

Баюрова Екатерина Олеговна

**«ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ
ИММУННОГО ОТВЕТА НА КАНДИДАТНЫЕ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1»**

1.5.10. – Вирусология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

Научный руководитель:
кандидат химических наук

Беликова-Исагулянц Мария Георгиевна

Официальные оппоненты:

Карпенко Лариса Ивановна – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Евтушенко Екатерина Алексеевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Защита диссертации состоится «___» _____ 202__ г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте: <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По состоянию на конец 2021 года в мире проживало 38,4 млн ВИЧ-инфицированных людей, и только за 2021 год было зафиксировано 5 млн новых случаев заражения и около 650 тыс. случаев смерти от ВИЧ-инфекции. В 2021 году на территории РФ проживало более 1,1 млн людей, инфицированных ВИЧ-1, было выявлено более 70 тыс. новых случаев и 34 тыс. смертей от ВИЧ-инфекции. На сегодняшний день этот вирус стал причиной смерти более 40 млн человек, из них 425 тыс. в России. Для сравнения, по данным Всемирной Организации Здравоохранения, вызвавший пандемию SARS-CoV-2, унес жизни 6,8 млн. В силу этого ВИЧ-инфекция и сегодня остается одной из главных проблем мирового здравоохранения.

В 2021 году 75% ВИЧ-инфицированных людей по всему миру получали антиретровирусную терапию (АРТ). В России охват лечением составил 82,2% от состоящих на диспансерном учете пациентов и 56,4% – от тех, у кого был выявлен ВИЧ-1. Применение АРТ вызывает развитие мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ), требующих перехода на вторую и третью линии терапии, что сильно удорожает лечение. Подавление вирусемии у лиц, принимающих АРТ, достигается в 76%-78% случаев (данные на 2019 и 2018 гг., соответственно), т.е. с вирусологической неэффективностью терапии сталкиваются не менее 20% ВИЧ-инфицированных лиц. За последние десятилетия на территории РФ возросла частота встречаемости вирусов с мутациями ЛУ у людей, никогда не принимавших АРТ (с 1% в 2005 г. до 5,4% в 2022 г.), включая множественную ЛУ (1,1% на 2021 г.), что предопределяет потенциал дальнейшего снижения эффективности терапии. Большинство механизмов действия препаратов АРТ связаны с ингибированием обратной транскриптазы (RT), интегразы (IN) и протеазы (PR) ВИЧ-1. Терапевтическая вакцинация, нацеленная на ЛУ-формы этих белков, в сочетании с АРТ могла бы отсрочить или даже предотвратить появление и распространение ЛУ-вариантов вируса. Разработка таких терапевтических вакцин осложняется отсутствием животной модели для функциональной оценки способности вакцинных кандидатов сформировать в организме хозяина эффективный иммунный ответ, в том числе против ВИЧ-1 с мутациями ЛУ, который бы обладал протективными свойствами.

Степень разработанности темы исследования

Для доклинических исследований протективных свойств вакцин против ВИЧ-1 используют заражение лабораторных мышей, иммунизированных кандидатными вакцинами, химерными вирусами на основе вируса ВИЧ-1 и вируса лейкемии мышей, но такие вирусы воспроизводят только один цикл заражения вирусом, не позволяя моделировать хроническую

инфекцию, сопровождаемую постоянным синтезом антигенов ВИЧ-1 в клетках. Также может быть проведено заражение ВИЧ-1 иммунодефицитных мышей с трансплантированными элементами иммунной системы человека, но применение этой модели ограничено невозможностью полноценной иммунизации ввиду неполного восстановления иммунного статуса таких животных при трансплантации, а также их высокой стоимостью. На настоящий момент отсутствуют модели для масштабного тестирования эффективности как профилактических, так и терапевтических вакцин против ВИЧ-1, вызывающих иммунный ответ, направленный против неструктурных вирусных белков. В то же время для оценки эффективности терапевтических вакцин против вируса папилломы человека (ВПЧ) и вируса гепатита С (ВГС) используются модели на основе сингенных клеточных линий мышей, экспрессирующих антигены ВПЧ и ВГС, соответственно. Вакцины, проявившие свою эффективность на таких моделях, успешно дошли до поздних стадий клинических испытаний, что свидетельствует о рациональности разработки подобных моделей и для ВИЧ-1. Моделей для доклинических испытаний вакцин против ВИЧ-1 на основе сингенных клеточных линий мышей, экспрессирующих антигены ВИЧ-1, на сегодняшний день не разработано.

Целью настоящего исследования является создание модели для функциональной оценки иммунного ответа, индуцируемого вакцинами против ВИЧ-1, на мышах на основе сингенных клеточных линий, экспрессирующих ферменты ВИЧ-1 без мутаций и с мутациями лекарственной устойчивости, и демонстрация возможности использования модели на примере проверки ряда ДНК-вакцинных кандидатов.

В задачи работы входило:

1. Получить субклоны клеточной линии аденокарциномы молочной железы мыши 4T1Luc2, продуцирующие обратную транскриптазу (RT), интегразу (IN) и протеазу (PR) ВИЧ-1 без мутаций и с мутациями лекарственной устойчивости;
2. Охарактеризовать туморогенный потенциал полученных субклонов линии 4T1Luc2, продуцирующих ферменты ВИЧ-1, *in vivo* в сингенных мышцах линии BALB/c;
3. Охарактеризовать миграционный и метастатический потенциал полученных субклонов линии 4T1Luc2, продуцирующих ферменты ВИЧ-1, *in vivo* в сингенных мышцах линии BALB/c;
4. Для разработанной модели подобрать условия имплантации субклонов 4T1Luc2 сингенным мышам и показатели мониторинга, позволяющие адекватно оценивать рост опухолей и процессы миграции и метастазирования опухолевых клеток;
5. В рамках разработанной модели оценить протективный потенциал ДНК-иммунизации, а именно способность иммунизации плазмидными конструктами, кодирующими лекарственно-устойчивые варианты обратной транскриптазы, интегразы и протеазы

ВИЧ-1, предотвращать образование, рост и метастазирование опухолей, продуцирующих соответствующие вирусные белки.

Научная новизна

В работе создана оригинальная модель для тестирования вакцин против ВИЧ-1 в лабораторных мышах, основанная на имплантации сингенных опухолевых клеток, экспрессирующих варианты RT, IN и PR, в том числе с мутациями ЛУ. Для этого были впервые получены производные высоко туморогенной, спонтанно метастазирующей клеточной линии 4T1Luc2, экспрессирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 штамма FSU_A, в том числе с мутациями ЛУ. Была впервые оценена эффективность ДНК-иммунизации против лекарственно устойчивых вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 путем имплантации иммунизированным мышам опухолевых клеток, экспрессирующих соответствующие варианты ферментов ВИЧ-1. Впервые была продемонстрирована возможность использования *ex vivo* биолюминесцентного сигнала для оценки миграции опухолевых клеток в дистальные органы, а также применимость параметра миграции опухолевых клеток при оценке эффективности индуцированного иммунного ответа. Показано, что в экспериментах с имплантацией опухолевых клеток иммунизированным мышам индуцированный иммунный ответ обладает разной степенью протективности, несмотря на высокую иммуногенность плазмидных конструкторов при ДНК-иммунизации.

Теоретическая и практическая значимость работы

Настоящая работа демонстрирует возможность применения моделей на основе сингенных клеточных линий мышей, продуцирующих вирусный антиген, для оценки эффективности вакцин против ВИЧ-1, включая ЛУ-варианты вируса. В работе продемонстрирована важность включения мутаций, приводящих к аминокислотным заменам в вирусных Т-клеточных эпитопах, в состав прототипных вакцин и при создании линий клеток, экспрессирующих данные антигены. В ходе работы было показано, что иммунный ответ, направленный против фермента ВИЧ-1 без мутаций ЛУ, теряет эффекторный потенциал за счет неспособности распознать Т-клеточный эпитоп в участке мутации ЛУ, вместо этого повышая туморогенную и миграционную/метастатическую активность опухолевых клеток. Полученные в работе данные подтверждают целесообразность использования подобных моделей для оценки протективного потенциала вакцинных кандидатов до перехода к следующим фазам клинических исследований. Разработанный в настоящей работе подход к созданию моделей для оценки эффективности иммунного ответа, индуцируемого вакцинами, на основе субклонов клеточной линии 4T1Luc2, экспрессирующих вирусные антигены, может быть распространен на другие вирусы, вызывающие хроническую инфекцию человека, но не инфицирующие лабораторных мышей.

В рамках разработанной модели было продемонстрировано, что RT является относительно сильным иммуногеном, пригодным для включения в кандидатную вакцину против ЛУ ВИЧ-1, PR является относительно сильным Т-клеточным иммуногеном, потенциально пригодным для включения в кандидатную вакцину против ЛУ ВИЧ-1 при условии корректного подбора включаемых мутаций ЛУ, а IN является относительно слабым иммуногеном, не эффективным для включения в кандидатную вакцину против ЛУ ВИЧ-1.

Методология и методы исследования

В ходе работы были использованы современные методы молекулярной биологии, такие как работы с бактериальными клетками и с культурами эукариотических клеток, методы трансфекции, получения лентивирусных частиц, ПЦР, получение моноклональных производных эукариотических клеток; методы работы с экспериментальными животными, такие как *in vivo* введение ДНК методом электропорации, имплантация мышам клеток, экспрессирующих люциферазу, с последующей *in vivo* детекцией билюминесценции; современные иммунологические методы, такие как *in vitro* оценка иммунного ответа после иммунизации методами FluoroSpot и иммуноферментным анализом, а также анализ полученных данных методами параметрической и непараметрической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия ферментов ВИЧ-1 с мутациями и без мутаций лекарственной устойчивости не приводила к снижению туморогенной и миграционной активности субклонов линии 4T1luc2 в сравнении с исходной линией, а также не приводила к изменению гистологических характеристик формируемых опухолей, что позволяет использовать полученные субклоны для создания разрабатываемой модели.
2. В рамках разработанной модели для субклонов 4T1luc2, кодирующих варианты обратной транскриптазы, интегразы и протеазы, оптимальной является доза имплантации в 1×10^4 клеток/сайт введения с мониторингом роста опухоли по кинетике билюминесценции от сайта имплантации клеток с 1-го по 10-й день, и морфометрически по размеру опухолей в конечной точке эксперимента. Для оценки влияния иммунизации на интенсивность миграции опухолевых клеток в дистальные органы после окончания эксперимента необходимо учитывать билюминесцентный сигнал от органов *ex vivo*. Для оценки влияния иммунизации на метастатическую активность необходимо проводить гистологический анализ количества и размера метастазов в легких и печени.
3. Разработанная модель для функциональной оценки иммунного ответа позволяет произвести оценку эффективности Т-клеточного, гуморального и смешанного иммунного

ответа, в том числе специфичного к мутациям лекарственной устойчивости, индуцированного в результате иммунизации ДНК-вакцинными кандидатами.

