

ЦАРАПАЕВ ПАВЕЛ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**АДЬЮВАНТ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДНОЙ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

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

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Косоруков Вячеслав Станиславович

Официальные оппоненты:

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

Утяшев Игорь Аглямovich, кандидат медицинских наук, директор департамента клинических исследований Института онкологии Хадасса Москва - Филиала компании с ограниченной ответственностью «Хадасса Медикал Лтд».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «02» октября 2025 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

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

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

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

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). Агонисты TLR3, используемые в качестве адъювантов в противоопухолевых вакцинах – полирибоинозиновая-полирибocитидиловая кислота (Polyriboinosinic – polyribocytidylic acid) (poly(I:C)) и ее производные poly-ICLC (Хилтонол, Hiltonol) и роу-IC₁₂U (Амплиген) – синтетические имитаторы полимеров вирусной двуцепочечной РНК со схожим механизмом действия. Эффекты Poly(I:C) на опухолевые и иммунные клетки были подтверждены во многих *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

Ранее в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России 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). 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 адъюванта Фрейнда и выбрать наиболее перспективный адъювант для включения в состав пептидной противоопухолевой вакцины.

2. Изучить изменение иммунофенотипа клеток селезенки мышей, иммунизированных выбранными адъювантами.

3. Изучить цитокиновый профиль сыворотки крови мышей, иммунизированных выбранными адъювантами.

4. Сравнить противоопухолевую эффективность выбранных адъювантов на мышинных моделях меланомы B16-F10 и лимфомы EG7-OVA.

5. Оценить противоопухолевую эффективность вакцин с выбранными адъювантами на мышинных моделях в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме.

6. Оценить противоопухолевую эффективность вакцин с выбранными адъювантами на мышинных моделях в терапевтическом режиме.

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 $p < 0,05$.

Научная новизна

Научная новизна работы заключается в том, что впервые проводится сравнение иммуногенности и противоопухолевой активности таких адъювантов, как Ридостин Про и Poly(I:C), в составе пептидной противоопухолевой вакцины на экспериментальных животных. Впервые было проведено сравнение адъювантов 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 адъюванта, 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 адъювантами, что открывает новые возможности для создания более эффективных противоопухолевых вакцин.

Теоретическая и практическая значимость

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.

Личный вклад

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

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту 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.)».

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 овальбумина, 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 овальбумина 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.

Внедрение результатов исследования

Материалы, полученные в научной работе, используются в научно-практической деятельности научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в исследованиях пептидных противоопухолевых вакцин.

Основные положения научной работы представлены на научных конференциях, включая VIII Всероссийскую конференцию по молекулярной онкологии в 2023 году и VII Всероссийскую конференцию с международным участием в 2022 году, где они были высоко оценены специалистами. Работа также была представлена на ученом совете НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей в июне 2024 года.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 27 декабря 2024 года на 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.

Публикации

Соискатель является автором 21 публикации. Материалы диссертационного исследования изложены в полном объеме в 3 научных статьях в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных результатов исследований.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследований», результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 114 страницах, содержит 11 таблицы и 14 рисунков, список литературы включает 212 источников.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе были использованы адъюванты: Poly(I:C) (Sigma) – синтетический аналог двуцепочечной РНК, состоящий из полиинозиновой и полицитидиловой цепей; полный адъювант Фрейнда (Sigma) – эмульсия 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.

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

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».

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	MQTDTQDHQ_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_ALHMARGLKYLHQEK
g.66708664A>C	Lins1	p.K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLLYFQL
g.7163330C>T	Pcmt1	p.P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPPC
g.77174891A>C	2210408I21Rik	p.D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLLNSFPGDLEFK

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). Для оценки противоопухолевого эффекта адьювантов и адьювантов с пептидами использовали модель меланомы B16-F10 и модель лимфомы E.G7-OVA. Вакцинацию проводили в двух режимах: смешанном (профилактическом/терапевтическом), когда вакцинацию начинали до перевивки опухоли в и в терапевтическом, когда вакцинацию начинали после перевивки опухоли.

