

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

АВДОШИНА
Дарья Валерьевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ И ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ДНК-ВАКЦИН
ПРОТИВ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННОГО РАКА**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Беликова-Исагулянц Мария Георгиевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Вирус папилломы человека.....	14
1.1.1 Организация генома вируса папилломы человека	14
1.1.2 Классификация типов вирусов папилломы человека.....	15
1.1.3 Репликация вируса папилломы человека и его жизненный цикл.....	16
1.1.4 Патогенез папилломавирусной инфекции	18
1.1.5 Механизмы уклонения вируса папилломы человека от иммунного ответа хозяина	19
1.2 Белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа, их структура и свойства.....	20
1.2.1 Онкогенный потенциал белка Е6	20
1.2.2 Онкогенный потенциал белка Е7	20
1.2.3 Структура белка Е6.....	21
1.2.4 Структура белка Е7.....	22
1.2.5 Сплайсинг Е6 и образование изоформ.....	23
1.2.6 Иммуногенные свойства белков Е6 и Е7	25
1.3 Терапевтические вакцины против злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусом папилломы человека.....	26
1.4 Потенциал применения ДНК-вакцин в терапии против вируса папилломы человека	32
1.4.1 Иммунный ответ, индуцируемый ДНК-вакцинами	32
1.4.2 Повышение иммуногенности ДНК-вакцин	33
1.5 Методы доставки ДНК-вакцин	34
1.5.1 Роль солевого состава растворителя ДНК в инъекционной смеси	34
1.5.2 Электропорация	35
1.5.3 Сонопорация	36
1.6 Модели для испытаний терапевтических вакцин против злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусом папилломы человека	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Реагенты.....	40
2.1.1 Праймеры	40
2.1.2 Белки и пептиды	42
2.1.3 Антитела.....	43
2.2 Материалы и объекты.....	43
2.2.1 Бактериальные штаммы.....	43

2.2.2 Плазмиды и лентивирусные векторы.....	44
2.2.3 Эукариотические клеточные линии	44
2.2.4 Лабораторные животные	44
2.3 Методы исследований	44
2.3.1 Схема экспериментальной работы	44
2.3.2 Получение и анализ консенсусных аминокислотных последовательностей E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	46
2.3.3 Получение ДНК-иммуногенов, кодирующих белки E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	47
2.3.4 Дизайн лентивирусного вектора pLJM1_pGK_E6E7, кодирующего E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	48
2.3.5 Работа с эукариотическими клетками.....	48
2.3.5.1 Культивирование и хранение эукариотических клеток	48
2.3.5.2 Трансфекция эукариотических клеток	49
2.3.5.3 Получение лентивирусных частиц	49
2.3.5.4 Трансдукция эукариотических клеток лентивирусными частицами	50
2.3.5.5 Определение титра лентивирусных частиц	50
2.3.5.6 Получение моноклональных производных клеточной линии 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	50
2.3.6 Работа с прокариотическими клетками	51
2.3.6.1 Получение компетентных клеток <i>E. coli</i>	51
2.3.6.2 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i>	51
2.3.6.3 Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E. coli</i>	52
2.3.7 Выделение тотальной РНК и ДНК из клеточных культур и тканей мышей	52
2.3.7.1 Выделение тотальной РНК и ДНК из клеточных культур.....	52
2.3.7.2 Выделение ДНК из тканей мышей	53
2.3.8 Детекция ДНК и мРНК E6 и E7 методом полимеразной цепной реакции	53
2.3.8.1 Конвенциональная полимеразная цепная реакция	53
2.3.8.2 Цифровая капельная полимеразная цепная реакция.....	53
2.3.8.3 Анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени.....	54
2.3.8.4 Оценка количества ДНК, кодирующей E6/E7 вируса папилломы человека 16 типа в мышинных тканях, залитых в парафиновые блоки.....	55
2.3.8.4.1 Детекция плазмидной ДНК, кодирующей E6/E7 вируса папилломы человека 16 типа и оценка ее количества	55

2.3.8.4.2 Детекция ДНК, кодирующей Е6/Е7 вируса папилломы человека 16 типа, и оценка ее количества в мышинных тканях	57
2.3.9 Агарозный гель-электрофорез образцов РНК и ДНК	57
2.3.10 Работа с лабораторными мышами.....	57
2.3.11 Эксперименты по оптимизации доставки плазмидной ДНК мышам	58
2.3.11.1 Определение пороговой силы буферного раствора, поддерживающего доставку плазмидной ДНК при внутрикожной инъекции.....	59
2.3.11.2 Определение оптимальных параметров сонопорации для эффективной доставки плазмидной ДНК	59
2.3.11.3 Определение оптимальных параметров электропорации для эффективной доставки плазмидной ДНК	61
2.3.12 ДНК-иммунизация мышей	62
2.3.13 Имплантация опухолевых клеток мышам	66
2.3.14 Мониторинг <i>in vivo</i> биолюминесцентного сигнала.....	66
2.3.15 Оценка роста опухолей.....	67
2.3.16 Эвтаназия и мониторинг миграции опухолевых клеток в дистальные органы мышей <i>ex vivo</i>	68
2.3.17 Гистологическая оценка органов и опухолей мышей	69
2.3.18 Получение сыворотки крови иммунизированных мышей	69
2.3.19 Иммуноферментный анализ сывороток иммунизированных мышей.....	70
2.3.20 Проточная цитофлуориметрия с внутриклеточным окрашиванием цитокинов	70
2.3.21 Статистический анализ.....	71
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	72
3.1 Разработка иммуногенов, входящих в основу терапевтической ДНК-вакцины против вируса папилломы человека 16 типа	72
3.1.1 Актуализация аминокислотных последовательностей белков Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа для конструирования ДНК-иммуногенов.....	72
3.1.2 Анализ точечных аминокислотных замен в белках Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа	72
3.1.3 Дизайн ДНК-иммуногенов	82
3.1.4 Оценка экспрессионной активности ДНК-иммуногенов, кодирующих Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа	84
3.2 Определение оптимального метода доставки ДНК-вакцинных конструкторов.....	86
3.2.1 Определение рабочего диапазона ионной силы буферного раствора для внутрикожного введения плазмидной ДНК	87

3.2.2 Оптимизация условий доставки ДНК методом сонопорации.....	88
3.2.3 Оптимизация условий электропорации	91
3.2.4 Сравнение эффективности методов доставки ДНК	93
3.2.5 Прогнозирование развития иммунного ответа на ДНК-иммуноген, введенный различными способами доставки.....	95
3.3 Исследование способности плазмидных ДНК вызывать иммунный ответ в мышинной модели	97
3.3.1 Выбор плазмид для оценки влияния способа доставки на силу иммунного ответа	97
3.3.2 Оценка зависимости силы иммунного ответа от способа введения ДНК-иммуногена.....	98
3.3.2.1 Оценка силы антительного иммунного ответа.....	98
3.3.2.2 Оценка силы клеточного иммунного ответа	99
3.4 Моделирование сценария взаимодействия двух ДНК-иммуногенов при совместном введении	100
3.5 Оценка иммуногенности E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	102
3.6 Оценка терапевтического потенциала разработанных ДНК-иммуногенов на модели ТС-1/luc2	108
3.7 Создание новой мышинной модели опухолевых клеток, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	111
3.7.1 Получение производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа.....	111
3.7.1.1 Дизайн лентивирусного вектора, кодирующего E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа, и получение экспрессирующих его лентивирусных частиц.....	111
3.7.1.2 Выбор клеточной основы для модели опухолевых мышинных клеток	111
3.7.1.3 Создание производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа.....	112
3.7.1.4 Оценка количества геномных вставок E6 и E7 в субклонах линии 4T1luc2.....	112
3.7.2 <i>In vitro</i> характеристика 4T1luc2 клонов со вставками ДНК E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа.....	112
3.7.2.1 Оценка уровней экспрессии мРНК E6 и E7 в субклонах линии 4T1luc2.....	112
3.7.2.2 Изменения уровней экспрессии мРНК E6 и E7 в клетках, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа при длительном культивировании	113
3.7.2.3 Анализ распределения сплайсированных изоформ E6 в клетках, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	115
3.7.3 <i>In vivo</i> характеристика клеток, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа	118

3.7.3.1 Туморогенный потенциал субклонов линии 4T1lus2 экспрессирующих <i>E6</i> и <i>E7</i> вируса папилломы человека 16 типа.....	118
3.7.3.2 Миграция опухолевых клеток, экспрессирующих <i>E6</i> и <i>E7</i> вируса папилломы человека 16 типа в дистальные органы.....	120
3.7.3.3 Гистологическая оценка органов мышей, имплантированных клетками субклонов В2 и Н6	123
3.8 Использование клеток 4T1lus2, экспрессирующих <i>E6</i> и <i>E7</i> вируса папилломы человека 16 типа, для оценки эффективности терапевтической ДНК-иммунизации.....	125
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ.....	148
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	150
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	151
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	152
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	155

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Инфицирование высокоонкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ) является причиной около 5% онкологических заболеваний в мире, включая рак шейки матки (РШМ) и значительную часть других видов рака аногенитальной области, плоскоклеточного рака кожи, рака головы и шеи [1]. Одним из перспективных подходов к лечению злокачественных новообразований, ассоциированных с хронической инфекцией ВПЧ, является терапевтическая иммунизация (в т.ч. ДНК-иммунизация), запускающая клеточно-опосредованный иммунный ответ, направленный на элиминацию злокачественных клеток. К сожалению, многочисленные разработанные терапевтические вакцины-кандидаты (в т.ч. ДНК-вакцины), показавшие многообещающие результаты в доклинических исследованиях, оказались не эффективными в клинических испытаниях [2–4]. В первую очередь это обусловлено низким трансляционным потенциалом данных, получаемых в доклинических исследованиях.

Для разработки нового поколения эффективных терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака необходимы тщательно охарактеризованные *in vivo* и *in vitro* модели ВПЧ-ассоциированного онкогенеза. При разработке вакцинных иммуногенов на основе онкогенных белков ВПЧ предпочтительно использование подхода синтетического консенсуса, учитывающего все варианты этих белков изолятов ВПЧ, циркулирующих в популяции. При этом важно определить влияние замен в консенсусных аминокислотных (АК) последовательностях вакцинных иммуногенов. Оптимизация способов доставки вакцинных ДНК-иммуногенов и подбор оптимальных схем иммунизации позволит повысить способность поствакцинального иммунного ответа ограничивать рост и метастазирование ВПЧ-ассоциированных опухолей.

Степень разработанности темы исследования

Мишенями большинства разработанных на сегодняшний день терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных новообразований являются белки Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа (ВПЧ16) [5]. Масштабный анализ современных вариантов белков Е6 и Е7 изолятов ВПЧ16, циркулирующих в европейской популяции, в частности Российской Федерации (РФ), не проводился. Рекомендации по совместному введению вакцинных иммуногенов на основе Е6 и Е7 на сегодняшний день отсутствуют. В настоящий момент клиническое применение ДНК-вакцин ограничено, в частности, ввиду несовершенства методов доставки. Так, например, пороговая ионная сила буферного раствора, обеспечивающая эффективную доставку ДНК в клетку, не определена. На сегодняшний день «золотым стандартом» доставки вакцинных

кандидатов на основе ДНК остается электропорация, однако универсального протокола электропорации не существует. Альтернативным неинвазивным методом внутрикожной доставки ДНК является сонопорация, но объективная информация об ее эффективности, в том числе по сравнению с электропорацией, отсутствует.

Наиболее широко используемыми моделями для тестирования терапевтических вакцинных кандидатов против ВПЧ-ассоциированного рака являются сингенные мышинные модели — эпителиальные клетки легких мышей, immortalized co-expression *E6* и *E7* ВПЧ16 и *RAS*, клетки ТС-1 и их производные, экспрессирующие люциферазу светлячка, клетки ТС-1/luc2 [6; 7]. Однако необходимо отметить большое расхождение между эффективностью вакцин-кандидатов в экспериментах с имплантацией клеток ТС-1 и клинической эффективностью этих же вакцин-кандидатов [8]. Данные об *in vitro* свойствах клеток ТС-1/ТС-1/luc2 и механизмах, за счет которых эти модели не позволяют объективно оценить терапевтический потенциал вакцин-кандидатов, отсутствуют.

Целью настоящей работы являлось конструирование иммуногенов на основе *E6* и *E7* ВПЧ16 в составе ДНК-вакцинных конструкций, разработка подходов к их введению и методов оценки их эффективности на мышинных моделях на основе клеточных линий мышей, экспрессирующих гены *E6* и *E7* ВПЧ16.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи исследования**:

- 1) провести анализ изменчивости аминокислотных последовательностей белков *E6* и *E7* изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории Европы, включая европейскую часть РФ, и сконструировать ДНК-вакцинные конструкторы, кодирующие консенсусные белки *E6* и *E7* ВПЧ16, способные воздействовать на большинство вариантов ВПЧ16, циркулирующих в популяции;
- 2) с использованием плазмидной ДНК, кодирующей репортерный белок, подобрать оптимальные методы доставки плазмид *in vivo* на мышах. С использованием модельных иммуногенов с охарактеризованными свойствами подобрать схемы ДНК-иммунизации, обеспечивающие выработку эффективного иммунного ответа на отдельные иммуногены;
- 3) используя оптимальный метод доставки плазмидной ДНК оценить иммуногенность полученных консенсусных последовательностей *E6* и *E7* ВПЧ16, циркулирующих на территории Европы, включая европейскую часть РФ, в составе ДНК-вакцинных конструкций *in vivo* на мышах;
- 4) исследовать способность полученных консенсусных последовательностей *E6* и *E7* ВПЧ16 в составе ДНК-вакцинных конструкций ограничивать рост и метастатическую активность опухолевых клеток в стандартной модели для тестирования терапевтических вакцин против

ВПЧ-ассоциированного рака на основе клеточной линии ТС-1/luc2; оценить корректность использования модели ТС-1/luc2 для указанной цели;

5) разработать новую модель для тестирования терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака на основе опухолевой клеточной линии мышей 4T1luc2, модифицированной для стабильной экспрессии генов *E6* и *E7* ВПЧ16, и оценить ее эффективность, и предикативную силу.

Научная новизна

В работе впервые был проведен анализ белков *E6* и *E7* циркулирующих на территории Европы и европейской части РФ изолятов ВПЧ16, как по общей изменчивости, так и по региональным различиям. Впервые было определено пороговое значение ионной силы буфера, необходимого для эффективной доставки ДНК *in vivo*. Впервые было продемонстрировано, что одиночное введение ДНК *E7* ВПЧ16 индуцирует продукцию цитокина ФНО- α , а также увеличивает количество воспалительных инфильтратов в печени, при совместном введении с ДНК *E6* приводит к снижению иммунного ответа на *E6*, что исключает возможность их совместного введения. Впервые была проведена характеристика *in vitro* широко используемой в доклинических испытаниях терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований модели ТС-1/luc2 и показаны возможные механизмы, за счет которых данная модель не позволяет в полной мере оценить терапевтический потенциал вакцинных кандидатов. Были впервые получены производные высоко туморогенной, спонтанно метастазирующей клеточной линии 4T1luc2, экспрессирующие *E6* и *E7* ВПЧ16, показана возможность их использования для оценки терапевтического потенциала модельных ДНК-вакцин на основе *E6* и *E7* ВПЧ16.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. В работе получены данные по вариабельности белков *E6* и *E7*, циркулирующих в Европе и европейской части РФ изолятов ВПЧ16. Важным результатом является выявление большого количества аминокислотных замен в белке *E6* в областях связывания *E6/p53*, но не в структурно-функциональных доменах белка, определяющих его функции. Нарушение участков связывания *E6/p53* напрямую влияет на протеолиз *p53* и, как следствие, онкогенный потенциал белка *E6*. Эти данные могут быть использованы для конструирования новых актуализированных терапевтических вакцин против неоплазий и опухолей, ассоциированных с ВПЧ16 инфекцией, для европейской популяции.

2. Были определены основные физические параметры методов электропорации и сонопорации, влияющие на их эффективность при доставке плазмидной ДНК *in vivo*. Полученные результаты могут быть использованы при разработке протоколов доставки ДНК мышам указанными методами с применением другого, отличного от используемого в работе, оборудования. Значение определенного в работе порогового значения ионной силы буфера, необходимого для эффективной доставки ДНК *in vivo*, может быть учтено при разработке протоколов непринудительной и принудительной доставки ДНК *in vivo*.

3. В работе показано, что использование вакцинного иммуногена на основе E7 ВПЧ16 не целесообразно и может приводить к негативным последствиям как при одиночном использовании, так и в составе с вакцинным иммуногеном на основе E6 ВПЧ16.

4. В работе продемонстрировано, что эффективность отбора кандидатных вакцин с высокой иммуногенностью зависит от используемых доклинических моделей. Показаны ограничения широко используемой мышинной модели ТС-1/luc2. В работе демонстрируется возможность применения моделей на основе сингенной клеточной линии мышей, линии 4T1luc2, экспрессирующей E6 и E7 ВПЧ16, как аналога «естественных» агрессивных опухолей, ассоциированных с ВПЧ16, для строгой оценки эффективности кандидатных вакцин против ВПЧ.

Методология и методы исследования

В ходе работы были использованы современные методы молекулярной биологии: работа с культурами эукариотических клеток, работа с бактериальными клетками, трансфекция, трансформация, получения лентивирусных частиц, трансдукция, конвенциональная полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ), цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), получение моноклональных производных эукариотических клеток. Использованы методы работы с экспериментальными животными: введение ДНК методом электропорации и сонопорации *in vivo*, имплантация мышам клеток, экспрессирующих люциферазу, с последующей детекцией биоллюминесценции *in vivo* и *ex vivo*. Использованы иммунологические методы: многопараметрическая проточная цитометрия, иммуноферментный анализ. Использованы гистологические методы. Анализ полученных данных проводился методами параметрической и непараметрической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. В циркулирующих на территории Европы и европейской части РФ изолятах ВПЧ16 аминокислотная последовательность белка E6 вариабельна, при этом имеются незначительные

региональные различия в частоте выявляемости отдельных аминокислотных замен. Наиболее вариабельные положения белков E6 (17, 21, 32, 85, 90) и E7 (29) локализуются в участках связывания E6/p53, а также в большом количестве В- и Т-клеточных эпитопов.

2. После внутрикожной инъекции мышам модельных ДНК-вакцинных конструкций оптимальные условия электропорации обеспечивают более высокий уровень продукции вводимого антигена *in vivo* в сравнении с оптимальным протоколом сонопорации, а также в сравнении с инъекцией без последующего воздействия физическими методами. Оптимальные условия электропорации, обеспечивающие эффективную доставку ДНК-вакцинных конструкций, позволяют индуцировать сильный иммунный ответ в мышинной модели.

3. ДНК-иммунизация E6 индуцирует развитие специфического Т-клеточного ответа Th1-типа. ДНК-иммунизация E7 не вызывает выраженного специфического Т-клеточного ответа, однако индуцирует продукцию цитокина ФНО- α спленоцитами, а также формирование иммунных инфильтратов в печени. Одновременное введение ДНК-иммуногенов E6 и E7 приводит к снижению иммунного ответа против E6 в сравнении с введением ДНК E6 как единственного иммуногена.

4. Экспериментальная модель с имплантацией опухолевых клеток TC-1/luc2 сингенным мышам не позволяет в полной мере оценить терапевтический потенциал экспериментальных вакцин против ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований ввиду отсутствия метастатического потенциала и экспрессии изоформ E6, отличных от таковых при вирусном канцерогенезе.

5. Экспериментальная модель на основе производных высокотуморогенной и высокометастатической клеточной линии аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2, экспрессирующей E6 и E7 ВПЧ16, позволяет производить достоверную оценку эффективности экспериментальных терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака по показателям метастазирования и паттернам экспрессии изоформ E6 в опухолевых клетках, соответствующих таковым при вирусном канцерогенезе. Модельный ДНК-вакцинный препарат, содержащий консенсусную последовательность E6 ВПЧ16, способен ограничивать рост опухолевых клеток TC-1/luc2, не способен ограничивать рост и метастатическую активность клеток 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы исследования были представлены и обсуждены в 14 докладах на международных и отечественных конференциях: международная конференция «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy» (онлайн формат, 2020); международный симпозиум «Chronic viral infections and cancer, openings for vaccines» (онлайн формат, 2020);

международный симпозиум «Chronic viral infection and cancer, openings for vaccines» (онлайн формат, 2021); международная конференция «2021 ISV Annual Congress» (онлайн формат, 2021); III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Москва, Россия, 2021); всероссийская научно- практическая конференция с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (2021 год); международная конференция «2022 ISV Annual Congress» (онлайн формат, 2022); международная конференция «Vaccines and Vaccination During and Post Covid Pandemics / VAC&VAC 2022» (онлайн формат, 2022); IX Петербургский международный онкофорум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2023); 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (Пущино, 2023); международная конференция «2023 ISV Annual Congress» (онлайн формат, 2023); X Петербургский международный онкофорум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2024).

Личное участие автора в получении результатов

Автором проведен сбор и анализ научной информации, изучена степень разработанности темы, определены цель и задачи исследования. Результаты, представленные в исследовании, получены непосредственно автором или при его участии. Автор лично проанализировал полученные результаты, произвел статистическую обработку данных, сформулировал положения и выводы диссертации. Лично или с участием автора подготовлены публикации по результатам исследования и материалы конференций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенной работы соответствуют областям исследований: пунктам 4, 7, 10, 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликовано 5 печатных работ, из них 4 – научные статьи и 1 – научный обзор, опубликованные в журналах, индексируемых в международных библиографических базах данных: Web of Science, Scopus и RSCI. Все публикации соответствуют требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы результаты диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 192 странице и состоит из введения и 4-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, а также заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений и список литературы, содержащий 387 источников. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 37 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирус папилломы человека

Папилломавирусы — маленькие безоболочечные, эпителиотропные ДНК-вирусы семейства *Papillomaviridae*. Согласно последним данным Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses — ICTV), семейство *Papillomaviridae* включает два подсемейства: *First-* и *Secondpapillomaviridae*. Первое подсемейство разделяется на несколько родов, обозначаемых греческими буквами, второе подсемейство содержит только один род *Alefpapillomavirus*. Внутриродовая классификация делит представителей родов на виды (обозначаемые греческой буквой рода и арабской цифрой) и типы/генотипы (обозначаемые арабской цифрой) [9]. Папилломавирусы родов *alpha-*, *beta-*, *gamma-*, *mu-* и *nu-* инфицируют человека и обозначаются общим термином «вирус папилломы человека», и являются наиболее распространенными инфекционными агентами, передающимися в основном половым путем среди мужчин и женщин во всем мире [10]. Представители разных родов ВПЧ схожи между собой в жизненном цикле, но различны в тропности тканей. Большая часть папилломавирусов рода *alpha-* поражает слизистые оболочки аногенитального тракта и верхних дыхательных путей. Представители рода *beta-*, а также представители родов *gamma-*, *mu-* и *nu-* и части рода *alpha-* поражают кожу [9].

1.1.1 Организация генома вируса папилломы человека

Организация геномов всех ВПЧ схожа. Вирусные геномы состоят из двухцепочечной кольцевой ДНК размером около 8000 п. о., ассоциированной с гистоноподобными белками, функционально разделенной на три области:

1) раннюю область (E), содержащую открытые рамки считывания (ОРС), кодирующие белки участвующие в репликации, транскрипции, высвобождении и распространении вирионов, а также белки, отвечающие за уклонение вируса от иммунной системы хозяина, поддержание пролиферации, иммортализации и трансформации эпителиальных клеток;

2) позднюю область (L), содержащую ОРС, кодирующие структурные белки капсида;

3) некодирующую восходящую регуляторную область (URR) или длинную контрольную область (LCR), содержащую набор цис-элементов, контролирующих репликацию и транскрипцию вирусной ДНК. Область LCR содержит промотор p97 вместе с регуляторными мотивами и обладает большой вариабельностью [11; 12].

В зависимости от типа ВПЧ вирусный геном может содержать от 5 до 11 ОРС [13]. Геномы наиболее распространенных типов ВПЧ – ВПЧ16 и ВПЧ18 содержат восемь ОРС: шесть ранних (E1, E2, E4, E5, E6, E7) и две поздних (L1, L2) [13]. Структура генома ВПЧ на примере ВПЧ16 представлена на Рисунке 1.

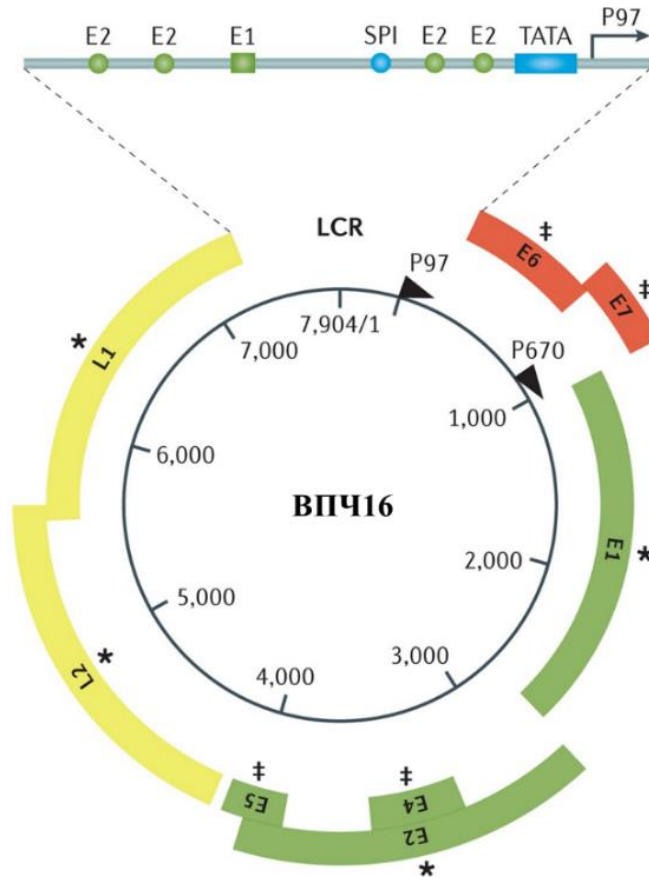


Рисунок 1 – Организация генома ВПЧ16. Некодирующая длинная контрольная область (LCR) содержит ранний (p97) промотор, а также точку начала репликации вируса, посттранскрипционные контрольные последовательности, способствующие экспрессии вирусных генов. Отмечены сайты связывания белков E1 и E2 и транскрипционного фактора SP1. Из шести ранних ОРС четыре отмечены зеленым цветом (E1, E2, E4 и E5), две (E6 и E7) – красным цветом. Желтым цветом отмечены поздние ОРС L1 и L2. Основные вирусные белки, необходимые для репликации генома, сборки и высвобождения вируса, отмечены (*). Вспомогательные вирусные белки, влияющие на клеточный цикл клетки-хозяина и отвечающие за взаимодействие с иммунной системой, в частности, уклонение от иммунного ответа, отмечены (‡). Ранний (p97) и поздний (p670) промоторы отмечены черными стрелками (адаптировано по: Schiffman, M. et al., 2016 [14])

1.1.2 Классификация типов вирусов папилломы человека

Филогенетическая классификация типов (генотипов) ВПЧ строится на основе консервативной нуклеотидной последовательности гена *L1*, кодирующего большой капсидный белок [13]. В настоящее время подтверждено более 230 типов ВПЧ [15]. По клинической значимости типы ВПЧ разделяют на группы:

- низкого канцерогенного риска (ВПЧ НКР) (6, 11, 42, 43, 44 типы), вызывающие в основном остроконечные кондиломы и бородавки [10; 11];
- высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типы), инфицирование которыми приводят к 5% всех случаев онкологических заболеваний во всем мире, включая РШМ, большинство других видов рака аногенитальной области и значительную долю случаев рака головы и шеи [1; 10].

Большинство типов ВПЧ ВКР (ВПЧ16, 31, 33, 35, 52, 58) относится к виду *alpha-9*. Внутри одного типа последовательности ВПЧ разделяются на линии и подлинии. На уровне линии ВПЧ различаются друг от друга на ~1,0–10% по всему геному и обозначаются заглавной буквой (например, А). Подлинии различаются друг от друга на ~0,5–1,0% и обозначаются числом (например, А1). Классификация линий и подлиний проводится по всему геному (не по отдельным последовательностям какого-либо отдельного белка) [16]. Описана географическая кластеризация и охарактеризована клиническая значимость вариаций внутритиповых последовательностей [16]. Филогенетически внутри наиболее распространенного 16 типа выделяют несколько доминантных вариантов вируса: А1–3 (Европейские варианты), А4 (Азиатский вариант), В и С (Африканские варианты), D1–3 (Американские варианты) [17; 18].

На территории РФ наиболее распространенным типом ВПЧ среди женщин и мужчин является ВПЧ 16 типа [19; 20], при этом подавляющее большинство вариантов ВПЧ16 принадлежат к линии А (субгенотип А) [21]. Доля ВПЧ18, ВПЧ31, ВПЧ52 и ВПЧ58 составляет от 5 до 10% случаев, доля остальных ВПЧ ВКР — менее 5% [22].

1.1.3 Репликация вируса папилломы человека и его жизненный цикл

Развитие продуктивной формы инфекции ВПЧ (как ВПЧ ВКР, так и ВПЧ НКР) схоже. Жизненный цикл ВПЧ, от инфицирования до высвобождения вирионов, тесно связан с дифференцировкой основных клеток эпидермиса кожи человека — кератиноцитов [11; 23].

ВПЧ инфицируют клетки базального слоя стратифицированного плоского эпителия. Инфицирование происходит через поврежденные участки эпидермиса путем связывания капсидного белка L1 с базальной мембраной. Это вызывает конформационные изменения обоих капсидных белков L1 и L2 с последующей интернализацией вируса в вакуолярные структуры по механизму клатрин- или кавеолин-опосредованного эндоцитоза [11]. После проникновения в цитоплазму, вирусная ДНК высвобождается из капсида и транспортируется в ядро клетки [13]. Начальная фаза репликации вирусного генома осуществляется независимо от клеточного цикла клетки-хозяина. Репликация вирусной ДНК инициируется белками E1 и E2 и сопровождается амплификацией генома вируса до 50–100 эписомальных копий на клетку, которые стабильно

поддерживаются в недифференцированных клетках [24]. На этой стадии экспрессия вирусных белков находится под жестким контролем белка E2. Эпителиальная дифференцировка запускает продуктивную фазу жизненного цикла вируса, в результате которой происходит активация экспрессии как ранних, так и поздних генов с позднего промотора, приводящая к амплификации вирусного генома до тысячи на клетку и поддержанию вирусной репликации [24]. Образование вирионов происходит только в полностью дифференцированных клетках наружного слоя эпителия. Высвобождение вирионов сопровождается гибелью дифференцированных клеток, что приводит к формированию койлоцитов [11]. Схема развития папилломавирусной инфекции схематично изображена на Рисунке 2.

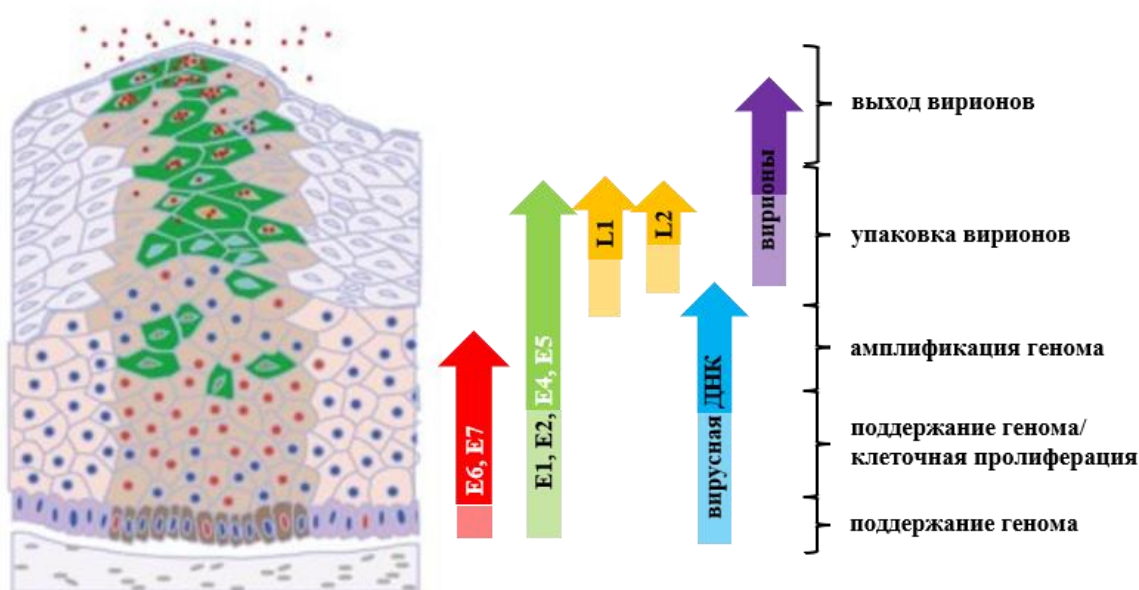


Рисунок 2 – Жизненный цикл ВПЧ. Слева схематично представлен дифференцированный эпителий, справа — продуцируемые в инфицированных клетках белки ВПЧ. После инфицирования кератиноцитов базального слоя вирус поддерживается в низкокопийном эписомальном состоянии. Инфицированные клетки отмечены красными ядрами. Ядра неинфицированных клеток обозначены синим. Белки E6 и E7 (красная стрелка), регулирующие клеточный цикл, экспрессируются с раннего промотора в нижних слоях эпителия. Активации позднего промотора вируса в верхних слоях эпителия (клетки, показанные зеленым цветом с красными ядрами) приводит к экспрессии ранних белков, необходимых для репликации вирусной ДНК (E1 и E2), а также белков E4 и E5. Экспрессия капсидных белков — L1 и L2 (оранжевые стрелки) следует за завершением амплификации геномной ДНК и происходит в клетках, экспрессирующих E4 (адаптировано по: Вонский М.С., и др., 2019, Egawa N., et al., 2015 [11; 25])

Геномы ВПЧ ВКР, помимо существования в эписомальной форме, могут интегрироваться в человеческий геном [12]. Вероятность интеграции определяется присутствием в геноме человека последовательностей, микрогомологических ВПЧ [11]. Это событие важно для злокачественной трансформации клетки, но для вируса является тупиком его жизненного цикла. В процессе интеграции происходит делеция ранних (E1, E2, E4 и E5) и поздних (L1 и L2) ОРС, с

сохранением практически интактных ранних ОРС Е6 и Е7 [11; 12]. Интегрированная ДНК становится неинфекционной, не упаковывается в вирионы, жизненный цикл вируса прерывается. Интеграция приводит к потере репликационного Е2-опосредованного контроля экспрессии Е6 и Е7. В результате уровень экспрессии этих белков многократно возрастает [12].

Скорость мутации ВПЧ низкая, поскольку геномы ВПЧ используют для репликации полимеразу клетки-хозяина. Частота мутаций ВПЧ более чем в 1000 раз ниже, чем у РНК-содержащих вирусов ($\sim 10^{-4}$ до 10^{-3} на участок в год) [16; 26]. Вследствие этого, ВПЧ — медленно эволюционирующий вирус. Мутированные формы ВПЧ закрепляются через естественный отбор, повышающий приспособленность вируса.

1.1.4 Патогенез папилломавирусной инфекции

Более чем у 90% инфицированных лиц происходит элиминация ВПЧ-инфекции. Персистирующая инфекция ВПЧ ВКР способна к эффективному уклонению от врожденного иммунного ответа и с высокой вероятностью приводит к злокачественной трансформации эпителиальных клеток [14]. Инфицирование ВПЧ ВКР вызывает 5% всех случаев онкологических заболеваний во всем мире, включая РШМ, большинство других видов рака аногенитальной области и значительную долю случаев рака головы и шеи [1; 10]. ВПЧ16 ответственен за более 50% случаев РШМ и предраковых поражений шейки матки [27], и, вместе с ВПЧ18 — за более 70% случаев [10]. ВПЧ16 также доминирует в случаях рака анальной области [28] и в 70% случаев связан с плоскоклеточным раком ротоглотки [12].

Основную роль в патогенезе ВПЧ-инфекции играют белки Е5, Е6 и Е7, поскольку они ответственны за иммортализацию и трансформацию ВПЧ-инфицированных клеток. Главными онкогенными белками ВПЧ являются Е6 и Е7. В основе онкогенной активности белка Е6 лежит его способность инактивировать онкосупрессорный белок р53 [11]. Основной мишенью белка Е7 является белок-супрессор ретинобластомы (pRb), играющий ключевую роль в клеточном цикле. Е7 способен связываться с нефосфорилированным pRb, направляя его на убиквитинилирование с последующей деградацией протеасомой [11]. Белки Е6 и Е7 действуют синергично, индуцируя генетическую нестабильность, дестабилизируя транскрипционные комплексы и ремоделируя хроматин, что стимулирует неконтролируемую клеточную пролиферацию [11].

Белок Е5 действует преимущественно на ранних стадиях вирусной инфекции, создавая благоприятную среду для репликации [29]. Данный белок играет ключевую роль в пролиферации клеток, вмешиваясь в целый ряд сигнальных путей. Он усиливает трансформирующую активность Е6 и Е7 путем регуляции факторов роста, таких как рецептор эпителиального фактора роста EGFR, Bcl 2, Vax, Fas и калнексина, участвующих в контроле выживания, пролиферации и дифференцировки клеток [11]. Проканцерогенная активность Е5 включает также ингибирование

апоптоза [11; 30]. Помимо этого, E5 модулирует экспрессию генов, участвующих в адгезии и клеточной подвижности [31]. Также была подтверждена роль белка E5 в метастатическом процессе, опосредованная повышением уровня онкобелка MET [30].

Ранние белки E1 и E2 не участвуют напрямую в канцерогенезе, однако участвуют в процессе интеграции вирусного генома в человеческий, повышении уровней экспрессии E6 и E7, в эпигенетической регуляции транскрипции генов, регуляции клеточного цикла и апоптоза, в также играют роль в уклонении вируса от иммунного надзора [12; 32–34].

Морфологическими признаками онкогенного процесса в тканях, пораженных ВПЧ, являются изменения, характерные для плоскоклеточных интраэпителиальных поражений низкой степени (low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) [14]. LSIL — это изменения, связанные с цитопатическим действием ВПЧ, в том числе койлоцитоз и слабая дисплазия 1-й степени [35]. Названия интраэпителиальных дисплазий 1-й степени определяется местом инфицирования: CIN1 (шейка матки), VIN1 (вульва), VAIN1 (вагина) или AIN1 (анус) [14]. LSIL может как регрессировать, так и прогрессировать до плоскоклеточных интраэпителиальных поражений высокой степени (high grade squamous intraepithelial lesion, HSIL), чему соответствует умеренная или тяжелая интраэпителиальная неоплазия (CIN2/3, VIN2/3, VAIN2/3, AIN2/3), а также инвазивный рак [36; 37].

Основным органом, пораженным метастазами при ВПЧ-ассоциированных злокачественных заболеваниях, являются легкие. При ВПЧ-положительном РШМ метастазы развиваются у 15–61% женщин преимущественно в легких [38; 39], несколько реже в печени [39] и очень редко в селезенке [40]. При ВПЧ-положительном плоскоклеточном раке головы и шеи (в т.ч. ротовой полости, ротоглотки и гортани) метастазы также чаще развиваются в легких [41].

1.1.5 Механизмы уклонения вируса папилломы человека от иммунного ответа хозяина

Устойчивость инфекции ВПЧ является следствием неспособности иммунной системы хозяина уничтожить инфицированные клетки [5]. Это отчасти обеспечивается его жизненным циклом. ВПЧ инфицирует только слой клеток, выше базальной мембраны, менее заселенных иммунными клетками. На протяжении жизненного цикла вирусные белки производятся в небольшом количестве и не секретируются. Усиление экспрессии вирусных генов и упаковка в вирионы происходит только в верхних слоях эпителия, в дифференцированных кератиноцитах. На протяжении всего жизненного цикла ВПЧ остается исключительно внутриэпителиальным вирусом, без виремии, не вызывая лизиса или гибели клеток [5].

Ранние белки E2, E5, E6 и E7 (в меньшей степени E1) задействованы в механизмах обхода иммунной системы. В совокупности, они вызывают нарушение экспрессии генов рецепторов

врожденного иммунного ответа, подавление сигнальных путей интерферона, способствуют нарушению презентации вирусных антигенов, подавлению воспалительных реакций, подавлению Т-клеточного ответа, блокируют активацию клеток Ларгенганса [5; 12; 42–44]. Доказано, что белки Е6 и Е7 синергично подавляют транскрипцию генов врожденного иммунного ответа [42].

В ВПЧ-инфицированных опухолевых клетках создается иммуносупрессивная среда, состоящая из иммуносупрессивных цитокинов, ассоциированных с опухолью макрофагов, миелоидных супрессорных клеток и регуляторных Т-клеток [43; 45].

1.2 Белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа, их структура и свойства

1.2.1 Онкогенный потенциал белка Е6

В зараженных ВПЧ клетках уровень экспрессии белка супрессора опухолей р53 регулируется белком Е6. Е6 связывается с коротким мотивом LxxLL клеточной убиквитинлигазы E3 UBE3A/E6AP, образуя стабильный комплекс, гетеродимер Е6/Е6АР [46], участвующий в убиквитинилизации и протеасомной деградации р53 [11], таким образом ингибируется р53-зависимая транскрипция генов [47; 48], регулируется клеточный цикл и апоптоз [49]. Посредством деградации р53 Е6 индуцирует окислительный стресс, активирует гликолиз и синтез липидов в клетках, способствуя повреждению клеток [50]. Также белок Е6 участвует в дерегуляции механизма репликации клеточной ДНК активируя теломеразную обратную транскриптазу (Т-ОТ) человека [11], индуцирует геномную нестабильность [51], ингибирует аутофагию [52], изменяет клеточную полярность, и изменяет клеточную сигнализацию [53], стимулирует миграцию клеток [54] и способствует осуществлению эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в зараженных клетках [55].

1.2.2 Онкогенный потенциал белка Е7

Опосредованная Е7 деградация рRb высвобождает связанный с рRb фактор транскрипции E2F, что влечет за собой изменение клеточного цикла, инициируя переход клетки в S-фазу [56; 57]. Также, белок Е7 способен ингибировать апоптоз [58], участвует в развитии геномной нестабильности путем нарушения процесса репарации повреждений ДНК [59] и подавлении передачи сигналов о двухцепочечном разрыве ДНК [60], активирует ДНК метилтрансферазу, нарушая эпигенетическую регуляцию клеточных процессов [11], ремоделирует актиновый цитоскелет [61], способствуя развитию ЭМП клеток, а также повышает миграционную способность клеток [62].

1.2.3 Структура белка E6

Полноразмерный белок E6 ВПЧ16 состоит из 158 аминокислотных остатков (а. о.). Наличие двух стартовых кодонов может приводить к инициации трансляции со второго кодона, что приводит к образованию белка длиной 151 а. о. [63]. Архитектура белка состоит из двух цинк-связывающих пальцев (Zinc Finger), образованных четырьмя цинк-связывающими мотивами (Cys-X-X-Cys), мотива связывания домена PDZ класса I и трех сигналов ядерной локализации (NLS) (Рисунок 3А, приведен ниже в разделе 1.2.4).

Оба цинковых пальца участвуют в образовании комплекса E6/E6AP, убиквитинилирующего p53 [64], т.е. опосредуют способность E6 вызывать деградацию p53. Помимо этого, они определяют транскрипционную активность E6. За счет цинковых пальцев белок E6, действуя как транскрипционный фактор, меняет профили экспрессии генов, нарушая внутриклеточную регуляцию и сигнальную систему, способствуя утрате клеточной полярности [11]. Через мотив второго цинкового пальца E6 может активировать теломеразу, способствуя иммортализации эпителиальных клеток [65].

Мотив связывания домена PDZ класса I (E155–L158 а. о.) расположен на карбоксильном конце белка E6. Данный мотив строго консервативен и его целостность важна для функциональной активности белка E6 как в отношении функционирования инфицированной клетки, так и в отношении репликации вируса. Ключевыми а. о., участвующими во взаимодействии с PDZ-содержащими белками, играют а. о. в положениях T156 и L158 [55]. PDZ-мишени E6 участвуют в регуляции полярности клеток, сборке межклеточных адгезионных соединений, пролиферации, инвазии и процессах апоптоза [66]. Некоторые из PDZ-мишеней E6 являются потенциальными опухолевыми супрессорами [49]. Данные о роли мотива PDZ в иммортализации ВПЧ-инфицированных клеток ограничены. Сообщалось, что делеция E6 Δ 153–158 существенно снижала иммортализацию клеток [67], а делеция E6 Δ 158 снижала онкогенный потенциал мутантного белка E6 по сравнению с белком дикого типа [68].

E6 содержит три сигнала ядерной локализации (R15–L19, NLS1; K72–I79, NLS2; K122–R131, NLS3) отвечающие за локализацию белка в ядре. Данные последовательности богаты положительно заряженными основными остатками, точечные мутации в этих ключевых остатках могут блокировать ядерный импорт, а также приводить к низкому сродству связывания E6 с E6AP, отменяя деградацию p53 [63]. Однако, ни один из мотивов NLS, взятых отдельно, не обеспечивает сохранения E6 исключительно в ядре [63]. Мотивы NLS опосредованно участвуют в процессах иммортализации клеток и деградации p53 [63]. В частности, делеция E6 Δ 125–129 NLS3 приводит к низкому сродству связывания E6 с E6AP, к невозможности индуцировать активность теломеразы, а также к снижению способности поддержания репликации эписомальной ДНК. Ключевым а. о. в этом процессе является гистидин (H) в положении 125.