Личное участие автора

Автором проведен анализ литературы, изучена степень разработанности проблемы с определением цели, задач исследования и его дизайна. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор лично провёл статистическую обработку, сформулировал основные положения и выводы диссертации. Лично или с участием автора подготовлены основные публикации по материалам исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. – «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 7, 10, 11 паспорта специальности «Вирусология».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов и выводов представленной работы подтверждает воспроизводимость полученных результатов, комплексный подход к проведению исследования с использованием широкого набора современных и стандартных методик, строгие условия проведения опытов и грамотный статистический анализ полученных результатов. Все выводы диссертации логично вытекают из полученных результатов и соответствуют цели и задачам работы.

Материалы исследования были представлены и обсуждены в 13 докладах на 9 международных конференциях: IV международный саммит «Skin vaccination summit-2017» (Лейден, Нидерланды, 2017); Международная конференция «Vaccines and vaccination» (Москва, 2017); Ежегодный конгресс Международного вакцинного общества «International Society for Vaccine, Annual Congress» (Париж, Франция, 2017, 3 доклада); Международная научная конференция университета Страдиня «RSU Scientific conference 2018» (Рига, Латвия, 2018); Международная конференция «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy» (Москва, 2018); Ежегодный конгресс Международного вакцинного общества «International Society for Vaccine, Annual Congress» (Атланта, США, 2018, 2 доклада); Международный конгресс «Immuno-oncology» (Вена, Австрия, 2018); Международная научная конференция университета Страдиня «Riga Stradins University International Conference on Medical and Health Care Sciences «Knowledge For Use in Practice»» (Рига, Латвия, 2019); Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019); Петербургский международный онкологический форум (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации

Основные результаты работы полностью отражены в печати. По теме работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК или приравненных к ним, индексируемых в библиографических базах – Web of Science, Scopus, PubMed, а также 1 тезисы в сборнике международной конференции.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 148 страницах и состоит из введения и 4-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, а также заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений и список литературы, содержащий 286 источников. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 32 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Дизайн консенсусной последовательности RT, PR и IN ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A и его вариантов с мутациями лекарственной устойчивости, и вариантов с мутациями лекарственной устойчивости и аминокислотными заменами, приводящими к инактивации ферментов (мутациями инактивации).

Для создания консенсусной аминокислотной последовательности RT (reverse transcriptase; обратная транскриптаза) и PR (protease, протеаза) использовали информацию из базы данных последовательностей ВИЧ-1, GeneBank, базы данных устойчивости к лекарственным средствам против ВИЧ и базы данных HIV Los Alamos. Были извлечены аминокислотные последовательности RT (n=44) и PR (n=326) изолятов ВИЧ-1 FSU_A от пациентов, ранее не получавших лечения, без известных мутаций лекарственной устойчивости. На основе консенсусной последовательности RT мы разработали варианты, несущие наиболее распространенные мутации лекарственной устойчивости (ЛУ) к нуклеозидным ингибиторам RT (НИОТ) и ненуклеозидным ингибиторам RT (ННИОТ), характерные для изолятов FSU_A. Были разработаны варианты RT_A с набором мутаций M184V в сочетании с K65R (RT_An, мутации ЛУ к НИОТ) и K103N в сочетании с G190S (RT_Ann, мутации ЛУ к ННИОТ).

Ген консенсусной последовательности интегразы (integrase, IN) ВИЧ-1, используемый в данной работе, был получен ранее в лаборатории. В консенсусную последовательность IN были внесены два набора мутаций устойчивости к ралтегравиру: один на основе первичной мутации N155H и вторичных мутаций L74M, E92Q, V151I, G163R (IN_a_r1), и другой – на основе первичной мутации Q148K и вторичных мутаций E138K и G140S (IN_a_r2).

Аминокислотные последовательности, использованные для получения консенсусной последовательности PR, относились к двум равным временным промежуткам с 1997 по 2003 гг. (1-й; n=206) и с 2009 по 2015 гг. (2-й; n=120). После выравнивания обе выборки дали одну и ту же консенсусную последовательность PR. Для PR были отобраны наиболее частые мутации ЛУ, к препаратам, стандартно применяемым на территории стран бывшего Советского Союза в контексте антиретровирусной терапии. Были отобраны три мутации, обуславливающие высокий уровень устойчивости – M46I, I54V и V82A и сконструированы два варианта PR с комбинациями мутаций M46I/I54V (PR_A2mut) и M46I/I54V/V82A (PR_A3mut).

Активность вирусных ферментов может быть токсична для клеток, и является источником потенциальной опасности при использовании ДНК-вакцин на их основе. В силу этого в полученные последовательности вариантов генов RT, IN с мутациями ЛУ, и PR с и без мутаций ЛУ были внесены точечные нуклеотидные замены, приводящие к замене аминокислот в активных центрах ферментов, а именно: D185N, D186N, E478Q – для вариантов RT, D64V – для вариантов IN и D25N – для вариантов PR. Таким образом, были получены варианты генов, кодирующих инактивированные варианты ревертаз RT_Ain, RT_Ainn, интеграз IN_in_r1, IN_in_r2, и протеаз PR_Ai, PR_Ai2mut, PR_Ai3mut.

На основе синтетических генов был получен целый ряд плазмидных векторов. Последовательности генов, кодирующих инактивированные ферменты RT_Ain, RT_Ainn, IN_in_r1, IN_in_r2, PR_Ai, PR_Ai2mut, PR_Ai3mut, снабженные последовательностью Kozak для эффективной трансляции, были клонированы в вектор pVAX1 (Invitrogen), рекомендованный для ДНК-иммунизации.

2. Создание производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1Luc2, кодирующих варианты генов RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A

Для создания системы «опухоловой угрозы» («челендж», от англ. challenge) – опухолевых клеток, экспрессирующих гены ВИЧ-1, были получены кодирующие их лентивирусные вектора. Для более адекватного моделирования инфекции в лентивирусный вектор встраивали гены, кодирующие энзиматически активные вирусные ферменты. В частности, в лентивирусный вектор были клонированы последовательности генов ферментов ВИЧ-1 как с мутациями, так и без мутаций ЛУ *RT_An*, *RT_Ann*, *IN_A*, *IN_a_r1*, *IN_a_r2*, *PR_A*, *PR_A2mut*, *PR_A3mut*. Ввиду токсичности PR получить лентивирусные частицы, кодирующие варианты *PR_A*, *PR_A2mut* и *PR_A3mut*, не удалось. Для решения этой проблемы был получен лентивирусный вектор pLV_PR_A3mut, несущий ген инактивированной протеазы *PR_Ai3mut*. С его помощью удалось получить лентивирусные частицы, экспрессирующие *PR_Ai3mut*. Также ввиду токсичности IN не удалось получить лентивирусные частицы, кодирующие *IN_a_r1*.

В качестве основы для создания клеток, продуцирующих антигены ВИЧ-1, была выбрана линия 4T1luc2 – производная от хорошо охарактеризованной линии клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4T1, экспрессирующая люциферазу светлячка.

Для лентивирусных частиц, кодирующих *IN_A*, *IN_a_r2*, при высокой множественности инфекции (5 и 20 Т.Е. на клетку) был выявлен токсический эффект IN на клетки. При применении других конструкторов признаков цитотоксичности выявлено не было. Путем клонирования методом последовательного разведения из единичных клеток были получены гомогенные субклоны 4T1luc2. Наличие вставок ДНК, кодирующих ферменты ВИЧ-1, было подтверждено методом ПЦР с парой праймеров, специфичных к лентивирусному вектору. Всего было получено 9 субклонов, представленных в Таблице 1.

Таблица 1 – Субклоны линии 4T1luc2, полученные в работе.

Кодируемый ген	Множественность инфекции, Т.Е. на клетку	Название	Аббревиатура
<i>RT_An</i>	1	4T1luc2_RT-An-1.4	RT-An-1.4
	10	4T1luc2_RT-An-10.1	RT-An-10.1
<i>RT_Ann</i>	1	4T1luc2_RT-Ann-1.5	RT-Ann-1.5
	10	4T1luc2_RT-Ann-10.2	RT-Ann-10.2
<i>IN_A</i>	1	4T1luc2_IN_a_1.2	IN_a_1.2
		4T1luc2_IN_a_1.4	IN_a_1.4
<i>IN_a_r2</i>	1	4T1luc2_IN_a_r2_1.5	IN_a_r2_1.5
<i>PR_Ai3mut</i>	20	4T1luc2_PR-20.1	PR-20.1
		4T1luc2_PR-20.2	PR-20.2

3. Туморогенный потенциал субклонов, кодирующих варианты генов RT, IN и PR ВИЧ-1

Для того чтобы оценить, как продукция антигенов ВИЧ-1 влияет на опухоленогенный потенциал полученных субклонов, клетки были подкожно имплантированы мышам линии BALB/c, сингенным подсаживаемым клеткам. Формирование опухолей мониторировали по детекции биолуминесцентного сигнала *in vivo* и морфометрически, измеряя пальпируемый размер опухоли. Все полученные субклоны при подкожном введении мышам линии BALB/c были способны формировать солидные опухоли. Для исходной линии и всех полученных субклонов была характерна экспоненциальная кинетика роста биолуминесцентного сигнала с последующим выходом уровня сигнала на плато. В работе были опробованы имплантации 4-мя дозами клеток в расчете на сайт введения: 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 . Уровень приживаемости клеток, оцененный как процент формирования пальпируемых опухолей, составлял 44%, 87%, 89% и 100%, соответственно. При этом введение 2×10^4 и 4×10^4 клеток в сайт приводило к быстрому выходу биолуминесцентного сигнала на плато: биолуминесцентный сигнал в контрольной группе, получавшей 2×10^4 или 4×10^4 клеток 4T1luc2 на сайт введения, с 6 по 18 день наблюдения увеличился в $1,52 \pm 0,39$ и $3,34 \pm 2,88$ раз, соответственно. При введении 1×10^4 за тот

же период наблюдения он увеличился в $40,80 \pm 12,76$ раз, что характерно для экспоненциального роста. На 6-й день мониторинга уровень биолюминесцентного сигнала от места введения коррелировал с дозой имплантированных клеток, однако в конце мониторинга (день 18) зависимость пропадала, что так же связано с выходом сигнала на плато. Снижение значимости биолюминесцентного сигнала для мониторинга роста опухоли в конце периода наблюдения было связано с недостатком снабжения клеток кислородом в центральной части опухоли, приводящему к снижению уровня ферментативной активности люциферазы. Таким образом, было показано, что оптимальной дозой является 1×10^4 клеток/сайт и оптимальными параметрами мониторинга роста опухоли являлись уровень биолюминесцентного сигнала в фазе его экспоненциального роста и пальпируемый размер опухоли в конце эксперимента.