Для изучения иммуногенности адьювантов и пептидов применяли метод ELISpot, с использованием набора определения мышинного INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech). Спленоциты мышей инкубировали на протяжении 48 часов в присутствии адьювантов или пептидов, использованных для иммунизации, а также с другими адьювантами и пептидами для анализа специфичности их действия. Результаты ELISpot анализировали на основе количества клеток, продуцирующих INF- γ , где менее 30 спотов в лунке 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. Анализ результатов ELISpot проводили с использованием программного обеспечения Excel и GraphPad Prism 5.0, для сравнения результатов применяли непарный t-тест. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Для оценки иммунофенотипа спленоцитов использовали метод проточной цитометрии. Подсчет клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™ (Becton Dickinson).

Для оценки сывороточных цитокинов использовали набор BD CBA Mouse Inflammation Kit (Catalog No. 552364). Образцы сыворотки крови мышей инкубировали с микрочастицами, покрытыми антителами к цитокинам IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF и IL-12p70. 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).

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.

Для статистического анализа данных проточной цитометрии и оценки противоопухолевого эффекта использовали критерий Манна-Уитни с помощью программы STATISTICA v.7. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования

Иммуногенность адъювантов

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

Таблица 2 – Изменение количества IFN- γ -продуцирующих спленоцитов мышей, ранее иммунизированных соответствующими адъювантами, при стимуляции *in vitro*

Иммунизация <i>in vivo</i>	Стимуляция <i>in vitro</i>	Количество IFN- γ -продуцирующих спленоцитов (M \pm SD)
Полный адъювант Фрейнда	Без стимуляции	23 \pm 22
	Полный адъювант 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 адъюванты усиливали продукцию IFN- γ , но Poly(I:C) и Ридостин Про более эффективно, чем полный адъювант Фрейнда, и мы не использовали полный адъювант Фрейнда в дальнейших исследованиях. Poly(I:C) описан во многих публикациях как адъювант 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 адъювантами.

Иммуногенность пептидной неоантигенной вакцины

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

В качестве адьюванта 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) (Таблица 3).

Таблица 3 – Изменение количества IFN- γ -продуцирующих спленоцитов мышей, ранее иммунизированных неоантигенными пептидами с адьювантами

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

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

Показана специфичность действия пептидов, входящих в состав обеих моделей вакцины с обоими адьювантами: в спленоцитах мышей, которых иммунизировали вакциной с пептидами 1, добавление *in vitro* пептидов 2 не вызывало усиления продукции IFN- γ , 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.

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. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – 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
TRP2 + Ридостин Про	Без стимуляции	192 \pm 51
	TRP2	669 \pm 51**
	OVA	198 \pm 42
OVA + Poly(I:C)	Без стимуляции	161 \pm 44
	TRP2	262 \pm 34
	OVA	624 \pm 61*
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*;

