также изменению иммунофенотипа Т-клеток. Вакцинация с использованием этих адъювантов продемонстрировала выраженный противоопухолевый эффект, особенно в смешанном режиме. Сравнительный анализ показал, что Ридостин Про оказывал более выраженное воздействие на иммунную систему, чем Poly(I:C), что проявлялось в значительном увеличении продолжительности жизни мышей и полном отсутствии роста опухолей при смешанном режиме вакцинации.

В то же время, в терапевтическом режиме адъюванты демонстрировали способность замедлять прогрессию опухолей, однако полного излечения не достигалось.

Таким образом, результаты исследования подтверждают, что Ридостин Про и Poly(I:C) обладают высоким потенциалом в качестве адъювантов для пептидных противоопухолевых вакцин. Их включение в состав вакцин может способствовать усилению иммунного ответа и повышению терапевтической эффективности.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из литературы известно о способности Poly(I:C) усиливать специфический иммунный ответ на пептиды, входящие в состав вакцин [154]. Например, в исследовании [68] при сравнении адъювантных свойств Poly(I:C) с некоторыми его аналогами, Poly(I:C) показал наилучшие результаты. В нашей работе мы показали, что Ридостин Про также способен к антиген-специфическому праймированию Т-клеток, причем более эффективно, чем Poly(I:C).

Насколько нам известно, способность Ридостина Про усиливать иммуногенность пептидов, а также замедлять рост меланомы в составе неоантигенной вакцины показана нами впервые. Обнаруженные некоторые отличия в эффективности Poly(I:C) и Ридостина Про можно объяснить тем, что Ридостин Про содержит кроме двухцепочечной также и одноцепочечную РНК, что допускает вовлечение в иммунный ответ TLR-7 и TLR-8, кроме TLR3, и может объяснить его повышенную иммуностимулирующую активность [174, 207].

С одной стороны, если учесть, что Poly(I:C) и Ридостин Про показали незначительно отличающуюся противоопухолевую эффективность на мышинных моделях, более низкая концентрация цитокинов в сыворотке для Poly(I:C) может считаться некоторым преимуществом, так как может свидетельствовать о более низкой токсичности. С другой стороны, известно, что Poly(I:C) не применяется в клинике, например, клинические испытания Poly(I:C) в качестве самостоятельного агента для лечения рака не выявили его положительного влияния на клинический исход из-за короткого периода полураспада [23]. В то же время, его менее токсичный аналог Poly-ICLC [112, 17], который, как и Ридостин Про, обладает пролонгированным действием, применяется в клинических испытаниях, как адъювант противоопухолевых вакцин [22]. В исследовании на приматах показано, что Poly-ICLC индуцировал значительное повышение уровня интерферона в сыворотке крови по сравнению с Poly(I:C) [17].

Поэтому на данном этапе нельзя точно сказать, что более низкие значения провоспалительных цитокинов указывают на преимущество Poly(I:C) над Ридостином Про. Можно отметить, что при сравнении с литературными данными уровень цитокинов при воздействии Ридостина Про был ниже, чем при использовании других агонистов TLR-3 [25].

Для исследования иммунных реакций, вызванных применением Poly(I:C) и Ридостина Про, был проведен анализ изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей через 24 часа после их однократного введения адьювантов. Исследование показало, что оба препарата статистически значимо влияли на профиль Т-клеток, уменьшая количество эффекторных Т-клеток (T_{em}) и увеличивая количество наивных Т-клеток (T_n) среди $CD4^+$ и $CD8^+$ популяций по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор. Изменений в количестве Т-клеток центральной памяти (T_{cm}) замечено не было.

При детальном сравнении эффектов Poly(I:C) и Ридостина Про была выявлена статистически значимая разница только в количестве наивных Т-клеток (T_n) для $CD4^+$ и $CD8^+$ популяций. Существующие литературные данные указывают, что введение мышам Poly(I:C) через 12 часов после инъекции может приводить к снижению Т-клеток памяти в селезенке из-за их апоптотической гибели [33], но спустя сутки начинает стимулировать пролиферацию $CD4^+$ $CD8^+$ Т-клеток памяти [196]. Этот механизм может служить для очищения от старых или неэффективных Т-клеток памяти, освобождая пространство для новых Т-клеток, адаптированных к актуальным антигенам. Имеющихся в литературе данных недостаточно, чтобы точно определить, в какой момент времени после воздействия Poly(I:C) Т-клетки памяти перестают погибать и начинают пролиферировать. Если предположить, что этот срок примерно равен суткам, полученные нами данные могут свидетельствовать о схожей тенденции к снижению Т-клеток памяти для обоих препаратов, но для Ридостина Про она выражена слабее, чем для Poly(I:C).

После воздействия Poly(I:C) и Ридостина Про обнаружено небольшое, но статистически значимое повышение PD-1 на $CD8^+$ Т-клетках по сравнению с

физраствором. Это может быть связано с увеличением уровня некоторых цитокинов в сыворотке [187]. Между эффектом адъювантов на PD-1 не было статистически значимой разницы, хотя Ридостин Про вызывал большее повышение PD-1 на CD8⁺ Т-клетках. На CD4⁺ Т-клетках изменения количества PD-1-положительных клеток не имели статистической значимости для обоих препаратов. Рецептор программируемой гибели клеток 1 (PD-1, Programmed cell death 1; CD279) представляет собой ключевую молекулу иммунных контрольных точек, которая играет важную роль в регуляции иммунного ответа. Он является одной из главных мишеней для современной иммунотерапии, направленной на подавление опухолей. PD-1 экспрессируется на поверхности активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, а также других клеток иммунной системы, таких как В-клетки и NK-клетки. Взаимодействие PD-1 с его лигандом PD-L1 необходимо для осуществления иммунной толерантности и предотвращения чрезмерной активности иммунных клеток [36, 145]. Повышение уровня экспрессии PD-1 в результате применения адъювантов предположительно может привести к анергии Т-клеток при контакте с молекулой PD-L1 на опухолевых клетках или клетках микроокружения опухоли.

После однократного подкожного введения Poly(I:C) не было замечено увеличения числа CD69⁺ клеток в популяции CD4⁺ Т-клеток. Однако среди CD8⁺ Т-клеток после применения Poly(I:C) было зафиксировано небольшое, но статистически значимое повышение количества клеток CD69⁺. В отличие от этого, подкожное введение Ридостина Про привело к значительному увеличению количества CD69⁺ клеток как в популяции CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток, что также подтверждено статистически. Кроме того, после введения Ридостина Про наблюдалось статистически значимо более высокое количество CD69⁺ клеток в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с эффектом от Poly(I:C). CD69 относят к ранним маркерам активации лимфоцитов, так как после стимуляции он быстро появляется на поверхности плазматической мембраны [55]. Существуют разные данные о влиянии CD69 на активацию иммунитета. В ранних исследованиях детектировали иммуноактивирующую роль CD69 [185], однако в

поздних работах обнаружили иммунорегуляторную функцию CD69: в исследовании [81] у мышей отсутствие CD69 характеризовалось более сильным противоопухолевым иммунитетом. В исследовании [49] при внутрибрюшинном введении Poly(I:C) индуцировал экспрессию CD69 на поверхности CD4 Т-клеток селезенки мышей. Также в работе [48] описано значительное увеличение количества CD69⁺ Т-клеток после внутривенного введения Poly(I:C). После многократного подкожного введения Poly(I:C) показано повышение CD69 на Т-клетках селезенки мышей [3]. Имеются литературные данные, что IFN-I типа индуцируют экспрессию CD69 во многих типах клеток [48]. В связи с этим можно предположить, что более высокие уровни CD69 на Т-клетках могут быть связаны с более сильной выработкой некоторых цитокинов после введения Ридостина Про по сравнению с Poly(I:C).