При анализе туморогенного потенциала субклонов, продуцирующих различные варианты RT_A, было выявлено, что биолюминесцентный сигнал после введения субклонов RT-An-10.1 и RT-An-10.2 был выше, чем от RT-An-1.4 и RT-An-1.5, соответственно. Начиная с 10-го дня наблюдения у всех животных детектировались пальпируемые опухоли, однако пальпируемый размер в большинстве случаев не коррелировал с уровнем биолюминесцентного сигнала. К 15-му дню наблюдения уровень биолюминесцентного сигнала во всех группах выходил на плато (Рисунок 1А-В).

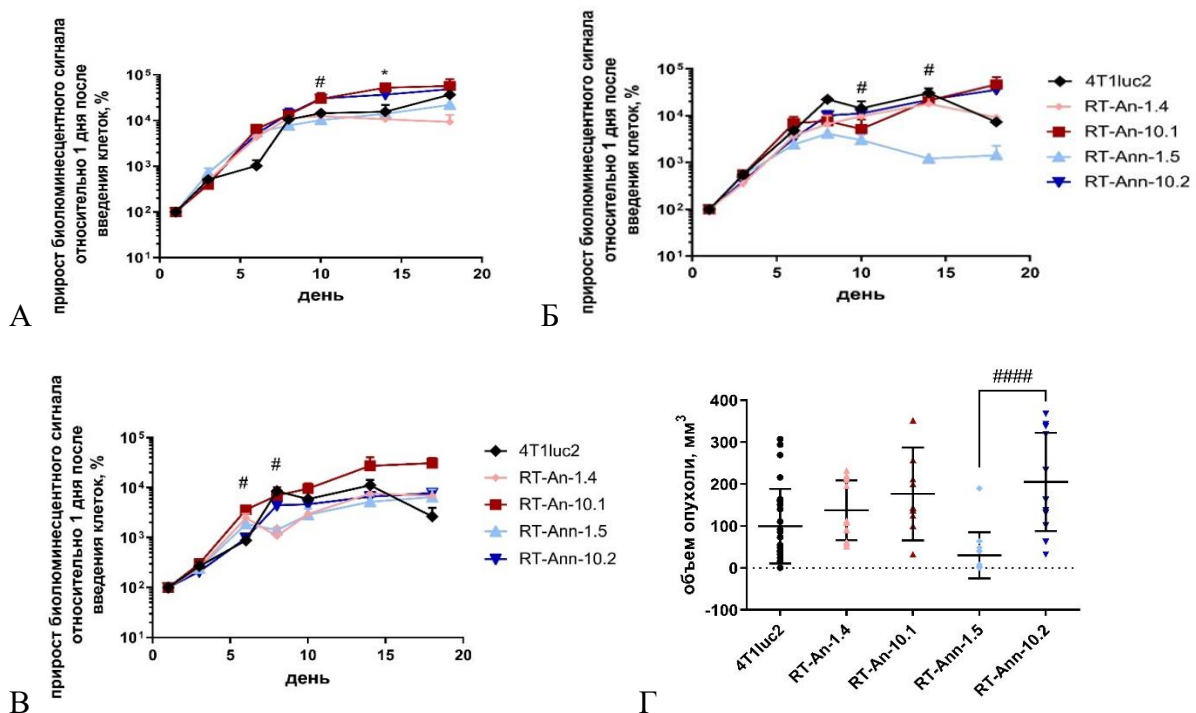


Рисунок 1 – Кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала от участков введения и пальпируемый объем опухолей субклонов линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, несущих вставки генов, кодирующих варианты RT. А – 1×10^4 клеток на сайт; Б – 2×10^4 клеток на сайт; В – 4×10^4 клеток на сайт. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, анализ проведен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Тьюки для множественного сравнения. * – RT-An-1.4 в сравнении с RT-An-10.1, $p < 0,05$; # – RT-An-1.5 в сравнении с RT-An-10.2, $p < 0,05$.

Статистический анализ пальпируемого размера опухоли показал, что внутри групп, получивших инъекции различного количества клеток одного и того же субклона, не было различий по размеру опухоли на 18-й день наблюдений, что позволило объединить данные. Различий в размере опухолей, формируемых субклонами, экспрессирующими варианты RT, в сравнении с опухолями, формируемыми родительской линией 4T1luc2, выявлено не было (Рисунок 1Г).

При анализе туморогенного потенциала субклонов, продуцирующих IN_A, было выявлено, что субклон IN_a_1.4 при введении 5×10^3 клеток не проявлял признаков роста опухоли. При введении 1×10^4 клеток данный субклон обладал сниженной приживаемостью и кинетикой роста опухоли в сравнении с исходной линией. При введении 2×10^4 клеток субклона IN_a_1.4 биолюминесцентный сигнал детектировали во всех сайтах введения клеток, однако рост опухолей был замедлен относительно исходной линии 4T1luc2, о чем можно судить по статистически более низкому уровню биолюминесцентного сигнала на 7-й день наблюдения. Кинетика биолюминесцентного сигнала от места введения клеток субклонов IN_a_1.2 и IN_a_r2_1.5 не отличалась от таковой для исходной линии 4T1luc2 (Рисунок 2).

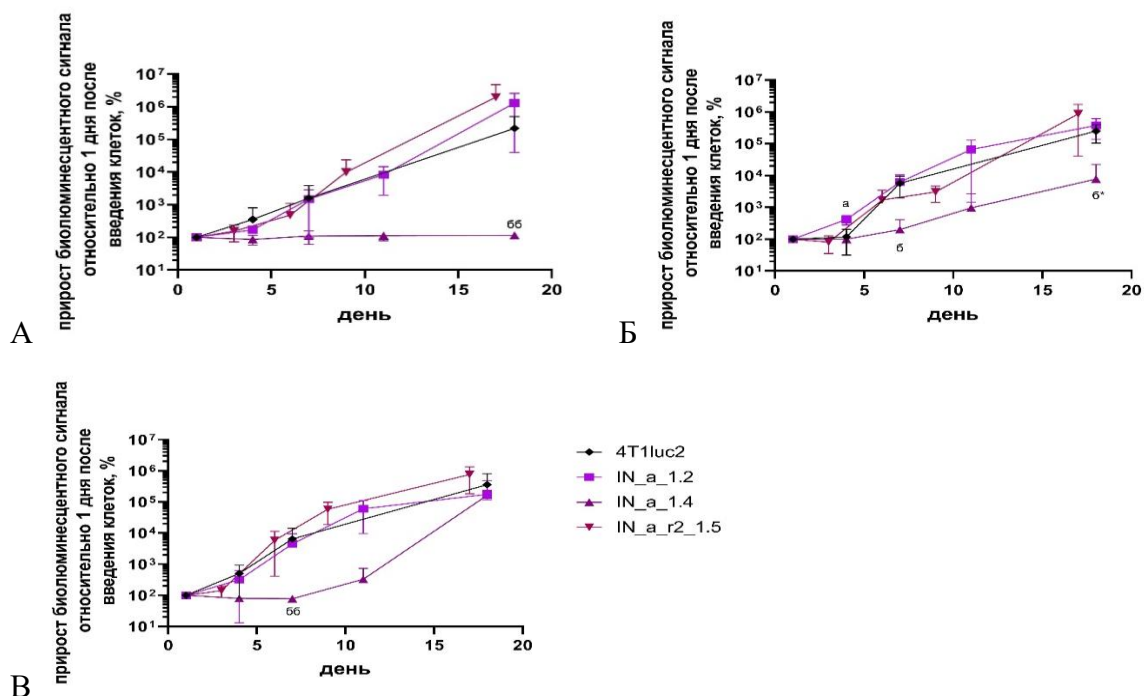


Рисунок 2 – Кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала от участков введения субклонов линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, несущих вставки генов, кодирующих варианты IN. А – 5×10^3 клеток на сайт; Б – 1×10^4 клеток на сайт; В – 2×10^4 клеток на сайт. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, анализ проведен с использованием модели смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса с тестом Данна для множественного сравнения (а, б, б*) или с использованием теста Манн-Уитни (бб). IN_a_1.2 в сравнении с 4T1luc2: а – $p < 0,05$. IN_a_1.4 в сравнении с 4T1luc2: б – $p < 0,05$; б* – $p < 0,1$, бб – $p < 0,01$.

Размер опухолей, образовавшихся в конечной точке эксперимента, был оценен морфометрически, как описано выше для RT_A субклонов. Размер опухолей, сформированных

субклонами IN_a_1.2 и IN_a_r2_1.5, не отличался от опухолей, сформированных клетками 4T1luc2. Несмотря на детектируемый биолюминесцентный сигнал, ни в одной из групп, имплантированных клетками IN_a_1.4, пальпируемые опухоли не сформировались (Рисунок 3).