1.2.4 Структура белка E7

Белок E7 ВПЧ16 состоит из 98 а. о. Структурно в белке выделяют три консервативных домена (CR): высококонсервативные CR1 и CR2 и низкоконсервативный CR3. Домен CR1 находится в N-концевой области белка E7 (M1–L15) (Рисунок 3Б) [11]. CR1 домен вносит вклад в трансформацию, но не принимает значительного участия в связывании pRb и не участвует в диссоциации E2F/pRb [69]. Домен CR2 располагается в области Q16–I38 а.о. и включает в себя два элемента: мотив XLXCXE (а.о. 21–26), определяющие высокое сродство с pRb, и сайт фосфорилирования протеинкиназы CKII (а. о. 30–37), разделенные между собой участком из трех аминокислот — мотивом QLN, а. о. 27–29. Мотив QLN домена CR2 играет важную роль в E7-опосредованной дестабилизации pRb [70]. Область, ограниченная а. о. 20–29 — основная для связывания с карманными белками pRb, p107, p130 и циклином А. При этом участие в деградации карманных белков принимают четыре а. о. в положениях 21–24 [71; 72]. В прямом контакте E7 с pRb участвуют а.о. в положениях 21, 22, 28 и 29 [73]. Фосфорилирование остатков серина S31 и S32 E7 киназой II играет важную роль в способности E7 трансформировать эпителиальные клетки. Сайт фосфорилирования также участвует в распознавании и деградации карманных белков pRb и p130. Домен CR3 (а. о. D39–P98) содержит консервативный карбоксильный концевой участок, состоящий из двух мотивов CXXC, разделенных участком 29–30 а. о., образующих структуру цинкового пальца [74]. В отличие от первых двух доменов, в основном отвечающих за нацеливание и стимулирование деградации членов семейства карманных белков, домен CR3 регулирует процессы, участвующие в ВПЧ-опосредованном онкогенезе, взаимодействуя как с белком онкосуппрессором Rb, так и онкогенным белком E7 [75]. Области кислых а. о. домена CR3 взаимодействуют с основной областью pRb за счет электростатических сил [76]. Область гидрофобных остатков в положениях 65–69 а. о. также опосредует ядерный импорт белка E7 [77]. Область домена CR3 84–98 а. о. отвечает за связывание E7 с фактором, индуцируемым гипоксией 1-альфа, HIF-1α [74]. Область домена CR3 39–98 а. о. является необходимой и достаточной для взаимодействия E7 с активным комплексом убиквитинлигазы cullin 2 [78]. А. о. в области цинкового пальца (положения 58–98) участвуют в связывании E7 с ко-активатором различных факторов транскрипции (pCAF) (включая p53, MyoD, NF-κB), компонентом комплекса ремоделирования нуклеосом и деацетилирования гистонов (NURD), а также с TBP [79]. Ранее было показано, что целостность мотивов CXXC, особенно в положении 91–94 а. о., крайне важна для трансформирующей способности белка E7 [80; 81].

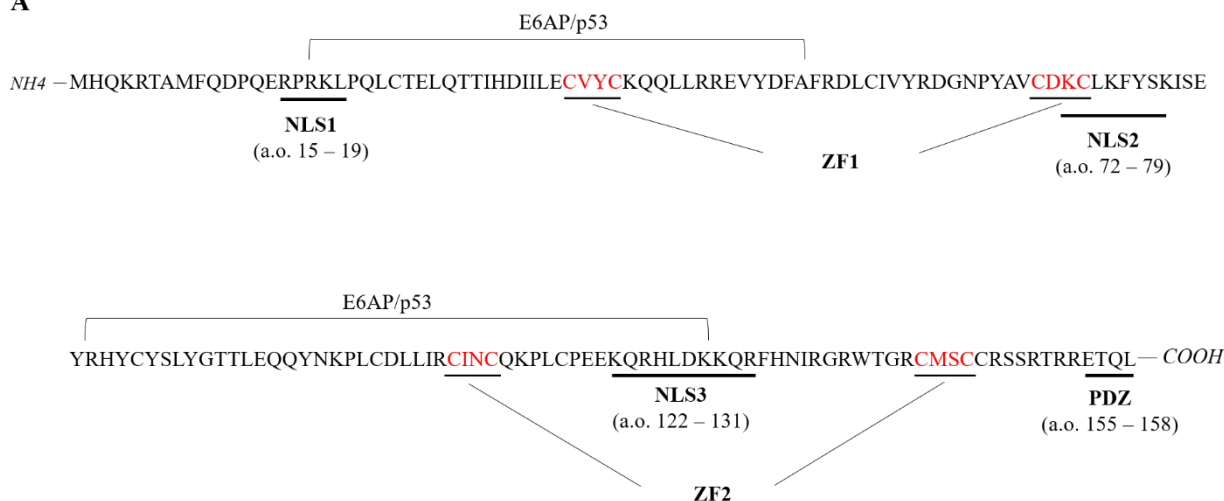
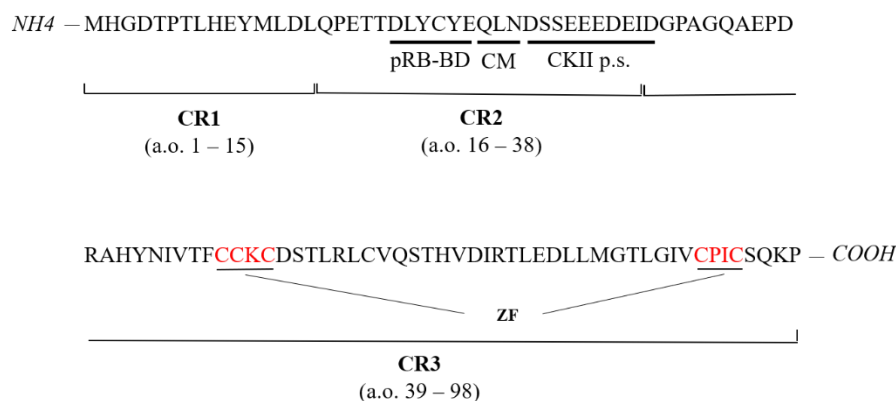
А**Б**

Рисунок 3 – Структура белков E6 (А) и E7 (Б) ВПЧ16. (А) Для белка E6 обозначены: NLS1–3 – сигналы ядерной локализации, PDZ – мотив связывания домена PDZ класса I, цинк-связывающие мотивы (Cys-X-X-Cys), образующие два цинк-связывающих пальца (Zinc Finger (ZF)1, 2) выделены красным. Сверху над N- и C-концом белка скобками обозначены области связывания E6 с E6AP/p53. (Б) Для белка E7 обозначены: консервативные мотивы (CR) CR1, CR2, CR3, цинк-связывающий мотив (Cys-X-X-Cys), образующий цинк-связывающий палец (Zinc Finger (ZF)) выделен красным. Области связывания pRD обозначена как pRD-BD, сайта фосфорилирования протеинкиназы CKII обозначенные как CKII p.s. и центральный мотив, между сайтами pRD-BD и CKII p.s. обозначенный как CM, подчеркнуты жирной линией

1.2.5 Сплайсинг E6 и образование изоформ

Белки E6 и E7 ВПЧ ВКР кодируются полицистронной пре-мРНК, транскрибируемой с раннего промотора (p97). Посредством альтернативного сплайсинга могут производиться различные сплайсированные транскрипты E6, называемые E6*, кодирующие усеченные формы белка E6 [82]. Полноразмерная форма E6 (E6FL) экспрессируется из пре-мРНК в пределах ОРС E6. Белок E7 может быть транскрибирован из различных мРНК, в том числе

сплайсированных. Для ВПЧ16 идентифицировано несколько сплайсированных транскриптов *E6**: *E6*I*, *E6*II*, *E6*III*, *E6^E7*, *E6^E7*I*, *E6^E7*II*, *E6*IV*, *E6*V* и *E6*VI* (Рисунок 4) [82].

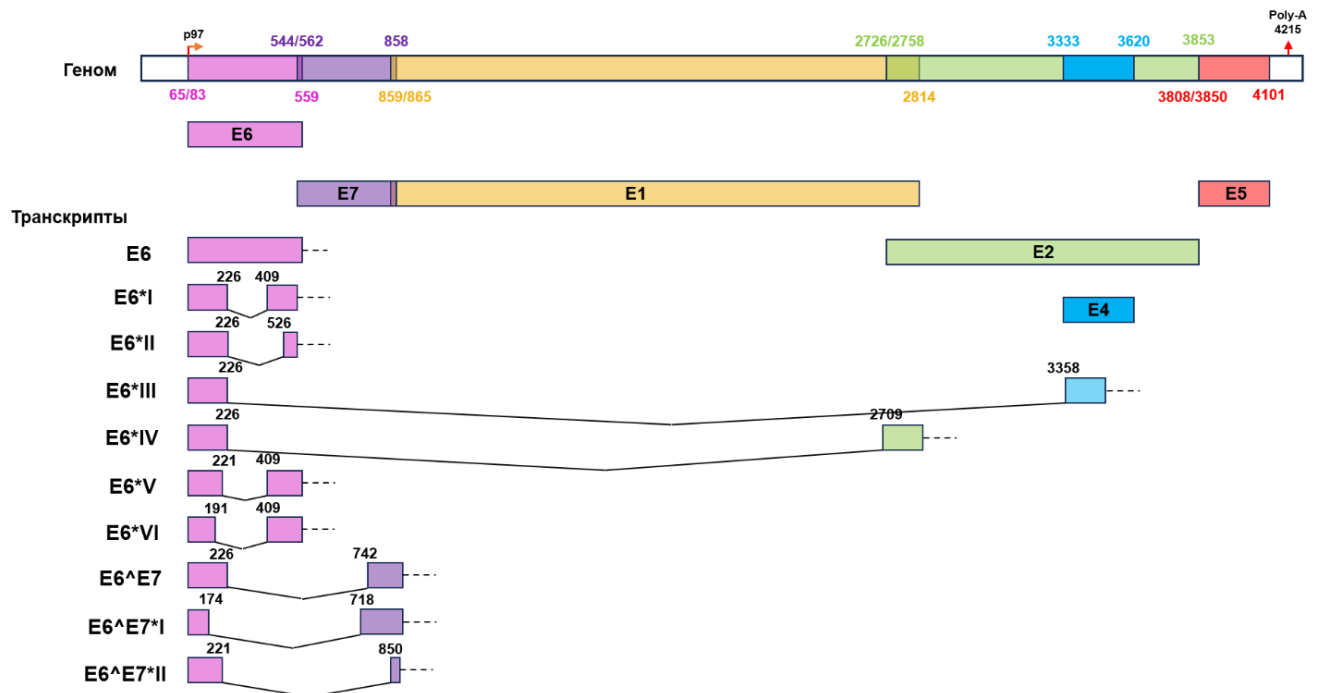


Рисунок 4 – Альтернативный сплайсинг мРНК *E6* ВПЧ. Донорские и акцепторные сплайсинг-сайты для усеченных транскриптов *E6**: *E6*I* по VI, *E6^E7*, *E6^E7*I* и *E6^E7*II*. Все варианты транскриптов содержат донорный сайт внутри ОРС *E6*, тогда как акцепторный сайт сплайсинга – в ОРС *E6*, *E7*, *E2* или *E4*. Красными стрелками обозначены позиции последовательностей раннего промотора (p97) и полиаденилирования (Poly-A) (адаптировано по: Olmedo-Nieva L., et al., 2018 [82])

Основной функцией сплайсинга *E6* является обеспечение трансляции белка *E7* за счет увеличения расстояния между стоп-кодоном *E6* и стартовым кодоном *E7*, облегчающего сборку рибосом [82]. Процесс альтернативного сплайсинга регулируется как белком *E2*, так и цис-регуляторными элементами, и богатыми серином и аргинином специфическими транс-действующими факторами (SRSFs) [82]. Инфекция ВПЧ16 вызывает гиперэкспрессию трех SRSFs: SRSF1, SRSF2 и SRSF3 [83]. Ключевым регулятором экспрессии *E6* и *E7* ВПЧ16 при прогрессировании РШМ является SRSF2 [83].

Наиболее распространенной изоформой *E6* является *E6*I*, ввиду предпочтительного отбора нуклеотидов в положениях 226 и 409 *E6* (донорный и акцепторный сайты соответственно) среди других сайтов сплайсинга [84]. В экспериментах на клеточной линии остеосаркомы U2OS, поддерживающей репликацию генома ВПЧ ВКР, было показано, что экспрессия *E6*I* может играть важную роль на первых стадиях вирусной инфекции [82].

*E6*I* способна функционировать независимо от полноразмерной формы *E6* [82]. Роли изоформы *E6*I* и *E6FL* часть описываются как противоположные [82; 85], а в некоторых случаях

как противодействующие [86; 87]. В частности, в противоположность E6FL изоформа E6*I может выполнять анти-туморогенные функции, действуя как ингибитор деградации p53, регулятор опухолевого супрессора p14 (ARF), активатор сигнальных путей β -интегрина [82]. E6*I и E6FL способны по-разному регулировать апоптоз, причем важную роль в регуляции апоптоза по-видимому играют паттерны экспрессии *E6/E6*I* [82; 87]. Гиперэкспрессия *E6*I* способствует канцерогенезу за счет стимулирования повреждения ДНК, индукции окислительного стресса, опосредование деградации PDZ-белков, что приводит к утрате клеточной полярности и снижению адгезии клеток [82].

Данные о функциях других изоформ ограничены. Имеются лишь сведения о том, что E6*II, также как E6FL, участвует в деградации p53 [85], вариант E6[^]E7 способен связываться с клеточными шаперонами HSP90 α , HSP90 β и глюкозорегулируемым белком 78 (GRP78) [82].

В ВПЧ-позитивных тканях предраковых поражений или злокачественных новообразований шейки матки и ротоглотки в основном экспрессируются *E6*I* и *E6*II*. Причем мРНК *E6*I* экспрессируется на более высоком уровне по сравнению с полноразмерным транскриптом *E6*, *E6*II* или *E6[^]E7*, а уровень экспрессии мРНК *E6*I* коррелирует со степенью поражения [88–93]. Транскрипты *E6* обнаруживаются и в других, редких видах рака, ассоциированных с ВПЧ. Например, в образцах плоскоклеточного рака мошонки обнаруживаются транскрипты *E6*I* [94], в образцах опухолей молочной железы, ассоциированных с ВПЧ16, обнаруживаются транскрипты *E6*I*, *E6*II*, *E6[^]E7*, *E6[^]E7*I* и *E6[^]E7*II* [95].

1.2.6 Иммуногенные свойства белков E6 и E7

У лиц с транзитной инфекцией ВПЧ или со спонтанной регрессией ВПЧ-ассоциированных неоплазий обнаруживаются специфические Т-клеточные ответы на пептиды из состава белков E6 и E7 [96–98], что указывает на то, что оба белка являются иммуногенными.

Области 16–60 а. о. и 76–94 а. о. белка E6 ВПЧ16 содержат большинство предсказанных и экспериментально подтвержденных эпитопов [99]. Наиболее значимыми позициями а. о. в областях известных Т-клеточных эпитопов являются позиции 17, 21, 32, 36, 37, 47, 50, 54, 85, 90, 110, 128, 135 [99–106], в областях В-клеточных эпитопов – 21, 32, 36, 70, 85, 110 [102; 104; 107]. АК-замены в указанных позициях приводят к нарушению распознавания эпитопов.

У лиц с персистирующей ВПЧ инфекцией, а также лиц с ВПЧ-ассоциированными неопластическими изменениями уровень как ЦТЛ, так и Т-хелперного клеточного ответа, специфичного к антигенам E6 и E7 значительно снижен [98], что обуславливается нарушением презентации вирусных антигенов и дефектами в представлении эпитопов. Таким образом, у лиц данной категории естественный противовирусный иммунный ответ не поддерживается. Это

диктует необходимость разработки терапевтических вакцин, индуцирующих Т-клеточный иммунный ответ.

1.3 Терапевтические вакцины против злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусом папилломы человека

Действие профилактических вакцин против ВПЧ направлено на индукцию гуморального иммунного ответа, призванного нейтрализовать вирус до его проникновения в клетку [108]. Однако, антигены, используемые в составе профилактических вакцин, непригодны в качестве мишеней терапевтической вакцины против ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований, поскольку в малигнизированных инфицированных клетках отсутствуют капсидные белки L1 и L2, вследствие делеции соответствующих ОРС, кодирующих данные белки.

Ключевые белки ВПЧ, участвующие в злокачественной трансформации, а именно белки Е6 и Е7, представляют собой основные мишени для терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований. Эти белки содержат антигенные области, представляемые молекулами HLA-A2. Иммунный ответ на вакцинацию, уничтожающий опухолевые клетки, в основном опосредуется CD8⁺ Т-клетками. Однако их активация обеспечивается CD4⁺ Т-хелперами [5].

Прямое использование белков Е6 и Е7 в качестве антигенов невозможно из-за их онкогенных свойств. Требуется их модификация для устранения онкогенного эффекта [108]. К настоящему времени прошли разные стадии клинических испытаний (КИ) несколько терапевтических вакцин на разных платформах (векторные, пептидные, белковые, вакцины на основе ДНК и на основе аутологичных дендритных и опухолевых клеток) (Таблица 1). Однако, все они показали неутешительные результаты (Таблица 1). В большинстве вакцин иммуногены Е6 и Е7 существенно модифицированы добавлением сигнальных пептидов либо адъювантов. Ни одна из них в монотерапии не обеспечивала значимого ответа при агрессивных опухолях, ответы в основном наблюдались у пациентов с предраковыми поражениями CIN2/3.

Примечательно, что специфический иммунный ответ на вакцинацию при использовании двух иммуногенов Е6 и Е7 в основном индуцировался только против Е6 [109–116], но не Е7 [95; 101–103].

В контексте взаимодействия (конкуренции) Е6 и Е7 интересно, что результаты клинических испытаний терапевтической пептидной вакцины ISA-101 против ВПЧ16 на основе перекрывающихся длинных пептидов из состава белков Е6 и Е7 в сочетании с адъювантом

Montanide показали, что при подкожном введении смеси пептидов E6 и E7 в один анатомический сайт специфический Т-клеточный ответ на E6 преобладал над ответом на E7. Напротив, раздельное подкожное введение пептидов E6 и E7 в разные анатомические сайты позволяло получить выраженный специфический ответ как на E6, так и на E7 [117].

Таблица 1 – Разработанные терапевтические вакцины против ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований, прошедшие клинические испытания

Тип вакцины	Название	Иммуноген	Результаты клинических испытаний
Векторные вакцины на основе рекомбинантных бактерий	GLBL101c	Немодифицированный полноразмерный белок E7 ВПЧ16	В исследованиях I/II фазы КИ регрессия с CIN3 до CIN2/1 наблюдалась только при введении высоких доз вакцины. При оценке эффективности против CIN2 не показала разницы по сравнению с группой плацебо [118]
	IGMKK16E7	Мутантный химерный белок E7Rb ВПЧ16	В исследованиях I /II фазы КИ регрессия с CIN3 до CIN2/1 наблюдалась только при введении высоких доз вакцины. Количество клеток в периферической крови, продуцирующих ИФН-γ, коррелировало с уровнем ответа [119]
	ADXS11-001 (ADXS-HPV)	Химерный белок E7 ВПЧ16, слитый с усеченным негемолитическим фрагментом порообразующего токсина листериолизина О (listeriolysin O – LLO)	В исследовании II фазы КИ показана способность индуцировать как CD4+, так и CD8+ специфический Т-клеточный иммунный ответ. Терапевтический эффект наблюдался у 30,8% пациенток с рецидивирующим раком шейки матки после химиотерапии или лучевой терапии [12]
Векторные вакцины на основе вирусных векторов	TG4001	На основе рекомбинантного вектора MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara — MVA), экспрессирующего E6 и E7 ВПЧ16 и человеческий интерлейкин-2 (ИЛ-2)	В исследованиях I /II фазы КИ вакцина в сочетании с авелумабом показала противоопухолевую активность у 22–32% пациентов с аногенитальным раком [120]. Вакцинация пациенток с CIN2/3 TG4001 приводила к регрессии поражения в 48% случаев [121]

Продолжение Таблицы 1

Тип вакцины	Название	Иммуноген	Результаты клинических испытаний
Векторные вакцины на основе вирусных векторов	TA-HPV	На основе вируса коровьей оспы, экспрессирующего E6 и E7 ВПЧ16/18	В исследованиях I /II фазы КИ у пациенток с РШМ, у трех из восьми пациенток обнаруживался специфический антительный ответ и лишь у одной из восьми пациентки наблюдался специфический CD8 Т-клеточный ответ [122]
	Vvax001	На основе альфавируса Леса Семлики (SFV), экспрессирующего E6 и E7 ВПЧ16	В исследованиях II фазы КИ у 94% пациентов с CIN3 после вакцинации наблюдалось уменьшение площади поражения, а у 50% – полный гистопатологический ответ [123]
	PRGN-2009	На основе аденовируса гориллы, экспрессирующего E6, E7 и E5 ВПЧ16	В исследованиях I фазы КИ вакцинация PRGN-2009 в сочетании с анти-PD-L1 белком Бинтрафусп альфа уровень ответа на терапию составлял 20% [124]
Вакцины на основе синтетических пептидов	PepCan	Смесь 4-х синтетических пептидов из состава белка E6 ВПЧ16 в сочетании с адъювантом Candin	По результатам исследований II фазы КИ было продемонстрировано, что после иммунизации иммунный ответ и регрессия неоплазий у пациентов с CIN2/3 развиваются не на антигены, а на адъювант Candin [125].
	ISA101	Смесь перекрывающихся пептидов из состава белков E6 и E7, в сочетании с адъювантом Montanide	По результатам исследований II фазы КИ вакцинация пациентов с CIN3 показала клинический ответ у 79%, а полный ответ – у 47% пациентов [126]. В сочетании с ниволумабом терапия показала общую частоту ответа у 33% пациентов [127].

Продолжение Таблицы 1

Тип вакцины	Название	Иммуноген	Результаты клинических испытаний
Вакцины на основе синтетических пептидов	PDS0101	Смесь пулов пептидов из составов белков E6 и E7 ВПЧ16	По результатам исследований II фазы КИ комбинированная терапия в сочетании с пембролизумабом у пациентов с метастатическим ВПЧ16+ рецидивирующим раком ротоглотки уменьшение размера опухоли наблюдалось у 67,6% пациентов [128]
Вакцины на основе белков	TA-CIN	Белки L2, E6 и E7 ВПЧ16	По результатам исследований II фазы КИ монотерапия индуцировала слабый Т-клеточный ответ. Комбинированная терапия с ДНК-вакциной PVX2 у пациентов с CIN1 оказалась неэффективна. Комбинированная терапия с имиквимодом у пациентов с VIN1 продемонстрировала полную регрессию поражения в 63% случаев [129].
	GTL001	Белки E6 и E7 ВПЧ16, слитые с каталитически неактивным токсином Bordetella pertussis СуаА	По результатам исследований I фазы КИ в комбинированной терапии с имиквимодом иммунный ответ наблюдался только после получения высокой дозы препарата [130]
Вакцины на основе аутологичных дендритных и опухолевых клеток	Нет	Аутологичные ДК, загруженные E7 ВПЧ 16 и 18	По результатам исследований I фазы КИ у пациентов с РШМ вакцина продемонстрировала индукцию антительного и CD4+ Т-клеточного ответа [131]
	MVX-ON-CO1	Аутологичные опухолевые клетки	По результатам исследований I фазы КИ у пациентов с рецидивирующей/метастатической плоскоклеточной карциномой головы и шеи у 50% пациентов наблюдался частичный ответ [132]

Продолжение Таблицы 1

Тип вакцины	Название	Иммуноген	Результаты клинических испытаний
Вакцины на основе ДНК	VGX-3100	полноразмерные E6 и E7 ВПЧ16/18	По результатам исследований II фазы КИ вакцинация индуцировала элиминацию вируса и гистопатологическую регрессию у 49,5% пациентов с CIN2/3 [133]. По результатам исследований III фазы КИ гистопатологический регресс наблюдался лишь у 27,6% пациентов.
	pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 (PVX2)	полноразмерный E7 ВПЧ16, слитый с белком теплового шока 70 (HSP70) и сигнальным пептидом (Sig)	По результатам исследований II фазы КИ в монотерапии у пациентов с CIN3 вакцинация высокой дозой приводила к регрессии поражения в 30% случаев. В комбинированной терапии с вакциной TA-CIN у пациентов с CIN1 оказалась неэффективна [134]
	pNGVL4a-CRT/E7(detox)	калретикулин (CRT) слитый с E7 ВПЧ16	По результатам исследований I фазы КИ у пациентов CIN2/3 гистологическая регрессия до CIN 1 наблюдалась у 30% пациентов [135]
	GX188E	участки E6 и E7 ВПЧ16/18, слитые с сигнальными последовательностями тра и лиганда тирозинкиназы-3 (Flt3L)	По результатам исследований II фазы КИ вакцинация приводила к регрессии поражения до CIN1 у более 70% пациентов с CIN3 [136]. В сочетании с пембролизумабом у пациентов с РШМ 8,3% реципиентов получили полный ответ, а 26,7% – частичный ответ [137]
	INO-3112 (MEDI0457)	полноразмерные E6 и E7 ВПЧ16/18 и интерлейкин-12 (ИЛ-12)	По результатам исследований I/II фазы КИ в монотерапии у пациентов с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC), наблюдался специфичный Т-клеточный ответ [138]. В комбинированной терапии с дурвалумабом ответ наблюдался у 27,6% пациентов [139]

1.4 Потенциал применения ДНК-вакцин в терапии против вируса папилломы человека

Принцип ДНК-иммунизации заключается в использовании в качестве иммуногенов плазмид, кодирующих вакцинные антигены. ДНК-вакцины обладают рядом сильных сторон, в частности: (1) использование механизма клетки-хозяина для трансляции закодированных белковых антигенов, т.е. воспроизведения естественных посттрансляционных модификаций антигенов [140]; (2) эффективная индукция как врождённого, так и адаптивного (клеточного и антительного) иммунного ответа, а также активация антиген-презентирующих клеток (АПК) [141; 142]; (3) естественная адьювантность [143–146]; (4) адаптивность платформы для быстрой разработки вакцины против новых патогенов [147]; (5) термостабильность и, следовательно, минимальные требования к условиям хранения и транспортировки (“cold chain”) [148]. Главным ограничением для клинического применения ДНК-вакцин является их сравнительно низкая иммуногенность, обусловленная в значительной мере неэффективной внутриклеточной доставкой ДНК [148; 149], а также необходимость обеспечения биобезопасности систем/методов их доставки [150].

1.4.1 Иммунный ответ, индуцируемый ДНК-вакцинами

После проникновения плазмидной ДНК в цитоплазму клетки запускаются реакции врожденного иммунитета за счет содержащихся в ней «сигналов» РАР (патоген-ассоциированных молекулярных паттернов). Распознавание РАР клетками индуцирует активацию провоспалительных генов, индуцирующих созревание и миграцию в лимфатические узлы АПК, а также цитокинов, привлекающих АПК в сайте инъекции [144; 145].

После транспортировки плазмидной ДНК в ядро и ее транскрипции в мРНК, молекула мРНК экспортируется в цитоплазму, где в результате трансляции образуются закодированные плазмидой белки-антигены [151]. Процессирование белковых антигенов до антигенных пептидов возможно двумя путями: (1) эндогенным, в результате которого они экспонируются на клеточной поверхности в составе молекул МНС класса I, что имеет решающее значение для активации CD8⁺ Т-клеток [152]; (2) экзогенным, в результате которого антигенные пептиды экспонируются на клеточной поверхности в составе молекул МНС класса II. Этот путь приводит к активации CD4⁺ Т-клеток, играющих роль в активации CD8⁺ цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ) и стимуляции В-клеток для производства антител [152].

По вышеуказанному механизму формируется иммунный ответ при вирусной инфекции [153]. При ДНК-вакцинации может происходить кросс-презентация внутриклеточного ДНК-антигена [142; 154].

Активированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки дифференцируются в различные популяции в зависимости от цитокинового окружения [155]. CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в Т-хелперы (T helper, Th1, Th2 и Th17-клетки), Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки (Treg), фолликулярные Т-клетки (Tfh) [155]. В ответ на внутриклеточные патогены, в т.ч. вирусы, активируются CD4⁺ Th1-клетки, продуцирующие цитокины ИФН- γ , ИЛ-2 и ФНО- α [156]. Данного типа клетки также обеспечивают активацию макрофагов и дифференцировку CD8⁺ Т-клеток [156]. CD8⁺ Т-клетки дифференцируются в CD8⁺ Т-клетки памяти или в эффекторные CD8⁺ ЦТЛ, уничтожающие инфицированные или опухолевые клетки и патогены [152]. Ответ на внеклеточные патогены сопровождается активацией CD4⁺ клеток Th2-типа, продуцирующих цитокины ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13 [151; 157]. Эти клетки необходимы для функционирования самих CD4⁺ Т-клеток и антительного ответа [151].

Обширные серии доклинических и клинических ДНК-вакцин показали участие указанных популяций в вырабатываемом на вакцину клеточном иммунном ответе [158–160].

1.4.2 Повышение иммуногенности ДНК-вакцин

Повышение иммуногенности ДНК-вакцин достигается за счет:

- 1) оптимизации закодированного иммуногена (использование консенсусных ДНК-антигенов [161]; внесение мутаций в последовательности антигенов, удаление фрагментов последовательностей, негативно влияющих на иммуногенность [162–164]; перенаправлением процессинга [165–167]);
- 2) усиления экспрессии закодированного иммуногена (использование подходящего промотора [168]; оптимизация кодонов и структуры мРНК [168–170]; добавление определённых последовательностей в UTR [171]);
- 3) добавления адъювантов [172; 173] и компонентов комплемента, доменов агрегации белков, хемокинов и костимуляторных молекул [174];
- 4) использования оптимальной схемы иммунизации (введение оптимальной дозы [175]; использование повторных вакцинаций одним [176] или разными типами вакцин [112]);
- 5) оптимальной доставки [177].

1.5 Методы доставки ДНК-вакцин

Метод доставки ДНК-вакцины также определяет ее эффективность. Для успешной транскрипции в мРНК, а затем трансляции в иммуногенный белок, введенная ДНК должна пересечь клеточную и ядерную мембраны [177]. Поскольку молекула ДНК является гидрофильной, полярной и положительно заряженной молекулой, она не может свободно проникать через клеточные мембраны. Существующие методы доставки призваны обеспечить принудительный транспорт ДНК в клетку. Все существующие на настоящий момент методы доставки ДНК включают этап химической доставки, то есть введение раствора ДНК с помощью иглы, микроиглы [178; 179]. Эффективность химической доставки повышают физическими методами (электропорацией, сонопорацией, струйной инъекцией, магнетопорацией, генной пушкой) [180].

1.5.1 Роль солевого состава растворителя ДНК в инъекционной смеси

Солевой состав буферного раствора имеет первостепенное значение как для химических, так и физических способов доставки ДНК. Как правило, плазмидную ДНК растворяют в нетоксичном и физиологически совместимом буфере, подходящем для использования *in vivo* (например, ФСБ или NaCl) [179]. Применение ФСБ предпочтительнее, поскольку он обеспечивает постоянную кислотность среды (pH), что критически важно для обеспечения жизнеспособности и нормального функционирования клеток. Компоненты ФСБ, NaCl и KCl, являются сильными электролитами, полностью диссоциирующие на ионы Na⁺ и K⁺, которые притягиваются к отрицательно заряженным фосфатным группам и электроотрицательным участкам оснований ДНК [181; 182]. Связывание нейтрализует силы отталкивания между цепями ДНК и стабилизирует ДНК-дуплекс [182; 183]. Ионы Na⁺ локально накапливаются между молекулами ДНК, способствуя конденсации ДНК [184]. Конденсированная ДНК менее подвержена ферментативной деградации и лучше взаимодействует с клеточными мембранами, что позволяет ей более эффективно проникать в клетки посредством пассивного транспорта [185].

Было высказано мнение, что проникновение ДНК в клетку может улучшаться за счёт использования фосфатного буфера на основе ФСБ повышенной ионной силы (гипертонического раствора) [186]. Однако следует учитывать, что высокие концентрации положительно заряженных ионов способны изменять конформацию нативной ДНК, вызывая ее скручивание [187]. Более того, избыток одновалентных ионов может инвертировать эффективный заряд ДНК с отрицательного на положительный, что приводит к дестабилизации

ДНК [188]. Помимо этого, инъекции ДНК в гипертоническом растворе могут вызывать повреждение клеток и воспаление [186; 189]. Негативные стороны имеются и во введении ДНК в гипотонических буферных растворах. Такие растворы снижают интегральную ионную силу инъекционной смеси, увеличивают отталкивание между фосфатными группами ДНК и дестабилизируют ДНК-дууплексы, что негативно сказывается на эффективности доставки. Кроме того, чрезмерно гипотонические растворы вызывают набухание и разрыв/гибель клетки [190].

1.5.2 Электропорация

Одним из основных физических методов повышения эффективности доставки ДНК после инъекции является электропорация (ЭП). Метод ЭП основан на электрофоретическом переносе отрицательно заряженной ДНК в клетки с помощью электрического поля, обратимо повышающего проницаемость клеточной мембраны. Эффективность ЭП определяется распределением электрического поля и его напряжённостью, задаваемыми типом и геометрией электрода, а также характеристиками электрических импульсов [191]. Метод зарекомендовал себя как надёжный, эффективный и высоковоспроизводимый [192; 193]. Однако, из-за разнообразия устройств для ЭП, универсального протокола ЭП не существует [193].

Это обуславливает необходимость оптимизации протоколов электропорации для обеспечения эффективной доставки генетического материала в клетки *in vivo* для каждого типа оборудования. К оптимизируемым параметрам электрических импульсов относятся их амплитуда, длительность, форма, частота и полярность [194–198]. Все они в совокупности определяют характер вызываемых ЭП изменений в липидных мембранах клеток. Длительность электрического импульса, косвенно связанная с напряжённостью поля, влияет на образование пор и, через них, на поглощение целевых молекул. Длительность и частота следования импульсов определяют продолжительность электропорации. Было показано, что режим с уменьшением интервала между импульсами, т.е. с высокой частотой их следования, является для клеток предпочтительным. Постепенное уменьшение длительности импульса, сопровождающееся увеличением амплитуды, не ухудшает жизнеспособность клеток [199]. Полярность импульсов влияет на перестройку липидных мембран клеток, увеличивая зону взаимодействия ДНК с клеточной мембраной [200]. Полярность также влияет на электролитическое загрязнение клеточной суспензии ионами металлов, выделяющимися из электродов: концентрации ионов, выделяемых биполярными импульсами, на порядок и более ниже, чем концентрации ионов, выделяемых униполярными импульсами при сохранении амплитуды и длительности импульсов [198; 201].

1.5.3 Сонопорация

Метод сонопорации (СП) основан на пермеабиллизации клеточных мембран под действием ультразвука [202; 203]. Поры в клеточных мембранах формируются ударной силой микроструй, образующихся в результате схлопывания пузырьков газа, колеблющихся в жидкой среде межклеточного пространства под действием акустического давления звуковой волны (кавитации).

Динамические характеристики мембранных пор, образованных в результате СП, зависят от величины акустического давления или интенсивности акустических колебаний [204; 205], длительности озвучивания [206]. При использовании импульсного режима генерации УЗ-волн динамические характеристики мембранных пор зависят также от процента активного времени подачи акустического сигнала (длительности пакета ультразвуковых импульсов) относительно его периода акустических импульсов, или рабочего цикла [207]. Низкое значение рабочего цикла сохраняет жизнеспособность клеток, но может снизить эффективность трансфекции [207]. Помимо кавитации, в жидкой среде под действием ультразвука может возникать локальный нагрев. Ультразвук высокой интенсивности вызывает повышение температуры тканей, что может усиливать проницаемость клеточной мембраны [202; 203], но также может вызвать разрушение клеток [208].

Наиболее многообещающие результаты *in vivo* трансфекции методом СП были продемонстрированы в сочетании с коммерчески доступными [209] или сделанными в лабораторных условиях [206] микропузырьками, усиливающими кавитацию в жидкой среде [210; 211]. Объективные данные об эффективности *in vivo* трансфекции методом сонопорации без использования микропузырьков отсутствуют.

1.6 Модели для испытаний терапевтических вакцин против злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусом папилломы человека

ВПЧ инфицирует только базальные клетки плоского эпителия, в то время как репликация вируса связана с процессом дифференцировки кератиноцитов. Ввиду сложности воспроизведения стратифицированной структуры эпителия *in vitro*, стабильных клеточных культур, поддерживающих репликацию ВПЧ, не существует. Высокая видовая специфичность папилломавирусной инфекции исключает возможность использования вируса папилломы человека в животных моделях. Однако, сходство вирусов папилломы животных и человека позволяет переносить выводы, полученные в ходе исследований на одном виде, на другой. Некоторые иммунокомпетентные линии мышей и иммунокомпрометированных мышей могут

быть заражены вирусом папилломы *Mus musculus* 1 (MmuPV1) [212]. Мыши генетически хорошо охарактеризованы, это позволяет преодолевать некоторые ограничения других животных моделей. Несомненным преимуществом мышей является их небольшой размер и простота разведения и содержания. Однако, MmuPV1 модель имеет ряд ограничений [212]. Первое – специфичность к мышинным, а не человеческим клеткам. Второе – искусственные приемы заражения, зачастую требующие иммуносупрессии, например, УФ-облучения. Третье – различия в прогрессии к дисплазиям и раку, в частности высокий уровень спонтанной реконвалесценции. Четвертое – ограничения в чувствительных штаммах мышей и необходимость иммуногенов на основе мышинных антигенов, а не человеческих. Ввиду этого, для определения влияния различных стратегий терапевтической вакцинации на рост ВПЧ-ассоциированных опухолей создаются линии мышинных опухолевых клеток, трансфицированных полным геномом или отдельными генами ВПЧ (модели на основе аллогraftов в иммунокомпетентных мышах) [213].

Наиболее простыми и широко используемыми моделями являются сингенные мышинные модели. Поскольку иммунная система в таких моделях интактна, они хорошо подходят для доклинических исследований препаратов, влияющих на иммунную систему, таких как ингибиторы контрольных точек и терапевтические противоопухолевые вакцины. К настоящему моменту большинство исследований было проведено на мышах с имплантируемой опухолевой клеточной линией ТС-1 и ее клоном, экспрессирующим рекомбинантную люциферазу светлячка – клеток ТС-1/luc2 [6]. Клеточную линию ТС-1 получали из первичных эпителиальных клеток мышей линии C57BL/6, иммортализованных ко-экспрессией *E6* и *E7* ВПЧ16, и *RAS* [6; 7]. Модель сохраняет иммунологические особенности спонтанно возникающих ВПЧ+ опухолей [214] и имплантируется интравагинально [215; 216], подкожно [217–219], внутривенно [220] и в полость рта [221]. Характерной особенностью клеток ТС-1 является низкий уровень белка *E6* [109]. Это противоречит картине, наблюдаемой при РШМ. Ткани РШМ характеризуются высокими уровнями экспрессии как мРНК *E6*, так и белка *E6*, причем оба параметра тесно связаны с вирусной нагрузкой и тяжестью поражений шейки матки [91; 222–226]. Способность клеток ТС-1 к инвазии из первичных опухолей ограничена [227]. Метастазирование происходит только после внутривенного введения клеток мышам [220]. Эта особенность клеток ТС-1 не позволяет тестировать влияние вакцины или иммунотерапии на рост солидных опухолей и их метастатическую активность в одном эксперименте на одних и тех же животных.

Другой часто используемой моделью является клеточная линия С3, полученная из эмбриональных клеток мышей линии C57BL/6, трансформированных полным геномом ВПЧ16 и *RAS*, а также ее субклон, экспрессирующий люциферазу светлячка С3-luc [228]. Так

же, как и клетки ТС-1, клетки СЗ характеризуются высокими уровнями экспрессии мРНК *E6* и *E7*, а также способны метастазировать в легкие при внутривенном введении [229]. По сравнению с моделью на основе клеток ТС-1 опухоли, формируемые клетками СЗ, обладают сниженной кинетикой роста и меньшей агрессивностью [230]. Данные об уровне продукции белка *E6* этими клетками не известны.

Разработана также модель АТ-84-*E7*, полученная на основе клеток спонтанного плоскоклеточного рака полости рта мышей линии СЗН, трансдуцированных геном *E7* ВПЧ16 [229]. Клетки способны метастазировать в легкие. *E7* стабильно экспрессируется не только в культуре клеток и опухолях, но и в отдаленных метастазах. Уровень продукции белка *E7* в этой клеточной линии аналогичен таковому в естественных ВПЧ+ опухолях [229]. Клеточная линия СUP-1, полученная из первичных клеток почки 9-дневной мыши линии С57BL/6, иммортализованной *E7* ВПЧ16 и *RAS* [231], стабильно экспрессирует как мРНК *E7*, так и белок *E7*. Данные клетки способны образовывать опухоли в голых мышах и мышах линии С57BL/6 [231]. Данные о метастазировании опухоли, развившейся из клеток СUP-1, в литературе отсутствуют. Поскольку в развитии ВПЧ-ассоциированного канцерогенеза и уклонении от иммунного надзора участвует набор белков ВПЧ и, в первую очередь, белок *E6*, возможности моделей АТ-84-*E7* и СUP-1 в доклинических испытаниях терапевтических вакцин ограничены.

Клеточные линии МОС1-HPV и МОС2-*E6E7* получали путем трансдукции мышинной плоскоклеточной карциномы полости рта лентивирусными частицами, кодирующими *E6* и *E7* ВПЧ16 [232; 233]. Метастатический потенциал модели МОС1-HPV не известен. Модель МОС2-*E6E7* обладает повышенным метастатическим потенциалом и способна метастазировать в легкие и лимфатические узлы [232]. Уровни экспрессии *in vitro* целевых антигенов *E6* и *E7* в данных моделях поддерживались на низком уровне и различались на разных стадиях роста опухолей [232].

ВПЧ-положительная клеточная линия mEERL, полученная путем трансдукции эпителиальных клеток ротоглотки мышей линии С57Bl/6 ретровирусным вектором, кодирующим онкогены *RAS* и *E6*, *E7* ВПЧ16, способна формировать трансплантируемые опухоли и метастазировать в легкие [234]. В испытаниях терапевтической противоопухолевой вакцины на основе *E7* была показана скудная инфильтрация иммунных клеток опухолей mEERL, независимо от их локализации [235]. Данные об экспрессии мРНК *E6* и продукции белка *E6* в клеточных линиях/опухолях не приводятся.

Также существуют клеточные линии на основе эпителиальных клеток миндалин мышей, иммортализованных ретровирусным вектором, кодирующим онкогены *RAS* и *E6*, *E7* ВПЧ16 [71; 236]. Линии способны формировать опухоли и метастазировать в регионарные

лимфоузлы. Данные об *in vitro* характеристиках данных моделей и об их использовании в качестве моделей для испытания терапевтических вакцин отсутствуют.

Помимо моделей на основе аллогraftов в иммунокомпетентных мышах, разработаны модели ВПЧ-трансгенных [237; 238] и гуманизированных мышей [7], а также модели ксенотрансплантатов (PDX), полученных от пациентов с ВПЧ+ опухолями [239; 240]. Такие модели не получили широкого распространения, т.к. модели трансгенных мышей сложны и дороги, гуманизированные мыши дороги и требуют специализированных условий содержания, а модели PDX не подходят для оценки новых методов лечения, требующих интактной иммунной системы, и не моделируют клиническое прогрессирование предраковых поражений [230].

Данные раздела 1.6 опубликованы автором и его коллегами в научном обзоре [230].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реагенты

В экспериментах использовали неорганические соли, спирты, кислоты и органические растворители марки «хч» (химически чистые) или «осч» (особо чистые) отечественного производства.

Также были использованы следующие реагенты: XenoLight D-люциферин K+ (Perkin Elmer, США), изофлуран (Baxter, США), гематоксилин Майера (БиоВитрум, Россия), эозин (БиоВитрум, Россия), 10% нейтральный забуференный формалин (БиоВитрум, Россия), фосфатно-солевой буфер (ФСБ, Sigma, США), маркёры длин ДНК Gene Ruler 1000 п.н., 100 п.н. и 50 п.н (Thermo FS, США), Lipofectamine LTX (Thermo FS, США), Твин 20 (Servicebio, Бельгия), бычий сывороточный альбумин V фракции (БСА) (ПанЭко, Россия), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) (Пушинские лаборатории, Россия), Трис (ПанЭко, Россия), ЭДТА (Serva, Германия), бромистый этидий (Sigma, США), 6× DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США), глюкоза (Sigma, США), смесь 5× qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), бактоагар (ПанЭко, Россия), канамицина сульфат (ПанЭко, Россия), полиэтиленимин PEI (MW 25000) (Polysciences, США), ампициллин натрия (Красфарма, Россия), HEPES (ПанЭко, Россия), ДНКазы I, свободная от РНКазной активности (Thermo FS, США), ДМСО (ПанЭко, Россия), иономицин (Sigma, Германия), Форбол 12-миристанат 13-ацетат (РМА) (Sigma, Германия), буфер АСК (Thermo FS, США), CytoFix/Cytoperm (BD Biosciences Pharmingen, США), Perm/Wash (BD Biosciences Pharmingen, США), смесь 2×ddPCR Evagreen Supermix (BioRad, Германия).

2.1.1 Праймеры

Использованные в работе праймеры представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры, использованные в работе. FW – прямой праймер, RV – обратный праймер, Pr – флуоресцентный зонд

Ген	Последовательность праймера	Назначение
Область GAG провируса	FW 5'-GGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTA-3' RV 5'-GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC-3' Pr: 5'-(FAM)-ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCAGG-(BHQ1)-3'	Определение титра лентивируса
Ген <i>Gapdh</i> мыши	FW 5'-GTAAGTGGCCGAAAGCTGAA-3' RV 5'-AGTGGGCCTGTTTAAGGGAAAG-3'	Подтверждение лентивирусной трансдукции; оценка количества копий ДНК
Ген <i>Hprt1</i> мыши	FW 5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTT-3' RV 5'-CAGATTCAACTTGCCTCAT-3'	Оценка экспрессии генов
Ген <i>Actb</i> мыши	FW 5'-CAGAGCATCTCACCTGAAGCAC-3' RV 5'-GCTTAGAAGGACACGCACCT-3'	Оценка количества копий ДНК; подтверждение вставки E6E7 ВПЧ16 в тканях
Последовательность, кодирующая белки E6 и E7 ВПЧ16, в составе лентивирусного вектора	FW 5'-TAGAGAAGGTGGCGCGGG-3' RV 5'-GTCGACTTATGGTTTCTGAGAACAG-3'	Подтверждение лентивирусной трансдукции
Последовательность, кодирующая белок E6 ВПЧ16 (тотальный E6)	FW 5'-CTGCAATGTTTCAGGACCCA-3' RV 5'-TCATGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGT-3'	Оценка экспрессии гена и количества копий ДНК; подтверждение вставки E6E7 ВПЧ16 в тканях

Продолжение Таблицы 2

Ген	Последовательность праймера	Назначение
Последовательность, кодирующая полноразмерный белок E6 ВПЧ16 (<i>E6FL</i>)	FW 5'-AAGTTAACCACAGTTATGC-3' RV 5'-TGTTCTAATGTTGTTCCAT-3'	Оценка экспрессии гена
Последовательность, кодирующая изоформу <i>E6*I</i> ВПЧ16	FW 5'-AGGAGCGACCCAGAAAGTTA-3' RV 5'-GCTTTTGACAGTTAATACACCTCAC-3'	Оценка экспрессии гена
Последовательность, кодирующая изоформу <i>E6*II</i> ВПЧ16	FW 5'-AGGAGCGACCCAGAAAGTTA-3' RV 5'-TACGTGTTCTTATGATCTCAGGTC-3'	Оценка экспрессии гена
Последовательность, кодирующая белок E7 ВПЧ16	FW 5'-ACCGGACAGAGCCCATTACA-3' RV 5'-GCCCATTAACAGGTCTTCCAAA-3'	Оценка экспрессии гена, количества копий ДНК

2.1.2 Белки и пептиды

В работе использовали рекомбинантный белок RT_A ВИЧ-1 субтипа А штамма HXB2 (rRT-A), полученный ранее в лаборатории [241], а также синтетические пептиды, представленные в Таблице 3 (все SynPeptide Inc, China).