Также определяли CD3⁺ Т-клетки, NK-клетки с помощью маркера NKp46⁺/CD3⁻ [93] и CD19⁺ В-клетки. Было установлено, что как введение Poly(I:C), так и Ридостина Про приводило к статистически значимому увеличению количества В-клеток и одновременному снижению числа Т- и NK-клеток по сравнению с контрольной группой, получавшей физраствор. При этом, после применения Ридостина Про количество В-клеток было значительно выше, а число Т- и NK-клеток — существенно ниже по сравнению с Poly(I:C). Снижение общего количества Т-клеток может быть связано с апоптозом клеток памяти. Кроме того, уменьшение числа NK-клеток и части Т-клеток в селезенке может быть объяснено их миграцией в другие ткани. В итоге можно отметить, что, за исключением влияния на экспрессию маркера CD69, тенденции в изменении иммунофенотипа клеток селезенки в целом схожи для обоих адъювантов.

Полученные результаты по противоопухолевой эффективности Poly(I:C) и TRP2 согласуются с литературными данными. В работе Castle J. и соавт. показано, что введение в терапевтическом режиме Poly(I:C) с пептидом TRP2 вызывало торможение роста опухоли B16-F10, более выраженное, чем введение одного Poly(I:C) [83]. В работе [30] показано, что добавление дополнительных иммуногенных пептидов к TRP2 при вакцинации в терапевтическом режиме

приводило к достаточно выраженным положительным эффектам на модели меланомы B16-F10.

Сравнение двух режимов вакцинации показало, что вакцинация в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме, когда лечение начинается еще до перевивки опухоли, более эффективно тормозит рост опухолей E.G7-OVA и B16-F10 и увеличивает продолжительность жизни мышей, а также вакцины, содержащие пептид и адъювант, вызывают полное излечение мышей. Иммуный ответ, развивающийся при таком режиме вакцинации, способен убить перевиваемые опухолевые клетки. Вакцинация в терапевтическом режиме, которая начиналась после перевивки опухоли, приводила только к торможению роста меланомы B16-F10 и лимфомы E.G7-OVA. Это подтверждает идею, что противоопухолевые вакцины наиболее эффективны при минимальной опухолевой нагрузке и их нужно применять после удаления опухоли для предотвращения рецидива [5, 8].

Обнаружено, что при одиночном применении Ридостин Про сильнее тормозил рост опухоли, по сравнению с Poly(I:C). Также при применении с пептидами в терапевтическом режиме вакцина с Ридостином Про оказалась немного эффективнее, чем с Poly(I:C).

Это коррелирует с литературными данными [14, 59], полученными при исследовании неоантигенных пептидных вакцин на модели меланомы B16-F10: включение Ридостина Про в качестве адъюванта в состав нескольких моделей пептидной неоантигенной вакцины с разными пептидами показало, что он более эффективно усиливает иммуногенность пептидов, чем Poly(I:C), а неоантигенная вакцина с адъювантом Ридостин Про замедляла рост меланомы B16-F10 и увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей с опухолями.

Предполагается, что более высокая, чем у Poly(I:C) иммуностимулирующая активность Ридостина Про связана с тем, что он помимо двухцепочечной РНК содержит и одноцепочечную РНК, что допускает вовлечение в иммунный ответ не только TLR3, но и TLR7 и TLR8 [207].

ВЫВОДЫ

1. Poly(I:C) и Ридостин Про показали более высокую эффективность в усилении продукции IFN- γ по сравнению с полным адьювантом Фрейнда (198 ± 102 IFN- γ -продуцирующих продуцирующих клеток для Poly(I:C) и 140 ± 25 для Ридостин Про против 69 ± 28 для полного адьюванта Фрейнда).

2. Ридостин Про и Poly(I:C) статистически значимо усиливали иммуногенность пептида TRP2 и Овальбумина ($p < 0,01$ для Ридостина и $p < 0,05$ для Poly(I:C) по сравнению с контролем). Ридостин Про и Poly(I:C) статистически значимо усиливали иммуногенность неоантигенных пептидов ($p < 0,05$).

3. Через 24 ч после иммунизации Ридостин Про и Poly(I:C) снижали количество NK-, Т-клеток и эффекторных Т-клеток памяти, увеличивали количество наивных Т-клеток и В-клеток. Ридостин Про значительно сильнее повышал количество маркера CD69 на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках по сравнению с Poly(I:C) ($p < 0,01$).

4. Ридостин Про через 6 ч после введения более эффективно, чем с Poly(I:C), увеличивал концентрацию цитокинов IL-12p70, TNF, IFN- γ , MCP-1, IL-10 и IL-6 в сыворотке крови иммунизированных мышей. Через 24 ч концентрации цитокинов возвращались к контрольным значениям, кроме TNF и MCP-1 в группе Ридостина Про ($p < 0,01$) и MCP-1 в группе Poly(I:C) ($p < 0,05$).

5. При применении в монорежиме Ридостин Про и Poly(I:C) статистически значимо тормозили рост опухоли ($p < 0,01$) и увеличивали продолжительность жизни мышей.

6. Вакцинация адьювантами с TRP2 для меланомы B16-F10 и адьювантами с овальбумином для лимфомы E.G7-OVA в терапевтическом режиме, приводила только к торможению роста опухоли ($p < 0,05$).

7. Вакцинация мышей адьювантами с TRP2 для меланомы B16-F10 и адьювантами с овальбумином для лимфомы E.G7-OVA в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме предотвращала образование опухоли.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В состав пептидных противоопухолевых вакцин для усиления иммуногенности и противоопухолевой эффективности рекомендуется включение адьюванта Ридостина Про, который способствует активации клеточного иммунного ответа и повышению продукции цитокинов.

2. Оценку иммуногенности потенциальных адьювантов рекомендуется проводить с использованием методов, таких как ELISpot для измерения продукции IFN- γ , мультиплексный анализ для определения уровня цитокинов и проточная цитометрия для анализа иммунных клеток. Эти методы позволяют точно оценить эффективность адьюванта в стимуляции иммунного ответа.