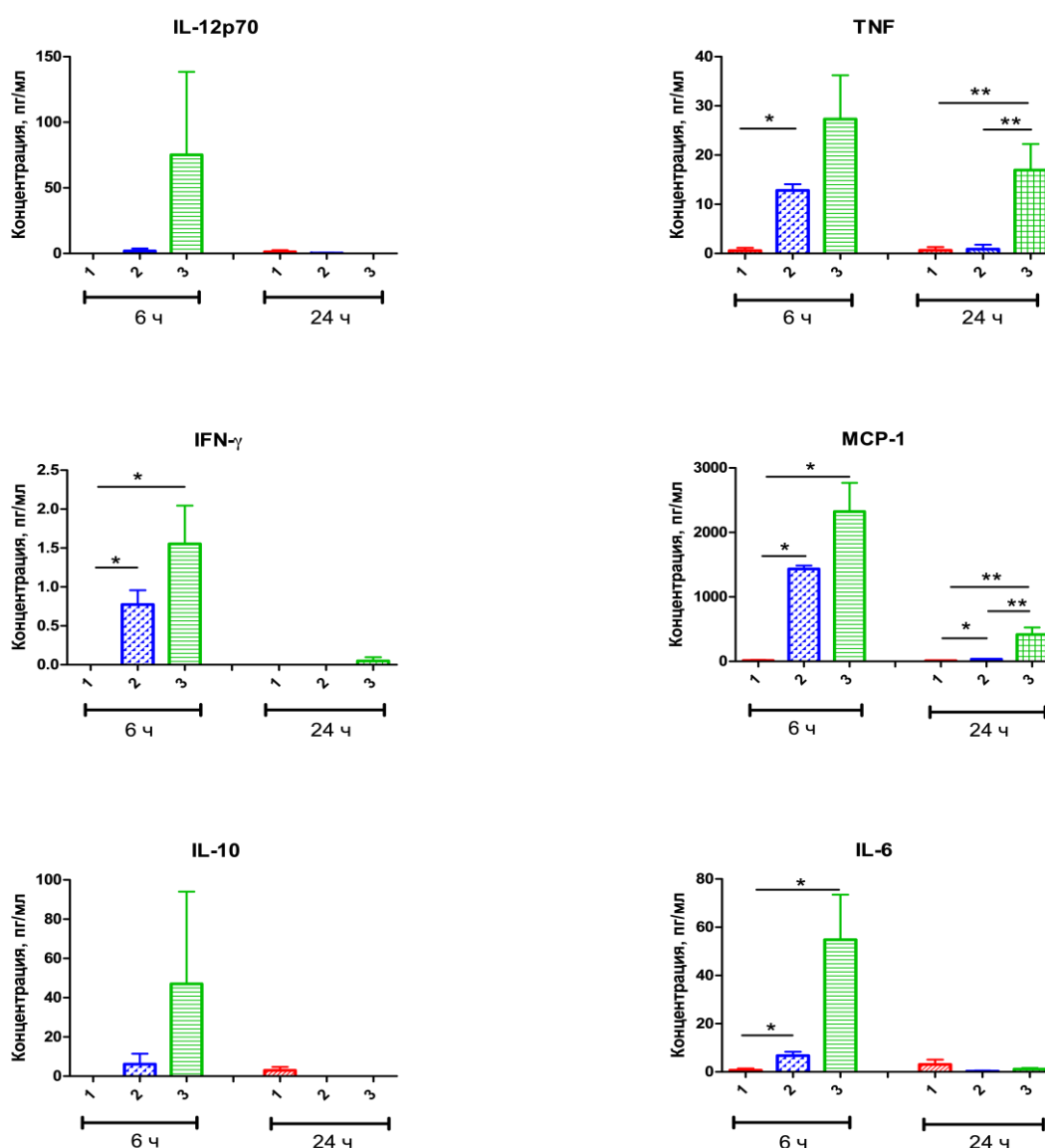
** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (без стимуляции) и со стимуляцией пептидом, не вводившимся *in vivo*

Адьюванты усиливали иммуногенность пептида TRP2 и овальбумина. Как и в случае с неоантигенной вакциной, в данном эксперименте также показана специфичность действия

пептидов (Таблица 4). В спленоцитах 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.

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. Результаты представлены на рисунке 1.