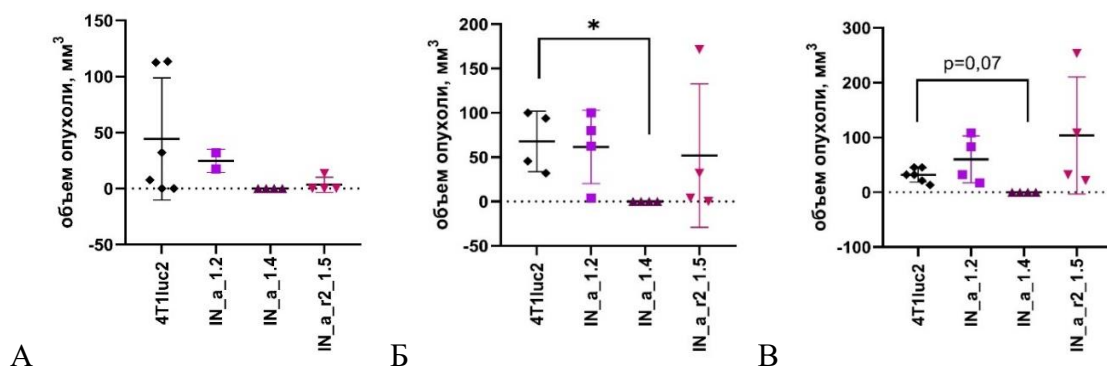


Рисунок 3 – Пальпируемый объем опухоли, сформированных субклонами, продуцирующими IN. А – 5×10^3 , Б – 1×10^4 , В – 2×10^4 клеток/сайт имплантации. Данные проанализированы с использованием критерия Краскел-Уоллис с поправкой множественного сравнения Данна или). * – $p < 0,05$.

На третьем этапе туморогенный потенциал был оценен для субклонов, продуцирующих PR_Ai3mut (Рисунок 4). На основании данных, полученных в ходе выполнения первых двух этапов, была выбрана доза 1×10^4 клеток на сайт инъекции. Начиная с 11-го дня мониторинга уровень биолюминесцентного сигнала для субклона PR20.2 был статистически выше, чем для исходной линии, в то время как для субклона PR20.1 он не отличался от сигнала материнской линии клеток на протяжении всего периода наблюдения (Рисунок 4А). Пальпируемый размер опухолей, сформированных субклоном PR20.2 на 18-й день наблюдения, имел тенденцию быть больше, чем размер опухолей, формируемых исходной линией 4T1luc2 (Рисунок 4Б).

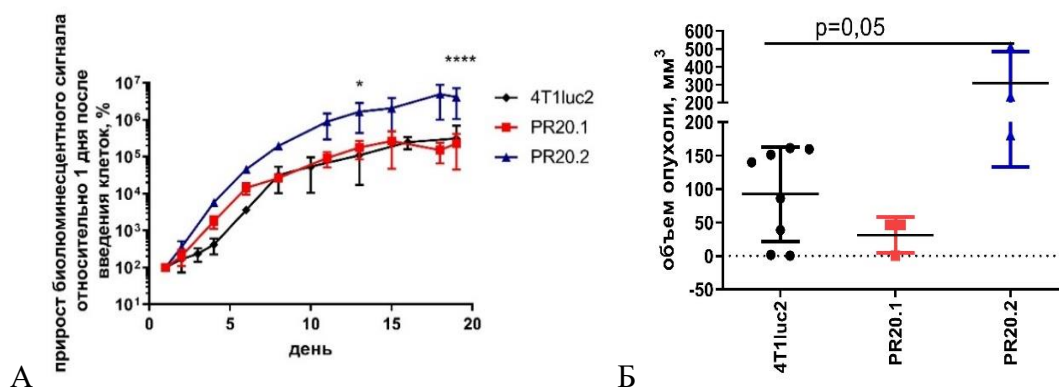


Рисунок 4 – Кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала от участков введения (А) и пальпируемый объем опухолей (Б) субклонов линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, несущих вставки генов, кодирующих PR_Ai3mut. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, анализ проведен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с поправкой Даннета для множественного сравнения (А) или теста Краскел-Уоллис (Б). * – $p < 0,05$; **** – $p < 0,0001$.

Из 9 полученных субклонов линии 4T1luc2, экспрессирующих варианты ферментов ВИЧ-1, 8 давали детектируемые опухоли. Субклон IN_a_1.4 был неспособен формировать

пальпируемые опухоли при подсадке сингенным иммунокомпетентным мышам и был исключен из дальнейшего анализа. Образцы пальпируемых опухолей были вырезаны для дальнейшего анализа экспрессии генов ВИЧ-1 и гистологического анализа. Экспрессия мРНК генов ВИЧ-1 была подтверждена во всех исследованных образцах. Гистологический анализ показал, что все опухоли, сформированные как исходной клеточной линией 4T1luc2, так и ее производными, экспрессирующими варианты ферментов ВИЧ-1, представляли собой позднюю стадию (G3) слабодифференцированной аденокарциномы с повышенной клеточной и ядерной атипией и частыми областями некроза и воспаления. Таким образом, продукция антигенов ВИЧ-1 не меняла гистологическую характеристику опухолей. Субклоны RT_An-1.4 и RT_Ann-1.5 были исключены из дальнейшей работы, так как давали меньшие по размеру опухоли, в сравнении с субклонами RT_An-10.1 и RT_Ann-10.2, продуцирующими аналогичные варианты RT-A с наборами мутаций ЛУ к НИОТ и ННИОТ, соответственно.

4. Миграция опухолевых клеток в дистальные органы *in vivo*

Наличие репортерного гена люциферазы позволяло оценить наличие единичных опухолевых клеток, мигрировавших в дистальные органы. Так как суммарное количество введенных опухолевых клеток могло сказаться на миграции клеток, для сравнительного анализа миграционной способности клеток *in vivo* использовали только органы, полученные от мышей, которым было имплантировано одно и то же количество – 1×10^4 клеток.

Исходя из измерений биолюминесцентного сигнала от органов наивных мышей уровень фонового сигнала принимали равным 8000 фотонов/сек. Ранее было показано, что экспрессия люциферазы снижает метастатический потенциал клеток 4T1luc2 в сравнении с исходной линией 4T1. Для 2 из 6 проанализированных субклонов суммарное значение биолюминесцентного сигнала от легких, печени и селезенки не превышало трехкратного значения фонового сигнала, что указывало на дальнейшее снижение миграционной активности клеток (Рисунок 5А).

В целом, экспрессия антигенов ВИЧ-1 не влияла на миграционную активность клеток аденокарциномы *in vivo* (при сравнении 4T1luc2 с совокупностью данных от всех субклонов). Однако экспрессия ряда ферментов ВИЧ-1 не только не снижала миграционный потенциал, но, напротив, усиливала его, относительно линии 4T1luc2 (Рисунок 5А). Для клеток 4T1luc2 ранее было показано, что основным органом для метастазирования являются легкие. При имплантации субклонов, экспрессирующих варианты ферментов ВИЧ-1, основным органом, в котором детектировали биолюминесцентный сигнал, также являлись легкие (Рисунок 5Б).

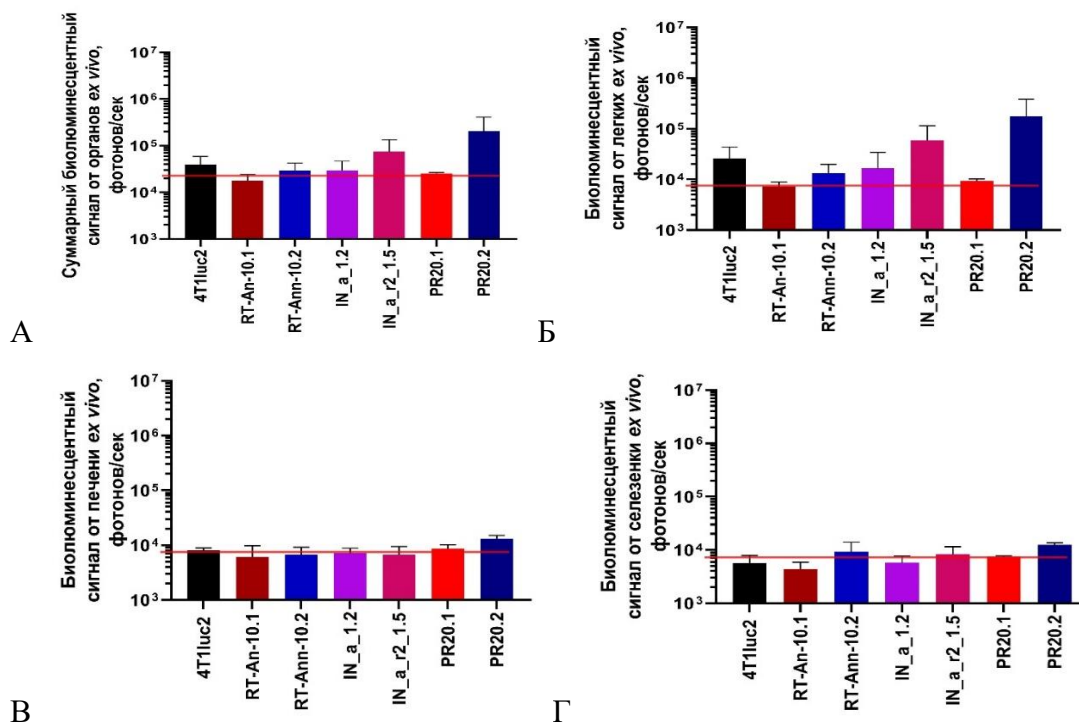


Рисунок 5 – Инфильтрация опухолевых клеток в дистальные органы. Инфильтрация клеток, продуцирующих люциферазу была оценена с помощью детекции биоломинесцентного сигнала *ex vivo*. Суммарный биоломинесцентный сигнал от органов (А), сигнал от легких (Б), печени (В) и селезенки (Г). Значения представляют среднее \pm стандартное отклонение ($n=3$). Красной линией изображен уровень фонового биоломинесцентного сигнала 8000 фотонов/сек для индивидуальных органов и 24000 фотонов/секунду для суммарного сигнала от органов. Статистически значимых различий в уровне сигнала выявлено не было (Краскел-Уоллис, $p>0,05$).

5. Метастазирование

Для того чтобы подтвердить, что миграция опухолевых клеток в органы приводит к образованию метастазов, органы были фиксированы параформальдегидом и залиты в парафиновые блоки, из которых были приготовлены гистологические образцы с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином.

Суммарный биоломинесцентный сигнал от легких мышей, несущих опухоли, образованные субклонами IN_a_1.4 и IN_a_r2_1.5, не превышал таковой от контрольной группы (Рисунок 5Б). Гистологический анализ подтвердил наличие в органах отдельных метастазов (в среднем $1 \pm 0,5$ на мышшь), состоящих из единичных опухолевых клеток, окруженных тяжелым воспалительным инфильтратом.