3. Рекомендуется использовать Ридостин Про в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме вакцинации для достижения максимальной противоопухолевой эффективности. Этот подход предотвращает развитие опухоли и тормозит её рост у экспериментальных животных, что делает его перспективным для дальнейших клинических исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПК – антиген-презентирующие клетки

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИЛ (IL) – Интерлейкин

ИФН – Интерферон

ЛНЧ – липидные наночастицы

ОАА – Опухолеассоциированные антигены

ОСА – Опухолеспецифические антигены

РНК – Рибонуклеиновая кислота

ТРО – торможение роста опухоли

ТЭС – телячьей эмбриональной сыворотки

УПЖ – Увеличение продолжительности жизни

ЦТЛ-цитотоксические Т-лимфоциты

CLRs – C-type lectin receptors

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

DAMPs – danger-associated molecular patterns

ELISpot – Enzyme-Linked ImmunoSpot

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

INF – interferon (интерферон)

IRF – interferon regulating factor (регуляторный фактор интерферонов)

MDA – melanoma differentiation-associated protein

MHC I – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

ODN – Oligonucleotide (олигодинуклеотид)

OVA – Ovalbumin

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns

PD-1 – Programmed cell death 1

PLGA – poly(lactic-co-glycolic) поли(молочно-гликолевая кислота)

Poly(I:C) – Polyribonucleosinic – polyribocytidylic acid

PRRs – pattern recognition receptors

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

Th – Т-хелперы

Tn – наивные Т-клетки

Tem – Т-клетки эффекторной памяти

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

TRP2 – Tyrosinase-related protein-2

WES – Whole Exome Sequencing (полноэкзомное секвенирование)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышникова, М. А. Адъюванты в вакцинотерапии опухолей. / М. А. Барышникова, В. С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 4. – С. 36-44.
2. Барышникова, М. А. Неоантигены в иммунотерапии опухолей / М. А. Барышникова, Е. Н. Кособокова, В. С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т.17. – №2. – Р. 6–14.
3. Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей. / А. В. Пономарев, А. А. Рудакова, З. А. Соколова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20. – № 4. – С. 51-58.
4. Двуспиральные РНК — перспективные адъюванты для повышения иммуногенности вакцин. / О. Н. Каплина, С. Г. Гамалей, О. С. Иванова, Е. Д. Даниленко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. – № 6. – С. 661–668.
5. Изучение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъювантов, усиливающих иммуногенность противоопухолевой вакцины. / А. В. Пономарев, П. В. Царапаев, М. А. Барышникова [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2024 – Т.23. – №3. – С. 86-99
6. Изучение эффективности Ридостина при экспериментальной форме тяжёлого острого респираторного синдрома. / С. Я. Логинова, В. Н. Щукина, С. В. Борисевич [и др.] // Антибиотики и Химиотерапия. – 2019. – Т. 64. – № 11-12. – С. 31-34.
7. Исследование клинической эффективности препарата Ридостин Про при лечении гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций. / С. В. Усова, Е. Д. Даниленко, М. П. Богрянцева [и др.] // ИммуноБиоТех, 13-14 сентября 2021: Сб. статей конференции. – Томск, 2021.
8. Исследование препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) в качестве адъювантов для противоопухолевой вакцины на модели E.G7-OVA. / П. В.

Царапаев, М. А. Барышникова, А. В. Пономарев [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2024. – Т. 23. – № 2. – С. 78-84.

9. Косоруков, В.С. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей / В. С. Косоруков, М. А. Барышникова, Е. Н. Кособокова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т.18. – № 3. – С. 23–30

10. Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. / А. А. Рудакова, М. А. Барышникова, З. А. Соколова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2021. – Т. 20. – № 2. – С. 61-68.

11. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. / М. А. Барышникова, А. А. Рудакова, З. С. Соколова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т. 18. – № 4. – С. 76-81.

12. Применение Ридостина как иммунокорректора в лечении острого панкреатита. / Д. П. Назаренко, А. И. Конопля, Т. Н. Анишева [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2005. – № 2. – С. 68.

13. Ридостин как иммунокорректор нарушений иммунного статуса у больных хроническим сальпингоофоритом. / С. В. Петров, М. Г. Газазян, А. И. Конопля [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 7. – С. 43.

14. Сравнение Ридостина Про и Poly(I;C) в качестве адьюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. / М. А. Барышникова, А. В. Пономарев, А. А. Рудакова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2022. – Т. 21. – № 3. – С. 82-89.

15. Филиппенко, Н.Г. Построение клинического алгоритма лечения урогенитальных инфекций на основе использования иммуномодулирующей терапии. / Н. Г. Филиппенко, Л. В. Иванова // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2003. – Т. 6. – № 2. – С. 27-30.

16. A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro

/ H. Navabi, B. Jasani, A. Reece [et all.] // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – № 1. – P. 107–115.

17. A Modified Polyriboinosinic-Polyribocytidylic Acid Complex That Induces Interferon in Primates / H.B. Levy, G. Baer, S. Baron [et all.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1975. – Vol. 132. – № 4. – P. 434-439.

18. A Multipeptide Vaccine Plus Toll-Like Receptor Agonists LPS or PolyICLC in Combination with Incomplete Freund's Adjuvant in Melanoma Patients / M. Melssen, G.R. Petroni, K.A. Chianese-Bullock [et all.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 163.

19. A neoantigen-based peptide vaccine for patients with advanced pancreatic cancer refractory to standard treatment / Z. Chen, S. Zhang, N. Han [et all.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 691605.

20. A pan-cancer clinical study of personalized neoantigen vaccine monotherapy in treating patients with various types of advanced solid tumors / Y. Fang, F. Mo, J. Shou [et all.] // *Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 26. – № 17. – P. 4511–4520.

21. A phase 1 study of NY-ESO-1 vaccine + anti-CTLA4 antibody Ipilimumab (IPI) in patients with unresectable or metastatic melanoma / C. L. Slingluff, H. M. Zarour, H. A. Tawbi [et all.] // *Oncoimmunology*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – Article 1898105.

22. A Phase Ib Trial of Personalized Neoantigen Therapy Plus Anti-PD-1 in Patients with Advanced Melanoma, Non-small Cell Lung Cancer, or Bladder Cancer / P.A. Ott, S. Hu-Lieskovan, B. Chmielowski [et all.] // *Cell*. – 2020. – Vol. 183. – № 2. – P. 347–362.e24

23. A Phase I-II Trial of Multiple-Dose Polyriboinosinic-Polyribocytidylic Acid in Patients with Leukemia or Solid Tumors / R.A. Robinson, V.T. DeVita, H.B. Levy [et all.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1976. – Vol. 57. – № 3. – P. 599-602.

24. A self-assembling peptide acting as an immune adjuvant / J.S. Rudra, Y.F. Tian, J.P. Jung, J.H. Collier // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2010. – Vol. 107. – № 2. – P. 622–627.

25. A TLR3-Specific Adjuvant Relieves Innate Resistance to PD-L1 Blockade without Cytokine Toxicity in Tumor Vaccine Immunotherapy / Y. Takeda, K. Kataoka, J. Yamagishi [et all.] // *Cell Reports*. – 2017. – Vol. 19. – № 9. – P. 1874–1887.
26. A7RC peptide modified paclitaxel liposomes dually target breast cancer / J. Cao, R. Wang, N. Gao [et all.] // *Biomaterials Science*. – 2015. – Vol. 3. – № 12. – P. 1545–1554.
27. Actively Personalized Vaccination Trial for Newly Diagnosed Glioblastoma / N. Hilf, S. Kuttruff-Coqui, K. Frenzel [et all.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 565. – № 7738. – P. 240-245.
28. Adjuvants that improve the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells enhance tumor immunity / R. Perret, S.R. Sierro, N.K. Botelho [et all.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 22. – P. 6597–6608.
29. Advances in Therapeutic Cancer Vaccines / K. K. Wong, W. A. Li, D. J. Mooney [et all.] // *Advances in Immunology*. – 2016. – № 1. – Vol. 130. – P. 191-249.
30. An empirical antigen selection method identifies neoantigens that either elicit broad antitumor T-cell responses or drive tumor growth. / H. Lam, L.K. McNeil, H. Starobinets [et all.] // *Cancer Discov*. – 2021. – Vol. 11. – № 3. – P. 696-713.
31. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma / P.A. Ott, Z. Hu, D.B. Keskin [et all.] // *Nature*. – 2017. – Vol. 547. – № 7662. – P. 217–221.
32. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma / U. Sahin, P. Oehm, E. Derhovanessian [et all.] // *Nature*. – 2020. – Vol. 585. – № 7823. – P. 107–112.
33. Analysis of apoptosis of memory T cells and dendritic cells during the early stages of viral infection or exposure to toll-like receptor agonists / K. Bahl, A. Hübner, R.J. Davis [et all.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – № 10. – P. 4866-4877.
34. Autoimmunity-Related Risk Variants in PTPN22 and CTLA4 Are Associated With ME/CFS With Infectious Onset / S. Steiner, S.C. Becker, J. Hartwig [et all.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 578.