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

1 – физраствор; 2 – Poly(I:C); 3 – Ридостин Про

Рисунок 1 – Изменение уровня цитокинов ($M \pm SEM$) в сыворотке крови мышей

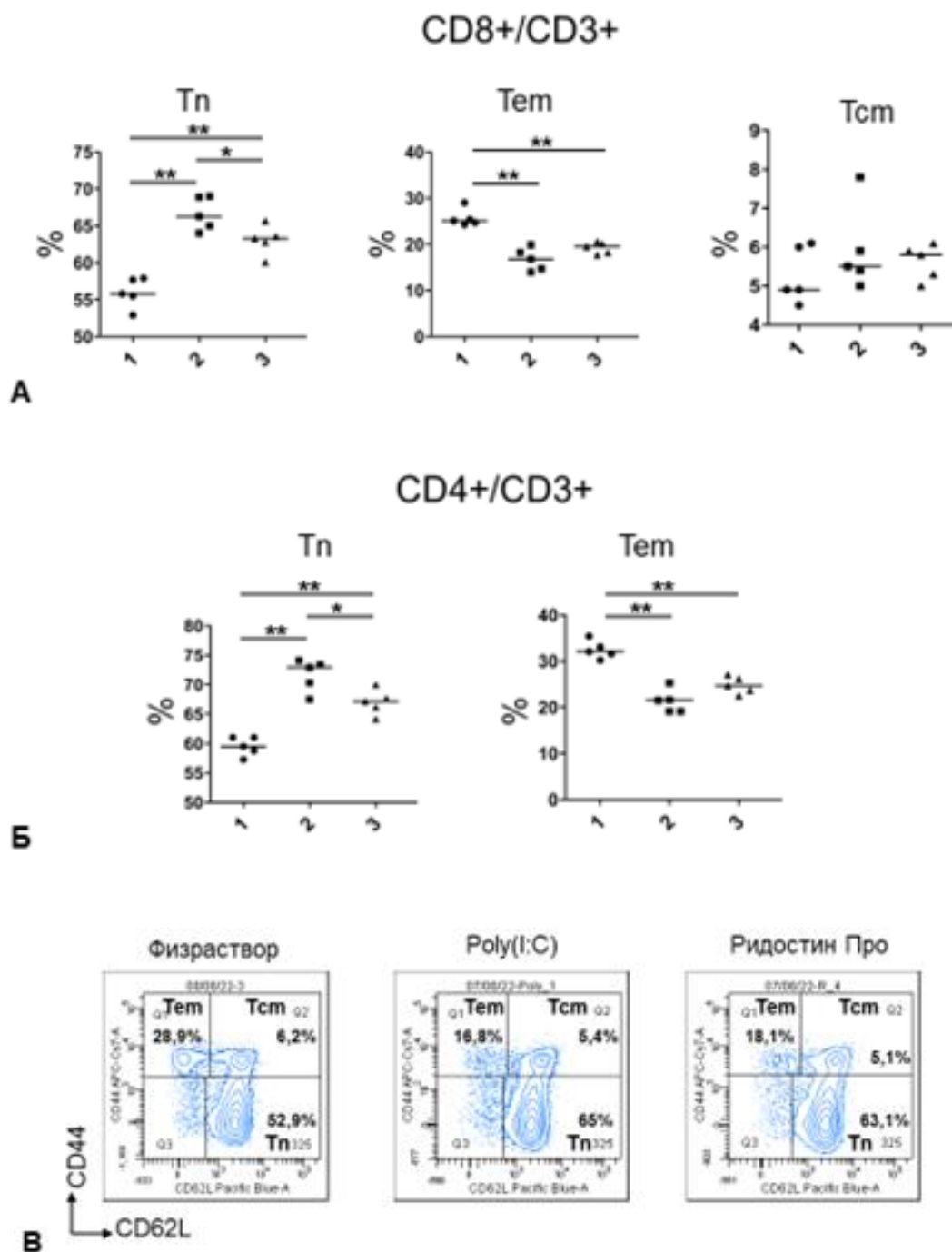
Через 6 часов Ридостин Про более выраженно по сравнению с Poly(I:C), увеличивал концентрацию всех шести исследованных цитокинов, но статистически значимо по сравнению с контролем Ридостин Про повышал уровни цитокинов INF- γ , MCP-1 и IL-6 (Рисунок 1). Poly(I:C) через 6 часов после введения также вызывал повышение уровней всех шести цитокинов, статистически значимо – TNF, INF- γ , MCP-1 и IL-6 (Рисунок 1). 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 (Рисунок 2). 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) (Рисунок 2).

После применения адьювантов 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 вызывал 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:C) (Рисунок 3). Помимо этого, оба адьюванта, 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 3).