Таблица 3 – Пептиды, использованные в работе

Белок	Аминокислотные позиции	Сокращение	Аминокислотная последовательность
E6 ВПЧ16	1–30	E6_1.1	MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTI
	26–58	E6_2	LQTTIHDIILECVYCKQQLLRREV YDFAFRDLC
	53–90	E6_3	AFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCL KFYSKISEYRHY
	110–143	E6_5	CINCQPLCPEEKQRHLDKKQRF HNIRGRWTGR
	139–158	E6_6	MSWTGRCMSCCRSSRTRRETQL

Продолжение Таблицы 3

Белок	Аминокислотные позиции	Сокращение	Аминокислотная последовательность
Е7 ВПЧ16	1–28	E7.1	MHGDTPTLHEYMLDLQPETTD LYCYEQL
	22–45	E7.2	LYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQA
	46–72	E7.3	EPDRAHYNIVTFCKCDSTLRL CVQST
	73–98	E7.5	HVDIRTLEDLLMGTLGIVCPIC SQKP
Белок теломеразной обратной транскриптазы (Т-ОТ) крысы	559–584	TERT357	QKNRLFFYRKSVWSKLQSIGI RQQL
	791–815		SLLHFFLRFVRHSVVKIDGRFYVQ
	888–917		KTVVNFPVETGALGGAAPHQL PAHCLFPW
	845–865		QQDGLLLRFVDDFLLVTPHL
	901–929		LGGAAPHQLPAHCLFPWCGLL LDTRTLE

2.1.3 Антитела

Для проточной цитофлуориметрии в иммунологических тестах были использованы следующие антитела производства BD Biosciences Pharmingen, США, реактивные к мышиным антигенам: к CD8а, конъюгированные с FITC (553031, BD Biosciences Pharmingen, США), к CD4, конъюгированные с APC-H7 (560181), к CD3, конъюгированные с PerCP (553067); и производства Biosciences Horizon, США, реактивные к мышиным антигенам: к ИФН- γ , конъюгированные с PE (554412), к ИЛ-2, конъюгированные с BV421 (562969), к ФНО- α , конъюгированные с BV510 (563386).

Для иммуноферментного анализа использовали антитела козы к суммарным IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab6789, Sigma, США).

2.2 Материалы и объекты

2.2.1 Бактериальные штаммы

В работе были использованы бактерии *E. coli* Top10 (Invitrogen, США).

2.2.2 Плазмиды и лентивирусные векторы

Плазмиды, используемые в работе: pVax1 (Invitrogen, США), pHPV16 [242], pVaxLuc [243], pVaxRT_Ain [244], pVaxCore152opt [245], pVaxTERT [246], полученные в ходе работы плазмиды pVaxE6 и pVaxE7 и лентивирусный вектор pLJM1-EGFP [247].

2.2.3 Эукариотические клеточные линии

В работе были использованы эукариотические клеточные линии: аденокарциномы шейки матки HeLa (Евроген, Россия), эпителиоподобные клетки почки эмбриона человека, трансформированные ДНК аденовируса типа 5 HEK293T (Евроген, Россия), аденокарциномы молочной железы мыши, экспрессирующие люцифразу светлячка 4T1luc2 (Bioware Ultra Cell Line 4T1luc2, Caliper Life Sciences Inc., Хопкинтон, США) и TC-1/luc2, любезно предоставленная профессором Т.С. Ву (John Hopkins University, США) [248].

2.2.4 Лабораторные животные

В работе были использованы лабораторные мыши линии BALB/с из питомников Envigo (Venray, Нидерланды), или Charles River Laboratories (Зандхофер, Германия) и НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино, Россия), и мыши линии C57Bl/6 из питомников Envigo (Venray, Нидерланды) и НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино, Россия).

2.3 Методы исследований

2.3.1 Схема экспериментальной работы

Работу проводили в несколько этапов: на этапе 1 анализировали изменчивость АК-последовательностей белков E6 и E7 изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории Европы, включая европейскую часть РФ, с учетом полученных результатов конструировали ДНК-вакцинные препараты, кодирующие консенсусные белки E6 и E7 ВПЧ16; на этапе 2 с использованием репортерной плазмиды подбирали оптимальные методы доставки плазмид *in vivo* на мышах, с участием охарактеризованных модельных иммуногенов оценивали способность доставленных плазмидных ДНК вызывать иммунный ответ; на этапе 3 с применением охарактеризованных модельных иммуногенов строили сценарий их взаимодействия при одновременном введении и подбирали оптимальную схему ДНК-иммунизации, обеспечивающую выработку эффективного иммунного ответа на отдельные иммуногены; на этапе 4 используя оптимальный метод доставки плазмидной ДНК оценивали

иммуногенность полученных консенсусных последовательностей Е6 и Е7 ВПЧ16 в составе ДНК-вакцинных конструкций *in vivo* на мышах; на этапе 5 исследовали способность полученных консенсусных последовательностей Е6 и Е7 ВПЧ16 в составе ДНК-вакцинных конструкций ограничивать рост и метастатическую активность опухолевых клеток в стандартной модели для тестирования терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака на основе клеточной линии ТС-1/luc2; на этапе 6 разрабатывали новую модель для тестирования терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака на основе опухолевой клеточной линии мышей 4Т1luc2, модифицированной для стабильной экспрессии генов Е6 и Е7 ВПЧ16 и сравнивали свойства разработанной модели со свойствами модели ТС-1/luc2; на этапе 7 оценивали эффективность и предикативную силу новой разработанной модели. Общая схема экспериментальной работы представлена на Рисунке 5.

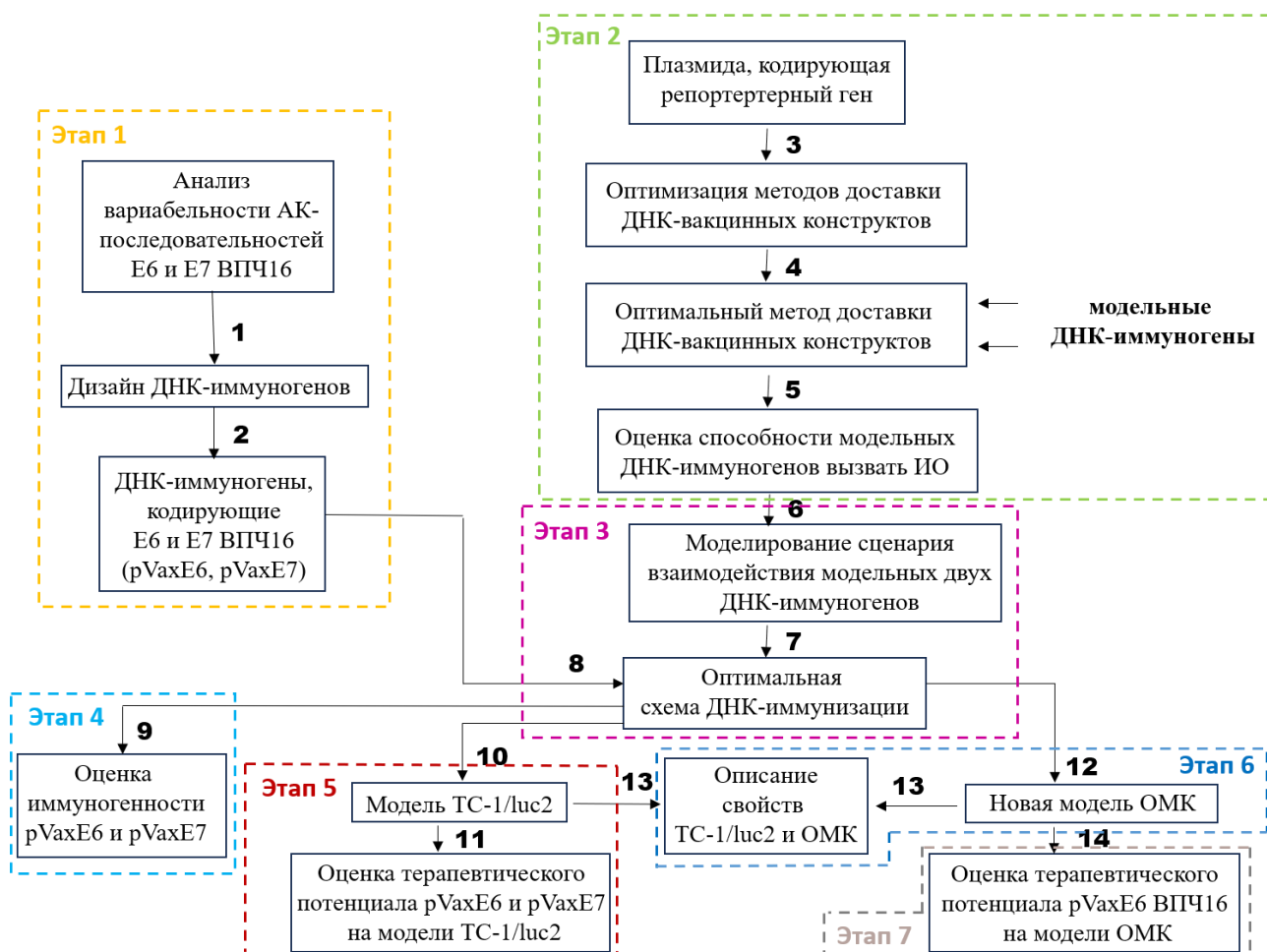


Рисунок 5 – Общая схема экспериментальной работы. Цветными пунктирными линиями обозначены блоки, соответствующие этапам работы. Стрелками обозначены связи/пути между этапами. Последовательность путей обозначена черными жирными цифрами у стрелок. Буквенные обозначения: ИО – иммунный ответ, ОМК – опухолевые мышечные клетки

2.3.2 Получение и анализ консенсусных аминокислотных последовательностей E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

Для создания консенсусных аминокислотных последовательностей E6 и E7 ВПЧ16 из международной базы данных GenBank NCBI [249] (даты выгрузки – 6.10.2022 и 12.08.2023) были выгружены 379 нуклеотидных последовательностей E6 и 331 нуклеотидная последовательность E7 ВПЧ16, полученные в результате секвенирования ДНК, выделенной из тканей пациентов европейской части РФ и стран Европы (Латвия, Швеция, Польша, Германия, Италия, Португалия, Словения, Люксембург, Нидерланды, Греция) полученных за период с 2007 по 2023 гг. (Таблица 4). Все образцы были аннотированы датой сбора, страной происхождения и диагнозом.

Таблица 4 – Номера нуклеотидных последовательностей E6 и E7 ВПЧ16, используемых для создания консенсусных последовательностей E6 и E7, выгруженные из международной базы данных GenBank NCBI [249]

Страна	ID образца в базе данных GenBank NCBI
Латвия	PQ215484–PQ215514; PV809647–PV809662
Германия	EU118173
Польша	KX462887–KX462889 (все*)
Швеция	KF880690; KY994539
Россия	MT353702–MT353713; PP794908–PP794955 (все*); PP804070–PP804117 (все**)
Италия	EF422093–EF422105; MN937377–MN937414
Португалия	EF424416; EF424414; EF433432; EF433433
Словения	MN148319–MN148346
Люксембург	LR861897; LR861899
Нидерланды	KY549156–KY549321
Греция	HM211087–HM211089
* - нуклеотидная последовательность содержит только E6 ВПЧ16; ** - нуклеотидная последовательность содержит только E7 ВПЧ16	

Полученные нуклеотидные последовательности были переведены в аминокислотные и выровнены в соответствии с референсными последовательностями: NP_041325.1 (GeneID1489078) для E6 и NP_041326.1 (GeneID1489079) для E7, соответственно. Консенсусные последовательности белков E6 и E7 ВПЧ16 были получены с использованием алгоритма CLUSTAL MUSCLE программы JalView 2.11.14 [250].

Данные по локализации В- и Т-клеточных эпитопов белков Е6 и Е7 ВПЧ16 были получены из международной базы данных открытого доступа IEDB Analysis Resource (<http://tools.iedb.org>, даты загрузки – 02.07.2019 и 12.10.2022). Карты эпитопов были построены в программе JalView 2.11.14 [250].

2.3.3 Получение ДНК-иммуногенов, кодирующих белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа

Используемые в работе ДНК-иммуногены, кодирующие Е6 и Е7 ВПЧ16, синтезировали в фирме ЗАО Евроген.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие консенсусные белки Е6 и Е7 ВПЧ16, полученные по результатам раздела 2.3.1, оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих с использованием сервисов Codon Optimization Calculator [251] и Codon Optimization Tool [252]. Синтезированные гены (Евроген, Россия) клонировали в коммерческий вектор pVax1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, США) под контроль конститутивного раннего цитомегаловируса (IE CMV) промотора по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI (Евроген). В результате были получены конструкции, несущие Е6wt и Е7wt (pVaxE6wt и pVaxE7wt, соответственно). Далее, полученные плазмиды модифицировали с помощью сайт-направленного мутагенеза с целью введения АК-замен в р53-связывающем сайте для Е6 (С70G и I135T; [253]) и в Rb-связывающем сайте для Е7 (С24G и E26G; [253]). В результате были получены ДНК-иммуногены pVaxE6 и pVaxE7. Наличие вставок ДНК было подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру (Евроген).

Схемы полученных ДНК-конструктов представлены на Рисунке 6.

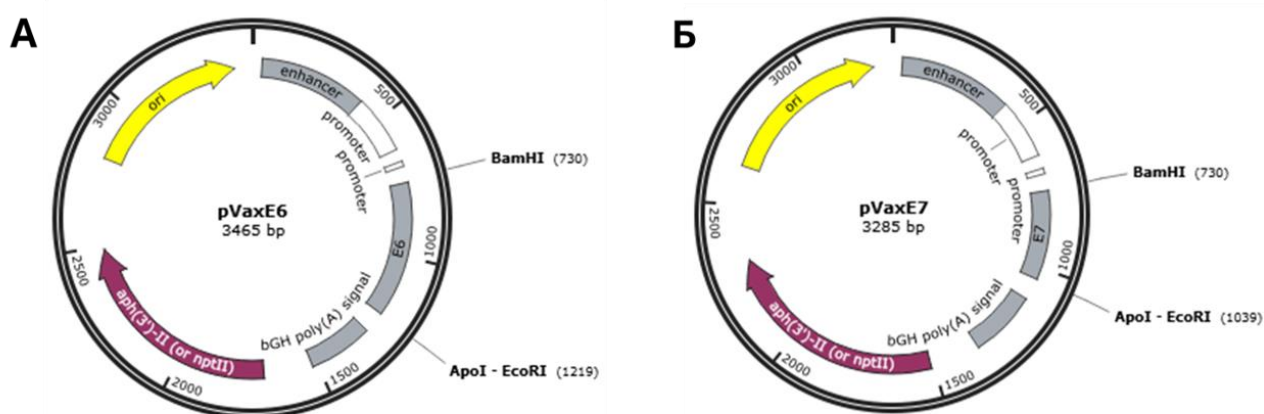


Рисунок 6 – Схемы ДНК-вакцинных конструкций pVaxE6 (А) и pVaxE7 (Б) на основе эукариотического экспрессионного вектора для ДНК-иммунизации pVax1. Синтетические гены Е6 и Е7 ВПЧ16 были клонированы по сайтам BamHI и EcoRI

2.3.4 Дизайн лентивирусного вектора pLJM1_pGK_E6E7, кодирующего E6 и E7 ВПЧ16 вируса папилломы человека 16 типа

В лентивирусный вектор pLJM1-EGFP [247] вместо участка, кодирующего EGFP под контролем IE CMV промотора, встраивали последовательность, кодирующую E6 и E7 ВПЧ16 из состава плазмиды rHPV16, с сохранением участка реинициации трансляции E7 под контроль промотора фактора элонгации трансляции 1 альфа человека (EF1 α) [254]. Участок последовательности селективного гена пурамицин-N-ацетилтрансферазы под контролем человеческого PGK промотора сохраняли. Схема полученного бицистронного лентивирусного вектора pLJM1_pGK_E6E7 представлена на Рисунке 7.

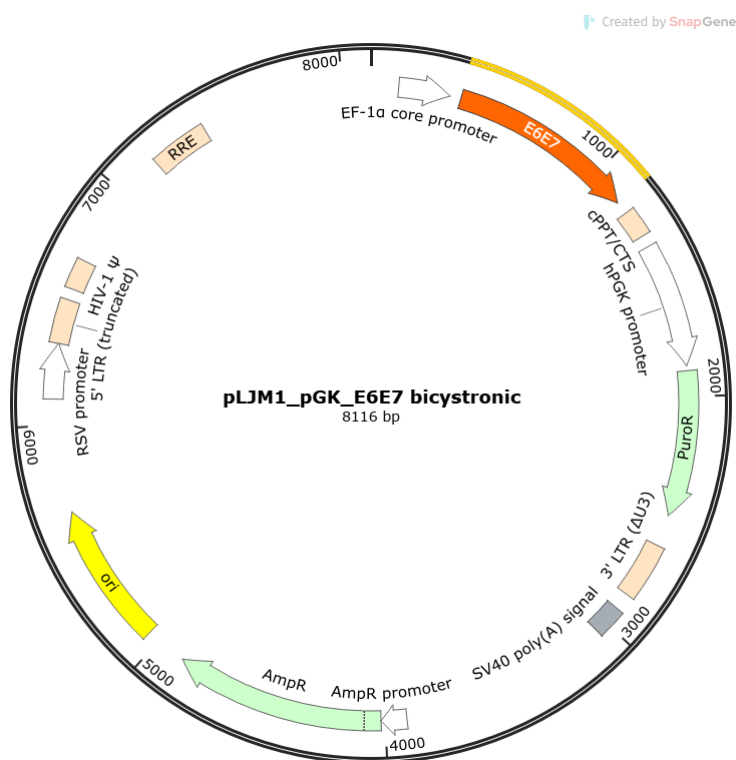


Рисунок 7 – Схема лентивирусного вектора pLJM1_pGK_E6E7, кодирующего E6 и E7 ВПЧ16, использованного для трансдукции клеточной линии 4T1luc2 в данной работе. Положение вставок ДНК, кодирующих E6/E7, показано оранжевым цветом

2.3.5 Работа с эукариотическими клетками

2.3.5.1 Культивирование и хранение эукариотических клеток

Эукариотические клетки HeLa и HEK293T культивировали в полной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 мкг/мл смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин). Эукариотические клетки 4T1luc2 и ее производные, а также клетки TC-1/luc2 культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L глутамина, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина. Все эукариотические клетки культивировались в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Экспоненциальную фазу роста клеток поддерживали путем их пересева в новый флакон при достижении 80-90% конфлюэнтности монослоя каждые 2–3 дня. Перед пересевом клеточный монослой промывали буфером PBS и открепляли от поверхности флакона 0,025% раствором Трипсин-ЭДТА в течение 5 минут при 37°C. Открепление клеток контролировали при помощи световой микроскопии. Непосредственно после открепления клеток от поверхности флакона проводили инактивацию трипсина добавлением полной среды для культивирования с последующим ресуспендированием. Далее, полученную суспензию переносили в новый флакон с полной питательной средой в соотношении 1:5 для последующего наращивания либо подсчитывали количество клеток в камере Горяева для последующей заморозки.

Для подготовки клеток к заморозке, клеточную суспензию центрифугировали при 600×g 10 мин. Тщательно удаляли надосадочную жидкость, к осадку на каждые 10⁶ клеток добавляли 1 мл среды для заморозки, содержащей 50% культуральной среды, 40% эмбриональной телячьей сыворотки, 10% ДМСО. Осадок аккуратно ресуспендировали в среде для заморозки и переносили в маркированные криопробирки (Corning, США) с последующим постепенным охлаждением при температуре минус 70°C в специальном контейнере с изопропанолом сутки. Далее клетки переносили в криохранилище для длительного хранения.

2.3.5.2 Трансфекция эукариотических клеток

Клетки 4T1uc2 высевали в 6-луночные планшеты в количестве 2×10⁵ клеток/лунку. На следующий день к клеткам добавляли по 2 мкг плазмид pVaxE6 или pVaxE7 с 5 мкл реагента Lipofectamine LTX и 2 мкл реагента Plus Reagent. Трансфекцию проводили согласно инструкции производителя. Через 2 дня после трансфекции клетки открепляли как описано в разделе 2.3.5.1 и собирали для выделения тотальной РНК. Анализ экспрессии мРНК проводили как описано в п. 2.3.8.3 с использованием праймеров, специфичных к E6 (тотальный) и E7 ВПЧ16 (Таблица 2).

2.3.5.3 Получение лентивирусных частиц

Лентивирусные частицы LJM1_pGK_E6E7 были продуцированы в культуре клеток НЕК293Т методом временной ко-трансфекции с использованием смеси ДНК лентивирусного вектора pLJM1_pGK_E6E7 и хелперных плазмид, кодирующих структурные белки вирусных частиц и гликопротеин оболочки вируса везикулярного стоматита (VSV-G). Трансфекцию

клеток проводили в присутствии раствора полиэтиленимина PEI (MW 25000) по протоколу [255]. Через 48 часов после трансфекции культуральную среду собирали, осветляли низкоскоростным центрифугированием (1200 об/мин, 10 мин) и фильтровали через стерильный шприцевой фильтр с размером пор 0,45 мкм (Millipore, США). Полученные в культуральной среде лентивирусные частицы концентрировали с использованием центрифужного концентратора Amicon с диаметром пор 100K (MilliporeSigma, США) при 5000 об/мин в течение 15 мин. Аликвоты по 10 и 20 мкл каждого препарата концентрированных лентивирусных частиц были использованы для трансдукции 10^5 клеток HeLa для определения титра вирусных частиц.

2.3.5.4 Трансдукция эукариотических клеток лентивирусными частицами

В три лунки 6-луночного планшета вносили по 10^5 клеток HeLa на лунку. Через 2 часа в две лунки добавляли по 10 и 20 мкл препаратов концентрированных лентивирусных частиц LJM1_pGK_E6E7, полученных на этапе 2.3.4.3, и полибрен в концентрации 8 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 72 часов, затем заменяли среду в лунках.

2.3.5.5 Определение титра лентивирусных частиц

Клетки HeLa, трансдуцированные лентивирусными частицами LJM1_pGK_E6E7, культивировали в течение шести дней, после чего выделяли геномную ДНК с помощью набора ExtractDNA Blood (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Титр лентивирусных частиц определяли методом ПЦР в режиме реального времени (как описано в п. 2.3.8.3) с использованием пары праймеров и зонда, специфичных к 5'-участку генома провируса (области GAG провируса) (Таблица 2), по калибровочной кривой, полученной по результатам амплификации стандартных образцов ДНК HeLa с известной эффективностью трансдукции.

2.3.5.6 Получение моноклональных производных клеточной линии 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

Клетки аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2 были трансдуцированы лентивирусными частицами pLJM1_pGK_E6E7 с множественностью инфекции 20 Т.Е./клетку. Моноклональные производные получали методом предельных разведений в 96-луночных планшетах. Колонии, появившиеся в лунках с единственной клеткой, пересаживали в 12-луночные планшеты и наращивали до получения монослоя. Полученные клеточные производные проверяли на наличие вставки E6/E7 ВПЧ16 методом конвенциональной ПЦР с праймерами к последовательностям лентивирусного вектора, фланкирующим участок вставки

E6/E7 (Таблица 2). Моноклональные производные линии 4T11uc2, содержащие вставку и экспрессирующие мРНК *E6* и *E7* ВПЧ16, культивировали и замораживали как описано в разделе 2.3.5.1.

2.3.6 Работа с прокариотическими клетками

2.3.6.1 Получение компетентных клеток *E. coli*

Бактериальные клетки *E. coli* высевали штрихом чашки Петри с твердой питательной средой SOB (2% бактотриптон, 0,5% экстракт дрожжей, 2,5 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄) и инкубировали чашки в течение ночи при 37°C в термостате. Далее отбирали одиночную колонию, инокулировали ее в 50 мл пробирку с 5 мл жидкой питательной среды SOC (получаемую добавлением 5 мл 20% глюкозы на каждые 100мл среды SOB) и растили ночь при 37°C при постоянном перемешивании на качалке при 180 об/мин. 3 мл ночной культуры добавляли к 150 мл свежей среды SOC и растили при тех же условиях до достижения оптической плотности OD₆₀₀=0,6. Полученную бактериальную культуру центрифугировали при 4°C в течение 10 мин при 2500 × g. Осадок ресуспендировали в 10 мл холодного буфера TB (250 мМ KCl, 10 мМ HEPES pH 6,7, 15 мМ CaCl₂, 55 мМ MnCl₂) и инкубировали на льду в течение 10 мин. Далее бактериальную суспензию повторно центрифугировали, осадок ресуспендировали в 3,5 мл ледяного буфера TB с добавлением 7% ДМСО и инкубировали суспензию на льду в течение 10 мин. Полученную бактериальную суспензию переносили в 1,5 мл пробирки и замораживали в жидком азоте. Полученные компетентные клетки хранили при минус 70°C.

2.3.6.2 Трансформация компетентных клеток *E. coli*

Компетентные клетки *E. coli* трансформировали методом теплового шока. К 100 мкл оттаявшей на льду суспензии клеток добавляли 20 нг плазмидной ДНК, после чего суспензию инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Далее бактериальную суспензию инкубировали в течение 2 мин в термостате при 42°C, и помещали на лед на 2 мин. Охлажденную бактериальную суспензию добавляли к 400 мкл питательной среды SOB и инкубировали в течение часа при 37°C в термостате. После инкубации небольшое количество (до 150 мкл) бактериальной суспензии распределяли шпателем по поверхности чашки Петри с твердой питательной средой SOB, содержащей 1,5% бактоагара с селективным антибиотиком, и инкубировали чашку ночь на 37°C в термостате.

2.3.6.3 Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

В пробирку с 10 мл питательной среды SOB с селективным антибиотиком (канамицин) помещали единичную колонию клеток *E. coli*, трансформированную плазмидной ДНК, и культивировали 8 часов при температуре 37°C при постоянном перемешивании на качалке при 180 об/мин. Далее 5 мл полученной бактериальной культуры переносили в 2,5 л питательной среды SOB с селективным антибиотиком (канамицин) и инкубировали ночь на качалке при постоянном перемешивании при температуре 37°C и 180 об/мин. Полученную бактериальную культуру центрифугировали при 6000 × g в течение 10 мин. Удаляли надосадочную жидкость, из осадка выделяли ДНК с использованием набора Plasmid Giga Kit EndoFree (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью прибора DS-11 FX (DeNovix, США). Образцы плазмидной ДНК хранили при температуре минус 20°C. Плазмидные ДНК дополнительно очищали переосаждением. Для этого к раствору ДНК в TE, добавляли 0,1 объема 3М ацетата натрия и три объема 96% этанола. Полученную смесь аккуратно перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин и центрифугировали при 11000 × g при комнатной температуре в течение 10 мин. К полученному осадку добавляли 0,5 мл 70% этанола и повторно центрифугировали при том же режиме. Осадок подсушивали на воздухе и растворяли в деионизированной воде. Процедуру повторяли дважды. Очищенную плазмидную ДНК, растворенную в деионизированной воде, хранили при температуре минус 20°C.

2.3.7 Выделение тотальной РНК и ДНК из клеточных культур и тканей мышей

2.3.7.1 Выделение тотальной РНК и ДНК из клеточных культур

Тотальную РНК из клеточных культур выделяли с использованием набора GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fischer Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКазной активности, для удаления остатков геномной ДНК. Для этого 1 мкл ДНКазы I (1 ед/мкл) добавляли к 1 мкг РНК, перемешивали и инкубировали смесь 30 мин при температуре 37°C. Далее смесь деактивировали добавлением 1 мкл 50 мМ ЭДТА с последующей инкубацией при температуре 65°C в течение 10 мин. Препарат РНК выделяли из реакционной смеси на колонках CleanRNA Standard kit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически на приборе DS-11 (DeNovix, США). Качество очистки проверяли методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле.

ДНК из клеточных культур выделяли с помощью набора MagNA Pure 96 DNA Large Volume Kit на приборе MagNA Pure 96 Instrument (оба Roche, Швейцария) согласно

инструкции производителя. Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе DS-11 (DeNovix, США).

2.3.7.2 Выделение ДНК из тканей мышей

ДНК из замороженных в жидком азоте опухолей выделяли с помощью набора MagNA Pure 96 DNA Large Volume Kit на приборе MagNA Pure 96 Instrument (оба Roche, Швейцария) согласно инструкции производителя.

ДНК из тканей органов мышей, фиксированных формалином и залитых в парафиновые блоки (FFPE-блоки, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded), выделяли по следующему протоколу: FFPE-блоки нарезали на срезы толщиной 5 мкм с помощью микротомы (Reichert, США). Срезы (10–15 шт), отбирали стерильным пинцетом и помещали в стерильные пробирки объемом 1,5–2,0 мл с 400–500 мкл стерильного минерального масла для ПЦР. Образцы нагревали при температуре 90°C в течение 10 минут, после чего минеральное масло, содержащее растворенный парафин, удаляли стерильной микропипеткой. Далее из полученного депарафинизированного материала выделяли ДНК с помощью набора AllPrep DNA/RNA FFPE (Qiagen, Германия) согласно рекомендациям производителя.

Концентрацию ДНК измеряли на приборе DS-11 (DeNovix, США).

2.3.8 Детекция ДНК и мРНК E6 и E7 методом полимеразной цепной реакции

2.3.8.1 Конвенциональная полимеразная цепная реакция

Наличие ДНК E6/E7 ВПЧ16 в образцах ДНК, выделенной из клеточных культур или опухолей мышей, подтверждали методом конвенциональной ПЦР с использованием пары праймеров, специфичных к E6 (тотальный) и E7 ВПЧ16 (Таблица 2). В качестве контроля выделения ДНК использовали пары праймеров, специфичных к последовательностям, кодирующим *Actb* мыши или *Gapdh* мыши (Таблица 2). Амплификацию проводили в 25 мкл смеси, содержащей 100 нг ДНК, 0,5 мкл праймеров (10 мкМ) и 2,5 единицы Hot Start Taq DNA Polymerase (New England Biolabs, США), с использованием прибора Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific, США) по протоколу: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 30 сек, Tm пары праймеров – 20 сек, 72°C – 15 сек. Продукты амплификации визуализировали методом агарозного гель-электрофореза.

2.3.8.2 Цифровая капельная полимеразная цепная реакция

Количество копий последовательностей ДНК, кодирующих E6 и E7, в субклонах 4T1luc2 определяли методом цифровой капельной ПЦР с использованием праймеров,

описанных в Таблице 2. Реакционная смесь содержала: 10 мкл 2×ddPCR Evagreen Supermix (Bio-Rad, Германия), 0,5 мкл каждого праймера (10мкМ) и 10 мг ДНК, выделенной из клеточных культур.

Капли генерировали с использованием автоматического генератора капель Droplet Generator (Bio-Rad, Германия). Перед амплификацией целевых продуктов проводили валидацию праймеров путем градиентной ПЦР на приборе C1000 Touch Thermal Cycler по протоколу: 95°C – 5 мин; 35 циклов, содержащих 95°C – 30 сек, градиент Tm от 55°C до 65°C – 1 мин; 4°C – 5 мин; 90°C – 5 мин; 12°C – 1 мин.

Амплификацию целевых продуктов проводили на том же приборе по аналогичному протоколу, но с фиксированной подобранной температурой отжига праймеров 59°C. Данные собирали с использованием устройства для считывания капель QX200 (Bio-Rad, Германия) и анализировали с использованием программного обеспечения QuantaSoft версии 1.7. 4.0917 (Bio-Rad, Германия).

Количество вставок (CNV) ДНК E6 и E7 в геномах субклонов 4T1luc2 определяли по формуле (1)

$$CNV = \left(\frac{A}{B}\right) \times NB, (1)$$

где А – концентрация молекул-мишеней (копий/мкл), В – концентрация референсных молекул (копий/мкл), NB – количество копий референсных локусов в геноме (для *Actb* и *Gapdh* в клетках 4T1 равно 4) [256].

2.3.8.3 Анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени

Обратную транскрипцию проводили с использованием 1–3 мкг тотальной РНК и набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя, на амплификаторе Arktik (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу: 42°C – 60 минут, 70°C – 10 минут, с последующим охлаждением до 4°C.

ПЦР-РВ проводили с использованием праймеров, специфичных к E6 (тотальный), E6*I, E6*II, E6FL, *Hprt1* (Таблица 2) и набора 5x qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на приборе RotorGene 6000 (Qiagen, Германия) по протоколу: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 30 сек, Tm пары праймеров – 20 сек, 72°C – 15 сек. Схематическое изображение локализации амплифицируемых участков на транскриптах E6 ВПЧ16 представлено на Рисунке 8.

Все измерения проводили в трех технических повторах, контроли без матрицы и без стадии обратной транскрипции были включены в тест. Уровни соответствующих мРНК

измеряли относительно мРНК *Hprt1* мыши. Относительные уровни экспрессии генов рассчитывали с помощью метода ddCt [257].

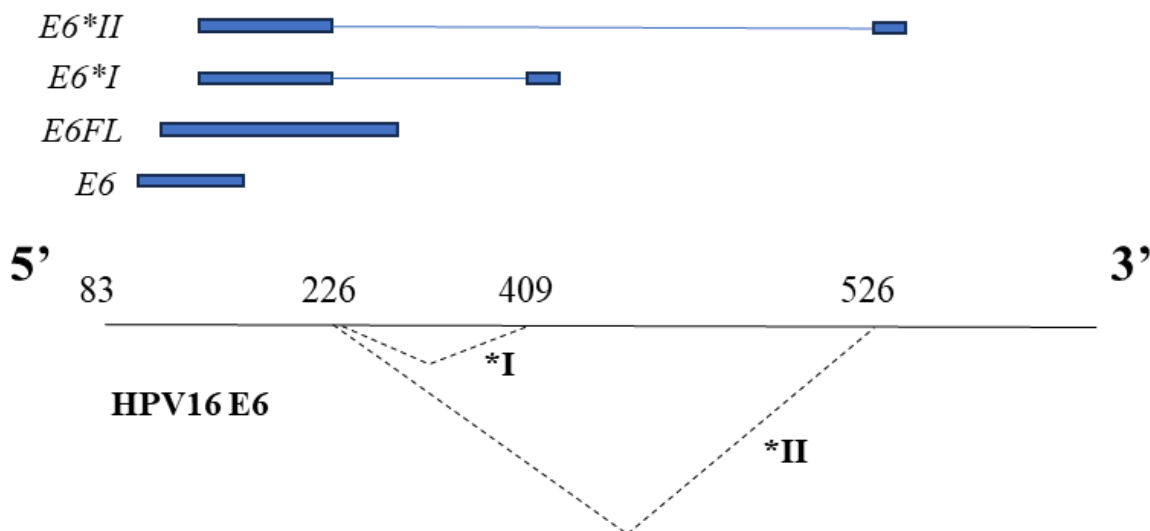


Рисунок 8 – Схематическое изображение локализации амплифицируемых участков на транскриптах E6 ВПЧ16, соответствующих изоформам *E6*I*, *E6*II*, а также полноразмерному E6 (*E6FL*). Синими полосками на рисунке обозначены: «E6» – амплифицируемый участок, содержащий все изоформы и полноразмерный транскрипт E6 (тотальный E6), ограниченный прямым и обратным праймерами, расположенный выше сайта донора сплайсинга в положении 226 нуклеотида; «E6FL» – амплифицируемый участок полноразмерного транскрипта E6, ограниченный прямым праймером, расположенным выше сайта донора сплайсинга в положении 226 нуклеотида, и обратным праймером, расположенным в интронной области; «E6*I» и «E6*II» – амплифицируемые участки изоформ E6*I и E6*II, соответственно, ограниченные прямыми праймерами, расположенными выше сайта донора сплайсинга в положении 226 нуклеотида, и обратными праймерами, охватывающими области за сайтами сплайсинга. Пунктирной линией отмечены сайты сплайсинга для изоформ E6*I (*I) или E6*II (*II). Цифрами обозначены положения нуклеотидов

2.3.8.4 Оценка количества ДНК, кодирующей E6/E7 вируса папилломы человека 16 типа в мышинных тканях, залитых в парафиновые блоки

2.3.8.4.1 Детекция плазмидной ДНК, кодирующей E6/E7 вируса папилломы человека 16 типа и оценка ее количества

Калибровочные образцы готовили из ДНК плазмиды pLJM1_pGK_E6E7, разведенной водой, свободной от нуклеаз, в количестве от 10^6 копий до 1 копии серией 10-кратных последовательных разведений. Количество копий плазмидной ДНК в образце рассчитывали по формуле (2) [258]

$$\text{количество копий ДНК} = \frac{\text{Количество ДНК (нг)} \cdot 6,022 \cdot 10^{23}}{\text{длина ДНК (п.о.)} \cdot 1 \times 10^9 \frac{\text{нг}}{\text{мл}} \cdot 650 \text{ дальтон}} \quad (2)$$

Серийные разведения pLJM1_pGK_E6E7 анализировали полуколичественной тест-системой HPV HR Anyplex™II HPV14 (Seegene, Корея) и количественной тест-системой

Allplex™ HPV HR (Seegene, Корея) в соответствии с рекомендациями производителя, а также с помощью количественной in-house ПЦР с использованием пары праймеров, специфичных к *E6* (тотальный) (Таблица 2).

Количественную in-house ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей серийные разведения плазмиды pLJM1_pGK_E6E7, 0,5 мкл праймеров (10 мкМ) и реагентов из набора 5x qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) для детекции в режиме реального времени, на приборах CFX Connect (Bio Rad, США) или Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Германия) по единому протоколу: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 30 сек, T_m пары праймеров – 20 сек, 72°C – 15 сек.

По результатам количественных ПЦР строили калибровочные кривые зависимости порогового цикла (C_t) от количества копий плазмиды pLJM1_pGK_E6E7 в образце (Рисунок 9).

Количественная in-house ПЦР с использованием пары праймеров, специфичных к *E6* (тотальный), определяла до 10 копий плазмидной ДНК (Рисунок 9); полуколичественная тест-система AnyPlex II HPV HR Detection assay – от 1 до 10 копий (Рисунок 9); количественная тест-система AllPlex HPV HR Detection assay – до 10 копий плазмидной ДНК (Рисунок 9).

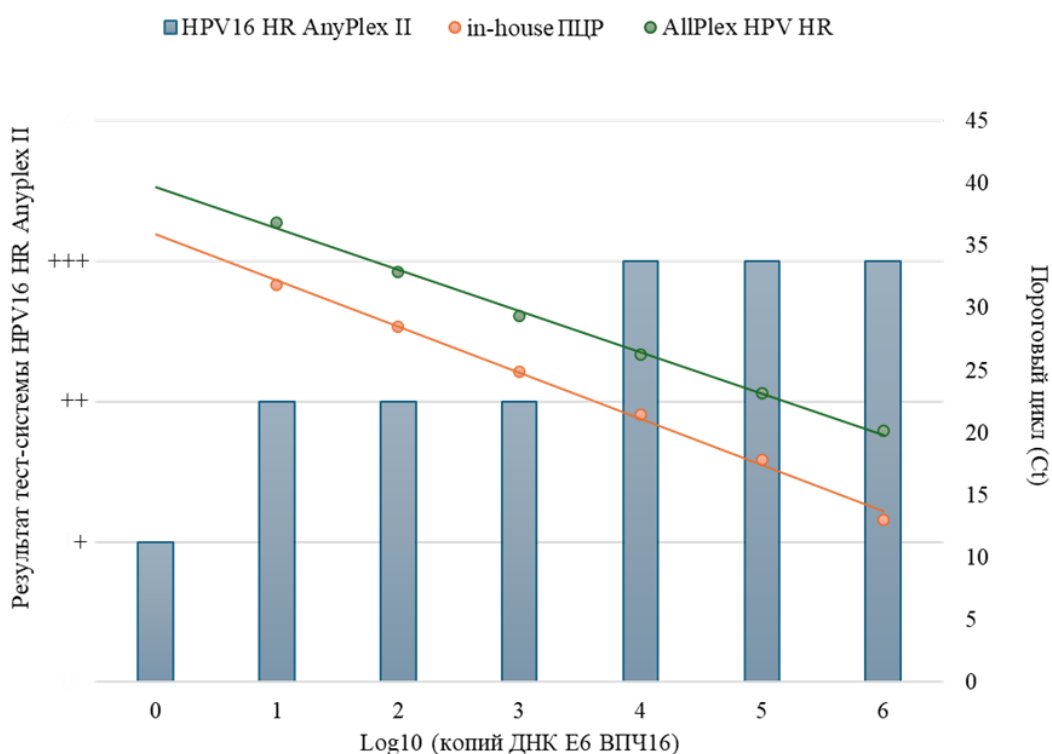


Рисунок 9 – Чувствительность обнаружения ДНК E6 ВПЧ16 с помощью метода ПЦР. Калибровочная кривая ПЦР с праймерами, специфичными к E6 (тотальному) (in-house ПЦР) (красная линия); калибровочная кривая по результатам ПЦР, проведенной с использованием тест-системы Allplex HPV HR Detection assay (зеленая линия); полуколичественное определение ДНК с помощью тест-системы AnyPlex II PCR: низкий уровень (+) соответствует положительному результату после 40 циклов ПЦР, промежуточный (++) - положительному результату в пределах от 31 до 39 циклов, высокий (+++) - положительному результату до 31 цикла (серые столбцы) [259]

2.3.8.4.2 Детекция ДНК, кодирующей Е6/Е7 вируса папилломы человека 16 типа, и оценка ее количества в мышинных тканях

Количество копий ДНК, кодирующей Е6/Е7 ВПЧ16, в тотальной ДНК, выделенной из мышинных тканей, залитых в FFPE-блоки, определяли полуколичественной тест-системой AnyPlex II PCR (Seegene, Корея) или рассчитывали на основе соответствующих значений пороговых циклов C_t , полученных в результате in-house ПЦР с использованием праймеров, специфичных к Е6 (тотальному), с использованием линейного уравнения калибровочной кривой, полученной при оценке чувствительности in-house ПЦР (метод описан в разделе 2.3.8.4.1).

Поскольку клетки исследуемых тканей несли по одной копии вставки ДНК Е6/Е7 (при том, что клетки 4Т1 являются анеуплоидными [256]), «копии ВПЧ16» переводили в количество хромосом мышей, несущих Е6/Е7 ВПЧ16, что отражало количество клеток.

ДНК, выделенная из клеток ТС-1/luc2, использовалась в качестве положительного контроля во всех анализах. Отрицательный контроль без матрицы был включен во все эксперименты. В качестве внутреннего контроля для in-house ПЦР использовали пару праймеров, специфичных к *Actb* мыши (Таблица 2).

2.3.9 Агарозный гель-электрофорез образцов РНК и ДНК

Электрофорез образцов РНК и ДНК проводили в 1% или 2% агарозном геле, соответственно, в 1× TBE буфере (89мМ Трис, 89мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0). Перед нанесением в лунки геля образцы смешивали с буфером нанесения 6х DNA Loading Dye (Thermo Fischer Scientific, США). Для визуализации нуклеиновых кислот (НК) в 1× TBE буфер вносили бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для определения размера продуктов использовали соответствующие маркеры длин НК. Электрофорез проводили в горизонтальной камере (Bio-Rad, Германия) при напряженности поля ~2В/см.

Результаты детектировали при помощи системы гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, Германия). Результаты анализировали с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, Германия). Полученные изображения обрабатывали в программе Image Lab (Bio-Rad, Германия).

2.3.10 Работа с лабораторными мышами

Эксперименты с использованием лабораторных мышей были выполнены в Латвийском центре биомедицинских исследований (Latvian Biomedical Research and study Centre, Рига, Латвия), ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

Минобрнауки России и ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Эксперименты были выполнены в соответствии с биоэтическими принципами, принятыми Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и для других научных целей (Страсбург, 1986), Латвийским комитетом по этике защиты животных и Латвийской продовольственно-ветеринарной службой (протокол № 99 от 4 апреля 2018 г. [246]), приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Протоколы исследований были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (протокол №39, 24 марта 2023 г.), а также этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (протокол №170124-3, 14 января 2024 г.).

В эксперименте были использованы мыши линии BALB/c или C57Bl/6 возрастом 8–13 недель массой 20 г. После поступления из питомника животные были акклиматизированы в виварии соответствующей лаборатории в течение 7–14 дней. Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках в отделении подопытных животных в специализированных помещениях, предназначенных для работы с SPF-животными при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности на уровне 45–65%, с 12-часовым циклом смены дня/ночи. Клетки ежедневно очищали от отходов жизнедеятельности и остатков пищи. Для кормления животных были использованы автоклавированные комбинированные корма и питьевая вода.

Во время манипуляций животных анестезировали ингаляционно путем подачи животным через полнолицевую маску воздушно-газовой смеси, содержащей изофлуран (4% для индукции и 2,5% для поддержания наркоза), с помощью прибора 410AP Anesthesia Unit (Univentor, Мальта). По окончании манипуляций мышей помещали в клетку на термоизоляционную подложку бок о бок друг с другом для предотвращения переохлаждения.

В конечной точке экспериментов проводили эвтаназию животных путем цервикальной дислокации или путем декапитации с последующим тотальным сбором крови (в эксперименте по определению гуморального иммунного ответа).

2.3.11 Эксперименты по оптимизации доставки плазмидной ДНК мышам

Перед введением плазмидной ДНК животных анестезировали ингаляционно, как описано выше, и удаляли шерсть с мест инъекций с помощью триммера Aescular Eхаста (Aescular, B. Braun Group, Мельзунген, Германия). Плазмидные ДНК вводили внутрикожными инъекциями инсулиновым шприцом с несъемной иглой 29G в дорсальную область у основания хвоста в дозе 20–100 мкг на инъекцию в объеме 20 мкл.