35. Bachmann, M. F. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns / M. F. Bachmann, G. T. Jennings // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – № 11. – P. 787-796.
36. Bardhan, K. The PD1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation / K. Bardhan, T. Anagnostou, V. A Boussiotis // *Frontiers in Immunology.* – 2016. – Vol. 7. – Article 550
37. Becker, S. M. Local temperature rises influence in vivo electroporation pore development: a numerical stratum corneum lipid phase transition model / S. M. Becker, A. V. Kuznetsov // *JBiomech Eng.* – 2007. – Vol. 129. – № 5. – P. 712-721.
38. Best practices for bioinformatic characterization of neoantigens for clinical utility / M. M. Richters, H. Xia, K. M. Campbell [et all.] // *Genome Med.* – 2019. – Vol. 11. – № 1. – Article 56.
39. Billiau, A. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases / A. Billiau, P. Matthys // *Journal of Leukocyte Biology.* – 2001. – Vol. 70. – № 6. – P. 849-860.
40. Blass, E. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines / E. Blass, P. A. Ott // *Nature Reviews Clinical Oncology.* – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 215-229.
41. Brahmer, J. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer / J. Brahmer, K. L. Reckamp, P. Baas [et all.] // *The New England Journal of Medicine.* – 2015. – Vol. 373. – № 2. – P. 123-135.
42. Breast Prosthesis Syndrome: Pathophysiology and Management Algorithm / M.-I. Caravantes-Cortes, E. Roldan-Valadez, R.-D. Zwojewski-Martinez [et all.] // *Aesthetic Surgery Journal.* – 2020. – Vol. 44. – № 5. – P. 1423-1437.
43. Brewer, J. M. (How) do aluminium adjuvants work? / J. M. Brewer // *Immunol. Lett.* – 2006. – Vol. 102. – № 1. – P. 10-5.
44. Brown, G.D. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor / G.D. Brown // *Nature Reviews Immunology.* – 2006. – Vol. 6. – № 1. – P. 33-43.
45. Butterfield, L. H. Cancer vaccines / L. H. Butterfield // *BMJ.* – 2015. – Vol. 350. – Article h988.

46. Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress / J. Liu, M. Fu, M. Wang [et all.] // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2022. – Vol. 15. – № 1. – Article 28
47. Cancer vaccines, adjuvants, and delivery systems / S. J. Paston, V. A. Brentville, P. Symonds [et all.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – Article 627932.
48. CD69 Acts Downstream of Interferon-Alpha/Beta to Inhibit S1P1 and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs / L. R. Shiow, D. B. Rosen, N. Brdicková [et all.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 440. – № 7083. – P. 540-544.
49. CD69 Regulates Type I IFN-Induced Tolerogenic Signals to Mucosal CD4 T Cells That Attenuate Their Colitogenic Potential / K. Radulovic, C. Manta, V. Rossini [et all.] // *J. Immunol.* – 2012. – Vol. 188. – № 4. – P. 2001-2013.
50. CD8+ CTL priming by exact peptide epitopes in incomplete Freund's adjuvant induces a vanishing CTL response, whereas long peptides induce sustained CTL reactivity / M. S. Bijker, S. J. F. van den Eeden, K. L. Franken [et all.] // *The Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 179. – № 8. – P. 5033-5040.
51. cGAS-STING pathway in cancer biotherapy / Y. Wang, J. Luo, A. Alu, [et all.] // *Molecular Cancer*. – 2020. – Vol. 19. – № 1. – P. 136.
52. Chang, K. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers / K. Chang, I. Pastan, M. C. Willingham // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Vol. 93. – № 1. – P. 136-140.
53. Chapel, H.M. Report of Nine Cases of Accidental Injury to Man with Freund's Complete Adjuvant / H.M. Chapel, P.J. August // *Journal of the American Medical Association*. – 1976. – Vol. 24. – № 3. – P. 538–541.
54. Christen, U. Pathogen infection and autoimmune disease / U. Christen // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2019. – Vol. 195. – № 1. – P. 10–14.
55. Cibrián, D. CD69: From Activation Marker to Metabolic Gatekeeper / D. Cibrián, F. Sánchez-Madrid // *Eur. J. Immunol.* – 2017. – Vol. 47. – № 6. – P. 946-953.

56. Clinical Trial Results of the HER-2/neu (E75) Vaccine to Prevent Breast Cancer Recurrence in High-Risk Patients: From US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02 / E.A. Mittendorf, G.T. Clifton, J.P. Holmes [et all.] // *Cancer*. – 2012. – Vol. 118. – № 10. – P. 2594-2602.

57. Combination treatment of radiofrequency ablation and peptide neoantigen vaccination: Promising modality for future cancer immunotherapy / J. Shou, F. Mo, S. Zhang [et all.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13. – Article 1000681.

58. Combined Adjuvants of Poly(I:C) Plus LAG-3-Ig Improve Antitumor Effects of Tumor-Specific T Cells, Preventing Their Exhaustion / Y. Kano, T. Iguchi, H. Matsui [et all.] // *Cancer Science*. – 2016. – Vol. 107. – № 4. – P. 398–406.

59. Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine / Baryshnikova M.A., Ponomarev A.V., Rudakova A.A., Z. A. Sokolova // *Russian Journal of Biotherapy* – 2022 – Vol. 21. – № 3 – P. 82-89

60. Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe / C. Trimble, C.-T. Lin, C.-F. Hung [et all.] // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – № 25-26. – P. 4036-4042.

61. Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer / M. L. Disis, D. R. Wallace, T. A. Gooley [et all.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 28. – P. 4685-4692.

62. Conserved pan-cancer microenvironment subtypes predict response to immunotherapy / A. Bagaev, N. Kotlov, K. Nomie [et all.] // *Cancer Cell*. – 2021. – Vol. 39. – № 6. – P. 845-865.

63. Corrales, L. Extremely potent immunotherapeutic activity of a STING agonist in the B16 melanoma model in vivo / L. Corrales, S.-R. Woo, T.F. Gajewski // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2013. – Vol. 1. – № 1. – Article 15.

64. Curtsinger, J.M. Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation / J.M. Curtsinger, M.F. Mescher // *Current Opinion in Immunology*. – 2010. – Vol. 22. – № 3. – P. 333–340.

65. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo / M. Matsumoto, M. Tatematsu, F. Nishikawa [et all.] // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 6280.

66. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation / R. A. Rosalia, E. D. Quakkelaar, A. Redeker [et all.] // *European Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 43. – № 10. – P. 2554-2565.

67. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant / M.P. Longhi, C. Trumfheller, J. Idoyaga [et all.] // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2009. – Vol. 206. – № 7. – P. 1589–1602

68. Designing Therapeutic Cancer Vaccines by Mimicking Viral Infections / H. Sultan, V.I. Fesenkova, D. Addis [et all.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 66. – № 2. – P. 203-213.