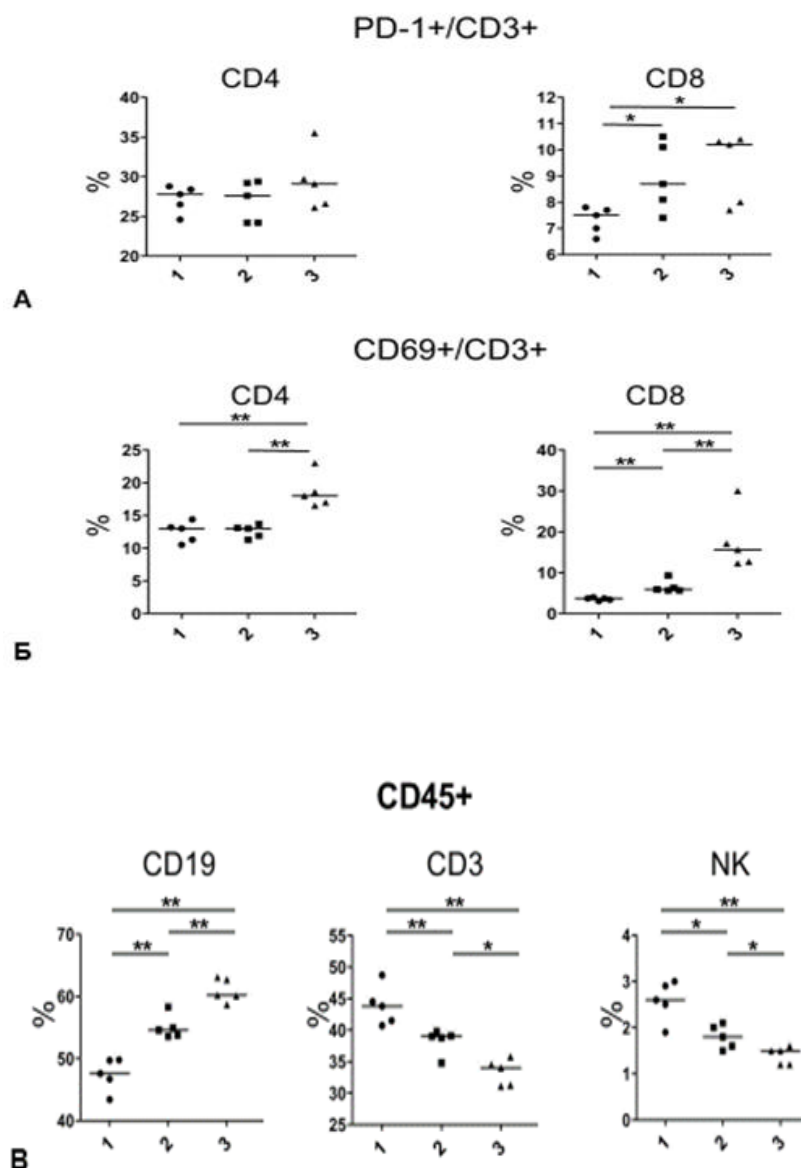
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

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



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

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 $CD45^+$

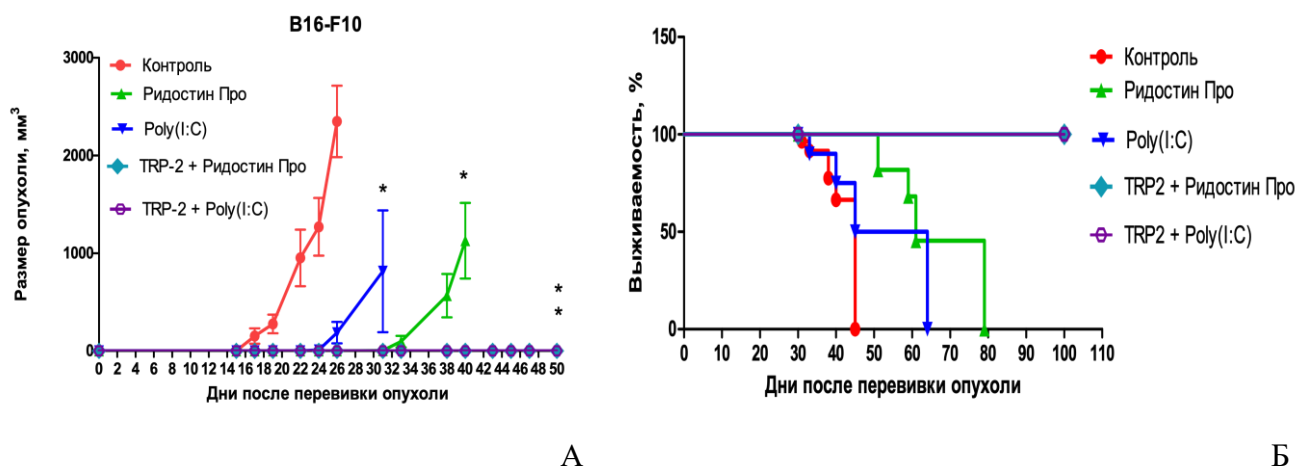
Рисунок 3 – Влияние Ридостина Про и Poly(I:C) на количество $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток; 1 – физраствор; 2 – Poly(I:C); 3 – Ридостин Про

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_m . 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 вызвали 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 более сильное воздействие на иммунную систему по сравнению с Poly(I:C).