2.3.11.1 Определение пороговой силы буферного раствора, поддерживающего доставку плазмидной ДНК при внутрикожной инъекции

В экспериментальной серии ВК, определяли пороговую ионную силу фосфатного буфера (ФБ) на основе ФСБ, при котором еще возможно проникновение ДНК в клетку пассивным транспортом. Для этого группам мышей линии BALB/c (n=5) однократно вводили в два сайта, слева и справа от основания хвоста, по 100 мкг очищенной и обессоленной плазмиды pVaxLuc, растворенной в ФСБ и в серийно разбавленных ФБ на основе ФСБ. Инъекционные растворы готовили, добавляя рассчитанный объем 10-кратного ФСБ к исходному раствору плазмиды, а затем доводя объем инъекционной смеси деионизированной водой (H₂O). Полученная ионная сила растворов ФБ, рассчитанная, как описано [260], представлена в Таблице 5. Контрольная группа мышей (группа ВК.5) получала однократную дозу плазмидной ДНК pVaxLuc в растворе ФСБ (изотонической ионной силы 163 ммоль/л) (Таблица 5).

Таблица 5 – Серия экспериментов на мышах линии BALB/c, проведенных для определения пороговой ионной силы ФБ, поддерживающего доставку плазмидной ДНК, кодирующей люциферазу (pVaxLuc), при внутрикожной инъекции. Экспрессию гена люциферазы (Luc) после доставки оценивали по уровню биолуминесцентного сигнала от мест инъекции

Группа* (количество мышей в группе)	Количество сайтов инъекции	Доза pVaxLuc на инъекцию, мкг	Ионная сила раствора ФБ, используемого для растворения плазмидной ДНК, ммоль/л**
ВК.1 (n=5)	2	100	0 (деионизированная вода H ₂ O)
ВК.2 (n=5)	2	100	20
ВК.3 (n=5)	2	100	41
ВК.4 (n=5)	2	100	81
ВК.5 (n=5)	2	100	163 (ФСБ)
* – код группы включает название экспериментальной серии и номер группы, разделенные точкой; ** – без учета влияния на ионную силу молекул ДНК			

2.3.11.2 Определение оптимальных параметров сонопорации для эффективной доставки плазмидной ДНК

В экспериментальной серии СП определяли оптимальные условия доставки ДНК путем внутрикожной инъекции с последующим озвучиванием.

Для этого группам мышей линии BALB/c (n=3) внутрикожно вводили 50 мкг pVaxLuc в растворе ФСБ в один участок слева от основания хвоста. Непосредственно после внутрикожной инъекции на место инъекции наносили акустический гель, затем накладывали головку датчика ультразвукового генератора площадью 2 см² (оба производства Chattanooga, Guildford, Великобритания) и проводили озвучивание в импульсном режиме, на частоте 1 МГц. Варьировали длительностью пакета ультразвуковых импульсов и интенсивностью ультразвука (Таблица 6).

Граничные условия озвучивания определяли согласно литературным данным [261; 262]. Минимальную и максимальную интенсивности ультразвука определяли, исходя из технических возможностей используемого ультразвукового генератора, а также параметров ткани, и рассчитывали по формуле (3)

$$I = \frac{p^2}{2\rho v}, (3)$$

где p – величина акустического давления, Па; ρ – плотность ткани, кг/м³; v – скорость распространения ультразвуковых волн в ткани, м/с [263].

Среднюю скорость распространения ультразвуковых волн в мягких тканях принимали равной 1540 м/с [264], а плотность дермы – до 1200 кг/м³ [265]. Согласно расчетам по формуле (3), минимальная интенсивность составила 0,6 Вт/см², максимальная – около 3,7 Вт/см². Поскольку максимальное значение интенсивности ультразвука, генерируемого используемым прибором, составляло 3 Вт/см², значение максимальной рабочей интенсивности было принято за 2,4 Вт/см². В качестве среднего значения рабочей интенсивности было выбрано значение 1,2 Вт/см². Значения рабочего цикла были выбраны на основе длительности пакета ультразвуковых импульсов 1 или 2 мс и частоты подачи пакетов ультразвуковых импульсов 16 Гц и составила 2% и 3% соответственно [266]. Общее время озвучивания областей инъекции ДНК выбрано согласно литературным данным [206] и не превышало 3 секунд.

Таблица 6 – Серия экспериментов на мышах линии BALB/c, проведенных для оптимизации доставки ДНК методом сонопорации после внутрикожной инъекции плазмиды, кодирующей люциферазу (pVaxLuc) в растворе ФСБ (ионная сила 163 ммоль/л). Экспрессию гена люциферазы (Luc) после озвучивания оценивали по уровню биолуминесцентного сигнала от мест инъекции

Группа* (количество мышей в группе)	Количество сайтов инъекции	Доза pVaxLuc на инъекцию, мкг	Варьируемые параметры ультразвука	
			длительность пакета ультразвуковых импульсов, мс	интенсивность ультразвука, Вт/см ²
СП.1 (n=3)	1	50	1	0,6
СП.2 (n=3)	1	50	1	1,2
СП.3 (n=3)	1	50	1	2,4
СП.4 (n=3)	1	50	2	2,4
* – код группы включает название экспериментальной серии и номер группы, разделенные точкой				

2.3.11.3 Определение оптимальных параметров электропорации для эффективной доставки плазмидной ДНК

Экспериментальная серия ЭП-1 была проделана для определения оптимальных условий *in vivo* доставки плазмидной ДНК методом электропорации после внутрикожной инъекции. Для этого группы мышей линии BALB/c (n=4) получали однократные внутрикожные инъекции 50 мкг плазмидной ДНК pVaxLuc, растворенной в растворе ФСБ, в один участок слева от основания хвоста. Непосредственно после введения плазмидной ДНК проводили электропорацию сайтов инъекции с помощью устройства CUY21EDITII (BEX Co., Токио, Япония) с многоигольчатым электродом (1,5 × 4 мм; Celectis, Париж, Франция). Предварительно смоченный 1× раствором ФСБ электрод накладывали так, чтобы измеренное электрическое сопротивление было в диапазоне от 2,0 до 2,5 кОм. Процедуру электропорации проводили в два этапа: сначала подавали один импульс порации с постоянными параметрами, а затем сразу же подавали серии из восьми направляющих импульсов с переменными параметрами, включая амплитуду напряжения, полярность, длительность и частоту (Таблица 7). Параметры импульса порации были постоянными: напряжение 400 В, длительность импульса 50 мс, интервал между импульсом порации и направляющими импульсами 50 мс. Для обеспечения изменения в плазматической мембране выбрали длительность направляющих импульсов короче постоянной времени зарядки плазматической мембраны (от мкс до мс) [267].

Серия ЭП-2 проводилась для сравнения полученных результатов с результатами серии ВК (Таблица 5). Для этого в серии ЭП-2 инъекции ДНК и электропорацию мышей проводили режимом аналогичным для группы ЭП-1.5 (Таблица 7), но мышам вводили внутрикожно 100 мкг плазмиды pVaxLuc, растворенной в растворе ФСБ, в два сайта слева и справа от основания хвоста (как в серии ВК).

Таблица 7 – Серии экспериментов на мышах линии BALB/c, проведенных для оптимизации доставки ДНК методом электропорации после внутрикожной инъекции плазмиды, кодирующей люциферазу (pVaxLuc), в растворе ФСБ (ионная сила 163 ммоль/л). Экспрессию гена люциферазы (*Luc*) после озвучивания оценивали по уровню биoluminesцентного сигнала от мест инъекции

Группа * (количество мышей в группе)	Количество сайтов инъекции	Доза pVaxLuc на инъекцию, мкг	Параметры направляющих импульсов			
			напряжение, В	полярность, постоянная (+/+)/ переменная (+/-)	длительность импульса, мс	интервал между импульсами, мс
ЭП-1.1 (n=4)	1	50	50	+/+	50	950
ЭП-1.2 (n=4)	1	50	50	+/-	50	950
ЭП-1.3 (n=4)	1	50	50	+/-	10	20
ЭП-1.4 (n=4)	1	50	100	+/+	10	20
ЭП-1.5 (n=4)	1	50	100	+/-	10	20
ЭП-2 (n=3)	2	100	100	+/-	10	20
* – код группы включает в себя наименование экспериментальной серии и номер группы, разделенные точкой (для серии ЭП-1) или только наименование экспериментальной серии (для серии ЭП-2)						

2.3.12 ДНК-иммунизация мышей

ДНК-иммунизацию мышей проводили двумя кластерами.

Первый кластер содержал три серии экспериментов (серии ИО_ОТ_ВИЧ, ИО_Т_ОТ и ИО_Е6Е7) (Таблица 8) по индукции иммунного ответа и изучению параметров, определяющих индукцию мощного иммунного ответа (методы введения, ионная сила

раствора ФБ, используемого для растворения плазмидной ДНК, совместное или отдельное введение двух плазмид).

Серию ИО_ОТ_ВИЧ (Таблица 8) проводили с целью оценки зависимости силы антительного иммунного ответа от способа введения ДНК-антигена. Мышам вводили в один сайт у основания хвоста по 100 мкг плазмиды, кодирующей обратную транскриптазу (ОТ) ВИЧ-1 клада А рVaxRT_Ain, методами внутрикожной инъекции ДНК в ФСБ, ФБ с ионной силой 81 ммоль/л и деионизированной водой (аналогично группам ВК.5, ВК.4 и ВК.1 серии ВК, Таблица 5), а также внутрикожной инъекцией ДНК в ФСБ с последующей электропорацией в том же режиме, что и группе ЭП-1.5 серии ЭП (Таблица 7). Все ДНК-иммунизации этой серии проводились дважды с интервалом в 21 день. В качестве отрицательного контроля служила группа наивных (без введенной ДНК) мышей (группа ИО_ОТ_ВИЧ.5, Таблица 8).

Серию ИО_Т_ОТ (Таблица 8) проводили с целью оценки силы клеточного ответа, вызванного ДНК-иммунизацией плазмидой, кодирующей теломеразную обратную транскриптазу крысы (Т-ОТ) рVaxTERT, а также моделировали ситуацию сценария двух ДНК-иммуногенов при их совместном введении. ДНК-иммунизацию проводили дважды с интервалом в 21 день методом внутрикожной инъекции в два сайта у основания хвоста 20 мкг ДНК в ФСБ с последующей электропорацией в том же режиме, что и группе ЭП-1.5 серии ЭП (Таблица 7). Мыши группы ИО_Т_ОТ.1 получали в оба сайта плазмиду рVaxTERT. Мыши группы ИО_Т_ОТ.2 получали в оба сайта эквимоллярную смесь плазмид рVaxTERT и рVaxCore152opt (плазмиды, кодирующей белок нуклеокапсида вируса гепатита С (ВГС)) (по 10 мкг каждой, суммарная доза ДНК на сайт введения составляла 20 мкг). Мыши группы ИО_Т_ОТ.3 в оба сайта получали пустой вектор рVax1.

Серию ИО_Е6Е7 (Таблица 8) проводили с целью оценки иммуногенности (Т-клеточного ответа) сконструированных в ходе работы ДНК-иммуногенов Е6 или Е7 ВПЧ16 как по отдельности, так с совместными инъекциями. ДНК-иммунизацию проводили дважды с интервалом в 21 день методом внутрикожной инъекции в два сайта у основания хвоста 20 мкг ДНК в ФСБ с последующей электропорацией в том же режиме, что и группе ЭП-1.5 серии ЭП (Таблица 7). Группа мышей ИО_Е6Е7.1 получала в оба сайта плазмиду рVaxЕ6. Группа ИО_Е6Е7.1 получала в оба сайта плазмиду рVaxЕ7. Группа ИО_Е6Е7.3 получала в левый сайт плазмиду рVaxЕ6, а в правый сайт – рVaxЕ6. Группа ИО_Е6Е7.4 в оба сайта получала пустой вектор рVax1.

Таблица 8 – Серии экспериментов по индукции иммунного ответа и изучению параметров, определяющих индукцию мощного иммунного ответа

Серия/ Линия мышей	Группа (n, количество мышей в группе)	ДНК-иммуноген / сайт введения	Доза ДНК на сайт, мкг	Ионная сила раствора ФБ, используемого для растворения плазмидной ДНК, ммоль/л
ИО_ОТ_ВИЧ/ BALB/c/	ИО_ОТ_ВИЧ.1 (n=5)	pVaxRT_Ain/ слева	100	0 (H ₂ O)
	ИО_ОТ_ВИЧ.2 (n=5)	pVaxRT_Ain/ слева	100	81
	ИО_ОТ_ВИЧ.3 (n=5)	pVaxRT_Ain/ слева	100	163 (ФСБ)
	ИО_ОТ_ВИЧ.4 (n=4)	pVaxRT_Ain/ слева	100	163 (ФСБ)
	ИО_ОТ_ВИЧ.5 (n=3)	pVaxRT_Ain/ слева	0	-
ИО_Т_ОТ/ BALB/c	ИО_Т_ОТ.1 (n=5)	pVaxTERT/слева+ pVaxTERT/справа	20	163 (ФСБ)
	ИО_Т_ОТ.2 (n=5)	pVaxTERT+ pVaxCore152opt /слева+ pVaxTERT+ pVaxCore152opt /справа	20 (эквимоллярная смесь по 10 мкг каждой)	163 (ФСБ)
	ИО_Т_ОТ.3 (n=9)	pVax1/слева + pVax1/справа	20	163 (ФСБ)
ИО_E6E7/ C57BL/6	ИО_E6E7.1 (n=5)	pVaxE6/слева + pVaxE6/справа	20	163 (ФСБ)
	ИО_E6E7.2 (n=5)	pVaxE7/слева + pVaxE7/справа	20	163 (ФСБ)
	ИО_E6E7.3 (n=5)	pVaxE6/слева + pVaxE7/справа	20	163 (ФСБ)
	ИО_E6E7.4 (n=5)	pVax1/слева + pVax1/справа	20	163 (ФСБ)

Второй кластер содержал две серии экспериментов (серии ИМПЛАНТ-ТС-Т, ИМПЛАНТ-4Т1-Т) (Таблица 9) по терапевтической иммунизации разработанными в ходе

работы ДНК-вакциными иммуногенами Е6 и Е7 ВПЧ16 совместно с «челленджем» опухолевыми клетками.

Мышам серии ИМПЛАНТ-ТС-Т и ИМПЛАНТ-4Т1-Т (Таблица 9) подсаживали опухолевые клетки как описано ниже в разделе 2.3.13, затем на 3-й и 6-й дни после имплантации ДНК-иммунизировали методом внутрикожной инъекции в два сайта на 1 см выше мест введения клеток 20 мкг ДНК в ФСБ с последующей электропорацией в том же режиме, что и группе ЭП-1.5 серии ЭП (Таблица 7). Мыши серии ИМПЛАНТ-ТС-Т в оба сайта получали плазмиды pVaxE6, pVaxE7 или pVaxE6 и pVaxE7 (как в серии ИО_Е6Е7). Контрольные мыши получали в оба сайта пустой вектор pVax1 или ФСБ. Мыши серии ИМПЛАНТ-4Т1-Т получали в оба сайта плазмиду pVaxE6 или пустой вектор pVax1.

Таблица 9 – Серии терапевтической иммунизации разработанными в ходе работы ДНК-вакциными иммуногенами Е6 и Е7 ВПЧ16 совместно с «челленджем» опухолевыми клетками

Серия/ Линия мышей	Группа (количество мышей в группе)	ДНК- иммуноген (плазмида)/ сайт введения	Доза ДНК на сайт, мкг	Имплантированная клеточная линия	Количество сайтов подсадки/ доза подсаженных клеток на сайт
ИМПЛАНТ-ТС-Т / C57BL/6	ИМПЛАНТ-ТС-Т.1	pVaxE6/слева + pVaxE7/справа	20	ТС-1/luc2	2 x 5 000
	ИМПЛАНТ-ТС-Т.2	pVaxE6/слева + pVaxE6/справа	20	ТС-1/luc2	2 x 5 000
	ИМПЛАНТ-ТС-Т.3	pVaxE7/слева + pVaxE7/справа	20	ТС-1/luc2	2 x 5 000
	ИМПЛАНТ-ТС-Т.4	pVax1/слева + pVax1/справа	20	ТС-1/luc2	2 x 5 000
	ИМПЛАНТ-ТС-Т.4	- (ФСБ/слева + ФСБ/справа)	20	ТС-1/luc2	2 x 5 000
ИМПЛАНТ-4Т1-Т / BALB/c	ИМПЛАНТ-4Т1-Т.1	pVaxE6/слева + pVaxE6/справа	20	B2	1 x 10 000
	ИМПЛАНТ-4Т1-Т.2	pVax1/слева + pVax1/справа	20	B2	1 x 10 000
	ИМПЛАНТ-4Т1-Т.3	pVaxE6/слева + pVaxE6/справа	20	H6	1 x 10 000
	ИМПЛАНТ-4Т1-Т.4	pVax1/слева + pVax1/справа	20	H6	1 x 10 000

2.3.13 Имплантация опухолевых клеток мышам

Имплантацию опухолевых клеток мышам проводили несколькими сериями. Во всех сериях перед имплантацией опухолевых клеток мышам удаляли шерсть с помощью триммера с последующей обработкой депиляционным кремом (Veet, Reckitt, Канада). Суспензии клеток вводили подкожно в объеме 50 мкл бессывороточной среды RPMI-1640 с антибиотиками с помощью инсулиновых шприцев с иглой 25G. Каждая доза клеток вводилась отдельным шприцом.

Серия ИМПЛАНТ-4T1 проводилась с целью оценки туморогенного потенциала подсаженных клеток. Для этого мышам линии BALB/c имплантировали клетки 4T1luc2 или полученные в ходе работы ее субклоны, экспрессирующие E6 и E7 ВПЧ16, в количестве 1×10^4 в один сайт слева от основания хвоста.

Серии ИМПЛАНТ-ТС-Т и ИМПЛАНТ-4T1-Т проводились с целью «челленджа» опухолевыми клетками (проверки иммунного ответа, вызываемого ДНК-иммунизацией E6 и E7 ВПЧ16, на способность влиять на рост имплантированных опухолевых клеток) (Таблица 9, приведена выше в разделе 2.3.12). Для серии ИМПЛАНТ-ТС-Т мышам линии C57BL/6 имплантировали клетки ТС-1/luc2 в два сайта справа и слева от основания хвоста в количестве 5×10^3 клеток на сайт (всего 1×10^4 клеток на мышь). Для серии ИМПЛАНТ-4T1-Т мышам линии BALB/c имплантировали клетки 4T1luc2 или ее субклоны, полученные в ходе работы, экспрессирующие E6 и E7 ВПЧ16 (B2 и H6), в количестве 1×10^4 в один сайт слева от основания хвоста.

2.3.14 Мониторинг *in vivo* биолюминесцентного сигнала

Мониторинг *in vivo* биолюминесцентного сигнала/биолюминесцентный имеджинг (BLI) проводили с целью: (1) оценки эффективности доставки плазмидной ДНК, кодирующей репортер, (2) оценки иммунного ответа на иммунизацию плазмидными ДНК, кодирующими репортер, (3) оценки роста имплантируемых опухолей, экспрессирующих репортерный ген.

Во всех случаях перед мониторингом мышам внутрибрюшинно вводили свежеприготовленный раствор D-люциферина (PerkinElmer) в физиологическом растворе NaCl (0,9%) в дозе 150 мкг/кг. После 10-минутного периода инкубации, позволяющего субстрату равномерно распределиться по телу, мышей подвергали ингаляционной анестезии смесью изофлурана с кислородом как описано в разделе 2.3.10, затем переносили животных в камеру прибора для детекции биолюминесцентного сигнала, оснащенного столиком с подогревом и оборудованием для поддерживающей ингаляционной анестезии, как описано выше. Мышей разделяли светонепроницаемыми пластиковыми перегородками с целью

снижения уровня неспецифического фонового сигнала. После проведения измерений мышей возвращали в клетку на термоизолирующую подложку, укладывая их рядом друг с другом.

В сериях ЭП-1, СП, ИМПЛАНТ-ТС-Т, ИМПЛАНТ-4Т1 и ИМПЛАНТ-4Т1-Т, мониторинг биолуминесценции осуществляли с помощью прибора IVIS (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США), а в сериях ВК и ЭП-2 – с помощью прибора LumoTrace® Fluor (Abisense, Долгопрудный, Московская область, Россия).

Оба устройства Perkin Elmer и Abisense оснащены ПЗС-матрицами (ПЗС – прибор с зарядовой связью), преобразующими фотоны в электрический заряд, и 16-битными аналого-цифровыми преобразователями (АЦП) для преобразования аналогового сигнала с ПЗС-матрицы в цифровой сигнал (называемый отсчётами АЦП, или просто «отсчётами»). Цифровой выходной сигнал («отсчёты») каждого пикселя пропорционален количеству фотонов, падающих на него от источника света.

Данные биолуминесценции, полученные с помощью прибора IVIS, обрабатывали с помощью программного обеспечения Living Image 4.5 Software® (Perkin Elmer, США), преобразующее цифровые «отсчёты» в пределах области интереса (ROI) в значение, равное общему потоку (фотонов/сек) = яркости (фотонов/сек/см²/стерадиан) на каждом пикселе, суммированному или интегрированному по площади области интереса (см²) × 4π [268]. Данные биолуминесценции, полученные с помощью прибора LumoTrace, обрабатывали с помощью программного обеспечения Icy (Institut Pasteur и France-BioImaging, Париж, Франция), работающим с выходными данными в виде отсчётов АЦП без математической обработки. Значения сигналов, измеренные в области ROI на изображениях, полученных с помощью устройства LumoTrace, представляют собой значения всех цифровых сигналов от каждого пикселя, суммированные или интегрированные по области интереса, или «общее количество отсчётов». Данные для каждого ROI представлялись в виде общего потока (для изображений, полученных на приборе IVIS) или общего количества отсчётов (для изображений, полученных на приборе IVIS LumoTrace). Представление результатов в виде % от максимальных значений, наблюдаемых на 2-й день каждым из методов, позволяло сравнивать результаты, полученные на обоих приборах.

2.3.15 Оценка роста опухолей

Оценку роста опухолей, экспрессирующих репортерный ген люциферазы светлячка (Luc), проводили методом визуализации *in vivo* биолуминесцентного сигнала с помощью прибора IVIS (как описано в разделе 2.3.14) и по морфометрическим измерениям. Уровень биолуминесцентного сигнала, излучаемого с ROI от места присадки опухолей, количественно

оценивали как общий поток фотонов в секунду (фотонов/с). Данные были обработаны с использованием программного обеспечения LivingImage® software version 4.5.

С момента формирования пальпируемых опухолей и далее до конечной точки эксперимента с помощью штангенциркуля измеряли длину (х) и ширину (у) опухолей с последующим вычислением объема (V , мм³) по стандартной формуле для оценки объема ксенографтов $V = xy^2/2$ [269]. Эксперименты продолжались до тех пор, пока объем опухоли первой мыши в серии экспериментов не достигал объема 1 см³, что было установлено в качестве конечной точки эксперимента.

2.3.16 Этаназия и мониторинг миграции опухолевых клеток в дистальные органы мышей *ex vivo*

В конечной точке эксперимента мышам внутрибрюшинно вводили свежеприготовленный раствор D-люциферина в физиологическом растворе NaCl (0,9%) в дозе 150мг/кг веса. Десять минут спустя мышей умерщвляли методом транслокации шейных позвонков, предварительно проводили анестезию животных в камере с газовой смесью, содержащей 4% изофлурана. Шерсть и кожу животных обрабатывали 70% этанолом, после чего проводили вскрытие. Опухоли и органы (селезенку, печень, легкие) иссекали хирургическими ножницами. Органы и опухоли помещали в отдельные лунки черных 24-луночных планшетов с прозрачным дном, содержащих ФСБ и измеряли биолуминесцентный сигнал от органов на приборе IVIS (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США). Для исключения неспецифического фонового сигнала от засветки съемку органов/опухолей с сигналом, превышающим 10^7 фотонов/с осуществляли индивидуально. Уровень биолуминесцентного сигнала, излучаемого от областей ROI органов, количественно оценивали как общий поток фотонов в секунду (фотонов/с). Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения LivingImage® software version 4.5.

Фоновый уровень биолуминесцентного сигнала определяли от областей органов мышей с введенной внутрибрюшинно люциферазой.

В условиях *in vitro* данный метод обнаруживает 3–5 клеток, экспрессирующих люциферазу, с величиной общего потока фотонов от одной клетки до 6500 фотонов [<http://www.caliperls.com/assets/014/7158.pdf>]. В условиях *in vivo* из-за снижения уровня экспрессии Luc [270; 271] и рассеяния величина эмиссии фотонов может уменьшаться до четырех раз. Таким образом, при прохождении через ткань величина излучения от одной клетки, экспрессирующей Luc, может снижаться до 1500–2000 фотонов.

Органы после съемки биолюминесцентного сигнала помещали в индивидуальные пробирки, содержащие 10% забуференный формалин, для фиксации и последующего гистологического или ПЦР-анализа.

2.3.17 Гистологическая оценка органов и опухолей мышей

Постфиксационную обработку опухолей и органов проводили с использованием нейтрального забуференного 10% формалина (Sigma-Aldrich, США) в течение 2 ч с последующей дегидратацией этиловыми спиртами концентрации от 40% до 96% с последующим обезвоживанием тканей ксилолом и заключением в парафин (Dia Path, Martinengo, Bergamo, Италия) (блоки FFPE) в соответствии со стандартными протоколами [272]. После получения блоки FFPE секционировали на ротационном микротоме (SLEE medical GmbH, Nieder-Olm, Германия) на срезы толщиной 5 мкм. Срезы собирали и помещали на поверхность воды в водяной бане с помощью пинцета, затем извлекали из водяной бани с помощью предметных стекол, подсушивали на воздухе и хранили в вертикальном положении на решетке для предметных стекол. Далее предметные стекла со срезами сушили в духовом шкафу. Высушенные срезы окрашивали раствором гематоксилина Майера, затем промывали окрашивали раствором Эозина. После окрашивания препараты промывали 96% этанолом, далее очищали ксилолом и покрывали срезы покровными стеклами.

Окрашенные гематоксилином и эозином слайды сканировали на цифровом гистологическом сканере Aperio CS2 (Leica, Германия). Размер и подсчет метастазов и областей инфильтрации иммунными клетками оценивали с помощью программы ImageScore (Leica, Германия). Морфологическое обнаружение метастазов основывалось на стандартных параметрах, таких как цитологическая атипия, размер ядер и митотическая активность. Также подсчитывалось количество воспалительных клеток (нейтрофилов) вокруг метастазов, а также скопления нейтрофилов в отсутствии видимого метастаза. Количество метастазов и/или иммунных инфильтратов подсчитывали в 10-ти случайных полях (увеличение 100x) или по всему слайду.

2.3.18 Получение сыворотки крови иммунизированных мышей

В серии ИО_ОТ_ВИЧ (Таблица 8) мышей подвергали эвтаназии декапитацией. После декапитации собирали кровь в 1,5 мл пробирки, перемешивали переворачиванием 2-3 раза и инкубировали при комнатной температуре в течение 40 минут. Далее центрифугировали при комнатной температуре 600×g в течение 10 минут. Сыворотку переносили в чистые пробирки и замораживали при температуре минус 80 °C до момента проведения анализа.

2.3.19 Иммуноферментный анализ сывороток иммунизированных мышей

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили на 96-луночных планшетах ИФА с плоским дном (MaxiSorb, Nunc A/C, Роскилле, Дания). На планшеты сорбировали рекомбинантный белок обратной транскриптазы ВИЧ-1 (RT-A) в концентрации 0,3 мкг/мл и инкубировали при 9°C в течение ночи. Несорбированный белок удаляли путем шестикратной промывки планшета ФСБ с добавлением 0,05% Твин 20. Промытые планшеты высушивали бумажным полотенцем. Далее готовили серийные четырехкратные разведения сывороток, начиная с 1:200 в буфере SCAN (2% нормальной сыворотки козы, 0,5% БСА, 0,05% Твин 20). Серийные разведения инкубировали в предсорбированных планшетах при 9°C в течение ночи. После инкубации планшеты промывали пять раз ФСБ, содержащим 0,05% Tween 20, и инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °C с антителами к суммарным IgG, конъюгированными с HRP (ab6789, Sigma, США), разведенными в буфере SCAN. После этого планшеты промывали, как описано выше, высушивали многократным постукиванием по бумажному полотенцу и инкубировали при комнатной температуре со 100 мкл свежеприготовленного субстрата 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в темноте до появления колориметрической реакции (около 10 мин). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,1 М серной кислоты. Оптическую плотность (ОП) измеряли на двух длинах волн 450 и 620 нм с помощью спектрофотометра (Multiskan, Thermo Fisher, США). Значения ОП представляли в виде ОП450–ОП620 (ОП450–620). Конечный титр разведения устанавливали по разведению сыворотки, при котором ОП450–620 в лунке с гипериммунной мышшиной сывороткой становилась равной или ниже среднего значения ОП450–620 3–5ти контрольных мышшиных сывороток, оцененных на том же планшете + 3СО или значение ОП $\leq 0,1$, большее из выбранных значений. Окончательные титры антител рассчитывали по кривым титрования, аппроксимированным нелинейной регрессионной моделью – кривой 4PL.

2.3.20 Проточная цитофлуориметрия с внутриклеточным окрашиванием цитокинов

Спленоциты мышей, полученные из экспериментов серий ИО_Т_ОТ и ИО_Е6Е7 (Таблица 8) гомогенизировали в клеточном фильтре с размером пор 70 мкл (Nunc, Германия). Полученную клеточную суспензию разводили полной питательной средой для клеток RPMI-1640 и центрифугировали при $390 \times g$ в течение 10 мин при 4°C. Для удаления эритроцитов к осадку добавляли 4 мл буфера для лизиса эритроцитов (буфер АСК) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Для остановки реакции к клеточной суспензии добавляли 10 мл ФСБ. Клеточную суспензию повторно центрифугировали в течение 10 мин

при $390 \times g$ при 4°C . Осадок ресуспендировали в 5 мл среды RPMI, содержащей 50% фетальной сыворотки и до 20% диметилсульфоксида с последующей заморозкой при минус 70°C .

Размороженные спленоциты стимулировали пептидами из состава белков Т-ОТ, Е6 и Е7, представленных в Таблице 3 в концентрации 10 мкг/мл для индивидуальных пептидов или 10 мкг/мл для пулов пептидов, а также РМА в концентрации 50 нг/мл, иономицином в концентрации 1 мкг/мл или только средой RPMI-1640. Стимулированные и нестимулированные спленоциты подвергались окрашиванию смесью поверхностных маркеров: антителами к рецепторам ЦТЛ (CD8a), Т-хелперов (CD4) и всех Т-клеток (CD3). После окрашивания клетки фиксировали и пермеабелизовывали в течение 20 мин в 100 мкл раствора Cytofix/Cytoperm с последующей промывкой буфером Perm/Wash и внутриклеточным окрашиванием при 4°C с использованием антител, специфичных к мышинным цитокинам: ИФН- γ , ИЛ-2 и ФНО- α (все антитела производства BD Biosciences, США).

Полученные образцы анализировали на проточном цитометре FACS Aria II (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences, США). Данные экспортировали в виде файлов FCS3.0 и анализировали в программном обеспечении FlowJo (Tree Star Inc, США). Доли CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих цитокины ИФН- γ /ИЛ-2/ФНО- α после стимуляции *in vitro* пептидами из состава Таблицы 3, определяли по сравнению с нестимулированными контролями.

2.3.21 Статистический анализ

Статистические расчёты выполняли с использованием программ Microsoft Excel, GraphPad Prism версии 9.0.2 (GraphPad Software, США) и Statistica 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., США). Для непараметрических данных сравнение в группах проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса с критерием множественных сравнений Данна, попарное сравнение проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Параметрические данные сравнивали t-тестом с применением критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Множественные сравнения выполняли с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием Тьюки. Анализ категориальных данных проводили с использованием критерия Хи-квадрат и критерия Фишера. Для выявления корреляций использовали критерий ранговой корреляции Спирмана. Значения $p < 0,05$ считали значимыми.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Разработка иммуногенов, входящих в основу терапевтической ДНК-вакцины против вируса папилломы человека 16 типа

3.1.1 Актуализация аминокислотных последовательностей белков E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа для конструирования ДНК-иммуногенов

Анализ литературных данных показал, что большинство терапевтических вакцинных кандидатов, имеющих положительные эффекты в доклинических и клинических испытаниях, основаны на белках E6 и E7 ВПЧ ВКР, в основном 16 типа [12]. Известно, что для ВПЧ16 существуют популяционные различия, имеющие четкую региональную представленность и отличающиеся трансформирующей способностью [18; 273; 274]. Циркулирующие в РФ варианты ВПЧ16 в основном относятся к субгенотипу А [21]. В силу этого в основу новых вакцинных кандидатов против ВПЧ16, предполагаемых к использованию на территории РФ, было решено положить АК-последовательности белков E6 и E7 ВПЧ16 субгенотипа А.

К моменту начала настоящей работы в международной базе данных GenBank NCBI содержалось мало данных секвенирования ВПЧ16, полученных из образцов биоматериала, собранных от пациентов из РФ. Поэтому выгружали все имеющиеся подробно аннотированные (дата сбора биоматериала, страна происхождения, диагноз) последовательности E6 и E7, полученные из биоматериала пациентов РФ (европейской ее части) и ряда Европейских стран (Швеция, Польша, Греция, Нидерланды, Люксембург, Германия, Латвия, Португалия, Италия, Словения, Хорватия) (Таблица 4). Самые ранние последовательности E6 и E7 были аннотированы 2007 годом сбора. Поскольку ВПЧ – медленно-эволюционирующий вирус со скоростью накопления АК-замен в участках генома около 10^{-4} – 10^{-3} замен на сайт в год [16; 26], было решено включать в анализ последовательности, аннотированные датой сбора за последние 16 лет (2007–2023 гг) [275]. Всего было выгружено 379 нуклеотидных последовательностей E6 и 331 нуклеотидная последовательность E7 ВПЧ16 (Таблица 4).

3.1.2 Анализ точечных аминокислотных замен в белках E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

Выгруженные нуклеотидные последовательности E6 и E7 переводились в аминокислотные в программе MEGA11 (США) с последующим сравнением с референсными последовательностями белков E6 и E7 ВПЧ16: NP_041325.1 (GeneID: 1489078) и NP_041326.1

(GeneID: 1489079) соответственно [275]. Из 158 а. о. белка E6, 128 а. о. оказались консервативными во всех анализируемых последовательностях, в тридцати положениях наблюдались точечные АК-замены с разной частотой встречаемости замен: в 25-ти положениях их частота составляла менее 1%, в пяти положениях (17, 21, 32, 85, 90) – от 1 до 59% (Рисунок 10А, Таблица 10). Преобладающей АК-заменой в белке E6 ВПЧ16 субгенотипа А являлась замена L90V, как отмечалось ранее в ряде публикаций [274; 276]. Белок E7 оказался более консервативным: точечные АК-замены наблюдались в шести положениях, из которых наиболее вариабельным было только одно (29) (частота замены 3,62 %). В остальных пяти положениях замены встречались с частотой менее 1% (Рисунок 10Б).

Вариации внутри генов *E6* и *E7*, приводящие к аминокислотным заменам, могут влиять на биологические и/или иммуногенные свойства кодируемых белков [277]. Действительно, несколько структурно-функциональных доменов белка E6 содержали вариации. В области сигнала ядерной локализации NLS1 наблюдалась одна АК-замена в положении 15 и тридцать шесть замен в положении 17 (Рисунок 10А). В области сигнала ядерной локализации NLS3 наблюдалась одна АК-замена в положении 131 (Рисунок 10А). В области цинк-связывающего мотива (Cys-X-X-Cys) первого цинкового пальца (Zinc finger 1) – четыре замены в положении 71 (Рисунок 10А). В области ZF1 – по одной замене в положениях 46, 58, 59, 60 (Рисунок 10А). Большинство остальных положений, в которых наблюдались точечные АК-замены, располагались вне структурно-функциональных доменов, но в областях связывания комплекса E6AP/p53, в частности, здесь располагались наиболее часто встречаемые АК-замены в положениях 21, 32, 85 и 90 (Рисунок 10А).

В белке E7 некоторые положения структурно-функциональных доменов (консервативных регионов (CR) – CR1, CR2, CR3) также оказались вариабельными. В области CR1 наблюдалась одна замена в положении 4 (Рисунок 10Б). В области CR2 – одна замена в положении 20 и двенадцать замен в положении 29, причем замена в положении 29 затрагивала центральный мотив QLN между мотивами связывания pRb и сайтом фосфорилирования протеинкиназы СКII (Рисунок 10Б). В области CR3 наблюдалось две замены в положениях 51 и 63, причем замена в положении 63 локализовалась в области участка цинк-связывающего пальца (Рисунок 10Б).

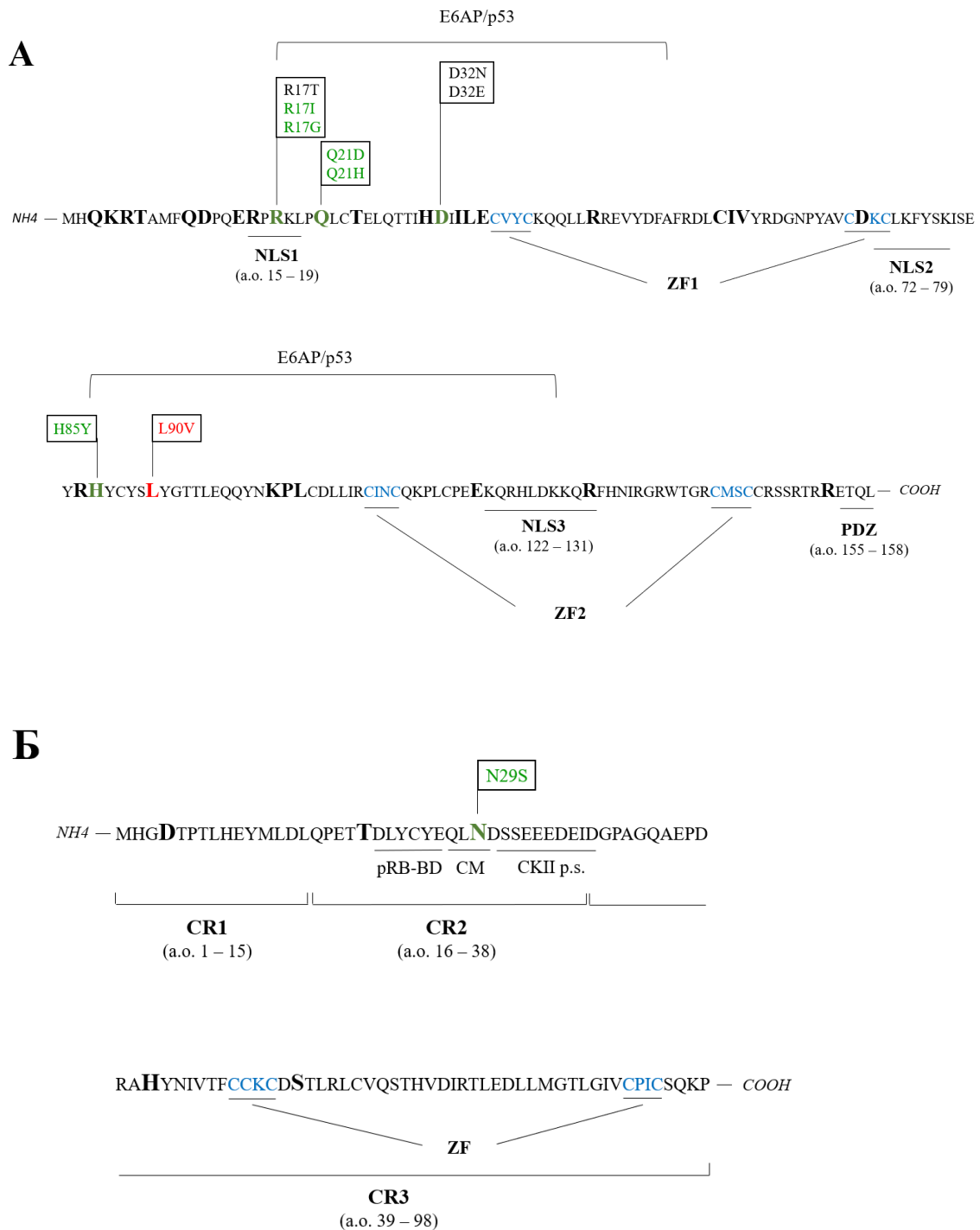
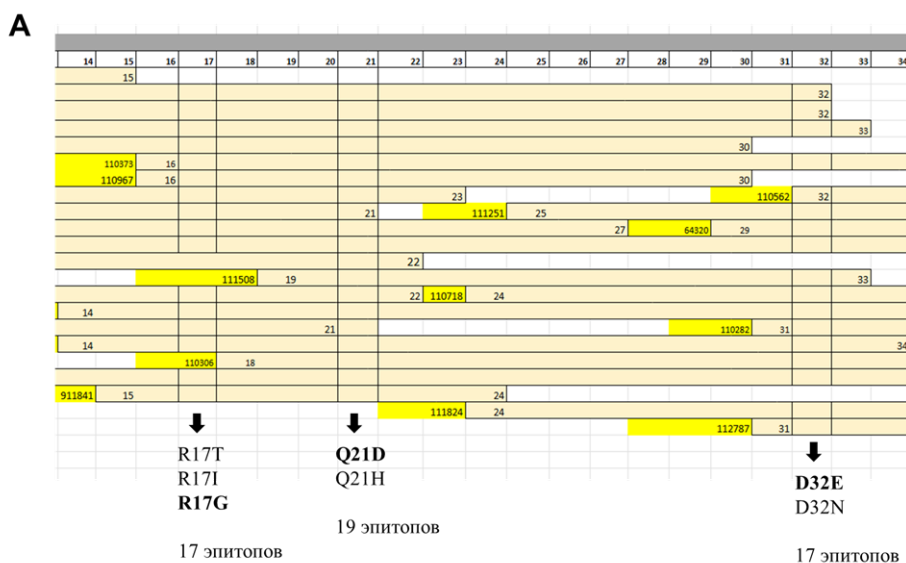


Рисунок 10 – Доменная структура белков E6 (А) и E7 (Б) ВПЧ16 и идентифицированные АК-замены в европейской популяции. (А) Доменная структура белка E6 (158 а. о.). Обозначенные структурные элементы: NLS1-3 – области сигналов ядерной локализации, PDZ – мотив связывания PDZ-белков, ZF1, 2 – области цинковых пальцев (цинк-связывающие мотивы (Cys-X-X-Cys), образующие два цинк-связывающих пальца выделены синим шрифтом). Верхней скобкой обозначены предполагаемые области связывания комплекса E6AP/p53. (Б) – Доменная структура белка E7 (98 а. о.). Консервативные регионы (CR)/домены обозначены как CR1, CR2 и CR3. Цинк-связывающий мотив (Cys-X-X-Cys), образующий цинк-связывающий палец выделен синим шрифтом. Область связывания pRb обозначена как pRb-BD, сайт фосфорилирования протеинкиназы CKII обозначен как CKII p.s., центральный мотив, между сайтами pRD-BD и CKII p.s. обозначен как CM. Все встречающиеся АК-замены в белках E6 и E7 ВПЧ16 выделены жирным увеличенным шрифтом. Частоты АК-замен в

определенных положениях маркированы цветом: положения с частотой АК-замен менее 1% выделены черным цветом, положения с частотой АК-замен от 1 до 50% - зеленым, положения с частотой АК-замен более 50% – красным. Над положениями, в которых АК-замены выявляются наиболее часто в рамках указаны варианты АК-замен (вариант замены, встречающийся менее 1% обозначен черным шрифтом; от 1 до 50% - зеленым; более 50% - красным)

Вариации внутри генов *E6* и *E7*, приводящие к изменениям аминокислот, могут изменять как функциональные (биологические), так и иммуногенные свойства кодируемых белков [277]. АК-замены в области эпитопов могут нарушать их распознавание антителами и иммунными клетками, приводящее к уходу от иммунного ответа и потере контроля за репликацией вируса. Ввиду этого было выполнено картирование Т- и В-эпитопов белков *E6* и *E7*, выгруженных из международной базы данных открытого доступа IEDB Analysis Resource. Пять положений в белке *E6*, наиболее часто затрагиваемые АК-заменами, локализовались в большом количестве эпитопов: АК-замены в положении 17 затрагивали 17 эпитопов, в положении 21 — 19 эпитопов, в положении 32 — 17 эпитопов (Рисунок 11А), в положении 85 — 18 эпитопов, в положении 90 — 11 эпитопов (Рисунок 11Б). Таким образом, часто встречаемые замены наблюдались в участках белка, находящихся под давлением иммунного ответа, в основном вне структурно-функциональных доменов, определяющих функции белка, но в участках связывания *E6* с p53.

Наиболее часто встречаемая АК-замена в белке *E7* N29S затрагивала 26 эпитопов (Рисунок 11В). В отличие от *E6*, данная замена наблюдалась как в участках локализации эпитопов, так и в структурно-функциональном домене.