Оценка уровня метастазирования на фоне иммунизации является одним из существенных оценочных параметров эффективности вакцинации. В легких описанное выше воспаление существенно затрудняло гистологический анализ полученных образцов образцов на наличие метастазов. В силу этого, для субклонов, продуцирующих различные варианты RT-A и PR_Ai3mut, для гистологической оценки была выбрана печень, уровень биоломинесцентного сигнала от которой для некоторых субклонов и контрольной линии превышал фоновые значения.

Гистологический анализ препаратов печени мышей подтвердил наличие метастазов, состоящих из единичных клеток, часто окруженных инфильтратами иммунных клеток. В печени мышей, имплантированных клетками субклона PR20.1, метастазов выявлено не было (Рисунок 6А). При этом, метастазы, сформированные субклонами, продуцирующими RT-Ann (RT-Ann-10.2) и PR_Ai3mut (PR20.2), были большего размера, в сравнении с метастазами, сформированными исходной линией клеток (Рисунок 6Б).

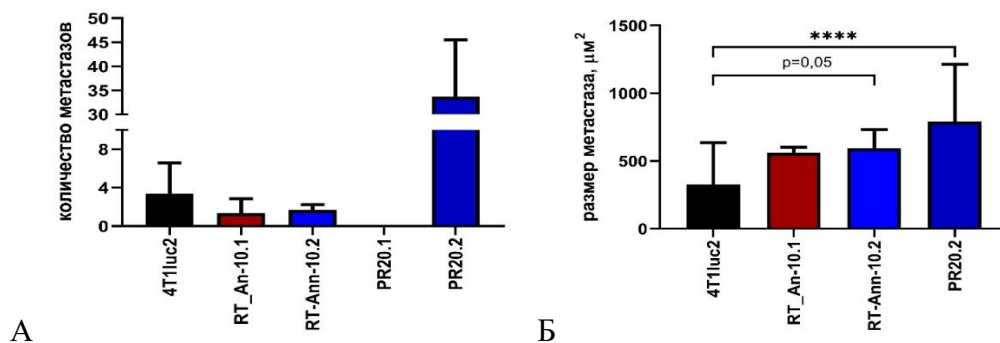


Рисунок 6 – Оценка процесса метастазирования в печень мышей субклонов 4T1luc2 продуцирующих различные варианты RT-A и PR_Ai3mut. А – суммарное количество метастазов на 10 hpf; Б – средний размер метастазов. Данные проанализированы с использованием теста Краскел-Уоллис с поправкой множественного сравнения Данна. $****$ – $p < 0,0001$.

На финальном этапе работы на основании полученных данных по воспроизводимости присадок опухолевых клеток, равномерности и воспроизводимости процесса роста опухолей, миграционной активности в дистальные органы и уровня метастазирования для оценки эффективности ДНК-иммунизации нами были выбраны субклоны RT-An-10.1, RT-Ann-10.2, IN_a_1.4, IN_a_r2_1.5 и PR20.2, с введением в количестве 1×10^4 клеток на участок инъекции.

6. ДНК-вакцинные конструкторы

Иммуногенность ДНК-вакцинных конструкторов, кодирующих различные варианты антигенов ВИЧ-1, оценивали методом подкожной иммунизации с последующей электропорацией.

При сравнении уровня продукции цитокинов в ответ на стимуляцию пептидами, все варианты RT вызывали сходный иммунный ответ, достоверно превышающий ответ на не содержащий вставки («пустой») вектор. Иммунизация RT_Ainn вызывала сравнительно более низкий иммунный ответ, чем RT_Ain, но разница была статистически не достоверна. Аналогично, все использованные варианты IN вызывали схожий высокий уровень иммунного ответа. Спленоциты мышей, иммунизированных вариантами PR_Ai, PR_Ai2mut и PR_Ai3mut были способны узнавать пептиды без и с мутациями ЛУ, при этом вариант PR_Ai2mut был наиболее иммуногенным. У мышей, иммунизированных PR_Ai3mut, развивался иммунный ответ, специфический к мутации V82A.

При анализе сыворотки иммунизированных мышей на наличие антиген-специфичных антител было показано, что титр антител против RT и IN не зависел от природы ДНК конструкторов, использованных для иммунизации. ДНК-иммунизация вариантами PR не приводила к формированию специфических антител.

Таким образом, нами были получены плазмидные ДНК, кодирующие различные варианты ферментов ВИЧ с мутациями и без мутаций ЛУ, индуцирующие различные типы иммунного ответа.

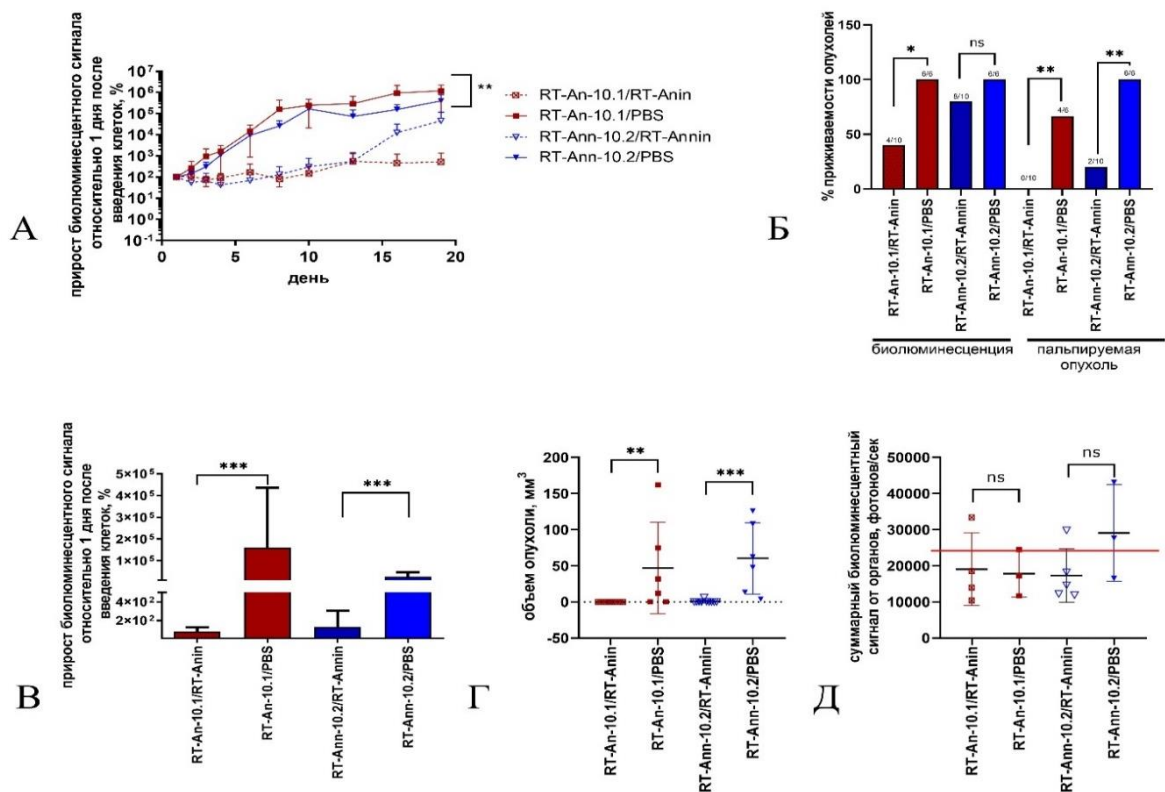
7. Имплантация 4T1uc2 субклонов экспрессирующих гены ферментов ВИЧ-1 мышам, ДНК-иммунизированным соответствующими ферментами («челлендж»)

Эффективность иммунного ответа при иммунизации конструктами RT-Anin и RT-Annin, кодирующими инактивированную RT с мутациями ЛУ, была оценена путем последующего «челленджа» субклонами RT-An-10.1 и RT-Ann-10.2, продуцирующими соответствующие белки в ферментативно активном варианте (отличающимся от иммуногена на 3 а.о. в активном центре). Кинетика роста опухолей в иммунизированных группах была замедлена относительно контрольных групп, иммунизированных PBS и получивших инъекцию тех же субклонов (Рисунок 7А). Как уровень биолюминесцентного сигнала в начале наблюдения (Рисунок 7В), так и пальпируемый размер опухолей в конце эксперимента (Рисунок 7Г) в иммунизированных группах был статистически ниже, чем в контрольных. Иммунизация RT-Anin полностью предотвращала формирование пальпируемых опухолей (Рисунок 7Б, Г). Иммунизация вариантом RT-Annin была способна лишь замедлить развитие опухолей, в 8 из 10 сайтов имплантации клеток происходило увеличение биолюминесцентного сигнала, хотя прирост биолюминесцентного сигнала был в 8,5 раз ниже, чем в контрольной группе (Рисунок 7А-В). В 2 из 10 сайтов наблюдали образование пальпируемых опухолей (Рисунок 7Б, Г).

Интересно, что в ряде сайтов имплантации пальпируемые опухоли не детектировались до конца эксперимента, несмотря на прирост биолюминесцентного сигнала от участка имплантации клеток (Рисунок 7). Это подчеркивает важность использования сочетания биолюминесцентного сигнала с морфометрией.

Ex vivo оценка миграции клеток в легкие, печень и селезенку показала, что иммунизация RT-Annin несколько снижала миграцию клеток в легкие по сравнению с таковой в контрольных животных (Рисунок 7Е), а иммунизация RT-Anin не оказала влияние на миграцию клеток RT-An-10.1 (Рисунок 7Е). Гистологическое исследование подтвердило снижение числа метастазов на фоне иммунизации RT-Anin и RT-Annin. Иммунизация RT-Anin не привела к изменению размера формируемых метастазов, в то время как на фоне иммунизации RT-Annin наблюдали увеличение размера метастазов, состоящих из опухолевых клеток, окруженных инфильтратом из иммунных клеток.