3.3 Противоопухолевый эффект

На первом этапе исследования сравнивали противоопухолевый эффект адьювантов 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 (Рисунок 4, Таблица 5).



* $p < 0,01$ по сравнению с контролем

А – размер опухоли \pm SEM;

Б – выживаемость мышей

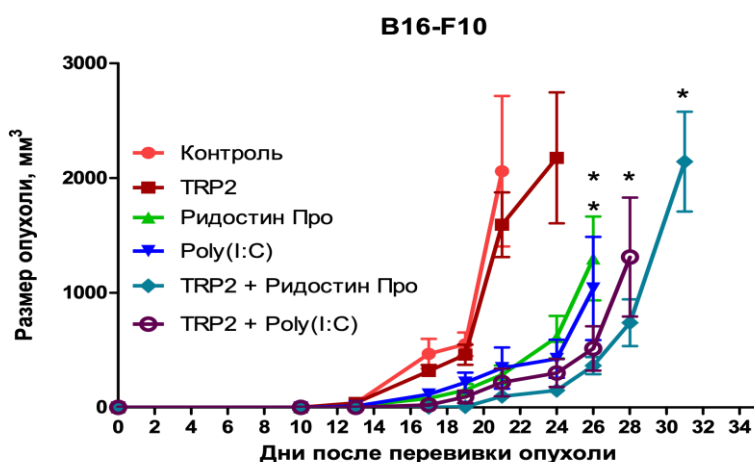
Рисунок 4 – Противоопухолевый эффект при смешанном режиме вакцинации мышей с меланомой B16-F10

Таблица 5 – Влияние смешанного режима вакцинации пептидом TRP2 с адъювантами на торможение роста меланомы B16-F10 и увеличение продолжительности жизни мышей

Воздействие	TPO, %						УПЖ, %	Излечение
	15 сут	17 сут	19 сут	22 сут	24 сут	26 сут		
Ридостин Про	100	100	100	100	100	100	53	нет
Poly(I:C)	100	100	100	100	99	92	16	нет
TRP2 + Ридостин Про	100	100	100	100	100	100	max	100%
TRP2 + Poly(I:C)	100	100	100	100	100	100	max	100%

При введении без пептида Ридостин Про и Poly(I:C) тормозили рост опухолей по сравнению с контролем статистически значимо ($p < 0,01$) (Рисунок 4, А), 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 4, Б, Таблица 6). После вакцинации TRP2 с Ридостином Про и с Poly(I:C) у мышей наблюдали отсутствие опухолей более 100 дней (Рисунок 4, Б).

Далее исследовали эффективность вакцинации пептидом TRP2 с адъювантами в терапевтическом режиме, когда после перевивки мышам клеток меланомы B16-F10 на 4 и 10 сутки вводили адъюванты с пептидом TRP2 или без него, а также один TRP2 без адъювантов. Результаты представлены на рисунке 5 и в таблице 6.



* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 5 – Противоопухолевый эффект при терапевтическом режиме вакцинации мышей с меланомой B16-F10: размер опухоли \pm SEM

Таблица 6 – Влияние терапевтического режима вакцинации пептидом TRP2 с адъювантами на торможение роста меланомы B16-F10 и увеличение продолжительности жизни мышей