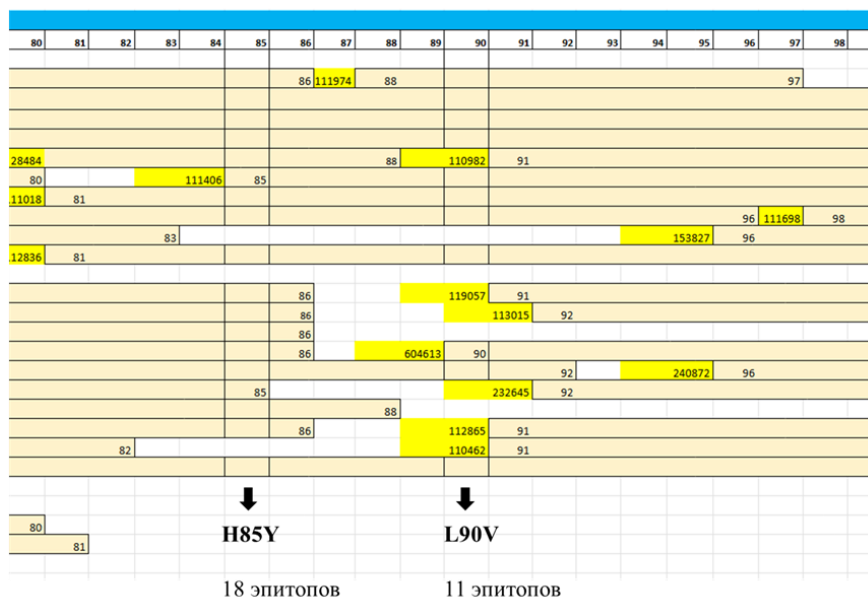
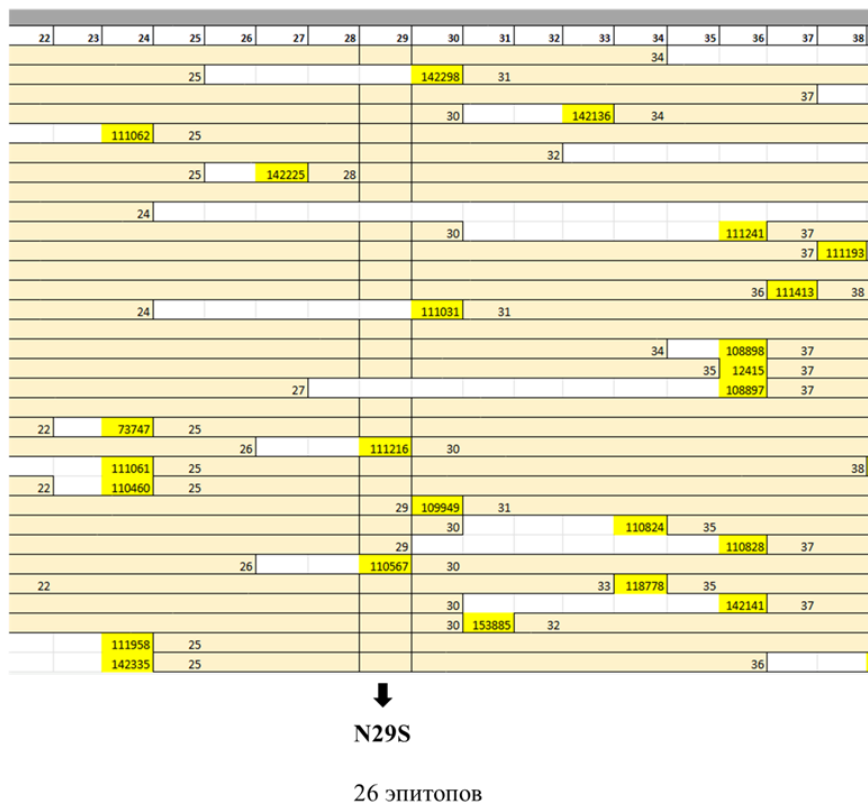
Б**В**

Рисунок 11 – Фрагменты карты эпитопов белков Е6 (**А, Б**) и Е7 (**В**) ВПЧ16. (**А**) Эпитопы белка Е6, локализованные между а. о. 14–34. (**Б**) Эпитопы белка Е6, локализованные между а. о. 80–89. (**В**) Эпитопы белка Е7, локализованные между а. о. 22–38. Коды внутри ячеек желтого цвета обозначают идентификационные номера (ID) эпитопов в базе данных IEDB. Светло-жёлтым цветом обозначена локализация эпитопа. Цифры внутри светло-жёлтых ячеек указывают положение первого и последнего а. о. эпитопа. Наиболее вариабельные позиции белков Е6 и Е7, а также общее количество эпитопов, затронутых АК-заменами в указанных позициях, подписаны снизу под черной стрелкой

Таким образом, часто встречаемые замены в белке Е6 наблюдались в участках множества эпитопов, под давлением иммунного ответа, в основном вне структурно-функциональных доменов, определяющих функции белка, но в участках связывания Е6 с р53. Часто встречаемая замена в белке Е7 наблюдалась не только в структурно-функциональном домене, но и в участках множества эпитопов.

Решение о включении/исключении того или иного доминантного варианта аминокислоты в переменных положениях белков Е6 и Е7 в состав соответствующего иммуногена основывалось на следующих положениях:

- доминантный вариант аминокислоты в этом положении не должен быть ассоциирован с тяжестью заболевания;
- доминантный вариант аминокислоты в этом положении должен быть распознаваем иммунной системой в популяции.

Выбор вариантов R17, Q21, H85 для Е6 и N29 для Е7 был однозначен в силу их доминирования в популяции, а также ассоциации других аминокислотных вариантов в этих положениях с патогенезом (Таблица 10). В положении 90 белка Е6 выбор был сделан в пользу лейцина, поскольку замена на валин ассоциирована с прогрессированием заболевания и может нарушать распознавание соответствующих эпитопов, содержащих данную замену, цитотоксическими Т-клетками [225; 278].

Таблица 10 – Частоты встречаемости АК-замен белков E6 и E7 ВПЧ16 в циркулирующих на территории европейской части РФ и ряда Европейских стран изолятов ВПЧ16. Таблица не включает позиции, в которых АК-замены встречаются менее 1%. Приведены варианты АК-замен, их число (n), частота встречаемости (%), принадлежность к структурно-функциональному домену соответствующего белка и ассоциация с патогенезом

Белок	Позиция АК	АК-замена	Частота встречаемости, n (%)	Принадлежность к структурно-функциональному домену белка, изменение его функции	Ассоциация с тяжестью заболевания
E6	17	T	3 (0,77%)	Область NLS1. Повышает аффинность связывания E6 с p53 [279]	РШМ [280]
	17	I	11 (2,82%)	Область NLS1. Нарушает образование комплекса E6/E6AP [281], снижает аффинность связывания E6 с p53 и снижает скорость деградации p53 [282]	Данных нет
	17	G	23 (5,90%)	Область NLS1. Нарушает ядерную локализацию белка E6 (в т.ч. усеченных форм), приводит к его дисфункции [63]; дестабилизирует комплекс E6/E6AP/p53 [281]	Плоскоклеточный рак языка [283]
	21	H	8 (2,05%)	Вне областей структурно-функциональных доменов, но вблизи области связывания E6-E6AP. Нарушает образование комплекса E6/E6AP, дестабилизирует E6/E6AP/p53 комплекс; ограничивает связывание и деградацию p53 [281]	Данных нет
	21	D	17 (4,36%)	Вне областей структурно-функциональных доменов. Повышает аффинность связывания E6 с p53 [279]; стабилизирует комплекс E6/E6AP/p53 [281]	Данных нет

Продолжение Таблицы 10

Белок	Позиция АК	АК-замена	Частота встречаемости, n (%)	Принадлежность к структурно-функциональному домену белка, изменение его функции	Ассоциация с тяжестью заболевания
Е6	32	Е	3 (0,77%)	Вне областей структурно-функциональных доменов, в центре комплекса Е6/Е6АР/р53. Увеличивает скорость деградации р53 [284]	РШМ [278], дисплазия шейки матки [285]
	32	N	1 (0,26%)	Вне областей структурно-функциональных доменов, в центре комплекса Е6/Е6АР/р53 [284].	Данных нет
	85	Y	26 (6,67%)	Вне областей структурно-функциональных доменов, вблизи области связывания Е6-Е6АР. Увеличивает скорость деградации р53 [284]	Дисплазия шейки матки [285; 286]
	90	V	229 (58,72%)	Вне областей структурно-функциональных доменов, вблизи области связывания Е6-Е6АР. Нарушает аффинность связывания Е6 с другими клеточными белками, снижает уровень р53 в ВПЧ-инфицированных клетках [287]	Дисплазия шейки матки, РШМ [278; 288; 289], рак анальной области [273] и ротоглотки [276]
Е7	29	S	12 (3,62%)	Центральный мотив (СМ) домена CR2 [290]. Изменяет аффинность связывания белка Е7 с рRb [291]	Дисплазия шейки матки, РШМ [288; 289; 292]

Также представляли интерес присутствующие региональные различия изолятов ВПЧ16, циркулирующих в Европе. Полученные аминокислотные последовательности были объединены по географическому признаку в четыре группы: Южная Европа (Италия, Хорватия, Словения, Греция. Всего $n=96$), Западная Европа (Нидерланды, Люксембург. Всего $n=167$), Балтийский регион (Германия, Польша, Швеция, Латвия. Всего $n=56$) и европейская часть РФ ($n=60$). Наиболее распространенной АК-заменой в белке Е6 для всех четырех регионов являлась L90V (Рисунок 12А). В Балтийском регионе частота данной замены была ниже ($p=0,08$), по сравнению с другими регионами (Рисунок 12Б). В странах Южной и Западной Европы также часто встречались АК-замены в положениях 17, 21 и 85. В обоих регионах в положении 17 встречались варианты R17I и R17G, вариант R17T встречался только в Южной Европе (Рисунок 12А). В положении 21 в обоих регионах встречались оба варианта замен Q21H и Q21D (Рисунок 12А). По сравнению с Южной и Западной Европой, в Балтийском регионе и европейской части РФ кроме АК-замены L90V встречались замены только в положении 17 (Рисунок 12А). Причем в Балтийском регионе встречались варианты замен R17T и R17G, в европейской части РФ – только один вариант R17G (Рисунок 12А).

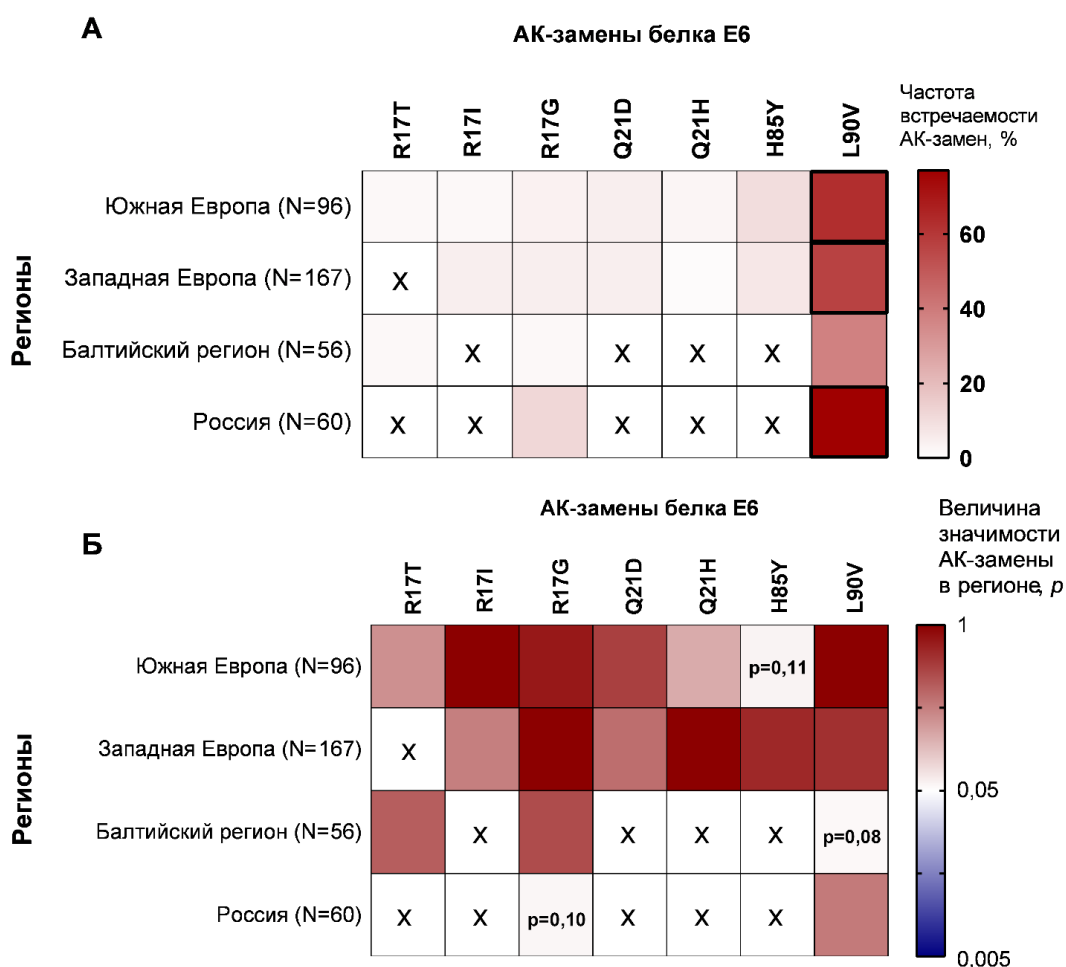


Рисунок 12 – Распространенность АК-замен в белке Е6 ВПЧ16 в четырех географических регионах Европы: Южной Европе, Западной Европе, Балтийском регионе и европейской части РФ. (А) Тепловая карта встречаемости АК-замен в белке Е6 в четырех географических

регионах Европы. Цветовая шкала справа отражает частоту встречаемости замены для региона; обведены ячейки с частотой встречаемости >50%. (Б) Тепловая карта значимости АК-замен в белке Е6 для региона при попарном сравнении с частотой встречаемости данной замены в общей популяции. Цветовая шкала справа отражает величину значимости, *p*. Сравнения проводили с использованием критерия Фишера. Отметка “х” на панелях А и Б означает отсутствие АК-замены в регионе, для которого сравнение не проводили [275]

В белке Е7 регионального разделения по частоте встречаемости замен в белке Е7 не было: по одной замене N29S встречалось в Южной Европе и европейской части РФ, и 10 замен встречалось в Западной Европе. В Балтийском регионе АК-замены N29S выявлено не было.

Во всех регионах АК-замена L90V в белке Е6 была представлена в основном в виде единичной замены (в более 50% случаев в Южной и Западной Европе, а также европейской части РФ и более 35% случаев в Балтийском регионе) (Таблица 11). В Южной Европе данная замена входила в состав сочетанных двойных, тройных и четверных замен, в Западной Европе – в состав двойных и тройных замен, в Балтийском регионе и европейской части РФ – в состав двойных замен (Таблица 11). Единичные АК-замены R17G встречались только в образцах Западной Европы, Балтийского региона и европейской части РФ. Другие варианты замен в положении 17, а также варианты замен в положении 21 и замена в положении 85 в белке Е6 встречались только в составе сочетанных замен (Таблица 11).

Таблица 11 – Распределение единичных и сочетанных АК-замен в белке Е6 ВПЧ16 по четырем географическим регионам Европы: Южной Европе, Западной Европе, Балтийском регионе и европейской части РФ. Представлено количество вариантов замен и частота встречаемости в каждом регионе

Регион (n – количество образцов)	Единичные и сочетанные замены в регионе (N – количество; % - частота встречаемости)			
	Единичные	Двойные	Тройные	Четверные
Южная Европа (n=96)	L90V (N=51; 53,1%)	– R17G/L90V (N=4; 4,2 %); – Q21D/H85Y (N=1; 1,0%); – H85Y/L90V (N=1; 1,0%)	– R17T/Q21D/H85Y (N=2; 2,1 %); – R17I/Q21D/H85Y (N=2; 2,01 %); – Q21H/H85Y/L90V (N=3; 3,1 %)	R17G/Q21D/H85Y/ L90V (N=1; 1,0%)

Продолжение Таблицы 11

Регион (n – количество образцов)	Единичные и сочетанные замены в регионе (N – количество; % - частота встречаемости)			
	Единичные	Двойные	Тройные	Четверные
Западная Европа (n=167)	– R17G (N=1; 0,6 %) – L90V (N=85; 50,90 %)	– R17G/L90V (N=8; 4,8 %); – Q21D/H85Y (N=1; 0,6 %)	– R17I/Q21D/H85Y (N=8; 4,8%); – Q21H/H85Y/L90V (N=2; 1,2%)	
Балтийский регион (n=56)	– R17G (N=1; 1,8 %); – L90V (N=20; 35,7%)	R17T/L90V (N=1; 1,8%)		
европейская часть РФ (n=60)	– R17G (N=1; 1,67%); – L90V (N=40; 66,7 %)	R17G/L90V (N=6; 0,1 %)		

3.1.3 Дизайн ДНК-иммуногенов

При разработке ДНК-иммуногенов на основе Е6 и Е7 ВПЧ16 использовали подход синтетического консенсуса. Неоднократно было показано, что этот подход оптимален для конструирования противомикробных/противовирусных ДНК-вакцин [293–295].

Исходя из этих соображений нами были созданы консенсусные последовательности белков Е6 и Е7 ВПЧ16 в результате множественного выравнивания полученных аминокислотных последовательностей Е6 и Е7 ВПЧ16 стран Европы и европейской части РФ по референсным последовательностям Е6 (NP_041325.1, GeneID: 1489078) и Е7 (NP_041326.1, GeneID: 1489079), соответственно (Рисунок 13). Консенсус формировался на основе АК-вариантов, представляющих более 50% в популяции [296]. Консервативность Е6 во всех положениях а.о., кроме положения 90, и Е7 составляла более 50%.

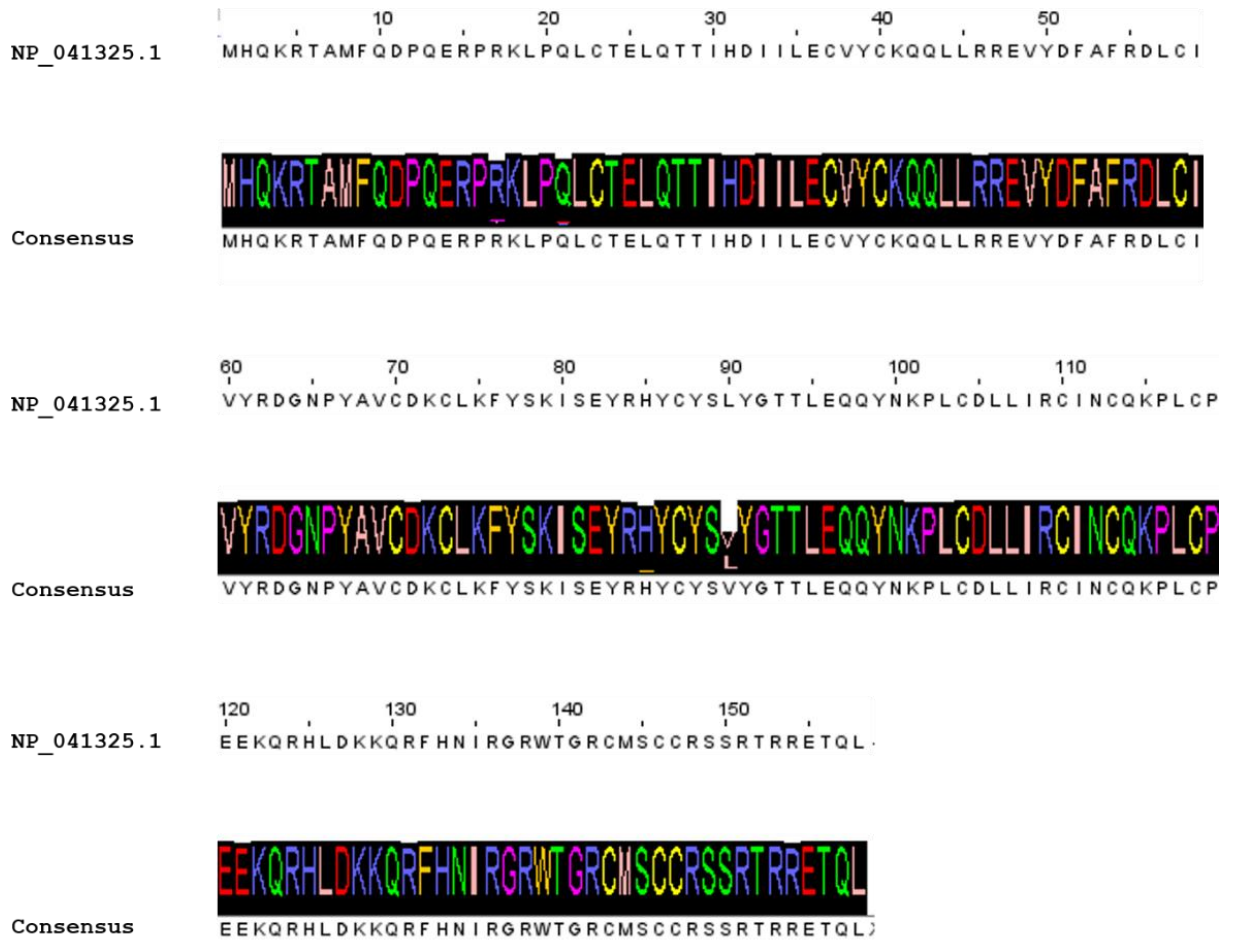
A**Б**

Рисунок 13 – Консенсусные аминокислотные последовательности белков Е6 (А) и Е7 (Б) ВПЧ16 субгенотипа А, полученные в результате множественного выравнивания 379 аминокислотных последовательностей белка Е6 и 331 аминокислотной последовательности белка Е7 по референсным последовательностям Е6 (NP_041325.1, GeneID: 1489078) и Е7 (NP_041326.1, GeneID: 1489079) ВПЧ16

Выбор консенсуса E6 осложнялся лишь одной заменой – L90V. Несмотря на то, что данная АК-замена была распространена в европейской популяции и в особенности в европейской части РФ, в т. ч. являлась актуальной на сегодняшний день, валин в положении 90 опасно было включать в состав иммуногена E6, поскольку замена L90V ассоциировалась с повышенной канцерогенностью белка E6. Таким образом, для дизайна E6 ДНК иммуногена было решено использовать референсную последовательность E6. Консенсусная последовательность E7 для европейской популяции совпадала с референсной последовательностью белка E7. Поэтому для дизайна E7 ДНК иммуногена также было решено использовать референсную последовательность E7.

Использование «нативных» референсных последовательностей белков E6 и E7 в качестве иммуногенов невозможно, в силу их трансформирующей способности. С целью выполнения требований безопасности белков E6 и E7, в гены, кодирующие консенсусные белки E6 и E7 ВПЧ16, были введены точечные мутации, приводящие к АК-заменам: в р53-связывающем сайте E6 (C70G и I135T) и рRb-связывающем сайте для E7 (C24G и E26G), как это было описано ранее [253]. Последовательности, кодирующие инактивированные белки, оптимизировали для экспрессии в клетках млекопитающих. В частности, выбирали часто используемые кодоны и оптимизировали структуру иРНК на предмет отсутствия шпилек. Для обеспечения экспрессии генов в широком спектре тканей (эпителиальных, мышечных, клетках иммунной системы), в настоящем исследовании нами был выбран универсальный промотор CMV [297]. Синтетические последовательности, кодирующие инактивированные E6 и E7 ВПЧ16, клонировали под контроль Immediate Early CMV (IE CMV) промотора в составе вектора pVax1, рекомендованного для ДНК-иммунизации pVax1 [298]. В результате были получены плазмиды pVaxE6 (ДНК E6) и pVaxE7 (ДНК E7) (Рисунок 6). Наличие вставки подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

3.1.4 Оценка экспрессионной активности ДНК-иммуногенов, кодирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

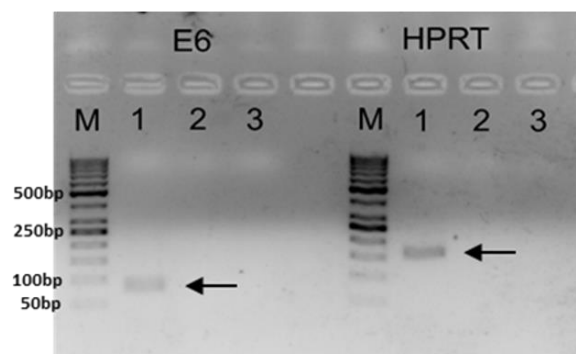
Поскольку предполагалось использование плазмид pVaxE6 и pVaxE7 в качестве ДНК иммуногенов на модели мышей, способность данных плазмид экспрессироваться оценивали в мышинных клетках. Для этого проводили трансфекцию клеток линии аденокарциномы молочной железы мышей 4T1uc2 плазмидами pVaxE6 и pVaxE7. Через 2 суток после трансфекции оценивали экспрессию E6 и E7.

Определение уровней экспрессии белков E6 и E7 в трансфицированных клетках сопровождается рядом ограничений. Белок E6 существует во множестве изоформ [82], кроме того, и E6, и E7 существуют в виде мономеров и димеров [299–302]. Экспрессионно

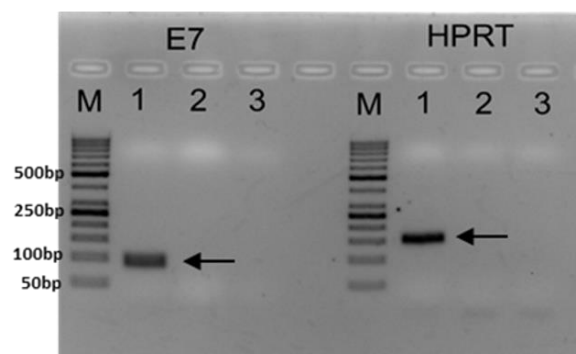
оптимизированные векторы на основе pVax1 обеспечивают экспрессию белков на уровне порядка 15–20 фг на клетку [303]. Стандартно для приемлемого разрешения изоформ исследуемого белка Вестерн блот проводится на 100 000 клеток [304]. Данное количество клеток должно предположительно содержать около 2 нг тотального белка, в случае E6 – во всей совокупности его изоформ. Коммерчески доступные анти-E6 и анти-E7 антитела (ab30716, Abcam; ab308180, Abcam; Mab 716–332, Arigobio; Mab 716–D1cc, Arigobio) имеют относительно низкую чувствительность и способны детектировать белки в количестве от десятков мкг. Альтернативным вариантом детекции может быть иммунопреципитация и последующий анализ осажденных белков. Однако способность/эффективность моноклональных антител распознавать и осаждать различные формы белков E6 и E7 неизвестна. Таким образом, содержание белков E6 и E7, осажденных моноклональными антителами, может не отражать фактическое их содержание и соотношение изоформ в клетках. Все эти факторы делают невозможной детекцию и идентификацию белков методом Вестерн-блот. С подобной проблемой столкнулся целый ряд исследователей [305], заключивших, что уровни экспрессии E6 и E7 следует определять по уровню синтеза соответствующих мРНК с помощью ПЦР.

мРНК трансфицированных клеток выделяли как описано в разделе 2.3.7.1, ПЦР-РВ проводили с использованием праймеров, специфичных к тотальному *E6* (все изоформы E6), специфичных к гену *E7*, а также к гену домашнего хозяйства *Hprt* (Таблица 2). Трансфицированные клетки 4T1luc2 экспрессировали *E6* и *E7*, о чем говорило наличие в агарозном геле продуктов амплификации ожидаемого размера (Рисунок 14А, Б). Уровень экспрессии мРНК *E6* в клетках был примерно в 40 раз выше уровня мРНК *E7* (Рисунок 14В).

А



Б



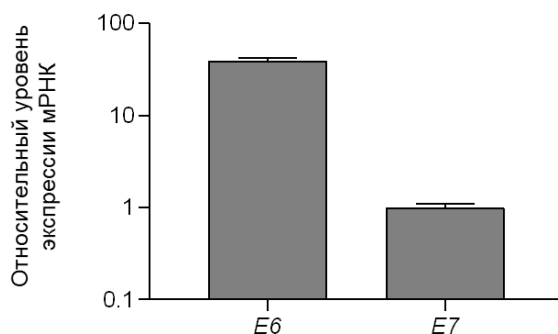
В

Рисунок 14 – Оценка экспрессии мРНК *E6* и *E7* в клетках 4T1Luc2, трансфицированных разработанными ДНК-конструктами pVaxE6 и pVaxE7. (А) Гель-электрофорез клеток 4T1Luc2, трансфицированных pVaxE6: лунка 1 – амплифицированный продукт *E6* (слева) или амплифицированный продукт *Hprt* (справа), лунка 2 – отрицательный контроль без обратной транскрипции (слева и справа), лунка 3 – отрицательный контроль без матрицы (слева и справа), лунка М – маркер длин ДНК 50bp (слева и справа); (Б) Гель-электрофорез клеток 4T1Luc2, трансфицированных pVaxE7: лунка 1 – амплифицированный продукт *E6* (слева) или амплифицированный продукт *Hprt* (справа), лунка 2 – отрицательный контроль без ОТ (слева и справа), лунка 3 – отрицательный контроль без матрицы (слева и справа), лунка М – маркер длин ДНК 50 п. о. (слева и справа). Специфические продукты амплификации *E6* (79 п. о.), *E7* (92 п. о.) и *Hprt* (155 п. о.) указаны стрелками. (В) Относительные уровни экспрессии мРНК *E6* и *E7* в клетках 4T1Luc2. Уровни экспрессии были нормализованы по экспрессии *Hprt* и рассчитывали, как кратное изменение уровня мРНК *E6* относительно уровня мРНК *E7* методом ddCt. Данные представлены как среднее трех независимых измерений $\pm$ СО

Таким образом было подтверждено, что при транзientной трансфекции эукариотических клеток разработанными ДНК-конструктами pVaxE6 и pVaxE7 обеспечивается экспрессия мРНК *E6* и *E7*.

Результаты раздела 3.1 опубликованы автором и его коллегами в двух научно-исследовательских статьях [275] [306].

3.2 Определение оптимального метода доставки ДНК-вакцинных конструкторов

Критическим этапом в ДНК иммунизации является введение плазмидной ДНК. В основе метода лежит простое введение (инъекция), само по себе недостаточно эффективное [179]. Эффективность проникновения ДНК в клетку можно повысить физическими методами [307]. Наиболее эффективным физическим методом доставки ДНК в ткани на настоящий момент является ЭЛП [178]. Нами были отработаны оптимальные условия ЭЛП, определяемые характеристиками используемого оборудования (электропоратор, электроды) и экспериментальной модели.

Минусом ЭЛП является болезненность, инвазивность, дороговизна и сложность в эксплуатации требуемого оборудования, а также вероятность его контаминации [150; 308]. В силу этого в настоящей работе были апробированы и оптимизированы альтернативные методы, в частности, внутрикожные (в/к) инъекции в гипотонических растворах на основе ФСБ [309] (метод ВКИ) и в/к инъекции ДНК в буферном растворе оптимальной ионной силы в сочетании с сонопорацией (метод ВКИ/СП) [204; 310].

Далее оптимальные режимы всех трех методов сравнивали по эффективности доставки *in vivo* плазмидной ДНК, кодирующей ген репортерного белка люциферазы светлячка (Luc).

3.2.1 Определение рабочего диапазона ионной силы буферного раствора для внутрикожного введения плазмидной ДНК

В состав инъекционной смеси ДНК-вакцин обычно входит ФСБ, обеспечивающий физиологический pH и целостность ДНК [179]. Известно, что ионная сила буферного раствора инъекционной смеси влияет на проникновение ДНК в клетки [186]. Изотонический ФСБ, являясь сильным электролитом ввиду полной диссоциации ионов Na^+ и K^+ , при добавлении молекул ДНК меняет свою ионную силу [181]. Поэтому было решено определить рабочий диапазон ионной силы буферного раствора, который бы обеспечивал проникновение ДНК в клетки. Для этого мышам линии BALB/c вводили в/к плазмидную ДНК, кодирующую Luc (pVaxLuc), в ФСБ (ионной силы 163 ммоль/л), а также фосфатных буферах (ФБ) на основе ФСБ пониженной ионной силы от 81 до 20 ммоль/л, и в деионизированной воде (H_2O , 0 ммоль/л) (серия ВК, Таблица 5). Сигналы биолюминесценции от мест инъекции детектировали на 2-й, 3-й и 5-й дни после введения с помощью прибора для детекции сверхмалых световых сигналов (ДССС) (ДССС imager) LumoTrace Fluo (Abisence, Россия, Москва).

Максимальный уровень продукции люциферазы от мест инъекции детектировался на 2-й день после введения, что согласовывалось с данными других исследований [311; 312]. При этом наибольший уровень сигнала биолюминесценции, соответствующий максимальной продукции люциферазы в местах инъекции, был достигнут при введении ДНК в ФСБ. Величина уровня сигнала биолюминесценции от мест инъекции ДНК в ФБ ионной силы 81 ммоль/л была достоверно ниже (Рисунок 15). Доставка ДНК в ФБ ионной силы ниже 81 ммоль/л была неэффективна, что выражалось в низком уровне продукции репортёра без различий между экспериментальными группами (Рисунок 15). Уровни сигнала биолюминесценции от мест инъекций в этих трех группах (41, 20 и 0 ммоль/л (деионизированная H_2O)) не отличался от уровня автолюминесценции (Рисунок 15).

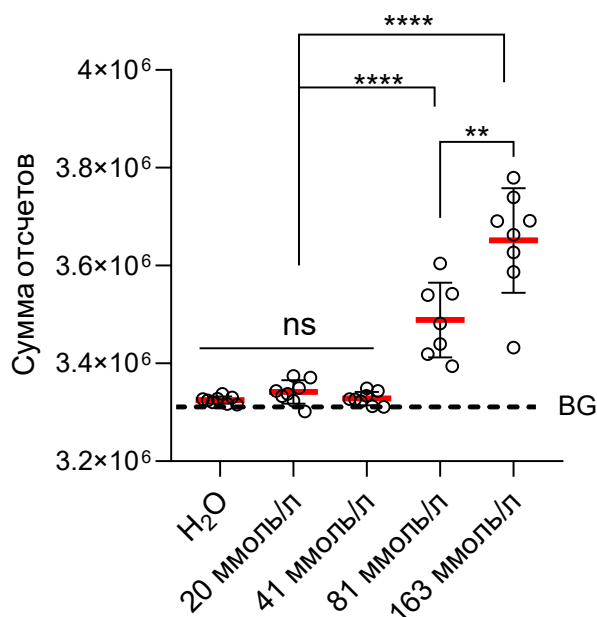


Рисунок 15 – Сравнение уровней сигналов биолуминесценции от мест инъекции плазмидной ДНК pVaxLuc, кодирующей люциферазу светлячка, введенной в ФСБ (ионная сила 163 ммоль/л), фосфатных буферах на основе ФСБ ионной силы 20, 41, 81 ммоль/л или в деионизированной воде (H₂O) на 2-й день после инъекции. Данные представлены как среднее значение в каждой группе ± СО. Фоновый уровень биолуминесценции (автолюминесценции [313]) обозначен пунктирной линией BG и установлен как среднее количество отсчетов с площади тела, эквивалентной участкам наблюдения (region of interest, ROI), в основном эксперименте, но взятой у наивных мышей линии BALB/c, после введения D-люциферина + СО (n=3). Попарные сравнения проводились с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни; **** — $p < 0,0001$; ** — $p < 0,01$; * — $p < 0,05$; ns – незначимо

Максимальный уровень экспрессии репортерного гена после в/к инъекции был достигнут при применении буферного раствора физиологической ионной силы, в ФСБ. Ионная сила буферного раствора 81 ммоль/л являлась пороговым значением, при котором поддерживалась экспрессия репортерного гена после в/к инъекции ДНК.

3.2.2 Оптимизация условий доставки ДНК методом сонопорации

Определив оптимальную ионную силу буферного раствора для в/к инъекции ДНК, мы попытались повысить эффективность проникновения ДНК в клетки методом сонопорации. Для этого необходимо было определить оптимальные режимы озвучивания мест в/к инъекций. Для озвучивания был использован портативный генератор ультразвука (Chattanooga, Guildford, Великобритания), работающий в импульсном и непрерывном режиме. Нами был выбран первый режим, поскольку он обеспечивает более щадящее воздействие на клетки. В импульсном режиме ультразвуковой преобразователь генерирует серии ультразвуковых колебаний (пакеты), перемежающихся с паузами. На первом этапе мы оценили влияние

увеличения акустического давления на эффективность сонопорации. Для этого были опробованы режимы озвучивания с изменяемыми величинами акустического давления от 1,5 до 3 кПа при одинаковых значениях длительности пакета 1 мс и частотой повторения пакетов 16 Гц (Таблица 6). Выбранное соотношение длительности пакета и частоты повторения пакетов (рабочий цикл 2%) было обосновано литературными данными, согласно которым данное соотношение минимизирует риск лизиса клеток [206]. Диапазон проверяемых интенсивностей ультразвука выбирали с учетом граничных условий, описанных в литературе [261; 262], а также технических возможностей используемого ультразвукового генератора и параметров ткани (дермы). Поскольку используемый в работе прибор позволял задавать только интенсивность ультразвука (но не акустическое давление), мы оперировали величинами интенсивности. Нами были выбраны три ступенчато увеличивающиеся рабочие интенсивности ультразвуковых колебаний – 0,6, 1,2 и 2,4 Вт/см², соответствующие акустическому давлению 1,5, 2,1 и 2,9 кПа (согласно расчетам в подразделе 2.3.11.2 раздела Материалы и Методы). Перед процедурой озвучивания мышам линии BALB/c вводили в/к плазмидную ДНК pVaxLuc в ФСБ (оптимальный буфер по результатам серии ВК). Непосредственно после введения плазмидной ДНК, места инъекций озвучивали ультразвуком интенсивностью 0,6, 1,2 или 2,4 Вт/см². Общее время озвучивания места инъекции не превышало 3 сек. Мониторинг сигналов биolumинесценции от мест введения репортерной плазмиды проводили на 2, 3, 9 и 15 сутки после озвучивания с помощью прибора для ДССС IVIS (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США).

Как в ВК-серии, максимальный уровень сигнала биolumинесценции наблюдали на 2-3-й дни после введения Luc без достоверных различий между двумя днями (все $p > 0,1$). Это позволило объединить данные двух дней и провести более строгую оценку. Дальнейшее сравнение показало, что на ранних этапах (дни 2-3) уровень сигнала биolumинесценции от участков инъекций, озвученных ультразвуком интенсивностью 2,4 Вт/см², был значительно выше, чем после озвучивания ультразвуком более низких интенсивностей (Рисунок 16А). Таким образом, максимальный сигнал биolumинесценции (наиболее высокий уровень экспрессии Luc) был достигнут при озвучивании места инъекции плазмидной ДНК ультразвуком интенсивностью 2,4 Вт/см².

На следующем этапе мы оценили влияние на эффективность сонопорации длительности пакета ультразвуковых колебаний. Для этого мышам линии BALB/c вводили pVaxLuc в ФСБ с последующим озвучиванием ультразвуком оптимальной интенсивности 2,4 Вт/см², частотой повторения пакетов ультразвуковых колебаний 16 Гц, и длительностью пакета в 1 мс и в 2 мс (т.е. ультразвуком с рабочим циклом 2% и 3%). Общее время озвучивания для обоих режимов было одинаково и не превышало 3 сек. Мониторинг/BLI от мест

озвучивания проводили на 2, 3, 9 и 15 сутки. Как и в первой серии, уровень сигнала биолуминесценции от мест введения плазмидной ДНК не менялся со 2-го по 3-й день ($p > 0,1$). Это также позволяло объединить данные за оба дня. При дальнейшем сравнении было обнаружено, что на ранних этапах уровень биолуминесценции, полученного от мест озвучивания участков инъекции режимом с коротким пакетом ультразвуковых колебаний (1 мс) был значительно выше, чем после озвучивания режимом с длинным пакетом (2 мс) (Рисунок 16Б).

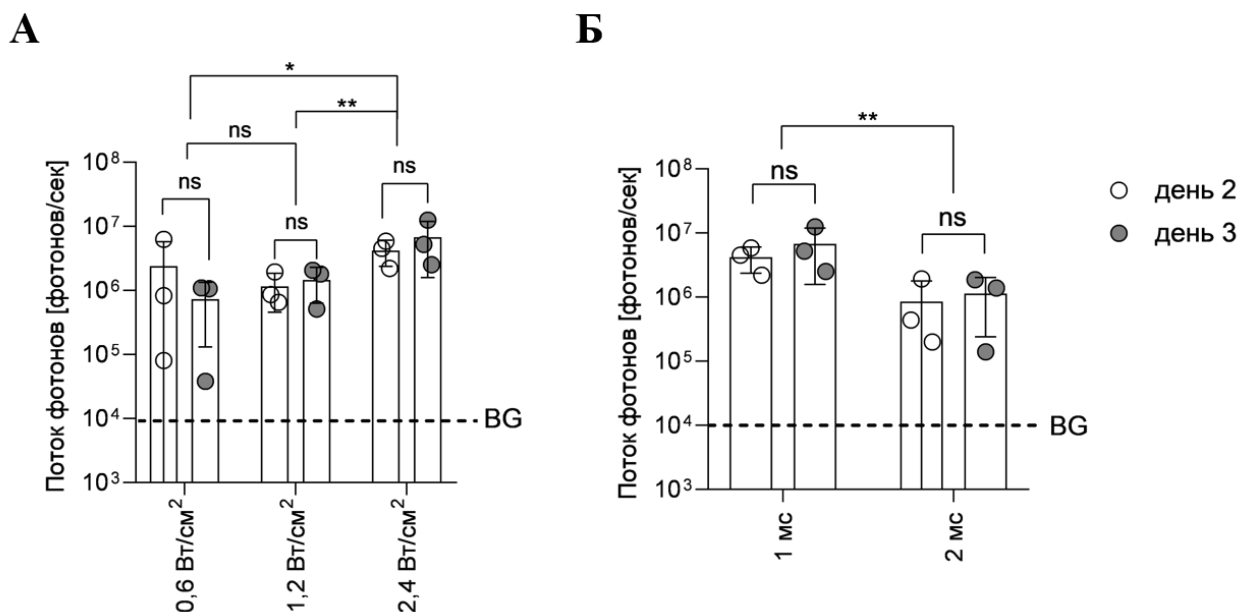


Рисунок 16 – Сравнение уровней общего потока фотонов (сигнала биолуминесценции) от мест инъекции плазмидной ДНК pVaxLuc, кодирующей люциферазу, в ФСБ с последующим озвучиванием в разных режимах на 2-й и 3-й дни после озвучивания. Озвучивание проводилоли с помощью портативного ультразвукового генератора с датчиком площадью 2 см² (оба производства Chattanooga, Guildford, Великобритания). (А) Уровни сигналов биолуминесценции от мест инъекций, озвученных в импульсном режиме с постоянной длительностью пакета ультразвуковых колебаний 1 мс и постоянным временем озвучивания 3 сек, но разной интенсивностью ультразвука (0,6 Вт/см², 1,2 Вт/см² и 2,4 Вт/см²); (Б) Уровни сигналов биолуминесценции от мест инъекций, озвученных в импульсном режиме с разной длительностью пакета ультразвуковых колебаний (1 мс и 2 мс), но постоянным временем озвучивания 3 сек и интенсивностью ультразвука 2,4 Вт/см². Данные представлены как средний уровень сигнала биолуминесценции (фотонов/сек) в каждой группе $\pm$ СО. Фоновый уровень биолуминесценции (автолюминесценции [313] обозначен пунктирной линией BG и установлен как среднее количество отсчетов с площади тела, эквивалентной участкам наблюдения (region of interest, ROI) в основном эксперименте, но взятой у наивных мышей линии BALB/c, после введения D-люциферина + СО (n=3). * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; ns — незначимо (тесты Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни)

Таким образом, эффективность сонопорации *in vivo* зависила от интенсивности ультразвука и длительности пакета ультразвуковых колебаний. Оптимальным являлся режим

озвучивания с интенсивностью $2,4 \text{ Вт/см}^2$ и длительностью пакета ультразвуковых колебаний 1 мс.

3.2.3 Оптимизация условий электропорации

Наиболее эффективным методом доставки ДНК *in vivo* («золотым стандартом») является электропорация [178]. В настоящей работе данный метод был использован как референс для сравнения с альтернативными методами доставки. Как было упомянуто выше, оптимальные условия ЭПП сильно зависят от экспериментальной модели и параметров используемого оборудования (электропоратора и электродов). Поэтому необходимо было определить оптимальные режимы ЭПП в условиях данной экспериментальной работы.

Нами была использована двухэтапная схема подачи электрических импульсов прямоугольной формы, включающая один высоковольтный импульс порации и восемь низковольтных направляющих импульсов. Эффективность подобной схемы неоднократно демонстрировалась различными исследователями [314–316].

На структурные изменения в липидных мембранах влияет напряженность прикладываемого электрического поля, а также длительность, частота и полярность подаваемых электрических импульсов [200; 314; 316; 317]. Напряженность прикладываемого электрического поля (В/м) определяется расстоянием и разностью потенциалов (напряжением) между электродами. Расстояние между электродами определялось конфигурацией используемого электрода и оставалось фиксированной величиной, остальные величины (длительность, частота и полярность подаваемых электрических импульсов) варьировали. Согласно литературным данным, использование импульсов миллисекундного диапазона предпочтительнее, поскольку они способствуют формированию пор, сохраняющихся в течение 15–20 мин [317], также повышает эффективность ЭПП использование коротких интервалов между импульсами [318]. На основании этих данных нами были опробованы два режима подачи направляющих импульсов: низкочастотный режим с «длинными» импульсами длительностью 50 мс и интервалом между импульсами 950 мс и высокочастотный режим с «короткими» импульсами длительностью 10 мс и интервалом между импульсами 20 мс. В каждом режиме дополнительно изменяли напряженность электрического поля путем изменения амплитуды электрических импульсов от 50 до 100 В (расстояние между электродами в многоигольном электроде оставалось постоянным) и полярность подаваемых импульсов (униполярный или биполярный режим). Параметры импульса порации оставляли неизменными: амплитуда 400 В, длительность импульса 0,05 мс.

Мышам линии BALB/c вводили в/к плазмидную ДНК pVaxLuc в ФСБ, после чего места инъекций подвергали ЭПП с использованием различных режимов (серия ЭП-1; Таблица 7)

(далее метод ВКИ/ЭЛП). Мониторинг/BLI сигналов биolumинесценции от мест ЭЛП проводили на 1, 3, 9 и 15 сутки с помощью прибора IVIS (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США).

Так же, как и в предыдущих экспериментах, для всех групп общий поток фотонов, измеренный на 1-й и 3-й день, не различался (все $p > 0,1$), поэтому данные за эти два дня были объединены. Низкочастотный биполярный режим направляющих импульсов амплитудой 50 В превосходил другие режимы подачи направляющих импульсов той же амплитуды (низкочастотного униполярного и высокочастотного биполярного). Однако этот режим оказался травматичным, вызывая локальные ожоги и воспаление в межэлектродном пространстве, аналогичные тем, которые наблюдались ранее при применении высокочастотных длинных импульсов [319].

Одним из способов повышения эффективности ЭЛП, позволяющих уйти от низкочастотного режима, является увеличение амплитуды направляющих импульсов. Действительно, увеличение амплитуды высокочастотных направляющих импульсов до 100 В в биполярном режиме приводило к более высокому уровню сигнала биolumинесценции от мест ЭЛП, указывающему на более высокие уровни продукции люциферазы (Рисунок 17).