В конце эксперимента методом FluoroSpot был оценен иммунный RT-специфичный иммунный ответ, индуцированный при иммунизации конструктами, кодирующими варианты RT. RT-специфичного иммунного ответа в контрольных мышах обнаружено не было, что говорит о том, что имплантация клеток, экспрессирующих RT, сама по себе не способна вызвать иммунный ответ, нацеленный на данный вирусный антиген. В группе мышей, иммунизированных конструктом RT-Anin и защищенных от образования опухолей субклоном RT-An-10.1, детектировали самый высокий уровень иммунного ответа, выраженного как в продукции отдельных цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2, так и в ко-продукции ИФН- γ /ИЛ-2. В группе мышей, иммунизированных RT-Annin и частично защищенных от формирования RT-Ann опухолей, также детектировали развитие RT-специфичного иммунного ответа. Была выявлена статистически значимая обратная корреляция уровня продукции ИФН- γ и ИЛ-2 и уровня биолюминесцентного сигнала от опухоли, а также уровня продукции ИФН- γ и пальпируемого размера опухоли в конце эксперимента. Таким образом, ДНК-иммунизация всеми конструктами, кодирующими RT, была способна затормозить рост опухоли, продуцирующей аналогичный вариант RT. Наиболее сильно эффект был выражен для варианта RT_Anin при «челлендже» субклоном, кодирующим ферментативно активный вариант этой обратной транскриптазы (RT-An-10.1).



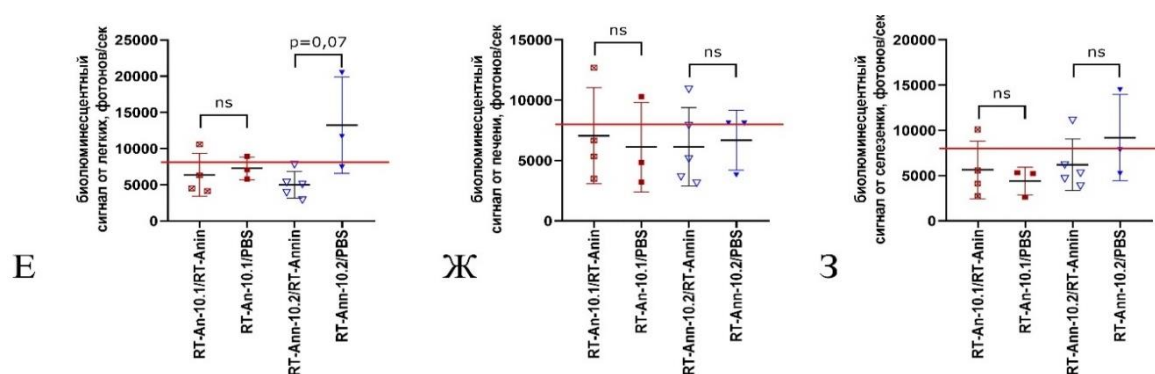


Рисунок 7 – Кинетика роста опухолей и миграции опухолевых клеток субклонов 4T1ис2, представляющих варианты RT (RT-An-10.1, RT-An-10.2) на фоне иммунизации ДНК-вакцинными конструктами, кодирующими аналогичный антиген (RT_Anin, RT_Anin соответственно). А – кинетика роста биоломинесцентного сигнала; Б – процент приживаемости клеток по нарастанию биоломинесцентного сигнала и формированию пальпируемой опухоли; В – анализ прироста биоломинесцентного сигнала на 8-й день наблюдения; Г – пальпируемый объем опухоли в конце эксперимента; Д – миграция опухолевых клеток в дистальные органы по *ex vivo* биоломинесцентному сигналу; Е – биоломинесцентный сигнал от печени; Ж – биоломинесцентный сигнал от легких; З – биоломинесцентный сигнал от селезенки. Данные проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (А) и теста Манна-Уитни для попарных сравнений (Б-З). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, ns – статистически не значимо (not significant).

Для оценки протективности ДНК-иммунизации конструктами, кодирующими IN, были использованы субклоны IN_a_1.2 и IN_a_r2_1.5, выбор субклона был основан на максимальном совпадении аминокислотных последовательностей белка, закодированного в вакцинном конструкте, и белка, представляемого опухолевыми клетками. В случае конструкта IN_in_r1, ввиду невозможности получить субклон, кодирующий данный вариант IN, мышам имплантировали субклон IN_a_1.2, экспрессирующий вариант IN_A, отличающийся от иммуногена на 6 аминокислотных остатков (а.о.). Иммунизация обоими вариантами IN приводила к замедлению роста опухолей (Рисунок 8А). Иммунизация вариантом IN_in_r1 приводила также к заметному снижению приживаемости клеток при оценке формирования пальпируемых опухолей (Рисунок 8Б), при этом сформированные опухоли были достоверно меньше, чем в контрольной группе (Рисунок 8Г). Тем не менее, в целом, нарастание биоломинесцентного сигнала в местах имплантации клеток было детектировано в 9 из 10 сайтов (Рисунок 8Б). Иммунизация вариантом IN_in_r2 приводила к снижению приживаемости как по уровню биоломинесцентного сигнала, так и по числу сформированных пальпируемых опухолей (Рисунок 8Б). Пальпируемые опухоли детектировали в 7 из 10 сайтов имплантации клеток, при этом их размер был в 2,3 раза меньше, чем размер опухолей в контрольной группе (Рисунок 8Г). Иммунизация обоими вариантами интегразы приводила также к снижению уровня биоломинесцентного сигнала от органов (Рисунок 8Д).

Гистологическое исследование срезов легких мышей показало, что для всех групп было характерно низкое число метастазов, группы не различались по их числу на мышь ($1 \pm 0,5$) и по

общему выявленному количеству метастазов в группе ($3 \pm 0,8$), однако размер метастазов у иммунизированных мышей был статистически меньше, чем у мышей из контрольных групп.

IN-специфичного иммунного ответа в контрольных мышках обнаружено не было. Во всех мышках, иммунизированных вариантами интегразы, как защищенных, так и не защищенных от формирования опухолей, был детектирован IN-специфичный иммунный ответ. Уровни продукции ИФН- γ , ИЛ-2 и ИФН- γ /ИЛ-2 в ответ на ДНК-иммунизацию вариантом IN_in_r1 и вариантом IN_in_r2 совпадали, что говорило об их схожей иммуногенности. Как и в случае RT, размер опухоли и биолюминесцентный сигнал в конце эксперимента обратно коррелировал с силой иммунного ответа на пептиды из состава IN.

Таким образом, ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие IN_in_r1 и IN_in_r2 имели разный протективный потенциал при опухолевом «челлендже» при схожей иммуногенности.

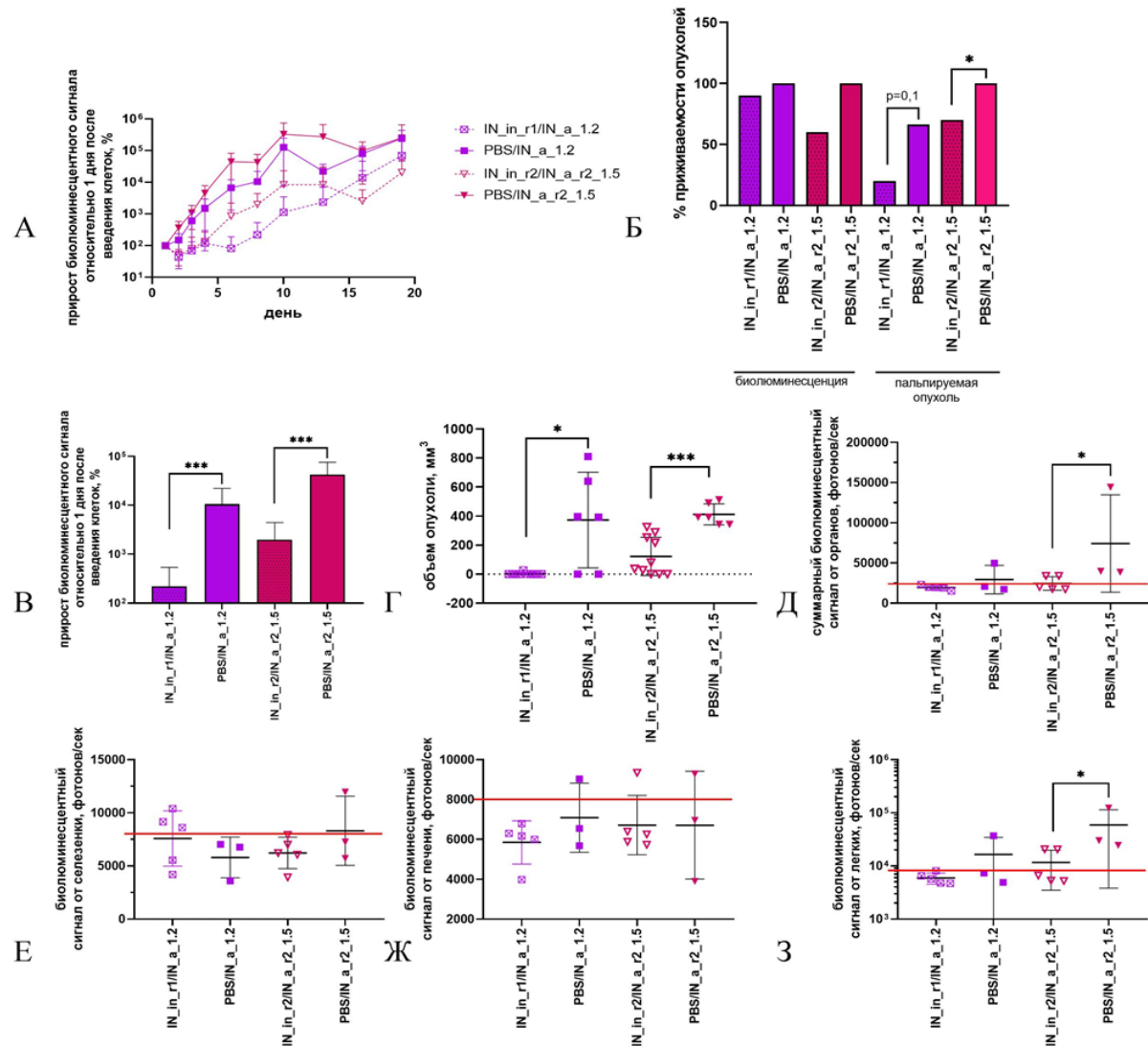


Рисунок 8 – Кинетика роста опухолей и миграции опухолевых клеток субклонов 4T1Luc2, продуцирующих варианты IN, на фоне иммунизации ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими варианты интегразы. А – кинетика роста биолюминесцентного сигнала; Б – процент приживаемости клеток по нарастанию биолюминесцентного сигнала и формированию пальпируемой опухоли; В – анализ прироста биолюминесцентного сигнала на 8-й день наблюдения; Г – пальпируемый объем опухоли в конце эксперимента; Д – миграция опухолевых клеток в дистальные органы по суммарному ex vivo