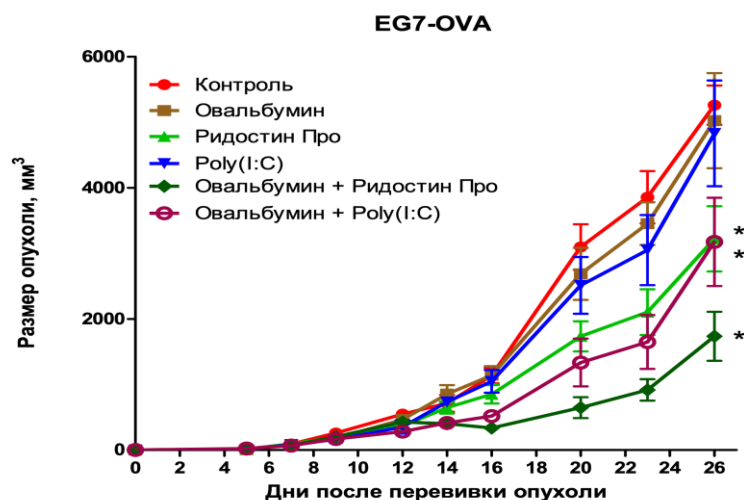
Воздействие	ТРО, %				УПЖ, %	Излечение
	13 сут	17 сут	19 сут	21 сут		
TRP2	0	32	17	23	8	нет
Ридостин Про	71	83	73	86	30	нет
Poly(I:C)	70	75	61	83	45	нет
TRP2 + Ридостин Про	100	100	99	95	43	нет
TRP2 + Poly(I:C)	100	96	83	89	46	нет

Вакцинация только пептидом TRP2 без адъювантов не имела противоопухолевого эффекта (Рисунок 5 и Таблица 6). 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 ($p < 0,05$) (Рисунок 5 и Таблица 6). 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 (Таблица 6). 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 6 и в таблице 7. 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) ($p=0,03$).



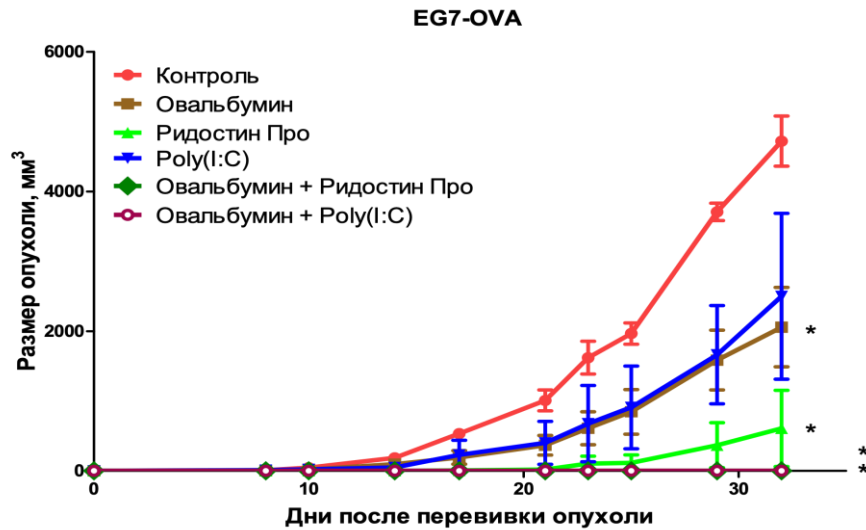
* $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

Рисунок 6 – Противоопухолевый эффект при терапевтическом режиме вакцинации мышей с лимфомой EG7-OVA: размер опухоли \pm SEM

Таблица 7 – 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

На следующем этапе исследовали влияние вакцинации овальбумином с адьювантами в смешанном (профилактическом/терапевтическом) режиме применения. Результаты представлены на рисунке 7 и в таблице 8.