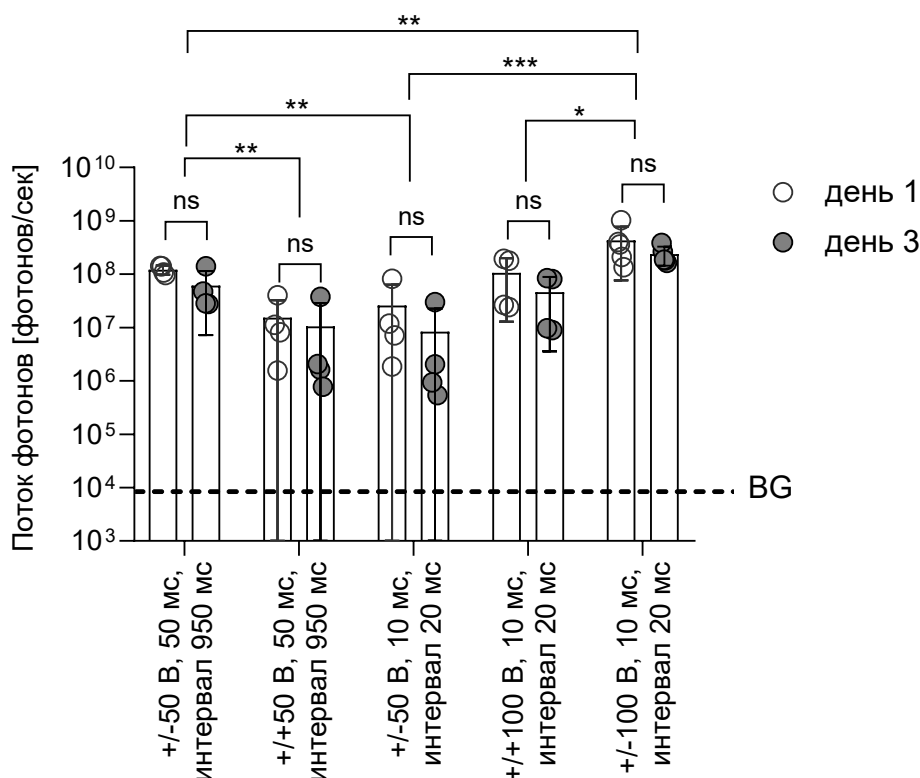


Рисунок 17 – Сравнение уровней сигналов биolumинесценции (общего потока фотонов) от мест инъекции плазмидной ДНК pVaxLuc, кодирующей люциферазу светлячка, введенной в ФСБ с последующей электропорацией устройством CUY21EDITII (BEX Co) оснащенного многоигольчатым электродом (1,5 × 4 мм; Collectis) различными протоколами подачи направляющих импульсов на 1-й и 3-й дни после электропорации. Данные представлены как

средний уровень сигнала биolumинесценции (фотонов/сек) в каждой группе $\pm$ СО. Фоновый уровень биolumинесценции (автолюминесценции [313] обозначен пунктирной линией BG и установлен как среднее количество отсчетов с площади тела, эквивалентной участкам наблюдения (region of interest, ROI) в основном эксперименте, но взятой у наивных мышей линии BALB/c, после введения D-люциферина + СО (n=3). ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$ (тесты Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни), ns – незначимо

Таким образом, оптимальный протокол направляющих импульсов при ЭЛП для устройства CUY21EDITII, оснащенного многоигольчатым электродом, включал высокочастотные биполярные импульсы напряжением 100 В, длительностью 10 мс и интервалом между импульсами 20 мс.

3.2.4 Сравнение эффективности методов доставки ДНК

После оптимизации каждого из методов, мы задались вопросом, могут ли более простые и менее травматичные методы ВКИ и ВКИ/СП доставки ДНК обеспечить сопоставимые с методом ВКИ/ЭЛП уровни продукции репортера. Поскольку измерение уровней сигналов биolumинесценции в разных сериях экспериментов осуществлялось разными приборами, прямое сравнение результатов было невозможным. Поэтому использовали косвенный метод сравнения. Дополнительной группе мышей линии BALB/c ввели в/к плазмидную ДНК pVaxLuc в ФСБ, после чего места инъекций подвергали ЭЛП в оптимальном режиме (серия ЭП-2, Таблица 7). Мониторинг BLI провели на приборе LumoTrace Fluor. Таким образом были получены результаты оптимального режима ЭЛП с помощью двух приборов: IVIS (в серии ЭП-1, Таблица 7) или LumoTrace Fluor (серия ЭП-2, Таблица 7). При этом величины максимального потока фотонов после доставки в оптимальном режиме ВКИ/ЭЛП, измеренный с помощью прибора IVIS (серии ЭП-1) или прибора LumoTrace Fluor (серии ЭП-2) были приняты за 100%. Величины потока фотонов после в/к инъекции без последующей ЭЛП (метод ВКИ) или после в/к инъекции с последующим озвучиванием (метод ВКИ/СП) на 2-3 дни введения репортерной плазмиды был представлен в виде отношения к величине потока фотонов после в/к инъекции с последующей ЭП (метод ВКИ/ЭЛП) в серии, измеряемой с использованием одного и того же устройства (в сериях СП как % от ЭП-1.5 для IVIS, в сериях ВК как % от ЭП-2 для LumoTrace Fluor) (Рисунок 18).

Эффективность доставки ДНК с помощью ВКИ/СП была крайне низкой по сравнению с эффективностью, обеспечиваемой ВКИ/ЭЛП (при той же дозе плазмиды). Аналогично низкоэффективной была доставка методом ВКИ, как в оптимальном, так и во втором по эффективности режимах.

В совокупности, это свидетельствует о том, что на ранних сроках после введения (до первых проявлений адаптивного иммунного ответа на люциферазу) проведение сонопорации не оказывало положительного влияния на экспрессию репортера Luc (Рисунок 18).

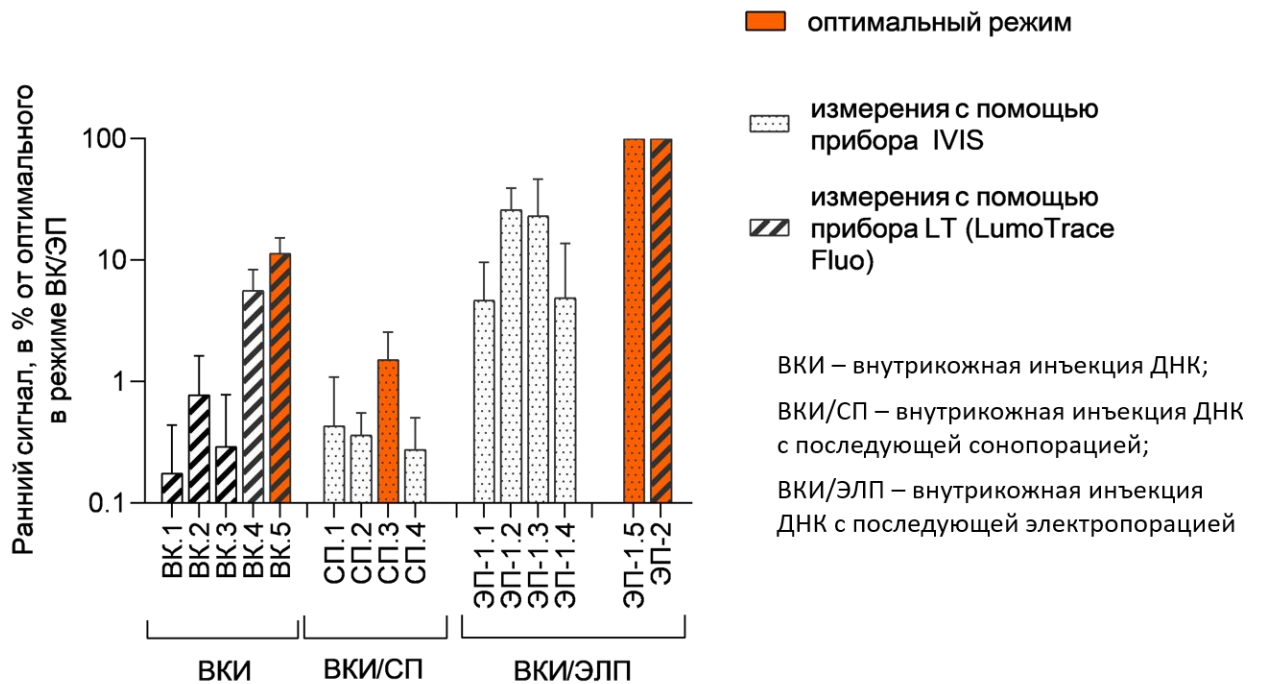


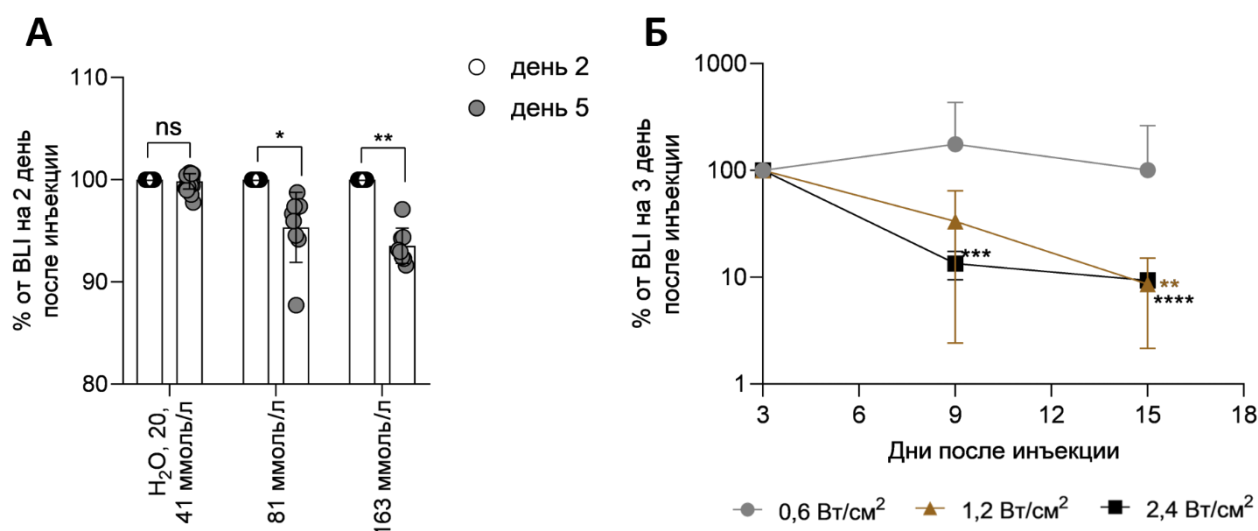
Рисунок 18 – Сравнение эффективности доставки ДНК методами внутривенной инъекции, внутривенной инъекции с последующей сонопорацией или электропорацией по уровню продукции репортера Luc от мест инъекций на 2-3 дни. Сравнение результатов доставки методом внутривенной инъекции (серия ВК, группы ВК.1–ВК.4 и ВК.5 (оптимальный вариант)), измеряемых с помощью прибора LumoTrace Fluo (LT), результатов доставки методом внутривенной инъекции с последующей сонопорацией (серия СП, группы СП.1–СП.4, СП.3 (оптимальный вариант)), измеряемых с помощью прибора IVIS, и сравнение результатов доставки методом внутривенной инъекции с последующей электропорацией (серия ЭП, группы ЭП-1.1–ЭП-1.4 и ЭП-1.5 (оптимальный вариант)), измеряемых с помощью прибора IVIS. Столбцы, представляющие наилучший протокол доставки ДНК в сериях ВК, СП и ЭП, окрашены в оранжевый цвет (ВК.5, СП.3 и ЭП-1.5 соответственно). Столбцы, представляющие результаты, измеренные с помощью прибора IVIS, обозначены пунктиром, а результаты, измеренные с помощью прибора LT, — полосами. Общий поток фотонов (IVIS) и сумма отсчетов (LT), зарегистрированные соответствующим приборами на 2-й день после доставки pVaxLuc оптимальным методом внутривенной инъекции с последующей электропорацией, были приняты за 100%. Проценты рассчитывались на основе средних значений общего потока/суммы отсчетов всех мест инъекции в группе в данный момент времени

Единственным эффективным методом доставки являлся ВКИ/ЭП с ЭП в режиме с биполярными направляющими импульсами амплитудой 100 В длительностью 10 мс с интервалом между импульсами 20 мс.

3.2.5 Прогнозирование развития иммунного ответа на ДНК-иммуноген, введенный различными способами доставки

Несмотря на сравнительно низкую иммуногенность люциферазы светячка, ее сверхэкспрессия в тканях после внутрикожного введения способна вызывать клеточный иммунный ответ [320], приводящий к постепенному снижению сигнала люминесценции от мест инъекции из-за иммуноопосредованной гибели клеток, экспрессирующих люциферазу [243; 321]. При таком сценарии падение уровня сигнала биолюминесценции с течением времени служит маркером развития иммунного ответа [243]. После введения ДНК-иммуногена инициация иммунного ответа приходится на 48–72 часа после инъекции [322]. На основании этого в качестве суррогатного маркера развития раннего иммунного ответа на Luc было предложено использовать уровень снижения сигнала биолюминесценции от мест инъекции на 5-ый и последующие дни по сравнению со 2-ым (3-м) днем.

В эксперименте со введением pVaxLuc в ФСБ и в ФБ с пониженной ионной силой, снижение сигнала биолюминесценции наблюдали только у мышей, получавших плазмиду в ФСБ и ФБ ионной силы 81 ммоль/л, начиная с 5-го дня после инъекции. У мышей, получавших pVaxLuc в ФБ с ионной силой ≤ 41 ммоль/л, изменений не наблюдалось (Рисунок 19А). В экспериментах по оптимизации режимов сонопорации устойчивая потеря люминесцентного сигнала наблюдалась с 3-го дня только в группе мышей, озвученных ультразвуком с интенсивностью 2,4 Вт/см² с длительностью пакета подачи импульсов 1 мс (Рисунок 19Б, В). В эксперименте по оптимизации режимов электропорации устойчивое значимое снижение уровня сигнала биолюминесценции наблюдалось у мышей, электропорированных режимом с биполярными направляющими импульсами амплитудой 100 В длительностью 10 мс с интервалом между импульсами 20 мс. В других группах значимого снижения сигнала биолюминесценции не наблюдали (Рисунок 19Г).



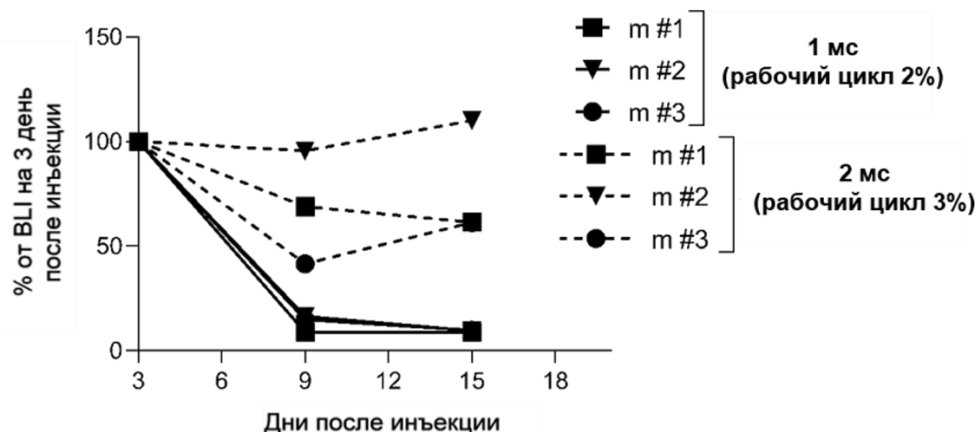
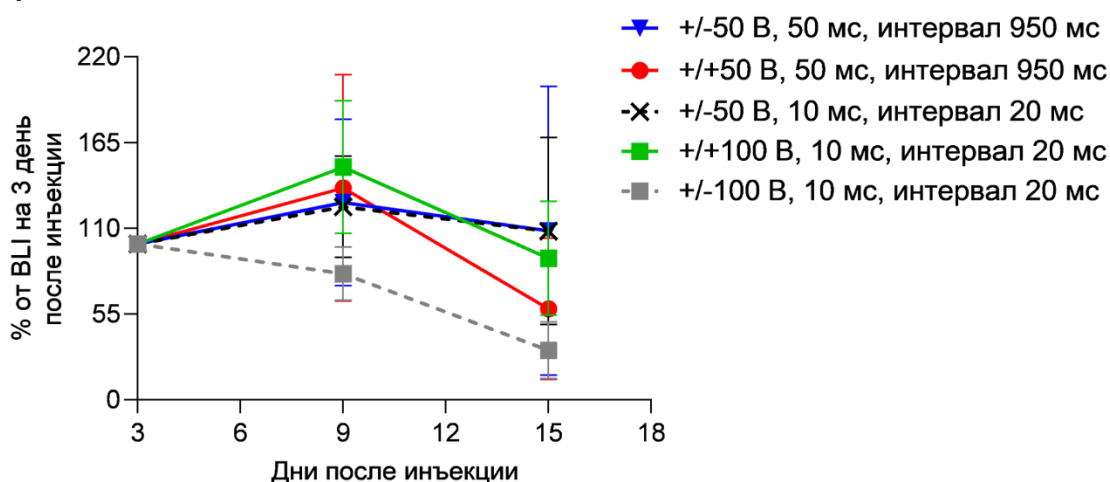
В**Г**

Рисунок 19 – Изменение уровней сигналов биолуминесценции от мест инъекций плазмидной ДНК pVaxLuc, кодирующей люциферазу светлячка, как % к потоку фотонов на день максимальной эмиссии. (А) После введения pVaxLuc в ФСБ, фосфатном буфере ионной силы 81 ммоль/л или фосфатных буферах ионной силы 41 ммоль/л, 20 ммоль/л и деионизированной H₂O взятых вместе (поскольку последние три группы не различались, $p > 0,1$) со 2-го на 5-й день после инъекции. (Б) После введения pVaxLuc в ФСБ с последующим озвучиванием мест инъекций ультразвуком интенсивностью от 0,6 до 2,4 Вт/см² при постоянной длительности пакета подачи импульсов 1 мс с 3-го по 15-й день. (В) После введения pVaxLuc в ФСБ с последующим озвучиванием мест инъекций ультразвуком интенсивностью 2,4 Вт/см² при длительностях пакетов подачи импульсов 1 мс и 2 мс с 3-го по 15-й день. Представлены данные отдельных мышей в группах. (Г) После введения pVaxLuc в ФСБ с последующей электропорацией мест инъекций при различных режимах с 3-го по 15-й день. Все данные представлены как средний уровень сигнала биолуминесценции (отсчеты или фотонов/сек) в каждой группе $\pm$ СО. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ (тесты Краскела-Уоллиса, Манна-Уитни и двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Тьюки), ns – незначимо

Ввиду того, что режимы, показавшие достоверную потерю люминесцентного сигнала после 2-х (3-х) суток, обеспечивали также максимальный начальный уровень продукции репортера в месте инъекции, потерю сигнала допустимо объяснить иммуноопосредованной гибелью Luc-экспрессирующих клеток.

Результаты раздела 3.2 опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [323].

3.3 Исследование способности плазмидных ДНК вызывать иммунный ответ в мышинной модели

Иммунный ответ на ДНК-иммуноген зависит от: (1) природы закодированного иммуногена; (2) уровня его экспрессии, задаваемого синтетическим геном; (3) от эффективности его проникновения в клетку (доставки). Первые два фактора были учтены при конструировании ДНК иммуногенов. Были созданы конструкторы, кодирующие инактивированные Е6 и Е7 ВПЧ16, обеспечивающие их эффективную экспрессию. Также был выбран способ доставки, обеспечивающий эффективное проникновение ДНК в клетку. На следующем этапе работы необходимо было на уже охарактеризованном иммуногене оценить влияние способа доставки на силу иммунного ответа на охарактеризованный модельный иммуноген. Далее предстояло оценить иммуногенность (на мышах), введенных этим оптимальным способом конструкторов, кодирующих Е6 и Е7 ВПЧ16 (ДНК-Е6 и ДНК-Е7).

3.3.1 Выбор плазмид для оценки влияния способа доставки на силу иммунного ответа

В качестве модельных ДНК-иммуногенов для оценки влияния способа доставки на силу иммунного ответа, были выбраны внутриклеточные белки, обладающие иммуномодулирующими свойствами и вовлеченные в канцерогенез, аналогично белкам Е6 и Е7 ВПЧ16: обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека типа 1 (ОТ ВИЧ-1 клада А) [241] и теломеразная обратная транскриптаза (Т-ОТ) крысы [246]. Ранние исследования этих белков в качестве ДНК-иммуногенов показали, что ОТ вызывает активную выработку специфических антител, но является слабым клеточным иммуногеном [324], в то время как Т-ОТ является сильным клеточным иммуногеном [246]. Использование этих двух модельных иммуногенов позволяло оценить влияние способа доставки на обе ветви адаптивного иммунного ответа.

Модельные иммуногены представляли из себя референсные (в случае Т-ОТ) или консенсусные (в случае ОТ ВИЧ-1) последовательности, закодированные оптимизированными генами и клонированными под контроль IE CMV промотора в состав pVax1. В работу были взяты:

– ДНК-иммуноген, кодирующий ОТ ВИЧ-1 клада А pVaxRT_Ain. Плазмида pVaxRT_Ain была создана нами ранее на основе экспрессионно оптимизированного синтетического гена, кодирующего консенсусную ОТ ВИЧ-1 клада А штамма FSU_A с введенными точечными мутациями, инактивирующими полимеразную активность и активность РНКазы H, клонированного в pVax1 (pVaxRT_A), любезно предоставленного к.б.н. Баюровой Е.О. (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), лаб. Моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян) [324];

– ДНК-иммуноген, представляющий собой экспрессионно оптимизированный синтетический ген, кодирующий Т-ОТ крысы pVax-TERT, клонированный в pVax1, любезно предоставленный к.б.н. Баюровой Е.О. (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), лаб. Моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян) [246].

3.3.2 Оценка зависимости силы иммунного ответа от способа введения ДНК-иммуногена

3.3.2.1 Оценка силы антительного иммунного ответа

На примере ДНК-иммуногена, кодирующего ОТ ВИЧ-1 клада А pVaxRT_Ain была проведена оценка зависимости антительного иммунного ответа от способа введения. Для этого группы мышей линии BALB/c иммунизировали плазмидой pVaxRT_Ain с доставкой методом ВКИ в растворах с ионной силой 0, 81 и 163 ммоль/л, и методом ВКИ/ЭЛП в оптимальном режиме (подраздел 3.2.3) (серия ОИ_ВИЧ, Таблица 8). ДНК вводили дважды с интервалом 3 недели, антительный иммунный ответ оценивали методом ИФА через 2 недели после последней иммунизации. Клеточный иммунный ответ не оценивали, поскольку ранее было показано, что ОТ ВИЧ-1 является слабым клеточный иммуногеном [324].

ДНК, введенная в воде, не вызывала иммунного ответа. Введение ДНК в ФСБ (ионная сила 163 ммоль/л) вызывала образование анти-ОТ антител в титре 1:40 000, введение ДНК в ФБ ионной силы 81 ммоль/л – в титре 1:20 000. Доставка методом ВКИ/ЭЛП в оптимальном режиме обеспечивала максимальный иммунный ответ, на порядок превышающий уровень иммунного ответа на ту же дозу ДНК, введенной внутрикожно без ЭЛП (титр антител 1:200 000) (Рисунок 20).

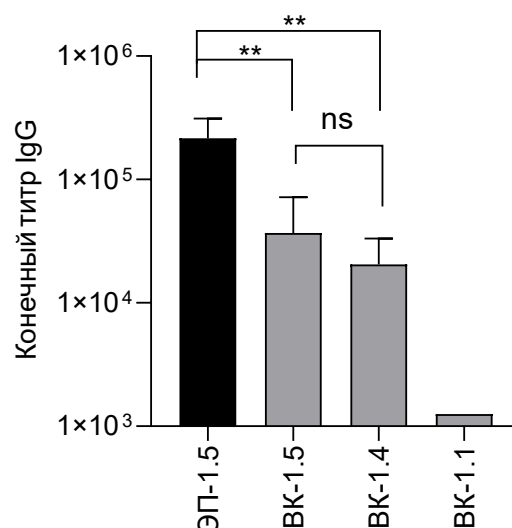


Рисунок 20 – Средние титры антител IgG против обратной транскриптазы ВИЧ-1 клада А после двухкратной иммунизации мышей плазмидой pVaxRT_Ain, вводимой в ФСБ, ФБ ионной силы 81 ммоль/л или деионизированной воде, или путем внутрикожной инъекции в ФСБ с последующей электропорацией в режиме с направляющими биполярными импульсами амплитудой 100 В, длительностью импульсов 10 мс с 20 мс интервалом между импульсами (серия ОИ_ВИЧ). Данные представлены как средние значения $\pm$ СО, ** — $p < 0,01$ (критерии Краскала-Уоллиса, Манна-Уитни), ns – незначимо

Таким образом, мы показали, что оптимальным методом введения ДНК иммуногена, обеспечивающим сильный антительный иммунный ответ на закодированный белок, является ВКИ/ЭЛП в режиме ЭЛП с использованием биполярных направляющих импульсов амплитуды 100 В, длительностью 10 мс и интервалом между и 20 мс интервалом между импульсами.

3.3.2.2 Оценка силы клеточного иммунного ответа

Далее мы оценили применимость метода доставки ВКИ/ЭЛП в подобранном режиме для индукции клеточного иммунного ответа. Для этого был использован сильный клеточный иммуноген – ДНК-конструкт, кодирующий Т-ОТ крысы. Группы мышей линии BALB/c иммунизировали плазмидой pVaxTERT либо векторной плазмидой pVax1 методом ВКИ/ЭЛП в оптимальном режиме (подраздел 3.2.3) (серия ОИ_Т-ОТ, Таблица 8). ДНК вводили дважды с интервалом 3 недели. Клеточный иммунный ответ оценивали методом многопараметрической проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием цитокинов (ICS) через 2 недели после последней иммунизации. Спленоциты иммунизированных мышей стимулировали *in vitro* смесью пептидов TERT357 из состава белка Т-ОТ (Таблица 3), фиксировали и окрашивали антителами к CD3, CD4, CD8 рецепторам и цитокинам ИФН- γ , ИЛ-2, ФНО- α . Ранее нами было показано [246], что эти пептиды содержат Т-клеточные

эпитопы и способны стимулировать CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеточный ответ у мышей, ДНК-иммунизированных Т-ОТ крысы.

В ответ на стимуляцию спленоцитов смесью пептидов TERT357 наблюдалась продукция цитокинов ИФН- γ , ИФН- γ / ИЛ-2 и ИФН- γ / ИЛ-2/ ФНО- α как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клетками. Данные приведены далее в разделе 3.4 (Рисунок 21). Таким образом, у мышей ДНК-иммунизированных pVaxTERT методом ВКИ/ЭЛП был получен сильный Т-клеточный ответ на Т-ОТ по типу Th1, развивающемуся в ответ на внутриклеточные патогены (в т.ч. вирусы) [325].

Эти результаты подтверждали эффективность метода доставки ДНК ВКИ/ЭЛП в оптимальном режиме ЭП для выработки Т-клеточного иммунного ответа.

Результаты раздела 3.3.2.1 опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [323], раздела 3.3.2.2 – в научно-исследовательской статье [326].

3.4 Моделирование сценария взаимодействия двух ДНК-иммуногенов при совместном введении

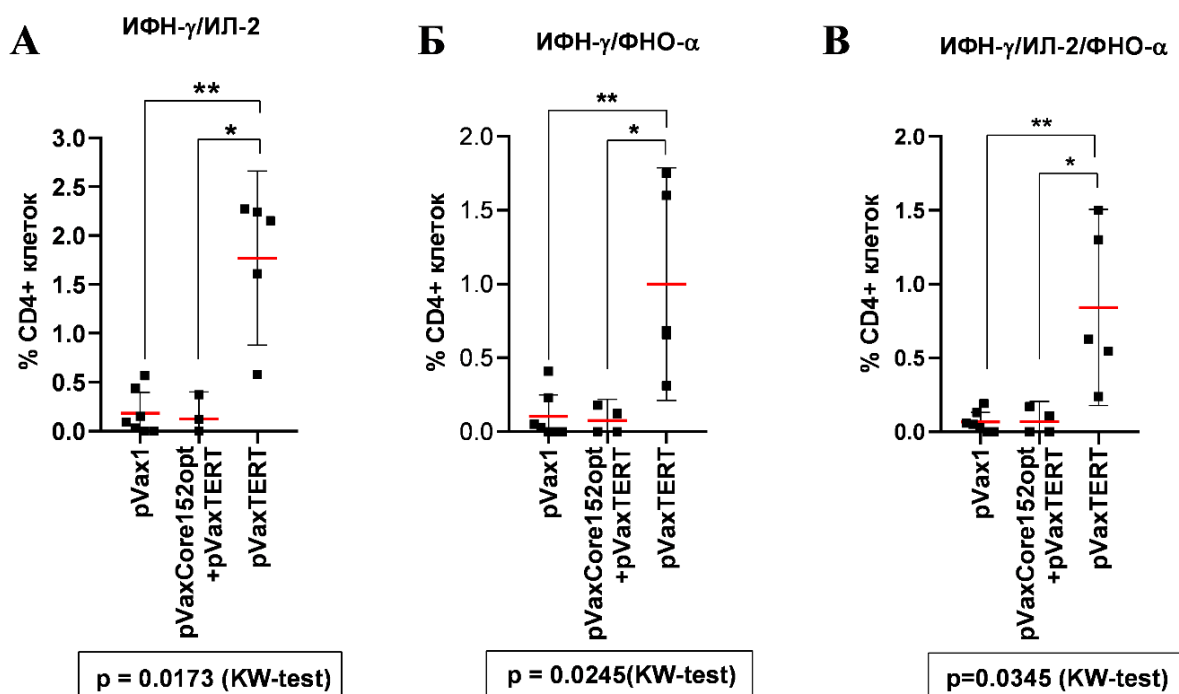
Белки Е6 и Е7 обладают иммуносупрессивными свойствами, влияя как на врожденный, так и на адаптивный иммунный ответ [327; 328] с синергическим ингибирующим эффектом [42]. В экспериментах *in vivo* у мышей Е7 снижал количество популяций клеток врожденного иммунитета (АПК, а именно клеток Лангерганса) и подавлял пролиферативный ответ CD8⁺ Т-клеток [329; 330], т.е., по-видимому, Е7 является более сильным иммуносупрессором. Ввиду этого возникает вопрос о возможной интерференции двух иммуногенов (Е6 и Е7) при совместном введении.

Для моделирования сценария взаимодействия двух ДНК-иммуногенов — сильного и слабого, значительно различающихся по уровням экспрессии, выбрали пару: плазмиду, кодирующую Т-ОТ крысы, использованную на предыдущем этапе работы, и плазмиду, кодирующую белок нуклеокапсид (кора) ВГС человека. В роли сильного высокоэкспрессирующегося клеточного иммуногена, аналога Е6 ВПЧ16, выступала Т-ОТ крысы. В качестве низкоэкспрессирующегося слабого иммуногена, обладающего иммуномодулирующими свойствами, аналога Е7 ВПЧ16 – нуклеокапсид ВГС, представленный оптимизированным синтетическим геном, кодирующим а. о. 1–152 белка нуклеокапсида (кора) ВГС (Gene Bank accession #AF176573), клонированный в pVax1 (pCMVcore152) [245]. Плазмида pVaxCore152opt была любезно предоставлена к.б.н.

Стародубовой Е. С. (ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаб. Регуляции внутриклеточного протеолиза).

Группу мышей линии BALB/c иммунизировали эквимольной смесью плазмид pVaxCore152opt и pVaxTERT (в каждый анатомический сайт) методом ВКИ/ЭЛП (Серия ОИ_Т-ОТ, Таблица 8) в оптимальном режиме дважды с интервалом 3 недели. Через 2 недели после последней иммунизации отбирали селезенки иммунизированных мышей, выделяли спленоциты и методом многопараметрической проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием цитокинов оценивали Т-клеточный ответ на стимуляцию смесью пептидов TERT357 (Таблица 3) из состава белка Т-ОТ, описанному в предыдущем разделе 3.3.2.2.

В отличие от мышей, ДНК-иммунизированных только pVaxTERT, у мышей, иммунизированных эквимольной смесью плазмид, ответ как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток был потерян. Доли секретирующих цитокинов ИФН- γ / ИЛ-2 и ИФН- γ / ИЛ-2/ ФНО- α как CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками не отличались от контролей (Рисунок 21). Таким образом было показано, что введение в один анатомический сайт низкоэкспрессирующегося слабого иммуногена совместно с высокоэкспрессирующимся сильным иммуногеном может привести к ингибированию Т-клеточного иммунного ответа против последнего. Подобная реакция могла быть обнаружена при совместном введении иммуногенов Е6 и Е7 в один анатомический сайт.



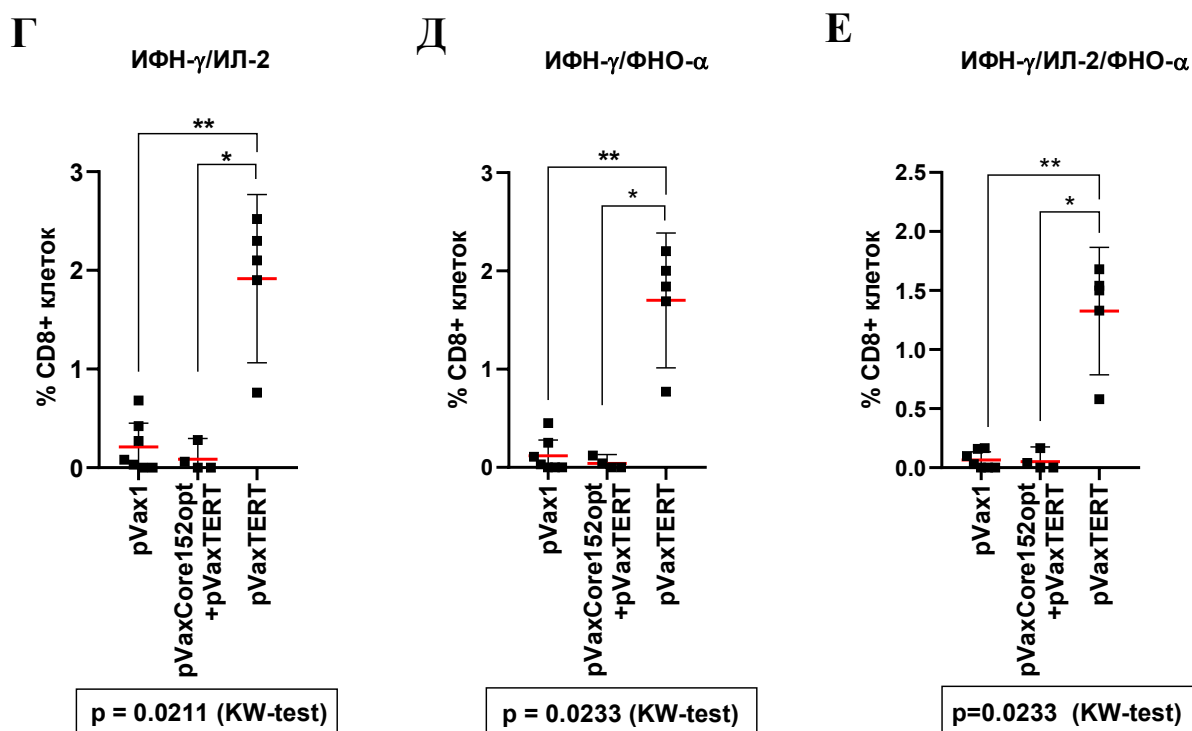


Рисунок 21 – Продукция ИФН-γ/ИЛ-2, ИФН-γ/ФНО-α и ИФН-γ/ИЛ-2/ФНО-α Т-клетками спленоцитов мышей через 2 недели после иммунизации плазмидами, кодирующими Т-ОТ и нуклеокапсид ВГС (серия ОИ_Т-ОТ) при стимуляции смесью пептидов TERT357 из состава белка Т-ОТ. (А, Б, В) Сравнение процентного соотношения CD4+ Т-клеток, реагирующих на стимуляцию пулом пептидов из состава белка Т-ОТ (TERT357) по продукции цитокинов ИФН-γ/ИЛ-2 (А), ИФН-γ/ФНО-α (Б) и ИФН-γ/ИЛ-2/ФНО-α (В). (Г, Д, Е) Сравнение процентного соотношения CD8+ Т-клеток, реагирующих на стимуляцию пулом пептидов из состава белка Т-ОТ (TERT357) по продукции цитокинов ИФН-γ/ИЛ-2 (Г), ИФН-γ/ФНО-α (Д) и ИФН-γ/ИЛ-2/ФНО-α (Е). Данные представлены в виде среднего значения ± СО. Статистический анализ выполнен с помощью критерия Краскела-Уоллиса (KW-test) и попарным тестом Манна-Уитни (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$) [326]

Результаты раздела 3.4 опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [326].

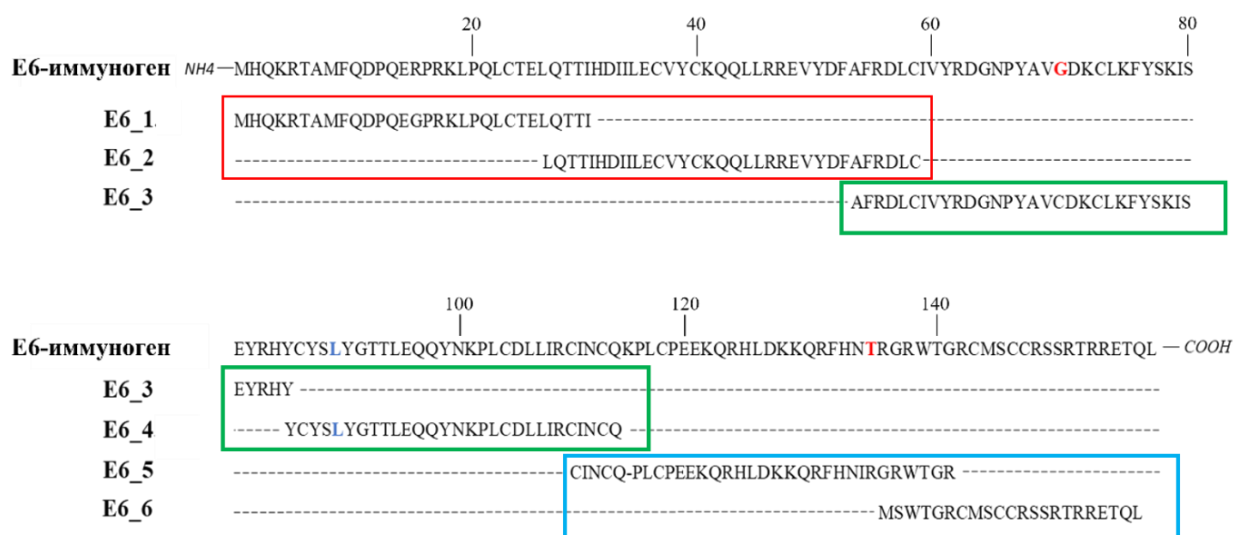
3.5 Оценка иммуногенности Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа

Определив метод и протокол доставки плазмидной ДНК, оптимальные для индукции сильного иммунного ответа, мы приступили к оценке иммуногенности разработанных ДНК-иммуногенов Е6 и Е7 на основе инактивированных консенсусных белков Е6 и Е7 ВПЧ16. Учитывая наши предыдущие результаты, показавшие неспособность схемы совместного введения (введение смеси) двух ДНК-иммуногенов с разными уровнями экспрессии и разной иммуногенностью, мышей линии С57Вl/6 иммунизировали либо ДНК Е6, либо ДНК Е7, либо обеими плазмидами, введенными раздельными инъекциями в пространственно разнесенные

анатомические сайты (серия ОТ_Е6Е7, Таблица 8). Контрольные мыши получали пустой вектор pVax1. Всех животных иммунизировали методом ВКИ/ЭЛП в оптимальном для ЭЛП режиме с трехнедельным интервалом. Оценку клеточного ответа проводили методом многопараметрической проточной цитометрии с внутриклеточным окрашиванием цитокинов через 2 недели после последней иммунизации.

В конечной точке эксперимента спленоциты иммунизированных мышей стимулировали *in vitro* смесью пептидов из состава белка Е6 (с перекрыванием аминокислотных областей белка Е6 в позициях 1–58, 53–114 и 110–158 а. о.; Таблица 3, Рисунок 22) или индивидуальными пептидами из состава белка Е7 ВПЧ16 (Таблица 3). Стимулированные спленоциты фиксировали и окрашивали антителами к CD3, CD4, CD8 рецепторам и цитокинам ИФН- γ , ИЛ-2, и ФНО- α .

А



Б

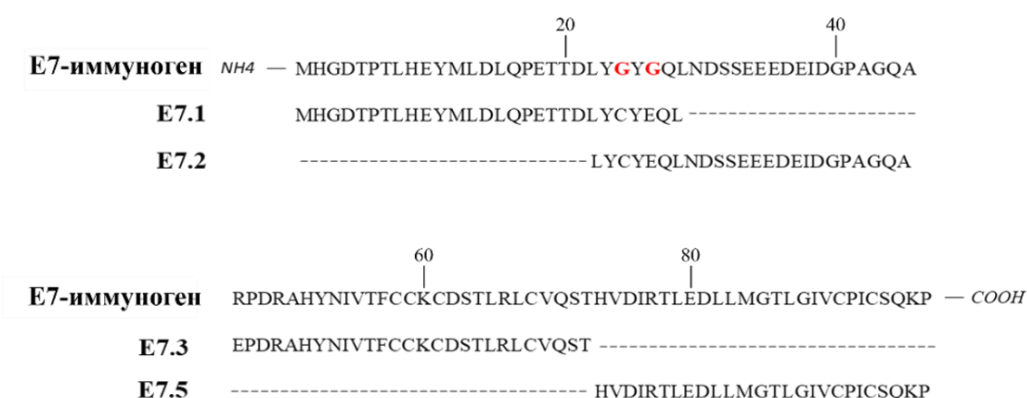


Рисунок 22 – Аминокислотные последовательности белков Е6 (А) и Е7 (Б), кодирующие соответствующие ДНК-иммуногены и пептиды, использованные для анализа специфического иммунного ответа. Жирным красным шрифтом выделены АК-замены, введенные для устранения онкогенной активности Е6 (С70G и I135T; [253]) и Е7 (С24G и E26G; [253]).

Буквенные коды слева представляют собой сокращенные названия синтетических пептидов. Красной рамкой выделена смесь пептидов из состава белка Е6, охватывающая области белка в позиции 1–58 а. о. Зеленой рамкой выделена смесь пептидов из состава белка Е6, охватывающая области белка в позиции 53–114 а. о. Голубой рамкой выделена смесь пептидов из состава белка Е6, охватывающая области белка в позиции 110–158 а. о.

При анализе секреции цитокинов нестимулированными спленocyтaми мышей, ДНК-иммунизированных Е6 и Е7, был отмечен повышенный уровень продукции моноцитокинов ИФН- γ , ИЛ-2 и ФНО- α по сравнению с контролем (Рисунок 23). Нестимулированные CD4⁺ Т-клетки мышей после ДНК-иммунизации Е6 сверхпродуцировали моноцитокины ИФН- γ и ИЛ-2 (Рисунок 23А, Б), в то время как для CD8⁺ Т-клеток никакого эффекта не наблюдалось (Рисунок 23Г-Е). Нестимулированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки мышей, ДНК-иммунизированных Е7, сверхпродуцировали ФНО- α (Рисунок 23В, Е). У мышей, ДНК-иммунизированных смесью Е6/Е7, получивших в два раза меньшие дозы обеих плазмид, никаких эффектов не наблюдали (Рисунок 23А-Е). Увеличение продукции данных цитокинов не было связано с инъекцией плазмидной ДНК и/или электропорацией, поскольку у мышей, электропорированных пустым вектором, увеличения процента клеток, секретирующих ИФН- γ , ИЛ-2 и/или ФНО- α , не происходило (Рисунок 23А-Е).