*биолюминесцентному сигналу от легких, печени и селезенки; E – биолюминесцентный сигнал от печени; Ж – биолюминесцентный сигнал от легких; З – биолюминесцентный сигнал от селезенки. Данные проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (А) и теста Манна-Уитни для попарных сравнений (Б-З). * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$.*

Для оценки протективной способности конструкторов, кодирующих варианты PR, после иммунизации мышам вводили клетки субклона PR20.2, продуцирующего вариант PR_Ai3mut. ДНК-иммунизация вариантом протеазы PR_Ai3mut, идентичным представляемому опухолевыми клетками, привела к замедлению роста опухолей (Рисунок 9А, В) и снижению процента приживаемости клеток (Рисунок 9Б). Увеличение биолюминесцентного сигнала наблюдали в 6 из 10 сайтов введения клеток, однако пальпируемые опухоли детектировали только в 1 из 10 сайтов, при этом размер опухоли был в 15 раз ниже, чем средний размер опухолей, образуемых в контрольной группе (Рисунок 9Г). Иммунизация конструктором PR_Ai, кодирующим вариант PR, наиболее отличающийся от представляемого опухолью, не повлияла на кинетику роста опухолей, что свидетельствовало об отсутствии у нее защитного эффекта (Рисунок 9). Интересно, что при имплантации клеток PR20.2 мышам, ДНК-иммунизированным PR_Ai2mut, отличающимся от представляемого опухолевыми клетками на всего один а.о. V82A, кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала и его уровень на 8-й день наблюдения совпадали с таковым в контрольной группе (Рисунок 9А, В). При этом, формируемые в конце эксперимента опухоли были статистически большего размера, чем опухоли в контрольной группе (Рисунок 9Г).

Иммунизация конструкторами PR_Ai и PR_Ai3mut блокировала миграцию опухолевых клеток в легкие (Рисунок 9). В то же время, иммунизация конструктором PR_Ai2mut не ослабляла, а, напротив, усиливала миграцию опухолевых клеток в дистальные органы (Рисунок 9Д), в частности, в легкие (Рисунок 9Ж). В ходе гистологического анализа срезов печени в группе, иммунизированной вариантом PR_Ai3mut, метастазов в печени выявлено не было. В группе, иммунизированной вариантом PR_Ai, кодирующим вариант, наиболее отличающийся от представляемого опухолью, метастазы не отличались от таковых в контрольной группе ни по числу, ни по размеру. Иммунизация вариантом PR_Ai2mut, кодирующим вариант, отличающийся от представляемого опухолью на 1 а.о., приводила к увеличению общего числа и размера метастазов в печени.

Специфического иммунного ответа на PR в контрольных мышах детектировано не было, то есть продукция PR опухолевыми клетками не вызывала иммунного ответа. В группе, иммунизированной PR_Ai3mut, был детектирован высокий уровень иммунного ответа, в группах, иммунизированных PR_Ai и PR_Ai2mut, иммунный ответ на протеазу детектирован не был. Как и в случае RT и IN, размер опухоли в конце эксперимента обратно коррелировал с магнитудой иммунного ответа на пептиды из состава PR.

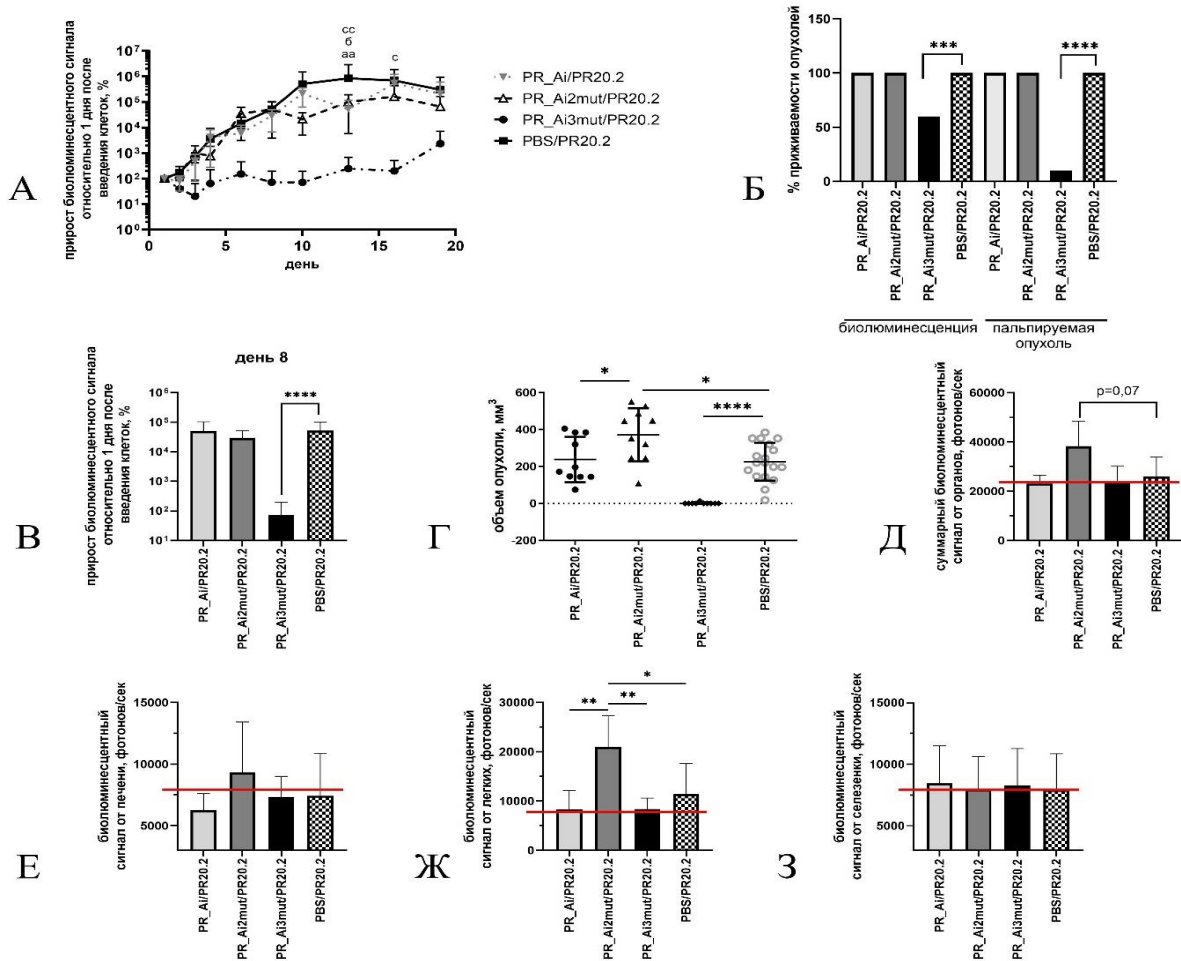


Рисунок 9 – Кинетика роста опухолей и миграции опухолевых клеток субклона PR20.2, представляющего вариант протеазы PR_Ai3mut, на фоне иммунизации ДНК-вакцинными конструктами, кодирующими варианты PR: PR_Ai, PR_Ai2mut и PR_Ai3mut. А – кинетика роста биoluminesцентного сигнала; Б – процент приживаемости клеток по нарастанию биoluminesцентного сигнала и формированию пальпируемой опухоли; В – анализ прироста биoluminesцентного сигнала на 8-й день наблюдения; Г – пальпируемый объем опухоли в конце эксперимента; Д – миграция опухолевых клеток в дистальные органы по *ex vivo* биoluminesцентному сигналу; Е – биoluminesцентный сигнал от печени; Ж – биoluminesцентный сигнал от легких; З – биoluminesцентный сигнал от селезенки. Данные проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (А) и теста Манна-Уитни для попарных сравнений (Б-З). * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, **** – $p < 0,0001$. На панели А группы иммунизированные: PR_Ai: aa – $p < 0,01$; PR_Ai2mut – бб – $p < 0,01$; PR_Ai3mut: с – $p < 0,05$, сс – $p < 0,01$ в сравнении с группой, иммунизированной PBS.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена созданию и характеристике опухолевых клеток, кодирующих ферменты ВИЧ-1 RT, IN, PR и их последующим применением для *in vivo* оценки эффективности ДНК-иммунизации этими белками. В связи с возрастающей частотой выявления ВИЧ-1 с мутациями лекарственной устойчивости (ЛУ) у пациентов, не получавших антиретровирусную терапию, особое внимание было уделено вариантам ферментов с мутациями ЛУ. На основе клеточной линии 4T1Luc2 была получена панель из 9 субклонов, кодирующих RT-A с мутациями ЛУ к НИОТ RT-An (2 субклона) и ННИОТ RT-Ann (2 субклона), IN_A (2 субклона) и ее вариант

с мутациями к ИПЦИ ралтегравире IN_a_r2 (1 субклон), а также вариант PR_A с мутациями ЛУ к различным ИП PR_Ai3mut (2 субклона).

Так как введение экзогенного антигена в опухолевые клетки может привести к их спонтанному отторжению, в ходе работы была отдельно охарактеризована способность полученных субклонов формировать опухоль в сингенных мышах. Было показано, что лишь один субклон, продуцирующий вариант IN_A обладал сниженным туморогенным потенциалом, в то время как большинство субклонов обладали туморогенным потенциалом схожим с или превышающим туморогенный потенциал исходной клеточной линии. Экспрессия ферментов ВИЧ-1 с мутациями ЛУ не повлияла на гистологические характеристики формируемых опухолей.

При имплантации опухолевых клеток сингенным мышам важным является выбор дозы подсаживаемых клеток. В ходе работы было проанализировано четыре варианта дозы и было показано, что для субклонов 4T1Luc2, кодирующих варианты RT, IN и PR, оптимальной является доза в 1×10^4 клеток/сайт введения.