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

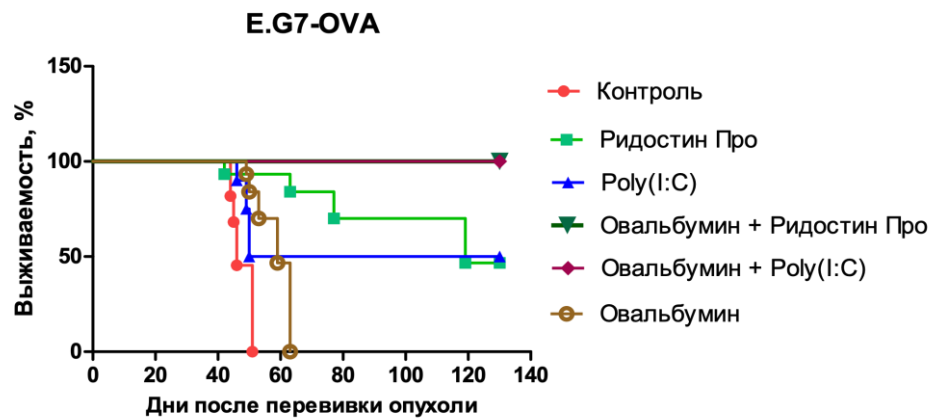
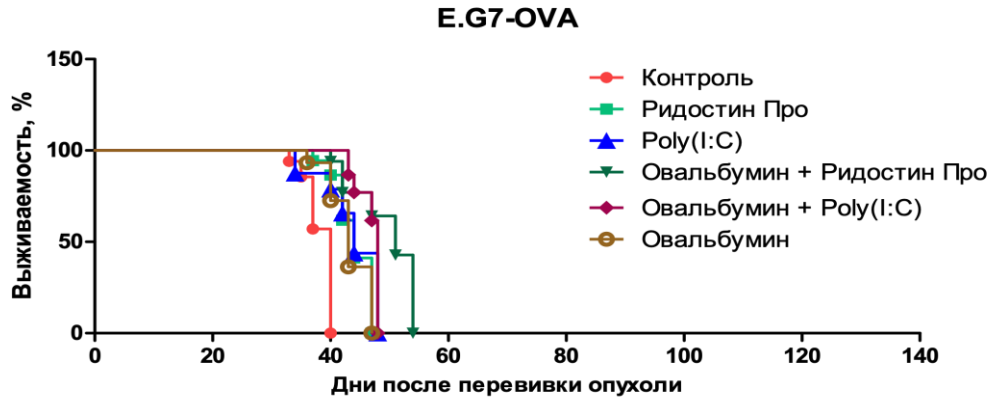
Рисунок 7 – Противоопухолевый эффект при смешанном режиме вакцинации мышей с лимфомой EG7-OVA: размер опухоли \pm SEM

Таблица 8 – Влияние смешанного режима вакцинации овальбумином с адъювантами 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 8 представлена выживаемость мышей при терапевтическом и смешанном режиме вакцинации.



А – после перевивки опухоли;

Б – вакцинация до перевивки опухоли

Рисунок 8 – 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) являются перспективными компонентами для включения в состав пептидных противоопухолевых вакцин, способными существенно повысить их иммуногенность и терапевтическую эффективность.

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 НК-, 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.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные данные закладывают основу для применения Ридостина Про в качестве адьюванта, усиливающего эффективность пептидных противоопухолевых вакцин, нацеленных как на опухолевые неоантигены, так и на опухолеассоциированные антигены. Понимание механизмов активации иммунного ответа адьювантами может быть полезно для оптимизации схем применения противоопухолевых вакцин. Выявленная иммуногенность и эффективность противоопухолевых пептидных вакцин с адьювантами позволяет продолжить исследования в комбинации с другими видами иммунотерапии, например, ингибиторами иммунных контрольных точек для достижения более устойчивого терапевтического эффекта.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пономарев, А. В. Изучение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адьювантов, усиливающих иммуногенность противоопухолевой вакцины / А. В. Пономарев, **П. В. Царапаев**, М. А. Барышникова, З. А. Соколова, А. А. Рудакова, М. В. Миронова, Д. В. Гусев, Г. М. Левагина, Е. Д. Даниленко, В. С. Косоруков // Сибирский онкологический журнал. – 2024. – Т.23. – №3. – С. 86-99.

2. **Царапаев, П. В.** Исследование препаратов Ридостин Про и Poly(I:C) в качестве адьювантов для противоопухолевой вакцины на модели E.G7-OVA / П. В. Царапаев, М. А. Барышникова, А. В. Пономарев, А. А. Рудакова, З. А. Соколова, К. А. Барышников, Г. М. Левагина, Е. Д. Даниленко, В. С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2024. – Т. 23. – № 2. – С. 78-84.

3. Барышникова, М. А. Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адьюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. / М. А. Барышникова, А. В. Пономарев, А. А. Рудакова, З. А. Соколова, Н. В. Голубцова, **П. В. Царапаев**, Г. М. Левагина, Е. Д. Даниленко, В. С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. – 2022. – Т. 21. – №3. – С. 82-89.