69. Desmet, C.J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination / C.J. Desmet, K.J. Ishii // *Nature Reviews Immunology*. – 2012. – Vol. 12. – № 7. – P. 479–491.

70. Detection of neoantigen-specific T cells following a personalized vaccine in a patient with glioblastoma / T. M. Johanns, C. A. Miller, C. J. Liu [et all.] // *Journal of Immunotherapy*. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – Article e1561106.

71. Diamond, M.S. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors / M.S. Diamond, M. Kinder, H. Matsushita, [et all.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011 Sep 26. – Vol. 208. – № 10. – P. 1989–2003.

72. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity / T. Marichal, K. Ohata, D. Bedoret [et all.] // *Nat. Med.* – 2011. – Vol. 17. – № 8. – P. 996-1002.

73. DNA vaccines to attack cancer: Strategies for improving immunogenicity and efficacy / A. Tiptiri-Kourpeti, K. Spyridopoulou, A. Pappa, K. Chlichlia // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2016. – Vol. 165. – № 1-3. – P. 32-49.

74. Dranoff, G. GM-CSF-based cancer vaccines / G. Dranoff // *Immunology*. – 2002. – Vol. 188. – № 1. – P. 147–154.
75. Dual Blockade of PD-1 and CTLA-4 Combined with Tumor Vaccine Effectively Restores T-Cell Rejection Function in Tumors / J. Duraiswamy, K.M. Kaluza, G.J. Freeman [et all.] // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – № 12. – P. 3591-3603
76. Dubensky, T.W. Rationale, progress and development of vaccines utilizing STING-activating cyclic dinucleotide adjuvants / T.W. Dubensky, Jr, D.B. Kanne, M.L. Leong // *Therapeutic Advances in Vaccines*. – 2013 Nov. – Vol. 1. – №. 4. – P. 131–143.
77. Effect of Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor on Circulating CD8+ and CD4+ T-Cell Responses to a Multi-peptide Melanoma Vaccine: Outcome of a Multicenter Randomized Trial / C.L. Slingluff Jr, G.R. Petroni, W.C. Olson [et all.] // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15. – № 22. – P. 7036-7044
78. Effects of interleukin-12 on the immune response to a multi-peptide vaccine for resected metastatic melanoma / P. Lee, F. Wang, J. Kuniyoshi [et all.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2001. – Vol. 19. – № 18. – P. 3836–3847.
79. Electroporation of skeletal muscle induces danger signal release and antigen-presenting cell recruitment independently of DNA vaccine administration / P. Chiarella, E. Massi, M. De Robertis [et all.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2008. – Vol. 8. – № 11. – P. 1645-1657.
80. Engel, A.L. The pharmacokinetics of Toll-like receptor agonists and the impact on the immune system / A.L. Engel, G.E. Holt, H. Lu // *Expert Review of Clinical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 4. – №. 2. – P. 275–289.–1026.e11.
81. Enhanced Antitumor Immunity in Mice Deficient in CD69 / E. Esplugues, D. Sancho, J. Vega-Ramos [et all.] // *J. Exp. Med.* – 2003. – Vol. 197. – № 9. – P. 1093-1106.
82. Enhancing humoral responses against HIV envelope trimers via nanoparticle delivery with stabilized synthetic liposomes / T. Tokatlian, D. W. Kulp, A. A. Mutafyan [et all.] // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – № 1. – Article 16527.
83. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. / J.C. Castle, S. Kreiter, J. Diekmann [et all.] // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72. – № 5. – P. 1081-1091.

84. Fidler, I.J. Selection of successive tumour lines for metastasis / I.J. Fidler // *Nature: New biology*. – 1973. – Vol. 242. – P.148–149.
85. Geier, D.A. A Case-Control Study of Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine-Associated Autoimmune Adverse Events / D.A. Geier, M.R. Geier // *Lupus*. – 2015. – Vol. 34. – № 7. – P. 1225–1231.
86. Geijtenbeek, T.B.H. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation / T.B.H. Geijtenbeek, S.I. Gringhuis // *Nature Reviews Immunology*. – 2016. – Vol. 16. – № 7. – P. 433–448.
87. Gene Gun Her2/neu DNA Vaccination: Evaluation of Vaccine Efficacy in a Syngeneic Her2/neu Mouse Tumor Model / T. Nguyen-Hoai, O. Hohn, A. Pezzutto, J. Westermann // *Methods Mol Biol*. – 2022. – Vol. 2521. – № 3. – P. 129-154.
88. Gouttefangeas, C. Personalized Cancer Vaccines: Adjuvants Are Important, Too / C. Gouttefangeas, H.-G. Rammensee // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2018. – Vol. 67. – № 12. – P. 1911–1918.
89. Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor Added to a Multi-peptide Vaccine for Resected Stage II Melanoma / J. Weber, V.K. Sondak, R. Scotland [et al.] // *Cancer*. – 2003. – Vol. 97. – № 1. – P. 186-200.
90. Guidelines for the Use of Flow Cytometry and Cell Sorting in Immunological Studies (Second Edition) / A. Cossarizza, H.-D. Chang, A. Radbruch [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2019. – Vol. 49. – № 10. – P. 1457-1973
91. Hennessy, E.J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? / E.J. Hennessy, A.E. Parker, L.A.J. O'Neill // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2010. – Vol. 9. – № 4. – P. 293–307.
92. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells / P. Serafini, R. Carbley, K.A. Noonan [et al.] // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 17. – P. 6337–6343.
93. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. / T. Walzer, M. Bléry, J. Chaix [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – Vol. 104. – № 9. – P. 3384-3389.

94. IL-17 and Th17 Cells / T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka [et all.] // *Annual Review of Immunology*. – 2009. – Vol. 27. – № 1. – P. 485–517.

95. Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery / L.L. Thomsen, P. Topley, M.G. Daly [et all.] // *Vaccine*. – 2004. – Vol. 22. – № 13-14. – P. 1799–1809.

96. Immune response to human papillomavirus one year after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: HPV-specific IgG and IgA antibodies in the circulation and the cervix / A.P. Costa, A.K. Gonçalves, P.R.L. Machado [et all.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2018. – Vol. 19. – № 8. – P. 2313–2317.

97. Immunity to tumour antigens / G. Li, S. A. Ali, S. E. B. McArdle [et all.] // *Current Cancer Drug Targets*. – 2005. – Vol. 11. – № 27. – P. 3501-3509.

98. Importance of MUC1 and spontaneous mouse tumor models for understanding the immunobiology of human adenocarcinomas / O. J. Finn, K. R. Gantt, A. J. Lepisto [et all.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2011. – Vol. 50. – № 2-3. – P. 261-268.

99. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma / F. S. Hodi, S. J. O'Day, D. F. McDermott [et all.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 363. – № 8. – P. 711-723.

100. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes / A.K. Field, A.A. Tytell, G.P. Lampson, M.R. Hilleman // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1967. – Vol. 58. – № 3. – P. 1004–1010.

101. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA / S.S. Diebold, T. Kaisho, H. Hemmi [et all.] // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – No. 5663. – P. 1529–1531.

102. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells / P. Pires, S. Simoes, S. Nir [et all.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 1999. – Vol. 1418. – № 1. – P. 71–84.

103. Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure / S. Okahira, F. Nishikawa, S. Nishikawa [et all.] // *DNA and Cell Biology*. – 2005. – Vol. 24. – № 10. – P. 614–623.

104. Intradermal delivery of TLR agonists in a human explant skin model: preferential activation of migratory dendritic cells by polyribosinic-polyribocytidylic acid and peptidoglycans / D. Oosterhoff, M. Heusinkveld, S.M. Loughheed [et all.] // *The Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 190. – № 7. – P. 3338–3345.

105. Is the “3+3” dose-escalation Phase I clinical trial design suitable for therapeutic cancer vaccine development? A recommendation for alternative design / O. E. Rahma, E. Gammoh, R. M. Simon, S. N. Khleif // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20. – № 18. – P. 4758-4767.

106. Janeway Jr, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology / C. A. Janeway Jr. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 1989. – Vol. 54. – P. 1-13.

107. Kasumba, D.M. Therapeutic Targeting of RIG-I and MDA5 Might Not Lead to the Same Rome / D.M. Kasumba, N. Grandvaux // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2019. – Vol. 40. – № 2. – P. 116–127.

108. Kawai, T. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors / T. Kawai, S. Akira // *Nature Immunology*. – 2010. – Vol. 11. – №. 5. – P. 373–384.

109. Kim, H. Combined Stimulation of IL-2 and 4-1BB Receptors Augments the Antitumor Activity of E7 DNA Vaccines by Increasing Ag-Specific CTL Responses / H. Kim, B. Kwon, J.-I. Sin // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 12. – P. e83765.

110. Komal, A. TLR3 Agonists: RGC100, ARNAX, and Poly-IC: A Comparative Review / A. Komal, M. Noreen, A. F. El-Kott // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 69. – № 4. – P. 312–322.

111. Lepenies, B. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands / B. Lepenies, J. Lee, S. Sonkaria // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Vol. 65. – № 9. – P. 1271–1281.

112. Levine, A.S. Phase I-II Trials of Poly IC Stabilized with Poly-L-Lysine / A.S. Levine, H.B. Levy // *The Journal of Immunology*. – 1978. – Vol. 62. – № 11. – P. 1907-1912.
113. Li, Y.-Z. Recent advances in primary resistance mechanisms against immune checkpoint inhibitors / Y.-Z. Li, H.-M. Zhang // *Current Opinion in Oncology*. – 2022. – Vol. 34. – № 1. – P. 95-106.
114. Linneberg, A. Allergen-Specific Immunotherapy and Risk of Autoimmune Disease / A. Linneberg, F. Madsen, T. Skaaby // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2012. – Vol. 12. – № 6. – P. 635–639.
115. Liu, S. Mitochondrial DNA sensing by STING signaling participates in inflammation, cancer and beyond / S. Liu, M. Feng, W. Guan // *International Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 139. – № 4. – P. 736–741.
116. Lloyd, J. E. The use of adjuvants in studies on influenza immunization. I. Measurements in monkeys of the dimensions of antigenicity of virus-mineral oil emulsions / J. E. Lloyd, A. R. Hickey // *Journal of Experimental Medicine*. – 1952. – Vol. 95. – № 5. – P. 429-447.
117. Lopes, A. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives / A. Lopes, G. Vandermeulen, V. Pr at // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 38. – № 1. – Article 146.
118. Luchner, M. TLR Agonists as Vaccine Adjuvants Targeting Cancer and Infectious Diseases / M. Luchner, S. Reinke, A. Milicic // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 142.
119. MAGE-A1-, MAGE-A10-, and gp100-Derived Peptides Are Immunogenic When Combined with Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Montanide ISA-51 Adjuvant and Administered as Part of a Multi-peptide Vaccine for Melanoma / K.A. Chianese-Bullock, J. Pressley, C. Garbee [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 174. – № 5. – P. 3080–3086.
120. Mandal, D. Self-assembly of peptides to nanostructures / D. Mandal, A. Nasrolahi Shirazi, K. Parang // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2014. – Vol. 12. – № 22. – P. 3544–3561.

121. Martins, K.A.O. Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives / K.A.O. Martins, S. Bavari, A.M. Salazar // *Expert Review of Vaccines*. – 2015. – Vol. 14. – № 3. – P.447–459.

122. Mass spectrometry profiling of HLA-associated peptidomes in mono-allelic cells enables more accurate epitope prediction / J. G. Abelin, D. B. Keskin, S. Sarkizova [et all.] // *Immunity*. – 2017. – Vol. 46. – № 2. – P. 315-326.

123. Mellman, I. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines / I. Mellman, R. M. Steinman. // *Cell*. – 2001. – Vol. 106. – № 3. – P. 255-258.

124. MF59 Formulated with CpG ODN as a Potent Adjuvant of Recombinant HSP65-MUC1 for Inducing Anti-MUC1+ Tumor Immunity in Mice / M. Yang, Y. Yan, M. Fang [et all.] // *International Immunopharmacology*. – 2012. – Vol. 13. – № 4. – P. 408–416.

125. Miller, L.H. Revisiting Freund's Incomplete Adjuvant for Vaccines in the Developing World / L.H. Miller, A. Saul, S. Mahanty // *Pharmaceutical Technology*. – 2005. – Vol. 21. – № 9. – P. 412–414.

126. Monophosphoryl lipid A-assembled nanovaccines enhance tumor immunotherapy / R. Li, Y. Hao, W. Pan [et all.]// *Acta Biomaterialia*. – 2023. – Vol. 171. – № 2. – P. 482–494.

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

128. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma / J. M. Zaretsky, A. Garcia-Diaz, D. S. Shin [et all.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 375. – № 9. – P. 819-829.

129. Nanoparticulate STING agonists are potent lymph node-targeted vaccine adjuvants / M.C. Hanson, M.P. Crespo, W. Abraham [et all.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2015 Jun. – Vol. 125. – № 6. – P. 2532–2546.

130. Nanotechnology inspired tools for mitochondrial dysfunction related diseases / R. Wen, B. Banik, R. K. Pathak [et all.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 99. – № A. – P. 52–69.

131. Nauts, H. C. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination selected for special study / H. C. Nauts, G. A. Fowler, F. H. Bogatko // *Cancer Research*. – 1953. – Vol. 145. – № 276. – P. 1-103.

132. Neoantigen vaccine: an emerging tumor immunotherapy / M. Peng, Y. Mo, Y. Wang [et all.] // *Molecular Cancer*. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – Article 128.

133. NF- κ B signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo [et all.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2017. – Vol. 2. – № 1. – P. 17023.

134. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma / R. J. Motzer, B. Escudier, D. F. McDermott [et all.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2015. - Vol. 373. – № 19. – P. 1803-1813.

135. No authors listed. The problem with neoantigen prediction. // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – № 2. – P. 97.

136. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation / R. Cooney, J. Baker, O. Brain [et all.] // *Nature Medicine*. – 2010 Jan. – Vol. 16. – № 1. – P. 90–97.

137. NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in human eosinophils: activation by NOD1 and NOD2 agonists / A. Månsson Kvarnhammar, T. Petterson, L.-O. Cardell [et all.] // *Immunology*. – 2011 Nov. – Vol. 134. – № 3. – P. 314–325.

138. Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer. / S. Feyerabend, S. Stevanovic, C. Gouttefangeas [et all.] // *Prostate*. – 2009. – Vol. 69. – № 9. – P. 917-927

139. Novel vaccine delivery system induces robust humoral and cellular immune responses based on multiple mechanisms / Y.-Q. Wang, J. Wu, Q.-Z. Fan [et all.] // *Adv Health Mater*. – 2014. – Vol. 3. – № 5. – P. 670-681.