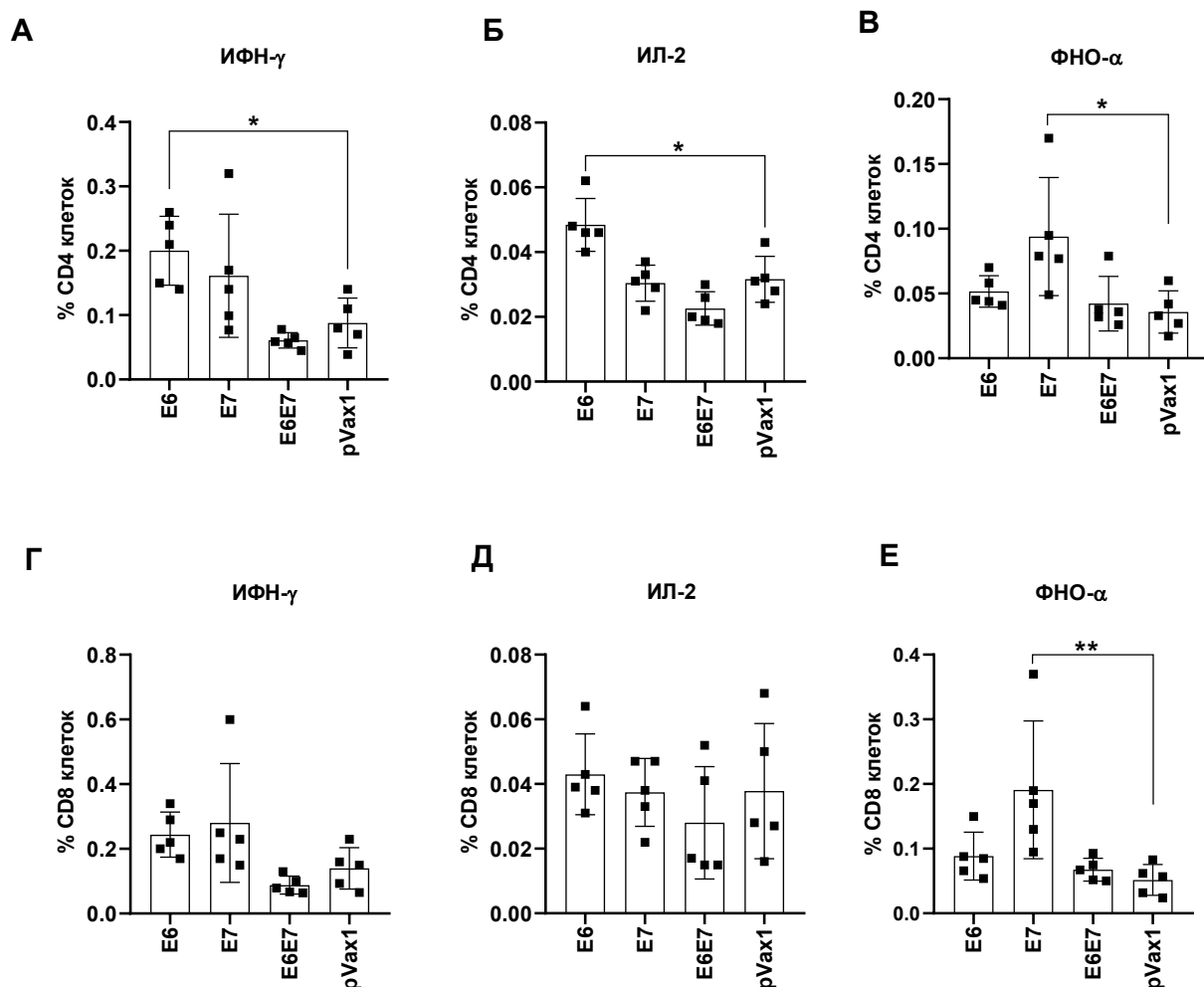
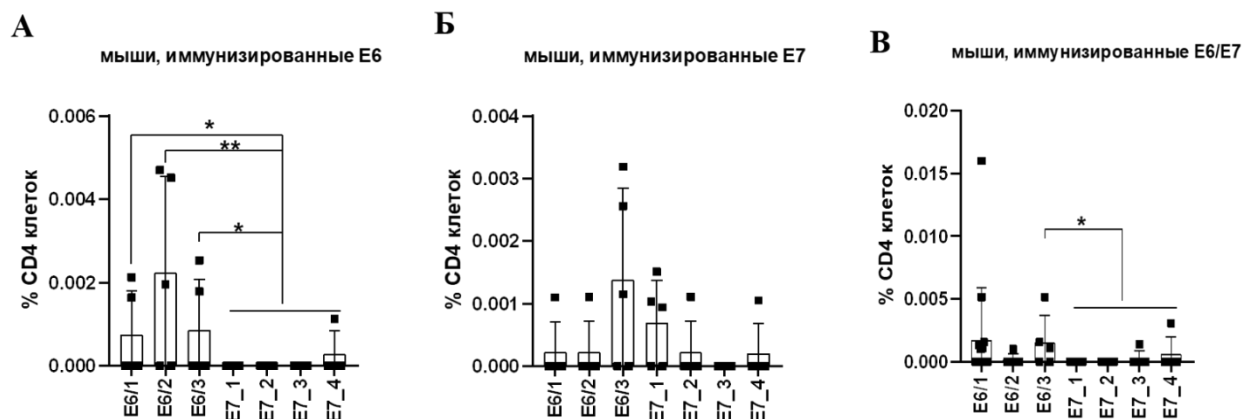


Рисунок 23 – Процент CD4+ (А–В) и CD8+ (Г–Е) Т-клеток, продуцирующих ИФН-γ (А, Г), ИЛ-2 (Б, Д) и ФНО-α (В, Е) среди спленоцитов мышей через 2 недели после ДНК-иммунизации плазмидами, кодирующими Е6 и Е7 ВПЧ16 или пустым вектором pVax1 (серия ОИ_Е6Е7), после 6 часов инкубации в культуральной среде. Все значения в группах представлены как среднее значение ± СО. Статистический анализ проводили попарным сравнением с использованием критерия Манна-Уитни, *— $p < 0,05$; **— $p < 0,01$

В силу высокого фона, специфический иммунный ответ оценивали по секреции тройных цитокинов ИФН-γ/ИЛ-2/ФНО-α. ДНК-иммунизация Е6 индуцировала полифункциональные (продуцирующие ИФН-γ/ИЛ-2/ФНО-α) специфические CD4+ Т-клетки, распознающие множество эпитопов белка Е6 (Рисунок 24А). Ответ CD8+ Т-клеток не детектировался (Рисунок 24Д). У мышей, ДНК-иммунизированных Е7, специфический иммунный ответ не детектировался (Рисунок 24Б, Е). ДНК-иммунизация Е6/Е7 индуцировала полифункциональные CD4+ Т-клетки только против С-концевого участка белка Е6 (область 110-158 а. о., пул Е6/3, Рисунок 24В), специфический ответ CD8+ Т-клеток не детектировался (Рисунок 24Ж). У мышей, ДНК-иммунизированных пустым вектором, специфический иммунный ответ не детектировался (Рисунок 24Г, З).

При анализе иммунного ответа отдельных мышей было выявлено, что четыре мыши (80%) в группе, получавшей ДНК Е6, отвечали на стимуляцию по крайней мере одной из смеси пептидов из состава белка Е6 (Рисунок 24И). В группе мышей, получавших смесь ДНК Е6/Е7, на стимуляцию смесями пептидов из состава белка Е6 ответило 3 мыши (60%), а на стимуляцию пептидами из состава белка Е7 – одна мышь (20%) (причем эта же мышь отвечала и на стимуляцию смесью пептидов из состава белка Е6 (Рисунок 24И)). Хотя общая доля мышей, реагирующих на стимуляцию смесями пептидов из состава белка Е6, в группах, получавших ДНК только Е6 и смеси ДНК Е6/Е7, не отличался (4/5 против 3/5), суммарный процент специфических CD4⁺ Т-клеток в группе ДНК-иммунизированных Е6/Е7 был несколько ниже ($p=0,08$, теста Фишера) [306].

Таким образом, ДНК-иммунизация Е6 индуцировала исключительно CD4⁺ (но не СВ8⁺) Т-клеточный ответ по Th1-типу, сопровождающийся продукцией тройных цитокинов ИНФ- γ /ИЛ-2/ФНО- α . Никакого специфичного Т-клеточного ответа против Е7 не наблюдалось. Нестимулированные спленоциты реципиентов ДНК Е7 секретировали высокий уровень ФНО- α , характерного маркера воспаления. Важно отметить, что ДНК-иммунизация Е6 и Е7, даже доставленными в виде отдельных инъекций, приводила к снижению иммунного ответа против Е6 по сравнению с мышами, ДНК-иммунизированными только Е6. Данный эффект мог быть обусловлен как меньшей вводимой дозой ДНК Е6, так и системным подавлением иммунного ответа, вызванным Е7.



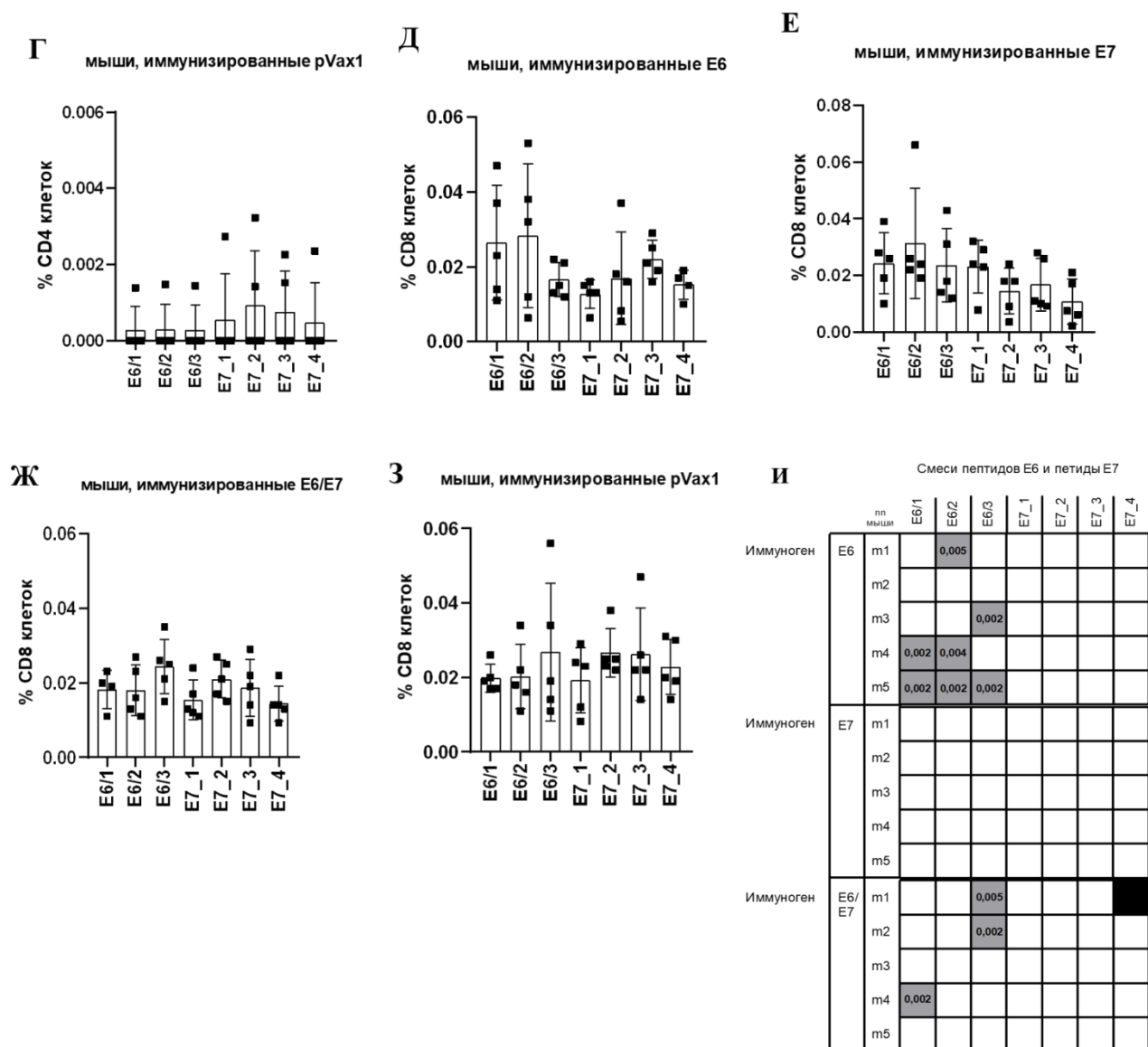


Рисунок 24 – Распознавание пептидов из состава белков E6 и E7 ВПЧ16 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками мышей, ДНК-иммунизированных E6, E7, E6/E7 ВПЧ16 или пустым вектором pVax1 (серия ОИ_E6E7). Секретция тройных цитокинов ИФН- γ /ИЛ-2/ФНО- α CD4⁺ (А, Б, В, Г) и CD8⁺ (Д, Е, Ж, З) Т-клетками ДНК-иммунизированных мышей: ДНК-иммунизированных E6 (А, Д), E7 (Б, Е), E6/E7 ВПЧ16 (В, Ж) или пустым вектором pVax1 (Г, З). (И) Продукция тройных цитокинов ИФН- γ /ИЛ-2/ФНО- α Т-клетками спленоцитов отдельных мышей в ответ на стимуляцию как минимум одной смесью пептидов E6 (серые квадраты), как минимум одним из пептидов E7 (черные квадраты). Числа в серых квадратах показывают % реагирующих клеток. Не реагирующие мыши обозначены белым цветом. Данные на панелях А–З представлены как среднее значение $\pm$ 3СО. Статистический анализ парных сравнений на панелях А–З проводился с использованием критерия Манна-Уитни, *— $p < 0,05$; **— $p < 0,01$

Результаты раздела 3.5 опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [306].

3.6 Оценка терапевтического потенциала разработанных ДНК-иммуногенов на модели TC-1/luc2

Наиболее широко используемой моделью для тестирования терапевтических ВПЧ вакцин на основе E6 и E7 является клеточная линия TC-1, экспрессирующая E6 и E7 ВПЧ16, и ее клон, TC-1/luc2, экспрессирующий рекомбинантную люцифразу [6], позволяющий мониторировать рост опухоли и ее метастазирование *in vivo*. Модель TC-1/luc2 позволяет провести оценку функциональности иммунного ответа против E6 и E7 ВПЧ16, а именно, его способности ограничивать рост опухолевых клеток, экспрессирующих E6 и E7.

Мышам линии C57Bl/6 вводили клетки TC-1/luc2, в дозе ранее использованной Т.С. Wu и соавторами в аналогичных экспериментах [331]. Через три и шесть дней после имплантации мышей ДНК-иммунизировали E6 или E7 или сочетанием E6 и E7, введенных отдельными инъекциями (E6/E7) методом ВКИ/ЭЛП. Контрольные мыши получали пустой вектор pVax1 или ФСБ (Таблица 9, серия ИМПЛАНТ-ТС-Т). В конечной точке эксперимента оценивали объем сформировавшихся опухолей и их метастатическую активность, т.е. способность мигрировать в легкие, печень и селезенку. Выбор данных органов для скрининга был обусловлен высокой частотой распространения метастазов в эти органы у пациентов с ВПЧ-ассоциированными злокачественными заболеваниями [39; 41; 332; 333]. Инфильтрацию опухолевыми клетками органов (лёгких, селезёнки и печени) оценивали методом биолуминесцентной визуализации *ex vivo*.

ДНК-иммунизация E6 подавляла рост опухолей, тогда как ДНК-иммунизация E7 или комбинацией E6 и E7 не оказывали никакого эффекта (Рисунок 25А). У всех животных уровни биолуминесцентного сигнала от органов не превышал фоновых значений, т.е. инфильтрация опухолевыми клетками в дистальные органы (и метастазирование) не наблюдалась (Рисунок 25Б).

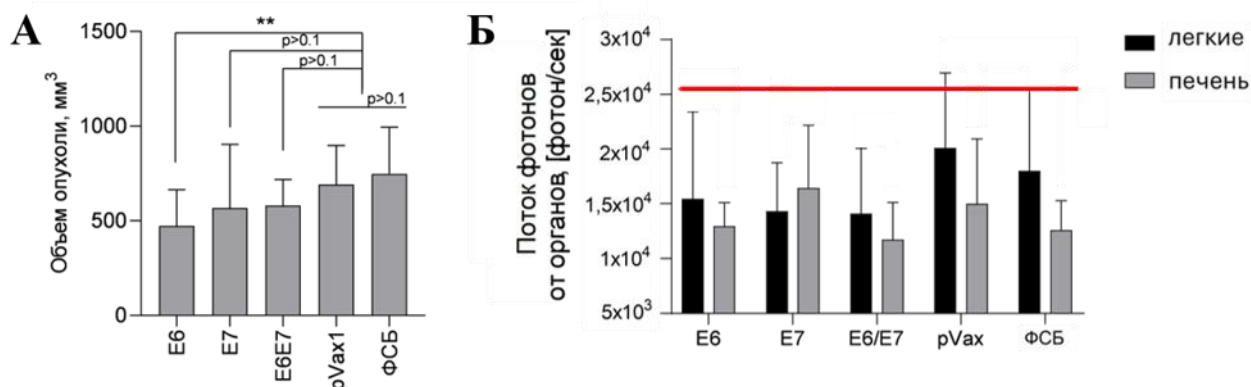
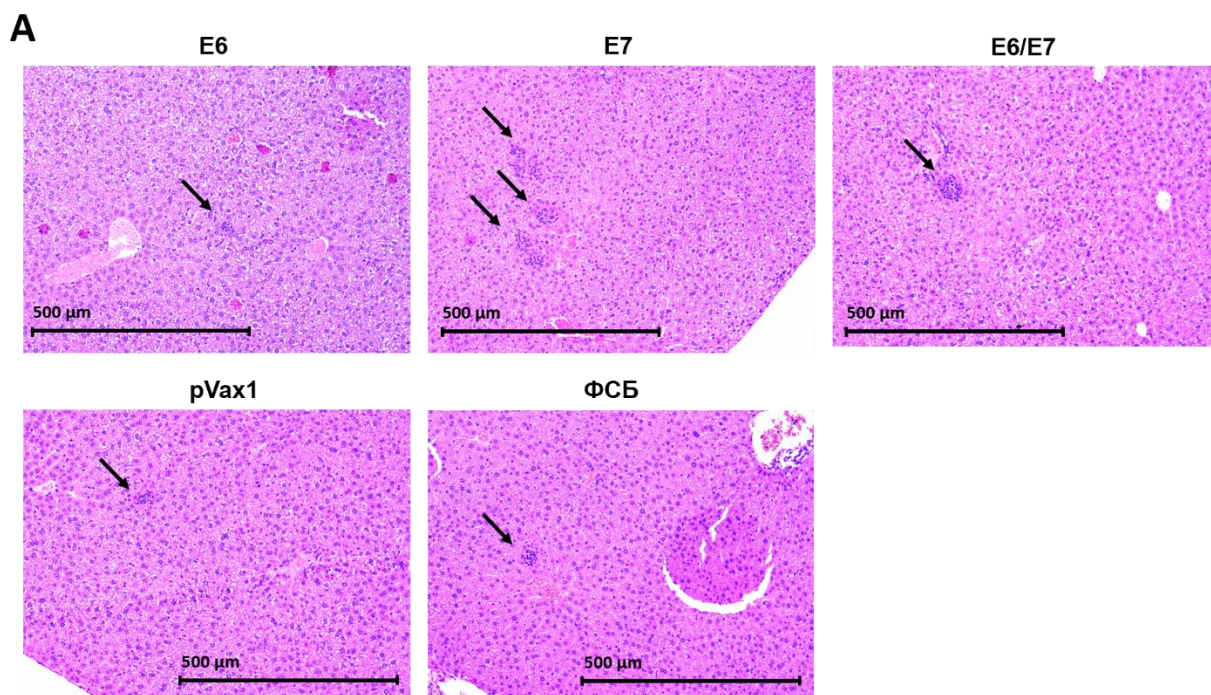


Рисунок 25 – Образование опухолей и миграция в дистальные органы клеток TC-1/luc2 у мышей, на фоне терапевтической ДНК-иммунизации E6, E7, E6/E7. Контрольные мыши получали пустой вектор pVax1 или ФСБ (серия ИМПЛАНТ-ТС-Т, n=5 для всех групп). (А) Конечные объемы опухолей на 21-й день. (Б) Инфильтрация органов опухолевыми клетками

ТС-1/luc2, оцененная методом BLI *ex vivo*. Красной линией отмечен уровень фонового биолюминесцентного сигнала органов [313]. Все значения представлены в виде среднего значения $\pm$ СО. Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна-Уитни, **— $p < 0,01$, ns – не значимо

Дополнительно был проведен гистохимический скрининг печени для оценки влияния ДНК-иммунизации на орган, поскольку мыши C57Bl/6 высоковосприимчивы к повреждению печени [334]. Все печени фиксировали в 10% забуференном формалине и заливали в парафин. От каждого блока в группе отделяли 5 срезов толщиной 5 мкм с интервалом 20 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Далее проводили анализ пяти полей зрения каждого среза (всего 125 полей зрения на группу) на наличие в них иммунных инфильтратов. У всех мышей были обнаружены иммунные инфильтраты в печени (ИИП) (Рисунок 26А), похожие на эпителиоидные клетки (гистоциты). Среднее количество иммунных инфильтратов на группу не различалось (Рисунок 26Б). Однако, в печени контрольных мышей, получавших ФСБ и pVax1, общее количество ИИП было достоверно ниже, чем в группах мышей, получавших ДНК Е6 и Е7 ($p < 0,0001$). Достоверных различий с группой мышей, получавших ДНК Е6/Е7 отмечено не было ($p > 0,1$, Рисунок 26В). Интересно также, что общее количество ИИП у мышей, ДНК-иммунизированных Е7, было несколько выше, чем у мышей, получивших ДНК Е6 ($p = 0,1$, Рисунок 26В).



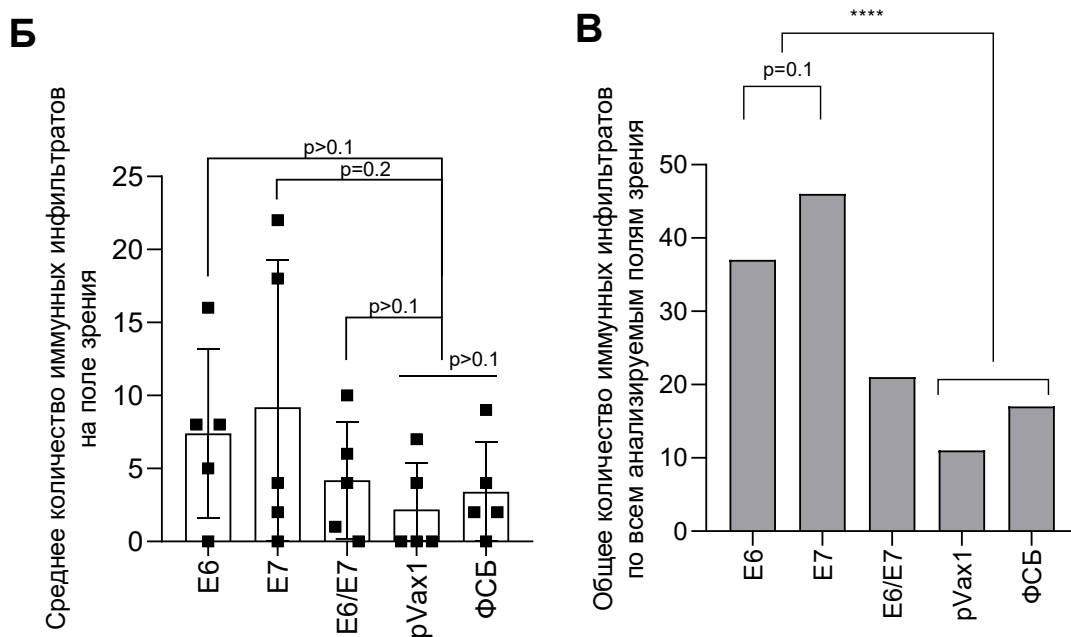


Рисунок 26 – Наблюдаемые иммунные инфильтраты в печени мышей с имплантированными клетками TC-1/luc2 и последующей ДНК-иммунизацией E6, E7, E6/E7, пустым вектором pVax1 или ФСБ (серия ИМПЛАНТ-ТС-Т). (А) Репрезентативные изображения FFPE-срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, увеличение 10×. Введенный ДНК-иммуноген приведен в подписи над изображениями. (Б) Среднее количество иммунных инфильтратов на поле зрения (n=5 на мышь). (В) Общее количество иммунных инфильтратов во всех анализируемых полях зрения (n=25). Каждая мышь представлена пятью предметными стеклами с пятью полями на каждое стекло. Срезы толщиной 5 мкм были выполнены последовательно с интервалом 20 мкм. Анализ выполняли с помощью теста Манна-Уитни (панель Б); по критерию Хи-квадрат (панель В), **** - $p < 0,0001$

Таким образом, ДНК-иммунизация полученным в работе конструктором E6 ограничивала рост опухолей, E7 – не имела эффекта. Модель не позволяла оценить влияние ДНК-иммунизации на процесс метастазирования. Было показано, что ДНК-иммунизация белками E6 и E7, в особенности E7, вызывала воспалительную реакцию в печени.

Результаты данного раздела опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [306].

3.7 Создание новой мышинной модели опухолевых клеток, экспрессирующих *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа

3.7.1 Получение производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1*Luc2*, экспрессирующих *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа

Неспособность модели ТС-1/*Luc2* к метастазированию обуславливала необходимость создания новой модели на основе ОМК для испытания терапевтических вакцин на основе *E6* и *E7* на противоопухолевую и антиместастатическую активность.

3.7.1.1 Дизайн лентивирусного вектора, кодирующего *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа, и получение экспрессирующих его лентивирусных частиц

Для создания новой модели ОМК необходимо было получить лентивирусный вектор, кодирующий гены *E6* и *E7* ВПЧ16, который бы обеспечивал их стабильную экспрессию. Это в первую очередь определяется промотором. Нами был выбран промотор фактора элонгации трансляции 1 альфа человека (EF1 α), поскольку он содержит элемент Sp1 [335; 336]. *E6* связывается с Sp1 и активирует промотор [337]. Таким образом, *E6* саморегулирует экспрессию.

Последовательности, кодирующие гены *E6* и *E7* ВПЧ16 из состава плазмиды rHPV16 с сохранением участка реинициации трансляции *E7*, встраивали под контроль промотора EF1 α в лентивирусный вектор rLJM1-EGFP (Рисунок 7). Лентивирусные частицы получали путем ко-трансфекции клеток НЕК293Т бицистронным лентивирусным вектором и хелперными плазмидами. Инфекционный титр полученных лентивирусных частиц, несущих гены *E6* и *E7* ВПЧ16, составлял около 3×10^6 Т.Е./мл.

3.7.1.2 Выбор клеточной основы для модели опухолевых мышинных клеток

Оптимальная клеточная платформа для модели МОК должна была обладать следующими характеристиками: (1) расти в доступных стандартных линиях мышей; (2) обладать известными характеристиками *in vivo* и *in vitro*; (3) относительной генетической стабильностью; (4) стабильно образовывать опухоли в мышах; (5) метастазировать в дистальные органы; (6) стабильно экспрессировать чужеродные гены [241; 303; 338]. Всем этим пунктам удовлетворяли клетки 4T1 [270; 271]. Нами был выбран субклон 4T1, экспрессирующий *Luc*, позволяющий проводить оценку роста опухоли *in vivo*, а также оценивать миграцию опухолевых клеток в дистальные органы *ex vivo*.

3.7.1.3 Создание производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

Клетки 4T1luc2 трансдуцировали полученными на предыдущем этапе лентивирусными частицами с множественностью инфекции 20 Т.Е./клетку. Во время трансдукции признаков цитотоксичности выявлено не было. После трансдукции полученные гетерогенные культуры были клонированы до одиночных клеток. Методом ПЦР с парой праймеров, специфичных к участку генов E6/E7 (Таблица 2), отбирали клоны, имеющие вставки ДНК, кодирующей E6 и E7 ВПЧ16.

3.7.1.4 Оценка количества геномных вставок E6 и E7 в субклонах линии 4T1luc2

Для определения количества вставок ДНК E6 и E7 проводили цкПЦР четырех случайно выбранных клонов (названных B2, H6, D10 и H12). Анализ проводили путем определения количества копий локусов-мишеней, E6 и E7, относительно инвариантных референсных локусов, глицеральдегида-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*) и бета-актина (β -актина) мыши (*Actb*) (Таблица 2).

Все субклоны имели по одной вставке ДНК E6 и E7 (Рисунок 27).

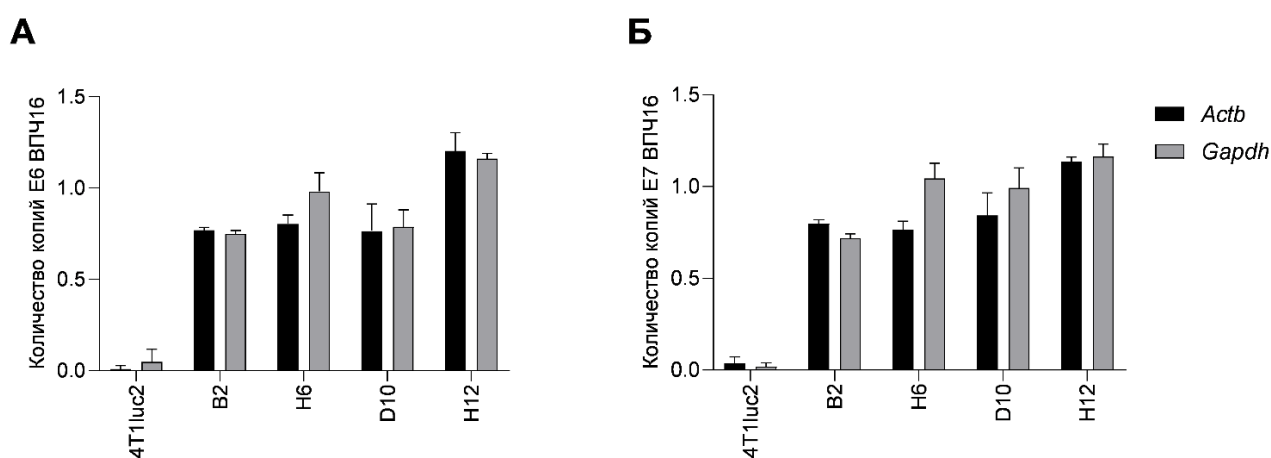


Рисунок 27 – Результат определения количества копий ДНК E6 и E7 ВПЧ16 в четырех субклонах линии 4T1luc2 (B2, H6, D10 и H12) методом цкПЦР по отношению к инвариантным генам *Actb* и *Gapdh*

3.7.2 In vitro характеристика 4T1luc2 клонов со вставками ДНК E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

3.7.2.1 Оценка уровней экспрессии мРНК E6 и E7 в субклонах линии 4T1luc2

Для оценки общего уровня синтеза мРНК E6 и E7 были выбраны праймеры, специфичные к участку мРНК, не затрагиваемого сплайсингом (Таблица 2). Субклоны различались по уровню экспрессии мРНК тотального E6 от 1,3 до 15,8 раз и по уровню

экспрессии мРНК *E7* от 2,9 до 5,5 раз. При этом, во всех субклонах уровни экспрессии мРНК *E6* превышали уровни экспрессии мРНК *E7* (Таблица 12).

Таблица 12 – Уровни экспрессии мРНК общего *E6* и *E7* в субклонах 4T1luc2, содержащих вставку *E6/E7* ВПЧ16. Уровни экспрессии мРНК *E6* и *E7* были нормализованы к гену гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы 1 мыши *Hprt1*, как одного из наиболее стабильных генов домашнего хозяйства в клетках опухоли 4T1 и мышинных тканях [339; 340]. Данные представлены как среднее по крайней мере двух независимых измерений + СО, N/A – не предусмотрено (not applicable)

Параметр ПЦР	Клетки				
	4T1luc2	B2	H6	D10	H12
Ct (<i>Hprt1</i>)	20,65±0,23	20,36±0,12	20,98±0,04	20,36±0,38	20,65±0,04
Ct (<i>E6</i>)	N/A	27,14±0,05	25,11±0,08	26,40±0,20	25,31±0,27
Ct (<i>E7</i>)	N/A	28,37±0,02	26,53±0,01	27,43±0,11	28,12±0,06
ΔCt (<i>E6</i>)	N/A	6,78± 0,01	4,13± 0,15	6,04±0,20	4,67±0,08
ΔCt (<i>E7</i>)	N/A	8,01± 0,11	5,55± 0,25	7,07±0,11	7,47±0,03
Отношение уровней экспрессии тотального <i>E6</i> к <i>E7</i>					
$2^{-\Delta Ct (E6)}$	N/A	0,009± 6,3E-05	0,057± 0,006	0,015± 0,002	0,040± 0,007
$2^{-\Delta Ct (E7)}$	N/A	0,004± 2,9E-04	0,021± 0,004	0,007± 5,5E-04	0,006± 2,9E-04
$\frac{2^{-\Delta Ct (E6)}}{2^{-\Delta Ct (E7)}}$	N/A	2,349± 0,162	2,680± 0,186	2,051± 0,175	7,048± 0,126

3.7.2.2 Изменения уровней экспрессии мРНК *E6* и *E7* в клетках, экспрессирующих *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа при длительном культивировании

Поскольку созданные субклоны планировалось использовать для оценки защитного и терапевтического потенциала ДНК-вакциных констуктов, важно было оценить стабильность экспрессии *E6* и *E7* в клетках при длительном культивировании. Оценку стабильности уровней *E6* и *E7* всех полученных субклонов 4T1luc2 проводили путем сравнения уровней экспрессии мРНК тотального *E6* и *E7* в ранних (10-й пассаж) и поздних пассажах (40-й пассаж) клеток. Все клетки культивировались параллельно. В качестве референсного гена домашнего хозяйства использовали ген гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы 1 мыши *Hprt1* [341], поскольку он одинаково хорошо функционирует как в нормальных, так и опухолевых клетках

мышь [339; 340]. Уровни экспрессии как *E6*, так и *E7* в ходе длительного культивирования увеличились (Рисунок 28), что свидетельствует не о подавлении экспрессии, а, напротив, об усилении экспрессии данных генов с промотора *EF1 α* .

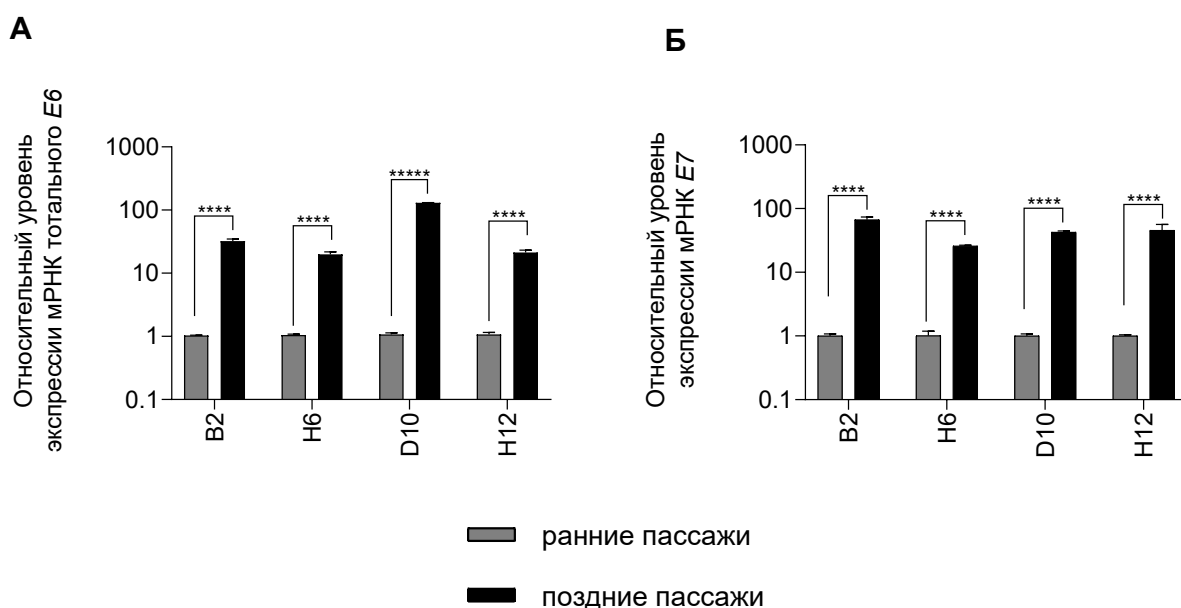


Рисунок 28 – Относительные уровни экспрессии мРНК тотального *E6* (А) и *E7* (Б) в ранних (n=10) и поздних (n=40) пассажах субклонов 4T1luc2, содержащих вставку *E6E7* ВПЧ16. Уровни экспрессии были нормализованы по экспрессии мРНК к гену *Hprt1*, уровни экспрессии мРНК в поздних пассажах рассчитаны как кратность изменения по сравнению с уровнями экспрессии в ранних пассажах. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ СО. **** – $p < 0,0001$; непарный t-критерий с поправкой Бонферрони

Период культивирования клеток TC-1/luc2 с момента создания в 2007 году неизвестен. В силу этого имеющиеся клетки TC-1/luc2 сравнили с «поздним пассажем» 4T1luc2 субклонов. Было обнаружено, что уровень экспрессии *E6* в клетках TC-1/luc2 в 5–20 раз ниже, а уровень экспрессии *E7* – в 8–16 раз ниже, чем в клетках субклонов 4T1luc2 (Таблица 13).

Таблица 13 – Уровни экспрессии мРНК тотального *E6* и *E7* в поздних пассажах субклонов 4T1luc2, содержащих вставку *E6/E7* ВПЧ16 и клетках TC-1/luc2. Уровни экспрессии мРНК *E6* и *E7* были нормализованы к гену *Hprt1*, как одного из наиболее стабильных генов домашнего хозяйства в клетках опухоли 4T1 и тканях мыши [339–341]. Данные представлены как среднее по крайней мере двух независимых измерений $\pm$ СО, N/A – не предусмотрено (not applicable)

Параметр ПЦР	Клетки					
	4T1luc2	B2	H6	D10	H12	TC-1/luc2
Ct (<i>Hprt1</i>)	20,65 $\pm$ 0,23	23,00 $\pm$ 0,08	23,84 $\pm$ 0,05	24,68 $\pm$ 0,03	24,00 $\pm$ 0,08	23,82 $\pm$ 0,34

Продолжение Таблицы 13

Параметр ПЦР	Клетки					
	4T1luc2	B2	H6	D10	H12	TC-1/luc2
Ct (E6)	N/A	24,39±0,10	22,47±0,11	23,69±0,01	24,27±0,13	26,79±0,11
Ct (E7)	N/A	24,95±0,15	24,71±0,04	26,33±0,06	26,00±0,36	28,73±0,04
Δ Ct (E6)	N/A	1,39±0,10	-1,37±0,11	-0,99±0,01	0,26±0,13	2,96±0,12
Δ Ct (E7)	N/A	1,95±0,15	0,86±0,04	1,65±0,06	1,99±0,36	4,91±0,05
Соотношение уровней экспрессии мРНК тотального E6 и E7						
$2^{-\Delta\text{Ct (E6)}}$	N/A	0,38±0,03	2,58±0,19	1,99±0,02	0,83±0,08	0,13±0,01
$2^{-\Delta\text{Ct (E7)}}$	N/A	0,26±0,03	0,55±0,02	0,32±0,04	0,25±0,12	0,03±0,01
$2^{-\Delta\text{Ct (E6)}/}$ $2^{-\Delta\text{Ct (E7)}}$	N/A	1,46±0,03	4,69±0,07	6,25±0,09	3,32±0,23	4,33±0,01
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct (E6)}}$	N/A	2,96±0,22	20,09±2,07	15,45±0,16	6,52±0,61	1,01±0,16
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct (E7)}}$	N/A	7,79±0,81	16,53±0,49	9,56±0,41	7,71±1,84	1,01±0,20

Полученные результаты подтвердили, что выбранный промотор EF1 α является оптимальным для обеспечения высокого уровня экспрессии E6 и E7 в субклонах 4T1luc2 при длительном культивировании. Полученные субклоны стабильно экспрессировали E6 и E7 в количестве на порядок превышающих уровни экспрессии в клетках TC-1/luc2.

2.7.2.3 Анализ распределения сплайсированных изоформ E6 в клетках, экспрессирующих E6 и E7 вируса папилломы человека 16 типа

Посредством альтернативного сплайсинга полицистронной пре-мРНК, кодирующей белки E6 и E7, производятся различные сплайсированные транскрипты E6, играющие важную роль в патогенезе ВПЧ-инфекции [82]. Поэтому нам важно провести анализ распределения основных сплайсированных изоформ E6 в клетках субклонов 4T1luc2 и клетках TC-1/luc2 [82].

Используя пары праймеров, специфичных к участкам сплайсированных транскриптов E6, а также только к полноразмерной форме E6 (E6FL) (Рисунок 8), мы измерили уровни экспрессии мРНК E6*I, E6*II и E6FL в ранних и поздних пассажах (10 и 40, соответственно) субклонов линии 4T1luc2 в сравнении с клетками TC-1/luc2 в одной временной точке (позднем пассаже). Как ранние, так и поздние пассажи всех субклонов линии 4T1luc2 экспрессировали все три основные формы E6: E6*I, E6*II и полноразмерный E6FL.

Относительные уровни экспрессии *E6*I* и *E6*II* поздних пассажей всех субклонов линии 4T1luc2 были снижены по сравнению с таковыми в ранних пассажах (Рисунок 29А, Б). Относительные уровни экспрессии *E6FL* увеличились со временем во всех субклонах (Рисунок 29В).

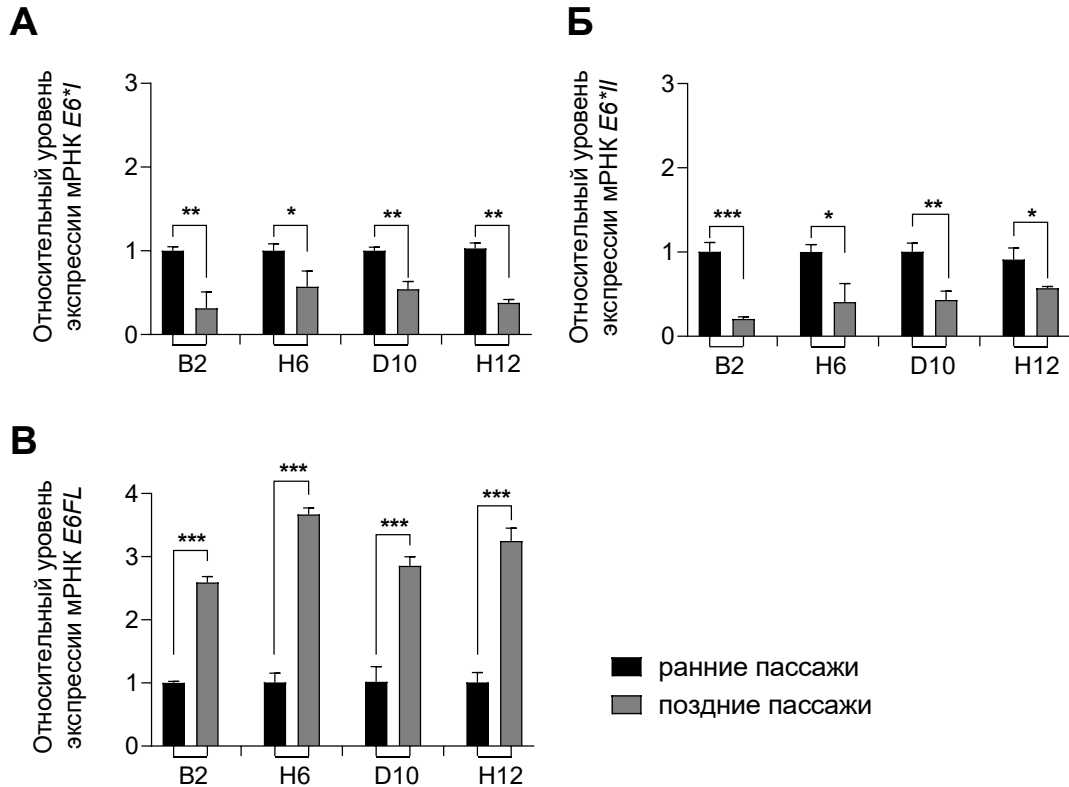


Рисунок 29 – Относительные уровни экспрессии мРНК изоформ Е6 и полноразмерного Е6 ВПЧ16 в ранних (n=10) и поздних (n=40) пассажах субклонов 4T1luc2, содержащих вставку Е6Е7 ВПЧ16. (А) изоформы *E6*I*; (Б) изоформы *E6*II*; (В) полноразмерного Е6, *E6FL*. Уровни экспрессии нормализованы по экспрессии мРНК к гену *Hprt1*, уровни экспрессии мРНК в поздних пассажах рассчитаны как кратность изменения по сравнению с уровнями экспрессии в ранних пассажах. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ СО. *, **, **** ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,0001$; непарный t-критерий с поправкой Бонферрони)

Анализ соотношения изоформ Е6 в исследуемых клетках показал, что в ранних пассажах всех субклонов линии 4T1luc2 преобладала изоформа *E6*I* (Рисунок 30). В двух поздних субклонах линии 4T1luc2, D10 и H12 наблюдались практически равные доли содержания изоформы *E6*I* и полноразмерного транскрипта *E6FL* (Рисунок 30). В позднем субклоне В2 доля полноразмерной формы *E6FL* несколько превышала долю изоформы *E6*I* (Рисунок 30). В позднем субклоне Н6 сохранялось существенное преобладание доли изоформы *E6*I* над другими транскриптами (Рисунок 30). В клетках ТС-1/luc2, оцененных в одной временной точке, учтенной как «поздний пассаж», преобладающим являлся полноразмерный транскрипт *E6FL* (Рисунок 30).

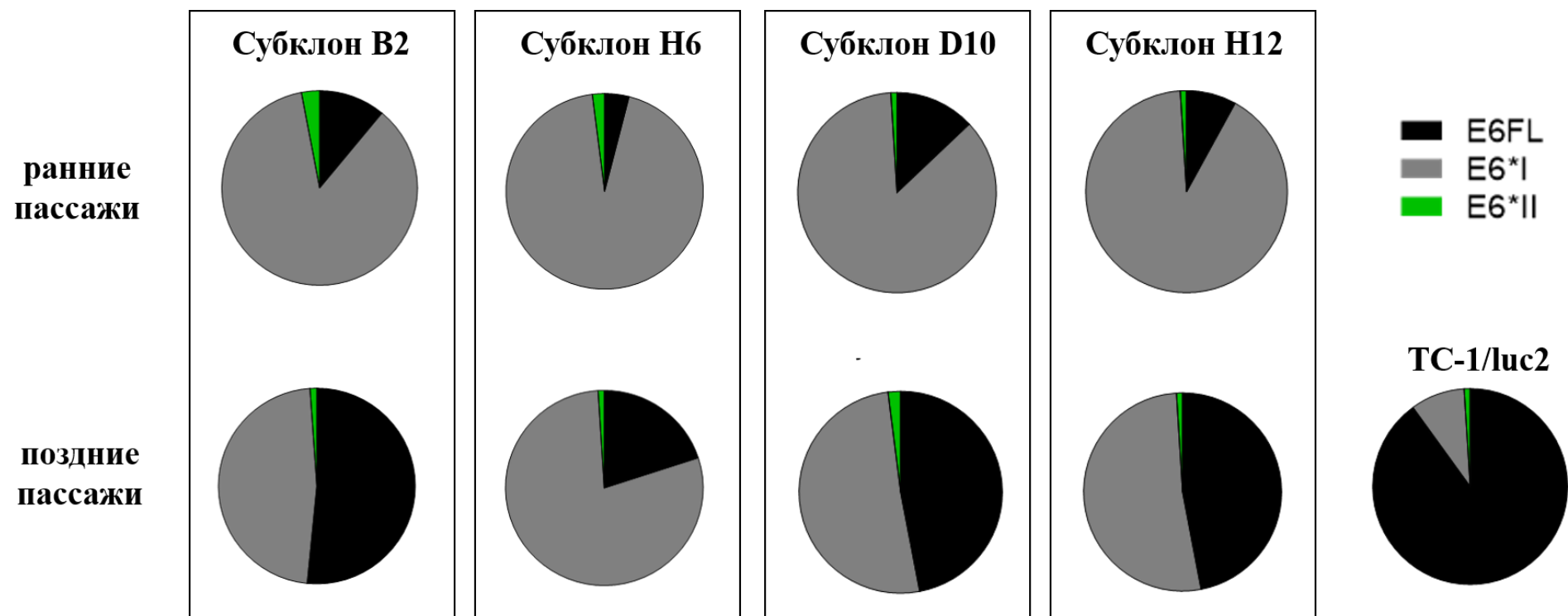


Рисунок 30 – Распределение изоформ E6 ВПЧ16 E6*I, E6*II, а также его полноразмерной формы E6FL по уровням их мРНК экспрессии в ранних (верхний ряд) и поздних (нижний ряд) пассажах четырех субклонов линии 4T1luc2 (B2, H6, D10, H12) и позднем пассаже клеток TC-1/luc2

Таким образом, в отличие от клеток ТС-1/luc2, поздние пассажи субклонов линии 4T1luc2, содержащие вставку E6E7 ВПЧ16, экспрессировали не только высокие уровни мРНК *E6* и *E7*, увеличивающиеся во времени, но также экспрессировали основные изоформы *E6*, в частности *E6*I* и *E6*II*, играющие существенную роль в патогенезе ВПЧ-инфекции. В совокупности, эти признаки имитировали естественно инфицированные ВПЧ16 опухолевые клетки.