Одним из важных параметров модели на основе опухолевых клеток является их способность к миграции в дистальные органы и метастатическая активность. Экспрессия ферментов ВИЧ-1 не изменяла способность к миграции и метастазированию полученных субклонов и тип и органное/тканевое распределение образуемых ими метастазов. Как и для исходной линии, для полученных субклонов основной мишенью при метастазировании являлись легкие, вторым по степени поражения метастазами органом являлась печень.

На основе синтетических экспрессионно оптимизированных генов ВИЧ-1, кодирующие ферментативно неактивные консенсусные варианты RT, IN и PR с мутациями и без мутаций ЛУ, были получены плазмиды для ДНК-иммунизации (ДНК-вакцинные конструкции). ДНК-иммунизация мышей этими плазмидами показала, что конструкции, кодирующие варианты IN, способны индуцировать как Т-клеточный иммунный ответ, так и формирование IN-специфичных антител. Конструкции, кодирующие RT, способны индуцировать слабый Т-клеточный ответ и высокий титр RT-специфичных антител. Индуцируемый конструктами, кодирующими RT и IN, иммунный ответ не был специфичен к мутациям лекарственной устойчивости. Конструкции, кодирующие варианты PR, обладали только Т-клеточной иммуногенностью, при этом иммунизация конструктом, кодирующим вариант PR_Ai3mut, индуцировала иммунный ответ, направленный на мутацию лекарственной устойчивости.

Полученная панель ДНК-вакцинных конструкций в совокупности с панелью субклонов, презентующих соответствующие вирусные антигены, была использована для оценки функциональной эффективности различных вариантов противовирусного иммунного ответа в системе опухолевого «челленджа». Иммунизация вариантами RT с мутациями ЛУ была способна

предотвратить формирование опухолей и метастазирование субклонов, экспрессирующих соответствующие варианты RT. Иммунизация вариантом IN_in_r1 предотвратила формирование опухолей, экспрессирующих гетерологичный вариант IN_A. ДНК-иммунизация вариантом IN_in_r2 оказалась менее эффективной в защите от формирования опухолей при имплантации опухолевых клеток, хотя они продуцировали вариант интегразы, идентичный представленному иммуногеном IN_a_r2. Иммунизация вариантом PR_Ai3mut, совпадающим с вариантом PR, представляемыми опухолевыми клетками, обеспечивала практически полную защиту от формирования опухолей и полную защиту от метастазирования. В то же время иммунизация наиболее иммуногенным вариантом PR_Ai2mut, отличающимся от варианта PR, экспрессируемого опухолевыми клетками, на один а.о., приводила к формированию опухолей большего размера в сравнении с контрольной группой и повышенной миграции опухолевых клеток в дистальные органы. Иммунизация вариантом PR_Ai, отличающимся от экспрессируемого опухолевыми клетками на 3 а.о., не оказывала влияния ни на кинетику роста, ни на размер опухолей, ни на миграцию и метастазирование в дистальные органы. Во всех группах, частично защищенных от формирования опухолей, размеры опухолей, обратно коррелировали с иммунным ответом на экспрессируемый ими фермент ВИЧ-1

Только для конструкторов, кодирующих варианты PR, иммунный ответ был специфичен к мутации ЛУ. А именно, иммунный ответ, вызываемый ДНК-иммунизацией вариантом PR_Ai3mut, специфически распознавал мутацию V82A, что и обеспечивало защиту от опухолевого роста и метастазирования в этой группе, несмотря на относительно низкую иммуногенность варианта PR_Ai3mut. В остальных случаях, ЛУ варианты были иммуногенны и обеспечивали кросс-реактивный иммунный ответ на варианты ферментов ВИЧ с мутациями и без мутаций ЛУ.

Таким образом, разработанная модель позволяет оценить эффективность различных видов иммунного ответа, направленного на варианты ферментов ВИЧ-1 с мутациями и без мутаций ЛУ, а полученные данные демонстрируют, что мутации ЛУ могут быть связаны не только с уходом от ингибирования антиретровирусными препаратами, но и с уходом от иммунного ответа. Полученные результаты могут найти применение в создании вакцин, нацеленных на варианты генов ВИЧ-1 с мутациями ЛУ, а разработанные в ходе работы субклоны опухолевых клеток – в доклинических испытаниях их протективных свойств.

ВЫВОДЫ

1. Получено 9 субклонов линии 4T1lus2, кодирующих варианты обратной транскриптазы (RT) с мутациями лекарственной устойчивости к нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам RT, интегразу (IN) и ее вариант с мутациями к ралтегравиру,

а также вариант протеазы (PR) с мутациями лекарственной устойчивости к различным ингибиторам протеазы.

2. Экспрессия лекарственно-устойчивых вариантов ферментов ВИЧ-1 не изменяла туморогенный потенциал и гистологические характеристики формируемых опухолей. Все субклоны способны формировать опухоли в сингенных мышцах, представляющие собой позднюю стадию (G3) слабодифференцированной аденокарциномы с повышенной клеточной и ядерной атипией и частыми областями некроза и воспаления.

3. Экспрессия лекарственно-устойчивых вариантов ферментов ВИЧ-1 не изменяла органную специфичность и уровень миграции субклонов опухолевых клеток оцененные по биолюминесцентному сигналу от органов *ex vivo*. Опухолевые клетки мигрировали в легкие и печень. Для отдельных субклонов при гистологическом исследовании были выявлены различия в числе и размере метастаз в печени.

4. Подобраны оптимальные параметры имплантации и мониторинга показателей роста опухоли, миграции и метастазирования. Для субклонов 4T1luc2, кодирующих варианты RT, IN и PR оптимальной являлась доза имплантации в 1×10^4 клеток/сайт введения с последующим мониторингом роста опухоли по кинетике биолюминесценции от сайта имплантации с 1 по 10 день и морфометрически в конечной точке эксперимента. Миграция клеток в дистальные органы может быть оценена по биолюминесцентному сигналу от органов *ex vivo*.

5. Иммунный ответ на ДНК-иммунизацию конструктами, кодирующими варианты RT, опосредованный RT-специфичными антителами, частично защищал иммунизированных животных от формирования опухолей в рамках разработанной модели при имплантации субклонов 4T1luc2, экспрессирующих соответствующий вариант RT.

6. Смешанный иммунный ответ на ДНК-иммунизацию конструктами, кодирующими варианты IN, опосредованный как Т-клетками, так и IN-специфичными антителами, замедлял рост опухолей и подавлял метастазирование, но не обеспечивал защиты от формирования опухолей в рамках разработанной модели при имплантации субклонов 4T1luc2, экспрессирующих как соответствующий вакцинному вариант IN, так и вариант имеющий аминокислотные замены.

7. Иммунный ответ на ДНК-иммунизацию конструктами, кодирующими варианты PR, опосредованный CD8⁺ Т-клетками, в рамках разработанной модели защищал только от формирования опухолей при имплантации субклонов 4T1luc2, кодирующих соответствующий вакцинному вариант PR. При этом было показано, что иммунный ответ, направленный на другие участки PR (кроме участка, содержащего замену V82A), способствовал росту опухолей и усиливал метастазирование.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Одним из направлений дальнейшей работы будет расширение описанного в работе подхода по созданию моделей для оценки эффективности ДНК-иммунизации против ВИЧ-1 на другие вирусные, а также опухолевые антигены. Кроме того, планируется использовать полученные в ходе работы производные клеточной линии 4T1Luc2 для изучения патогенеза, связанного с конститутивной продукцией вирусных белков клетками при хронической вирусной инфекции.

Важной задачей дальнейших исследований также является изучение детальных аспектов иммунного ответа, связанного с предотвращением опухолевого роста субклонов 4T1Luc2, экспрессирующих антигены ВИЧ-1.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Включение разработанной модели в доклинические испытания терапевтических вакцин против ВИЧ-1.

2. Включение вариантов обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ-1 в состав разрабатываемых терапевтических вакцин, с учетом корректного подбора вариантов протеазы с мутациями ЛУ ввиду изменений в T-клеточных эпитопах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. HIV-1 Reverse Transcriptase Promotes Tumor Growth and Metastasis Formation via ROS-Dependent Upregulation of Twist / **E. Bayurova**, J. Jansons, D. Skrastina, O. Smirnova, D. Mezale, A. Kostyusheva, D. Kostyushev, S. Petkov, P. Podschwadt, V. Valuev-Elliston, S. Sasinovich, S. Korolev, P. Warholm, A. Latanova, E. Starodubova, A. Tukhvatulin, O. Latyshev, R. Selimov, P. Metalnikov, A. Komarov, O. Ivanova, T. Gorodnicheva, S. Kochetkov, M. Gottikh, I. Strumfa, A. Ivanov, I. Gordeychuk, M. Isaguliants // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Т. 2019. – С. 6016278. DOI: 10.1155/2019/6016278, (WoS, Scopus).
2. Cellular Immune Response Induced by DNA Immunization of Mice with Drug Resistant Integrases of HIV-1 Clade A Offers Partial Protection against Growth and Metastatic Activity of Integrase-Expressing Adenocarcinoma Cells / M. Isaguliants, O. Krotova, S. Petkov, J. Jansons, **E. Bayurova**, D. Mezale, I. Fridrihsone, A. Kilpeläinen, P. Podschwadt, Y. Agapkina, O. Smirnova, L. Kostic, M. Saleem, O. Latyshev, O. Eliseeva, A. Malkova, T. Gorodnicheva, B. Wahren, I. Gordeychuk, E. Starodubova, A. Latanova // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 6. – P. 1219. DOI: 10.3390/microorganisms9061219, (WoS, Scopus).
3. HIV-1 Protease as DNA Immunogen against Drug Resistance in HIV-1 Infection: DNA Immunization with Drug Resistant HIV-1 Protease Protects Mice from Challenge with Protease-Expressing Cells / S. Petkov, A. Kilpeläinen, **E. Bayurova**, A. Latanova, D. Mezale, I. Fridrihsone, E. Starodubova, J. Jansons, A. Dudorova, I. Gordeychuk, B. Wahren, M. Isaguliants // *Cancers*. – 2022. – Vol. 15. – HIV-1 Protease as DNA Immunogen against Drug Resistance in HIV-1 Infection. – № 1. – P. 238. DOI: 10.3390/cancers15010238, (WoS, Scopus).