140. O'Hagan, D. T. The continued advance of vaccine adjuvants - 'we can work it out' / D. T. O'Hagan, R. N. Lodaya, G. Lofano. // *Semin. Immunol.* – 2020. – Vol. 50. – № 7. – Article 101426.

141. O'Neill, L.A.J. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. / L.A.J. O'Neill, D. Golenbock, A.G. Bowie // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – № 6. – P. 453-460.

142. Opposite Immune Functions of GM-CSF Administered as Vaccine Adjuvant in Cancer Patients / G. Parmiani, C. Castelli, L. Pilla [et all.] // *Annals of Oncology.* – 2007. – Vol. 18. – № 2. – P. 226-232.

143. Pathogen molecular pattern receptor agonists: treating cancer by mimicking infection / M. Aleynick, J. Svensson-Arvelund, C.R. Flowers [et all.] // *Clinical Cancer Research.* – 2019. – Vol. 25. – № 21. – P. 6283–6294.

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

145. PD-L1 / A. Kythreotou, A. Siddique, F. A Mauri [et all.] // *Journal of Clinical Pathology.* – 2018. – Vol. 71. – № 3. – P. 189-194.

146. Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma / Z. Hu, D.E. Leet, R.L. Allesøe [et all.] // *Nature Reviews Immunology.* – 2021. – Vol. 27. – № 3. – P. 515–525.

147. Personalized neoantigen vaccine NEO-PV-01 with chemotherapy and Anti-PD-1 as First-Line Treatment for Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer / M.M. Awad, R. Govindan, K.N. Balogh [et all.] // *Cancer Cell.* – 2022. – Vol. 40. – № 9. – P. 1010-1026.e11.

148. Personalized neoantigen vaccine prevents postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients with vascular invasion / Z. Cai, X. Su, L. Qiu [et all.] // *Molecular Cancer.* – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 164.

149. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer / U. Sahin, E. Derhovanessian, M. Miller [et all.] // *Nature.* – 2017. – Vol. 547. – № 7662. – P. 222-226.

150. Phase I Trial of Overlapping Long Peptides from a Tumor Self-Antigen and Poly-ICLC Shows Rapid Induction of Integrated Immune Response in Ovarian Cancer Patients / P. Sabbatini, T. Tsuji, L. Ferran [et all.] // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18. – № 23. – P. 6497-6508.

151. Phase II Randomized Controlled Trial of an Epidermal Growth Factor Vaccine in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer / E. Neningen Vinageras, A. de la Torre, M. Osorio Rodríguez [et all.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2008. – Vol. 26. – № 9. – P. 1452–1458.

152. Phosphoinositide interactions position cGAS at the plasma membrane to ensure efficient distinction between self- and viral DNA / K.C. Barnett, J.M. Coronas-Serna, W. Zhou [et all.] // *Cell*. – 2019. – Vol. 176. – № 6. – P. 1432-1446.e11.

153. Pollard, A. J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments / A. J. Pollard, E. M. Bijker // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – Vol. 21. – № 2. – P. 83-100.

154. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs / R. Ammi, J. De Waele, Y. Willemen [et all.] // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – Vol. 146. – №. 2. – P. 120–131.

155. Preliminary Clinical Study of Personalized Neoantigen Vaccine Therapy for Microsatellite Stability (MSS)-Advanced Colorectal Cancer / Y.-J. Yu, N. Shan, L.-Y. Li [et all.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2023. – Vol. 72. – № 7. – P. 2045–2056.

156. Pulendran, B. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors / B. Pulendran // *Immunological Reviews*. – 2004. – Vol. 199. – P. 227–250.

157. Pulendran, B., Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants / B. Pulendran, P. S. Arunachalam, D. T. O'Hagan // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2021. – Vol. 20. – №. 6. – P. 454-475.

158. Randomized phase II clinical trial of NY-ESO-1 protein vaccine combined with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) in resected esophageal cancer patients / S.

Kageyama, Y. Nagata, T. Ishikawa [et all.] // *Immunotherapy of Cancer*. – 2019. – Vol. 30. – № 5. – Abstract V496

159. Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery / T. X. Nguyen, L. Huang, M. Gauthier [et all.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 11. – № 9. – P. 1169–1185.

160. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors / N.A. Lind, V.E. Rael, K.P. Pestal [et all.] // *Nature Reviews Immunology*. – 2022. – Vol. 22. – № 4. – P. 224–235.

161. Rehwinkel, J. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing / J. Rehwinkel, M.U. Gack // *Nature Reviews Immunology*. – 2020. – Vol. 20. – № 9. – P. 537–551.

162. Reikine, S. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5 / S. Reikine, J.B. Nguyen, Y. Modis // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 342.

163. Roche, P. A. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation / P. A. Roche, K. Furuta // *Nat Rev Immunol*. – 2015. – Vol. 15. – № 4. – P.203-216.

164. Role of Damage-Associated Molecular Pattern/Cell Death Pathways in Vaccine-Induced Immunity. / S.M. Lee, P. Kim, J. You, E.H. Kim // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – № 12. – Article 2340

165. Roudko, V. Computational Prediction and Validation of Tumor-Associated Neoantigens / V. Roudko, B. Greenbaum, N. Bhardwaj // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Article 27.

166. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer / J. Hamanishi, M. Mandai, T. Ikeda [et all.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 33. – № 34. – P. 4015-4022.

167. Sequencing CTLA-4 Blockade with Cell-Based Immunotherapy for Prostate Cancer / S. Wada, C.M. Jackson, K. Yoshimura [et all.] // *J. Transl. Med*. – 2013. – Vol. 11. – P. 89

168. Seya, T. Tumor vaccines with dsRNA adjuvant ARNAX induces antigen-specific tumor shrinkage without cytokinemia / T. Seya, Y. Takeda, M. Matsumoto // *OncoImmunology*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. e1043506.

169. Shoenfeld, Y. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants / Y. Shoenfeld, N. Agmon-Levin // *Journal of Autoimmunity*. – 2011. – Vol. 36. – № 1. – P. 4–8.

170. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING / M.F. Gulen, U. Koch, S.M. Haag [et all.] // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 427.

171. Silicone Breast Implants and the Risk of Autoimmune/Rheumatic Disorders: A Real-World Analysis / A. Watad, V. Rosenberg, S. Tiosano [et all.] // *International Journal of Epidemiology*. – 2018. – Vol. 47. – № 6. – P. 1846–1854.

172. Simple and effective bacterial-based intratumoral cancer immunotherapy / C. S. E. Carroll, E. R. Andrew, L. Malik [et all.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2021. – Vol. 9. – № 9. – Article e002688.

173. Skin electroporation: effects on transgene expression, DNA persistence and local tissue environment / A.-K. Roos, F. Eriksson, J. A. Timmons [et all.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4. – № 9. – Article e7226.

174. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-Like Receptor 7 and 8 / F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein [et all.] // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – № 5663. – P. 1526-1529.

175. Srivastava, P. K. Neoepitopes of cancers: looking back, looking ahead / P. K. Srivastava // *Cancer Immunology Research*. – 2015. – Vol. 3. – № 9. – P. 969-977.

176. Stills Jr, H.F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants / H.F. Stills Jr. // *ILAR Journal*. – 2005. – Vol. 46. – № 3. – P. 280–293.

177. STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer / D. Chandra, W. Quispe-Tintaya, A. Jahangir [et all.] // *Cancer Immunology Research*. – 2014 Sep. – Vol. 2. – № 9. – P. 901–910.

178. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines / H. Liu, K.D. Moynihan, Y. Zheng [et all.] // *Nature*. – 2014. – Vol. 507. – № 7493. – P. 519–522.

179. Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation / M. S. Bijker, S. J. F. van den Eeden, K. L. Franken [et all.] // *European Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 38. – № 4. – P.1033-1042.

180. Synthetic liposomal mimics of biological viruses for the study of immune responses to infection and vaccination / W.-Y. Wholey, J. L. Mueller, C. Tan [et all.] // *Bioconjug Chem*. – 2020. – Vol. 31. – № 3. – P. 685–697.

181. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy / L.M. Kranz, M. Diken, H. Haas [et all.] // *Nature*. – 2016. – Vol. 534. – № 7607. – P. 396-401.

182. Tamoxifen embedded in lipid bilayer improves the oncotarget of liposomal daunorubicin in vivo / M. H. Li, H. Yu, T. F. Wang [et all.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – Vol. 2. – № 12. – P. 1619–1625.

183. Tan, A. C. A quantitative analysis of therapeutic cancer vaccines in phase 2 or phase 3 trial / A. C. Tan, A. Goubier, H. E. Kohrt // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2015. – Vol. 3. – № 1. – Article 48.

184. Tay, R. E. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms / R. E. Tay, E. K. Richardson, H. C. Toh // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2021. – Vol. 28. – № 1. – P. 5-17.

185. Testi, R. T Cell Activation via Leu-23 (CD69) / R. Testi, J.H. Phillips, L.L. Lanier // *J. Immunol*. – 1989. – Vol. 143. – № 4. – P. 1123-1128.

186. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses / W.T. Watford, M. Moriguchi, A. Morinobu [et all.] // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2003. – Vol. 14. – № 5. – P. 361–368.

187. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands / A.L. Kinter, E.J. Godbout, J.P.

McNally [et all.] // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 181. – № 10. – P. 6738-6746.

188. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells / A. Engering, T.B.H. Geijtenbeek, S.J. van Vliet [et all.] // *The Journal of Immunology*. – 2002. – Vol. 168. – № 5. – P. 2118–2126.

189. The vaccine adjuvant alum promotes IL-10 production that suppresses Th1 responses / E. Oleszycka, S. McCluskey, F. A. Sharp [et all.] // *Eur. J. Immunol.* – 2018. – Vol. 48. – № 4. – P. 705-715.

190. Therapeutic cancer vaccines / C. J. M. Melief, T. van Hall, R. Arens [et all.] // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – Vol. 125. – № 9. – P. 3401-3412.

191. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials / I. Melero, G. Gaudernack, W. Gerritsen [et all.] // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 11. – № 9. – P. 509-524.

192. TNF-alpha dominates cytokine mRNA expression in lymphoid tissues of rats developing collagen- and oil-induced arthritis / A. Müssener, L. Klareskog, J. C. Lorentzen [et all.] // *Immunology*. – 1995. – Vol. 42. – № 1. – P. 128-134.

193. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells / O. Schulz, S.S. Diebold, M. Chen [et all.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 433. – № 7028. – P. 887–892.

194. Tomljenovic, L. Mechanisms of Aluminum Adjuvant Toxicity and Autoimmunity in Pediatric Populations / L. Tomljenovic, C.A. Shaw // *Autoimmunity Reviews*. – 2012. – Vol. 21. – № 2. – P. 223–230.

195. Topical Rather Than Intradermal Application of the TLR7 Ligand Imiquimod Leads to Human Dermal Dendritic Cell Maturation and CD8+ T-Cell Cross-Priming / C.M. Fehres, S.C.M. Bruijns, A.J. van Beelen [et all.] // *European Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 44. – № 8. – P. 2415–2424.

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

197. Transplantable Murine Tumors in the Studies of Peptide Antitumor Vaccines / A.V. Ponomarev, I.Z. Shubina, Z.A. Sokolova [et all.] // *Oncology Reviews*. – 2024. – Vol. 17. – Article 12189.

198. Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines / J. Pol, N. Bloy, A. Buqué [et all.] // *OncoImmunology*. – 2015. – Vol. 4. – № 4. – Article e974411.

199. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity / G. Trinchieri // *Nature Reviews Immunology*. – 2003. – Vol. 3. – № 2. – P. 133–146.

200. Turley, J. L. Resolving adjuvant mode of action to enhance vaccine efficacy / J. L. Turley, E. C. Lavelle // *Curr. Opin. Immunol.* – 2022. – Vol. 77. – Article 102229.

201. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants / C. Maisonneuve, S. Bertholet, D.J. Philpott [et all.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 34. – P. 12294–12299.

202. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia / G. G. Kenter, M. J. P. Welters, A. R. P. M. Valentijn [et all.] // *N Engl J Med*. – 2009. – Vol. 361. – № 19. – P. 1838-1847.

203. Vaccination against Oncoproteins of HPV16 for Noninvasive Vulvar/Vaginal Lesions: Lesion Clearance Is Related to the Strength of the T-Cell Response. / M.I.E. van Poelgeest, M.J.P. Welters, R. Vermeij [et all.] // *Clin Cancer Res*. – 2016. – Vol. 22. – № 10. – P. 2342-2350.

204. Vaccination with Synthetic Long Peptide Formulated with CpG in an Oil-in-Water Emulsion Induces Robust E7-Specific CD8 T Cell Responses and TC-1 Tumor Eradication / S.K. Maynard, J.D. Marshall, R.S. MacGill [et all.] // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 540.

205. van Drunen Littel-van den Hurk, S. Electroporation for DNA immunization: clinical application / S. van Drunen Littel-van den Hurk, D. Hannaman // *Expert Review of Vaccines*. – 2010. – Vol. 9. – № 5. – P. 503-517.

206. Van Herck, S. Delivery of STING agonists for adjuvanting subunit vaccines / S. Van Herck, B. Feng, L. Tang // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2021 Dec. – Vol. 179. – P. 114020

207. Vasilakos, J.P. The Use of Toll-Like Receptor 7/8 Agonists as Vaccine Adjuvants / J.P. Vasilakos, M.A. Tomai // *Expert Review of Vaccines*. – 2013. – Vol. 12. – № 7. – P.809-819.
208. Vogel, F. R. A compendium of vaccine adjuvants and excipients / F. R. Vogel, M. F. Powell. // *Vaccine Adjuvants and Excipients*. – 1995. – Vol. 6. – № 1. – P. 141-228
209. Walsh, K. P. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation / K. P. Walsh, K. H. G. Mills // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34, - № 11. – P. 521-530.
210. Watad, A. The ASIA syndrome: basic concepts / A. Watad, K. Sharif, Y. Shoenfeld // *Mediterranean Journal of Rheumatology*. – 2017. – Vol. 28. – № 2. – P. 64–69.
211. Whitehurst, A. W. Cause and consequence of cancer/testis antigen activation in cancer / A. W. Whitehurst // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2014. – Vol. 54. – № 1. – P. 251-272.
212. Xing, Y. T-cell tolerance: central and peripheral / Y. Xing, K. A. Hogquist // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2012. – Vol. 4. – № 6. – Article a006957.