3.7.3 *In vivo* характеристика клеток, экспрессирующих *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа

3.7.3.1 Туморогенный потенциал субклонов линии 4T1luc2 экспрессирующих *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа

Для проверки, могут ли субклоны клеток 4T1luc2, экспрессирующие *E6* и *E7* ВПЧ16, образовывать солидные опухоли, четыре субклона В2, Н6, D10 и Н12 имплантировали мышам линии BALB/с подкожно в один сайт в количестве 1×10^4 клеток. Контрольной группе мышей имплантировали родительские клетки 4T1luc2 в той же дозе (серия ИМПЛАНТ-4Т1). Ранее было показано, что доза 1×10^4 клеток является оптимальной для субклонов 4Т1 [243]. С момента формирования пальпируемых опухолей, их размер определяли морфометрически. Все полученные субклоны показали 100% приживаемость. Кривые роста всех четырех субклонов (построенные по результатам мониторинга биолуминесцентного сигнала *in vivo*) не отличались от таковых родительских клеток, выходили на плато на 14й день эксперимента (Рисунок 31А). В экспериментальной конечной точке формировали опухоли объемом до 1 см³, без значимых отличий в размере от опухолей 4T1luc2 (Рисунок 31Б). По своей структуре все опухоли представляли собой низкодифференцированные аденокарциномы солидной структуры со слабой лимфоидной инфильтрацией, с небольшими очагами некроза и врастанием мышечной ткани. Типичные морфологические структуры сформированных субклонами опухолей были неотличимы от опухолей, образованных родительскими клетками (показано на примере опухолей, образованных субклонами В2 и Н6; Рисунок 31В, Г, Д, соответственно).

По одной опухоли из каждой группы проанализировали на предмет экспрессии мРНК тотального *E6* и *E7*. Все опухоли экспрессировали схожие уровни мРНК тотального *E6* и *E7* со значениями ΔC_t в диапазоне от 8 до 9,6 (Рисунок 31Е).

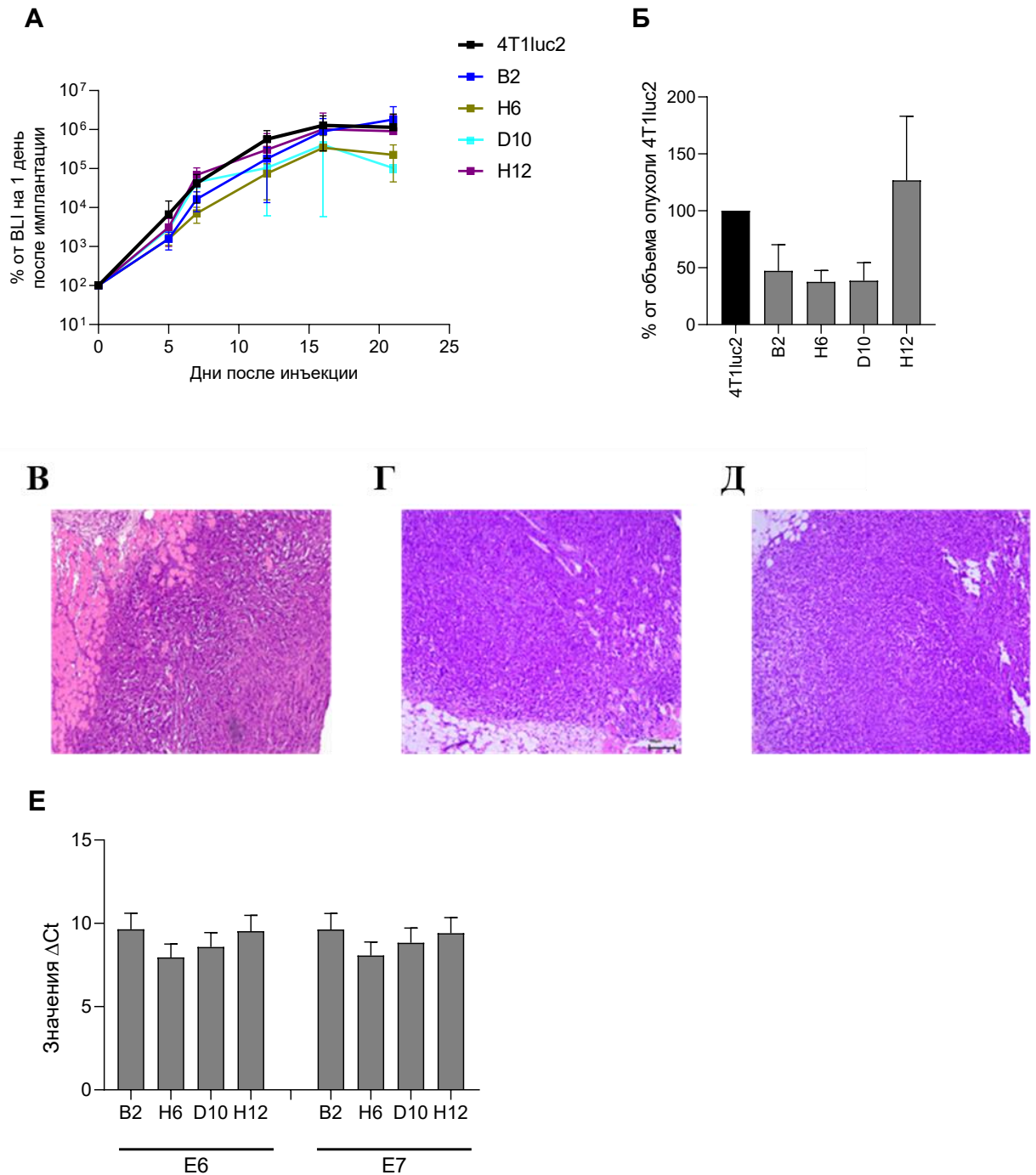


Рисунок 31 – Туморогенный потенциал субклонов линии 4T1luc2, экспрессирующих E6/E7 ВПЧ16, после подкожной имплантации сингенным мышам линии BALB/c (серия ИМПЛАНТ-4T1). (А) Кинетика нарастания биолуминесцентного сигнала от участков введения опухолевых клеток, оцененная с помощью *in vivo* биолуминесцентной визуализации (BLI). (Б) Объёмы опухолей в экспериментальной конечной точке (21-й день после имплантации), выраженные как процент от среднего объёма опухолей, образованных у мышей, имплантированных клетками 4T1luc2. (В, Г, Д) Гистологическая характеристика солидных опухолей, образованных субклонами B2 (В) и H6 (Г) в сравнении с опухолями, образованными родительскими клетками 4T1luc2 (Д) (окрашивание гематоксилин и эозин, увеличение 10×). (Е) Уровни экспрессии мРНК тотального E6 и E7 на примере одной опухоли из каждой группы, оценённых с помощью метода ПЦР-РВ с использованием РНК, выделенной из 10 последовательных срезов опухоли толщиной 4 мкм. Данные представлены как средние для минимум трех измерений $\pm CO$

3.7.3.2 Миграция опухолевых клеток, экспрессирующих Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа в дистальные органы

Основным органом метастазирования ВПЧ-ассоциированных опухолей являются легкие [38; 39]. Основным органом метастазирования клеточной линии 4T1luc2 также являются легкие, несколько реже метастазы встречаются в селезенке и печени [241; 243; 324; 338]. Таким образом, метастазирование субклонов линии 4T1luc2 в легкие корректно моделирует процесс метастазирования естественных ВПЧ-ассоциированных опухолей.

Оценку миграции субклонов в дистальные органы проводили методом биолюминесцентной визуализации *ex vivo* (для всех субклонов) и специфической для Е6/Е7 *in-house* ПЦР анализом ДНК, выделенной из зафиксированных в формалине и залитых в парафин органов мыши (для двух субклонов). Орган считали инфильтрированным опухолевыми клетками, если было показано наличие опухолевых клеток в органе хотя бы одним из методов.

По результатам оценки метастазирования методом BLI, все органы содержали опухолевые клетки (Рисунок 32). Основным органом, инфильтрированным опухолевыми клетками, были легкие. От легких всех групп детектировался высокий биолюминесцентный сигнал, превышающий фоновый уровень (Рисунок 32Б). Также детектировались слабые сигналы от селезенки и печени (Рисунок 32 В и Г).

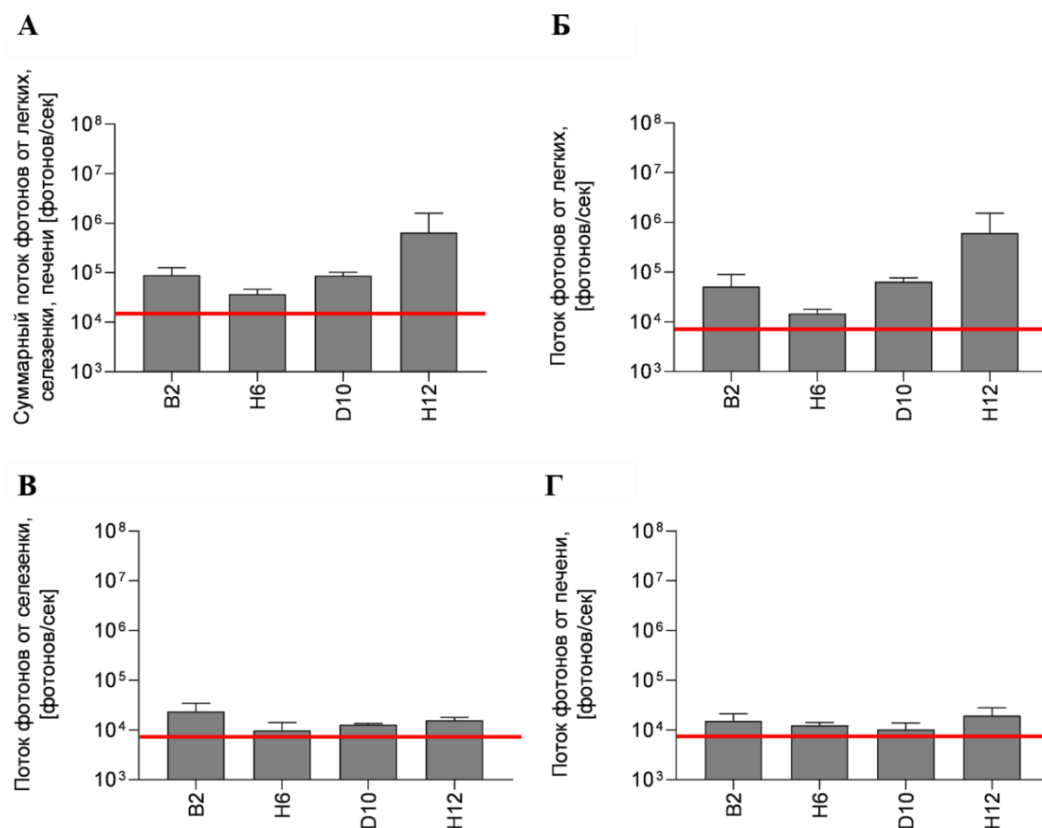


Рисунок 32 – Инфильтрация опухолевыми клетками, продуцирующими люциферазу, в дистальные органы, оцененная с помощью детекции биолюминесцентного сигнала *ex vivo*. (А)

Суммарный биолюминесцентный сигнал от трех органов (легких, печеней, селезенки) всех мышей в каждой группе. **(Б)** Биолюминесцентный сигнал от легких. **(В)** Биолюминесцентный сигнал от селезенки. **(Г)** Биолюминесцентный сигнал от печеней. Красной линией отмечен уровень фоновой биолюминесценции органов наивных мышей с введенным субстратом $\pm$ СО (n=5) [313]. Все значения представлены как среднее $\pm$ СО (n=3). Данные анализировали тестом Краскел-Уоллиса с поправкой Данна для множественного сравнения

Детальное исследование инфильтрации опухолевых клеток дистальных органов комбинированными методами ВЛ/ПЦР было проведено для двух субклонов — В2 и Н6, различающихся уровнем экспрессии мРНК тотального Е6 и Е7 (Таблица 12), а также распределением изоформ в поздних пассажах (Рисунок 33). Мы оценили органы индивидуальных мышей на наличие метастазов/опухолевых клеток. Методом ВЛ опухолевые клетки были выявлены в общей сложности в 6/8 (75%) легких (Рисунок 33А), 5/8 (62,5%) селезенках (Рисунок 33Б) и 6/8 (75%) печеней (Рисунок 33В). На основе расчетов для ВЛ (раздел Материалы и Методы) органы содержали 3–25 клеток В2 или Н6. С помощью метода количественной in-house ПЦР опухолевые клетки в тех же образцах были обнаружены в 3/8 (37,5%) легких (Рисунок 33А), 1/8 (12,5%) селезенке (Рисунок 33Б) и 3/8 (37,5%) печени (Рисунок 33В). В соответствии с калибровочной кривой для количественной in-house ПЦР, органы мышей содержали от 5 до 10, и в одном случае – 100 молекул ДНК со вставками Е6/Е7 ВПЧ16. В целом инфильтрация Е6/Е7-экспрессирующих клеток 4Т1lus2 дистальных органов была выявлена у 100% животных (Рисунок 33Г).

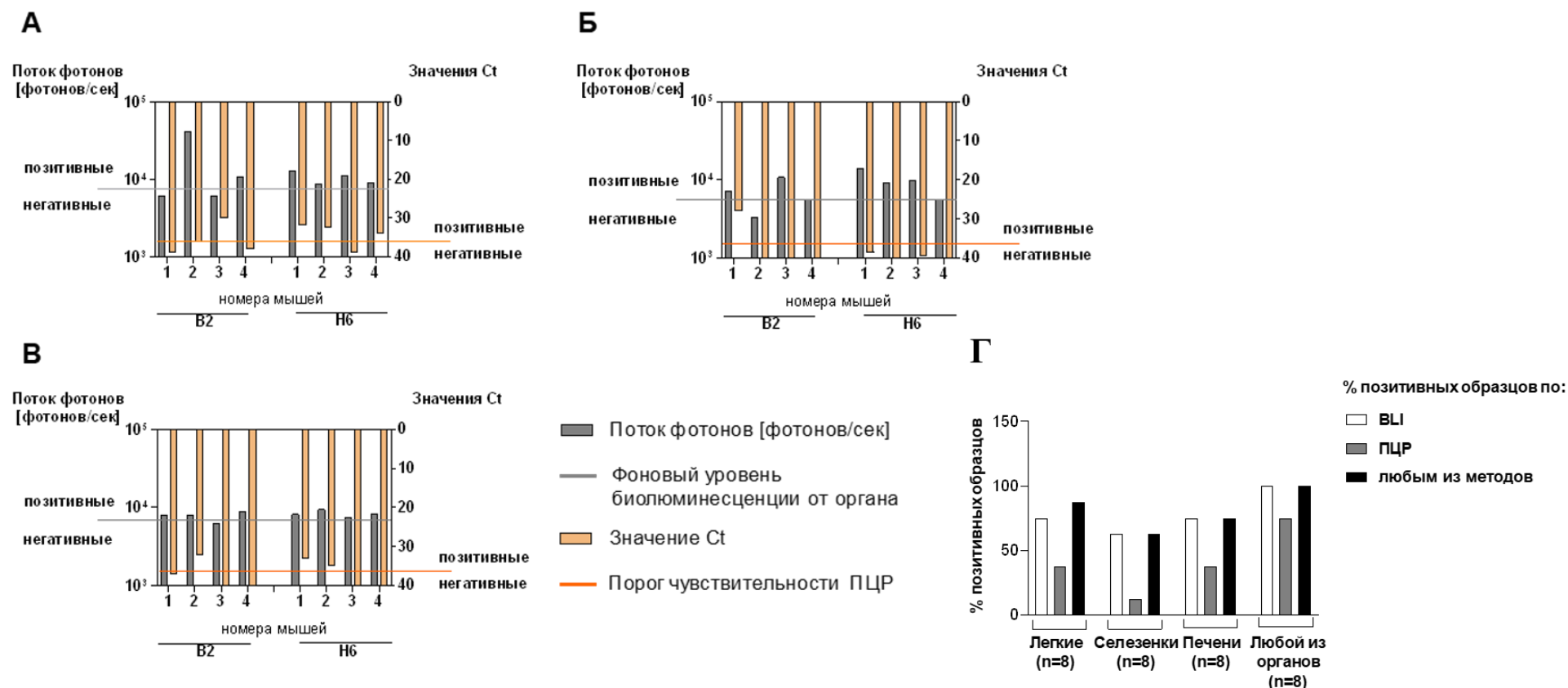
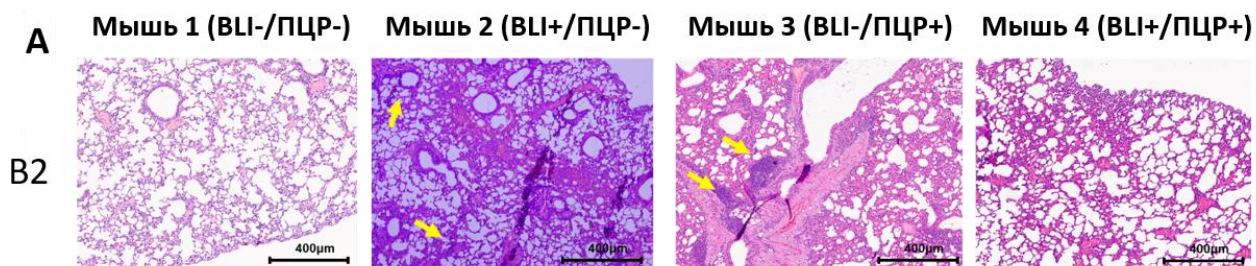


Рисунок 33 – Оценка инфильтрации органов (легких, селезенки, печени) опухолевыми клетками 4T1luc2, экспрессирующими E6/7 ВПЧ16 (субклоны B2 и H6), эктопически имплантированными мышам (n=8) линии BALB/c. (А, Б, В) Суммарный поток фотонов [фотонов/сек] от органов каждой мыши в группе (n = 4 на группу) и пороговый цикл количественной in-house ПЦР (Ct): (А) – от для легких, (Б) – от селезенки, (В) – от печени. Величины потока фотонов и Ct представлены в виде столбцов (серых и оранжевых, соответственно). Данные представлены результатами от отдельных мышей в каждой группе. Пороговый уровень автолюминесценции [313] от соответствующих органов наивных мышей (n=3) отмечен серой линией. Предел чувствительности in-house ПЦР, определенной серийными 10-кратными разведениями плазмидной ДНК pLJM1_pGK_E6E7, описанный в Материалах и методах, отмечен красной линией. (Г) Процент органов, признанных положительными с помощью *ex vivo* мониторинга биолуминесценции (представлен белыми столбцами), с помощью in-house ПЦР (представлен серыми столбцами) или любым из методов (представлен черными столбцами)

Таким образом, субклоны 4T1luc2, экспрессирующие *E6* и *E7* могли мигрировать из мест имплантации/соответствующих солидных опухолей к дистальным органам, где было обнаружено множество опухолевых клеток. Самое главное — опухолевые клетки были детектированы в основном в легких, что указывает на образование метастазов/микрометастазов в этом органе.

3.7.3.3 Гистологическая оценка органов мышей, имплантированных клетками субклонов B2 и H6

Для подтверждения наличия метастазов мы выполнили гистологический скрининг органов мышей. Гистологическому скринингу подвергнуты все органы (легкие, селезенки и печень) мышей, имплантированных клетками B2 и H6. Оценку проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Ткани легких мышей с имплантированными клетками обоих субклонов B2 и H6 характеризовались выраженной воспалительной полиморфноклеточной инфильтрацией с очагами метастатического поражения, приуроченными к кровеносным сосудам (Рисунок 34), характерной для легких мышей с опухолями 4T1luc2 [243]. Из-за плотной воспалительной инфильтрации оценка метастазов в лёгких методом гистохимии оказалась невозможной. Гистологически метастазы были подтверждены во всех легких, положительных по результатам комбинированного метода BLI/ПЦР (BLI+/ПЦР+) (Рисунок 34). Интересно, что методом гистохимии удалось обнаружить у мыши, продемонстрировавшей положительный результат по ПЦР и отрицательный по BLI (мыши B2/#3 - BLI-/ПЦР+ (Рисунок 34А, мышь 3)). Также наблюдались случаи отсутствия гистологического подтверждения наличия метастазов/кластеров опухолевых клеток в легких мышей с результатом BLI+/ПЦР- (Рисунок 34А, мышь 4; Рисунок 34Б, мышь 3).



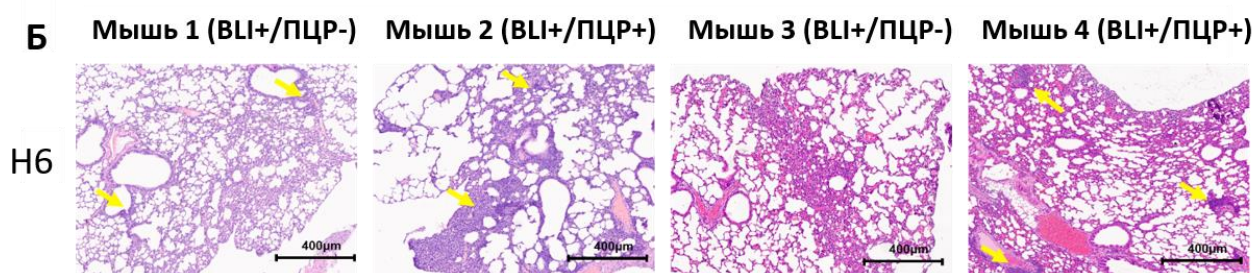


Рисунок 34 – Окрашенные гематоксилином и эозином, репрезентативные срезы легких мышей с опухолями, сформированными субклонами В2 (А) и Н6 (Б). Статус BLI и ПЦР каждой мыши в отношении наличия в легких опухолевых клеток указан на каждой панели над изображением каждого среза. Желтыми стрелками указаны предполагаемые метастазы: положительные по BLI (BLI+), по ПЦП (ПЦП+), отрицательные по BLI (BLI-), по ПЦР (ПЦР-)

Ткань селезенки всех мышей выглядела морфологически нормальной, с четко выраженными лимфоидными фолликулами различной формы, герминативными центрами и перифолликулярными зонами (Рисунок 35). Строма была несколько отечной. Ткани не имели признаков фиброза. Выявить единичные опухолевые клетки или метастазы, образованные несколькими клетками, не представлялось возможным из-за морфологических особенностей селезенки [306].

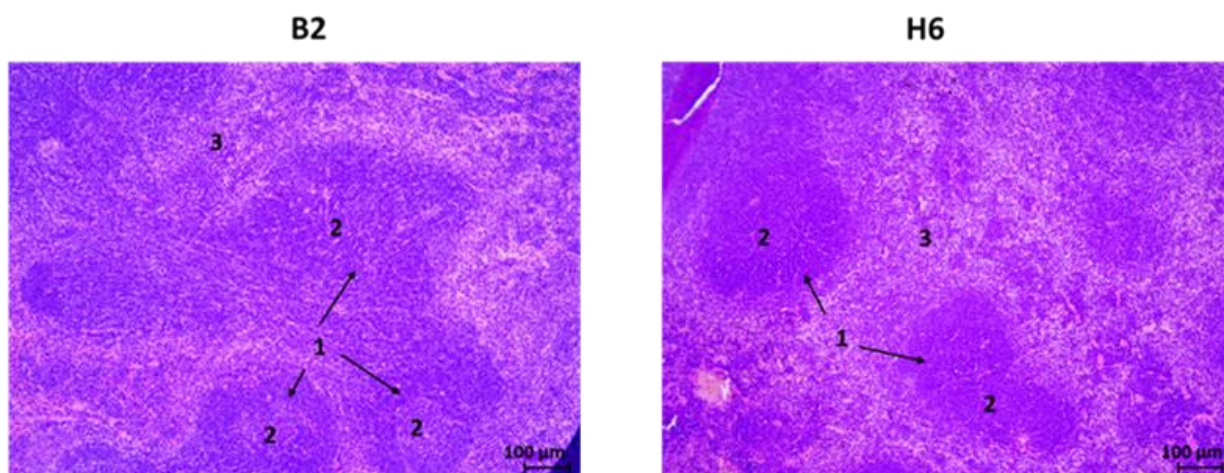


Рисунок 35 – Окрашенные гематоксилином и эозином, репрезентативные срезы селезенок мышей с опухолями, сформированными субклонами В2 и Н6. На изображениях отмечены: лимфоидные фолликулы (1), герминативные центры (2) и перифолликулярные зоны (3). Строма отека. Фиброз или метастазы не выявляются. Увеличение x100

В печени выраженных патологических изменений обнаружено не было. Были отмечены редкие скопления эпителиоидных клеток с атипичными ядрами (патологические митозы), диффузно расположенные между гепатоцитами без признаков некроза. Скопления наблюдались у положительных и отрицательных по наличию опухолевых клеток по данным комбинированной оценки методами BLI/ПЦР мышей (Рисунок 36). Совокупность

ограничений делала гистохимический метод анализа органа на наличие метастазов малоинформативным.

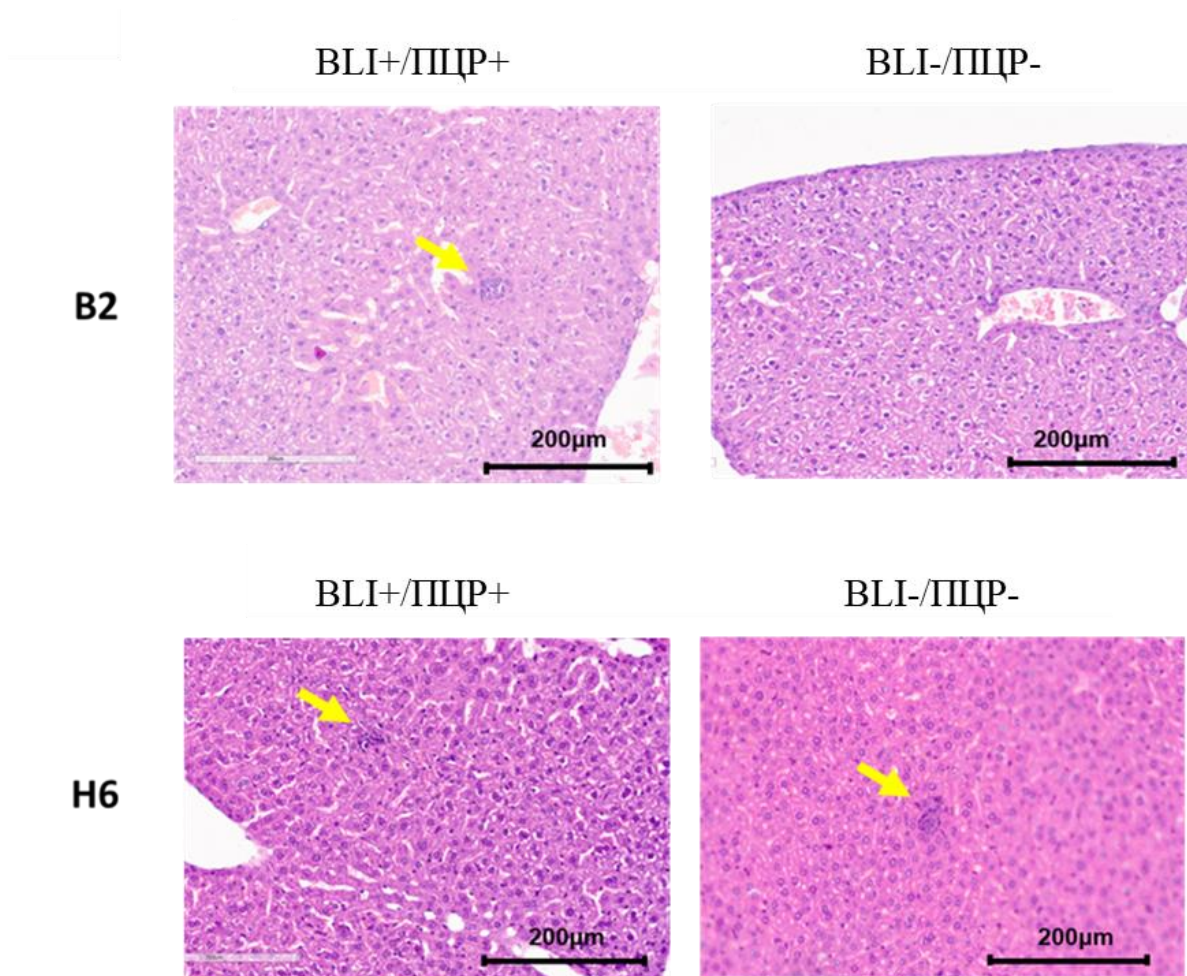


Рисунок 36 – Окрашенные гематоксилином и эозином, репрезентативные срезы печени мышей с опухолями, сформированными субклонами В2 и Н6. Статус BLI и ПЦР образца в отношении наличия/отсутствия в печени опухолевых клеток указан на каждой панели над изображением каждого среза. Желтыми стрелками отмечены редкие скопления эпителиоидных клеток с атипичными ядрами (патологические митозы). Увеличение x100

Результаты раздела 3.7 были опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [306].

3.8 Использование клеток 4T1uc2, экспрессирующих *E6* и *E7* вируса папилломы человека 16 типа, для оценки эффективности терапевтической ДНК-иммунизации

Субклоны В2 и Н6, подробно охарактеризованные по *in vitro* и *in vivo* свойствам, были использованы для дальнейшей оценки терапевтической эффективности вакцинных кандидатов.

В силу того, что ДНК-иммунизация E7 не ограничивала рост опухолей и вызывала воспалительную реакцию, выражающуюся в повышенных уровнях продукции иммунными клетками ФНО- α и обнаружением кластеров иммунных инфильтратов в печени, в новой модели ОМК испытывали только ДНК-иммунизацию E6.

Нами было оценено влияние ДНК-иммунизации E6 на опухолеобразующую и метастатическую активность субклонов 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16, в терапевтических условиях, воспроизводящих эксперимент, проведенный ранее на клетках ТС-1/luc2. Для этого мышам линии BALB/c подкожно имплантировали субклоны B2 или H6 и через 3 и 6 дней после имплантации животных ДНК-иммунизировали E6. Контрольным мышам вводили пустой вектор (Таблица 9, серия ИМПЛАНТ-4T1-Т). Рост опухолей оценивали морфометрически и по изменению уровня биолуминесцентного сигнала от мест имплантации клеток. В экспериментальной конечной точке оценивали массы опухолей и их метастатическую активность.

ДНК-иммунизация E6 подавляла рост опухолей B2 к 8-му дню, однако к 11-му дню эффект исчезал (Рисунок 37А, Б). Несмотря на то, что эффект подавления роста опухолей был кратковременным, наблюдалась тенденция к формированию меньших по размеру (массе) опухолей B2 у мышей ДНК-иммунизированных E6 по сравнению с мышами, ДНК-иммунизированными пустым вектором (Рисунок 37В). Суммарные уровни биолуминесцентных сигналов от легких, селезенки и печени мышей с опухолями B2 и ДНК-иммунизированных E6 также были ниже таковых у мышей с B2 опухолями, но иммунизированных пустым вектором (Рисунок 37Г).

На опухоли, сформированные клетками H6, ни с точки зрения их конечной массы, ни с точки зрения суммарных уровней биолуминесцентных сигналов от легких, селезенки и печени, ДНК-иммунизация E6 не оказывала никакого влияния (Рисунок 37В, Г). В то же время, уровни биолуминесцентных сигналов от легких мышей с опухолями B2 и H6, ДНК-иммунизированных E6, не отличались от соответствующего уровня контрольных мышей (Рисунок 37Д). Это означало, что ДНК-иммунизация E6 не влияла на инфильтрацию легких опухолевыми клетками.

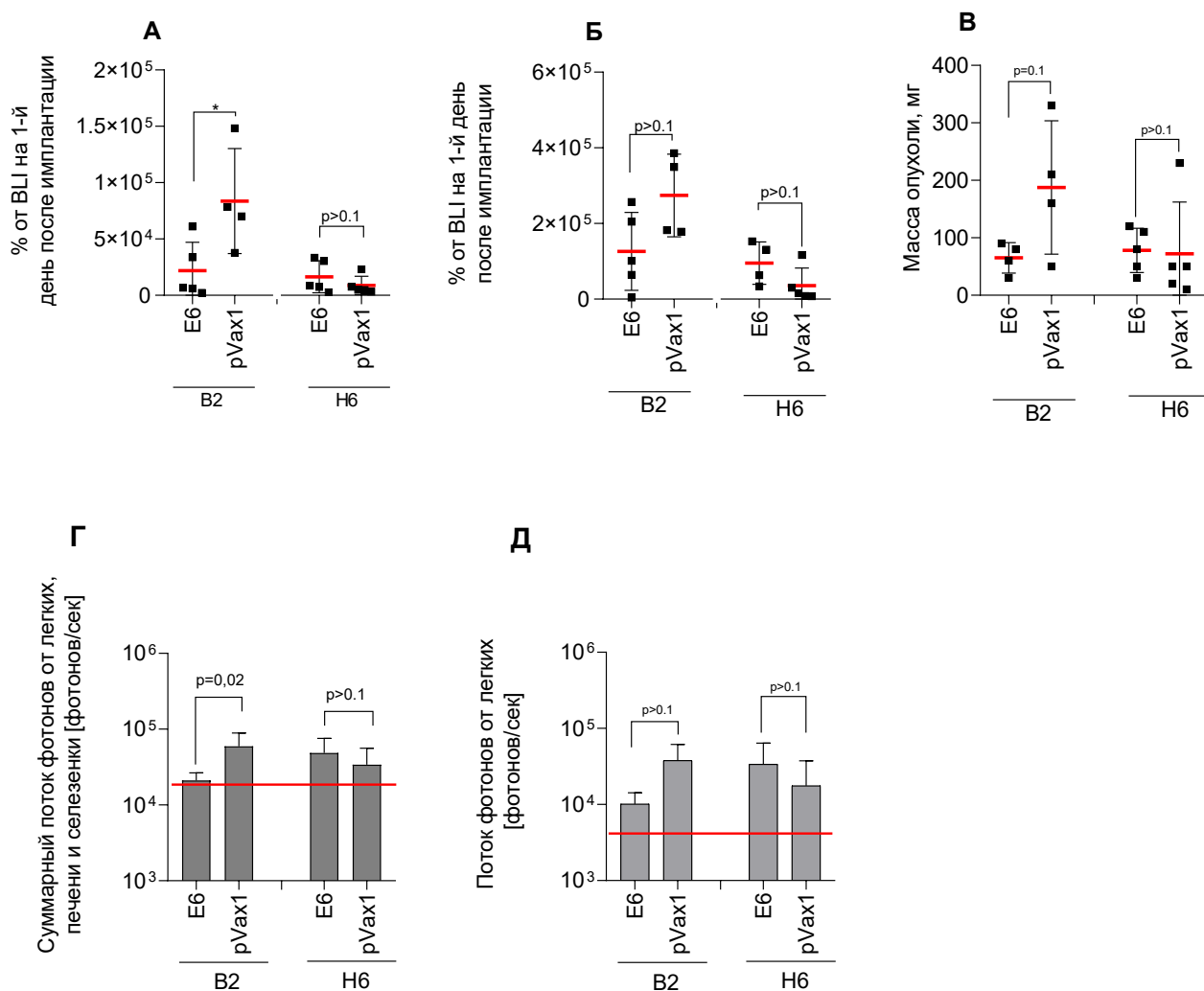


Рисунок 37 – Влияние терапевтической ДНК-иммунизации Е6 на опухолеобразующую и метастатическую активность субклонов 4T1luc2, экспрессирующих Е6 и Е7 ВПЧ16, Н6 и В2. (А) Уровень биолуминесцентного сигнала от присадки клеток В2 и Н6, на 8-й день после имплантации. (Б) Уровень биолуминесцентного сигнала от присадки клеток на 11-й день после имплантации. (В) Масса опухолей В2 и Н6 в экспериментальной конечной точке. (Г) Инфильтрация легких, печени и селезенки клетками В2 и Н6, оцененная по BLI *ex vivo* и представленная как суммарный поток фотонов от трех органов. (Д) Инфильтрация легких клетками В2 и Н6, оцененная по BLI *ex vivo*. Все групповые значения представлены как среднее $\pm$ СО. Красной линией отмечен уровень фонового биолуминесцентного сигнала от органов наивных мышей с введенным субстратом $\pm$ СО (n=5) [313]. Статистический анализ проводили с помощью критерия Манна-Уитни, *— $p < 0,05$

Дополнительно, лёгкие и селезёнки мышей были проанализированы методом ПЦР с использованием коммерческого набора Anyplex II HR HPV Detection, выявляющего как мы показали от 1 до 10 копий ДНК Е6 ВПЧ16 (Рисунок 9). В органах мышей с опухолями, образованными субклоном В2 и ДНК-иммунизированных Е6, ДНК Е6 выявлялась с той же частотой, что и у контрольных животных (ДНК-иммунизированных пустым вектором pVax1 и не иммунизированных мышей). В органах мышей с опухолями, образованными субклоном

Н6 и ДНК-иммунизированными Е6, ДНК Е6 выявлялась реже по сравнению с органами контрольных животных, хотя разница не достигала уровня значимости ($p=0,069$) (Таблица 14). Данные различия можно объяснить разными уровнями инфильтрации органов опухолевыми клетками. Высокий уровень инфильтрации клетками Н6 (по ВЛІ, Рисунок 37) позволял увидеть разницу между иммунизированными и контрольными животными. Низкий уровень инфильтрации органов клетками В2 такой возможности не давал.

Таким образом, в терапевтических условиях ДНК-иммунизация Е6 не оказывала практически никакого влияния ни на туморогенную, ни на метастатическую активность клеток 4Т1luc2, экспрессирующих *Е6* и *Е7* ВПЧ16, в отличие от обнадеживающих результатов, полученных на модели ТС-1/luc2.

Результаты раздела 3.8 опубликованы автором и его коллегами в научно-исследовательской статье [306].

Таблица 14 – Анализ ДНК, выделенной из органов мышей с подсаженными клетками B2 или H6, после терапевтической ДНК-иммунизации E6, или пустым вектором pVax1 (Таблица 8, серия ИМПЛАНТ-4Т1-Т), а также неиммунизированных (naïve) контрольных мышей, на наличие ДНК ВПЧ16 с помощью коммерческого набора для ПЦР, Амурplex II. Анализ проведен "N-1" Хи-квадрат тестом, * - $p=0,069$ – при сравнении мышей с опухолями H6 и ДНК-иммунизированных E6 по сравнению с контрольной группой

Мыши	Имплантируемые клетки	Селезенки		Легкие		Общее количество тестируемых образцов	Общее количество ВПЧ16+ образцов	% позитивных образцов
		Всего образцов	Количество ВПЧ16+ образцов	Всего образцов	Количество ВПЧ16+ образцов			
Naïve	B2	2	0	2	0	4	0	0
Иммунизированные pVax1		4	3	4	2	8	5	63
Контрольные (naïve+pVax1)		6	3	6	2	12	5	42
Иммунизированные pVaxE6		4	2	5	2	9	4	44
Naïve	H6	2	2	2	2	4	4	100
Иммунизированные pVax1		4	2	5	3	9	5	56
Контрольные (naïve+pVax1)		6	4	7	5	13	9	69
Иммунизированные pVaxE6		5	1	5	2	10	3	30(*)

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Вирус папилломы человека является одним из широко распространенных инфекционных агентов, передающихся половым путем среди мужчин и женщин. Инфицирование ВПЧ высокого канцерогенного риска является причиной около 5% всех случаев злокачественных новообразований в мире [1; 10]. Одним из возможных подходов к лечению ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований является терапевтическая иммунизация, направленная на выработку специфичного противоопухолевого иммунного ответа [342]. Вирусные белки Е6 и Е7 ВПЧ, ответственные за злокачественную трансформацию инфицированных клеток, являются уникальными вирус- и опухоль-специфичными антигенами (Tumor-Specific Antigen, TSA). Экспрессируемые исключительно опухолевыми клетками, они представляют собой идеальные мишени для терапевтической иммунизации [342]. Более половины всех разработанных на сегодняшний день терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных заболеваний нацелены на белки Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа [5], поскольку этот тип ответственен за более чем 50% случаев РШМ, рака анальной области и плоскоклеточного рака ротоглотки во всем мире [10–12]. Особенностью ВПЧ16 является наличие популяционных различий внутри типа, так называемых субгенотипов, имеющих четкую региональную представленность и отличающихся по трансформирующей способности [18; 273; 274]. Наличие субгенотипов связывают с этническими особенностями проживающего на каждой территории населения, в основном иммунной системы, определяющей давление на вирус и направляющей его эволюцию. В силу этого разрабатываемые терапевтические вакцины против злокачественных новообразований, ассоциированных с хронической инфекцией вирусом папилломы человека, должны учитывать генотипические и субгенотипические различия вариантов ВПЧ, а также этнические особенности той популяции, для которой они предназначены.

Настоящая работа была направлена на разработку и доклинические испытания новых терапевтических вакцинных кандидатов против ВПЧ16, предполагаемых к использованию на территории РФ. В силу этого мы сосредоточились на анализе генов, кодирующих Е6 и Е7 изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории РФ. К моменту начала настоящей работы в международной базе данных GenBank NCBI содержалось мало данных секвенирования *Е6* и *Е7* ВПЧ16, полученных из образцов биоматериала от пациентов из РФ. Все имеющиеся образцы были получены только от пациентов ее европейской части (г. Москва и г. Санкт-Петербург). Поскольку циркулирующие в РФ варианты ВПЧ16 в основном относятся к субгенотипу А [21], мы расширили выборку, включив в нее также полностью аннотированные последовательности *Е6* и *Е7* вариантов ВПЧ16, относящихся к субгенотипу А, но полученных

из биоматериала пациентов других европейских стран (Швеция, Польша, Греция, Нидерланды, Люксембург, Германия, Латвия, Португалия, Италия, Словения, Хорватия). Полученную выборку анализировали как на общую изменчивость белков E6 и E7, так и на наличие региональных различий.

Анализ генов, кодирующих E6 и E7 более 300 изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории европейской части РФ и ряда европейских стран, показал, что в исследуемой популяции ген *E6* был более вариабелен, чем *E7*. Полученные нами результаты согласовывались с другими исследованиями [273]. Белок E6 содержал ряд вариабельных положений — а. о., в которых часто наблюдались АК-замены, в частности положения 17, 21, 32, 85 и 90. Наиболее вариабельным оказалось положение 90 с единственным вариантом АК-замены — L90V. Частота выявления данной замены наблюдалась в 59% последовательностях всей популяции. Наименее вариабельным положением было 32, в нем АК-замены встречались в 1% выборки. В остальных трех положениях частота выявления АК-замен составляла от 2 до 10%. Лишь одно из этих положений (положение 17) локализовалось в области структурно-функционального домена, а именно в области сигнала ядерной локализации NLS1 (15–19 а. о.). Достоверно установлено, что замена аргинина (R) на глицин (G) в положении 17 области NLS1 нарушает ядерную локализацию белка E6 и приводит к его дисфункции [63]. О роли других вариантов АК-замен в этом положении не известно. Остальные четыре вариабельных положения располагались вне структурно-функциональных доменов, определяющих биологические свойства белка. Однако, все пять положений располагались в участках связывания E6 с p53, изменяя аффинность связывания E6 с p53 и в разной степени влияя на протеолиз p53 [284; 287; 291; 343–346] и, как следствие, на онкогенный потенциал белка E6.

Белок E7 оказался высоко консервативен. Из 98 а. о. белка вариабельными были лишь пять положений, причем частота встречаемости самой частой АК-замены N29S составляла менее 5% от всей популяции. Данная АК-замена располагается в мотиве QLN центральной области сайта фосфорилирования протеинкиназы СКII белка E7. Замена аспарагина (N) на серин (S) создает новый полнофункциональный сайт фосфорилирования протеинкиназы СКII, влияющий на эффективность взаимодействия белка E7 с карманными белками (в т.ч. pRb), способствуя их усиленной деградации и, в конечном итоге, к усилению онкогенного потенциала мутантного варианта белка E7 [290]. Таким образом, все наблюдаемые замены были так или иначе связаны с онкогенными свойствами E6 и E7, а именно с их способностью деградировать p53 и pRb, соответственно.

Интересно, что все упомянутые положения белков, затрагиваемые АК-заменами, локализовались в участках большого количества эпитопов. Результаты *in silico* исследований [49; 278; 347; 348] установили, что АК-замены R17G, Q21H, Q21D, D32N, D32E, H85Y и L90V

в белке Е6 могут изменять аффинность связывания существующих эпитопов с молекулам HLA, а также приводят к образованию новых эпитопов. Это говорит о том, что все выявленные вариабельные участки белков Е6 и Е7 находятся под давлением иммунного ответа. В силу этого, АК-замены в этих участках могут способствовать ускользанию вируса от иммунного ответа и приводить к потере организмом контроля над репликацией вируса в популяции [349]. Связь АК-замены L90V с ускользанием от иммунного ответа неоднозначна. Ряд исследований показал, что АК-замена L90V изменяет сродство связывания пептидов, несущих эту замену, с рядом аллелей МНС класса I [225; 278]. У женщин с аллелями человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) HLA-B*44, HLA-B*51 или HLA-B*57, не распознающими вариант V90, наблюдался повышенный риск развития РШМ [225]. Это могло бы объяснить неспособность цитотоксического Т-клеточного ответа действовать против белка Е6. Однако, в исследовании другой популяции [280] значимой связи между заменой L90V и полиморфизмом HLA обнаружено не было, что указывает на то, что данная замена может быть связана с ускользанием от иммунного ответа только в отдельных группах населения с преобладающим распространением типов HLA (гаплотипов), не способных распознавать замену L90V. Поскольку проведенный нами анализ показал сравнительно низкую частоту встречаемости АК-замен в положениях 17, 21, 32 и 85 белка Е6 в европейской популяции, их вклад в патогенез у исследуемой популяции может быть минимальным.

Анализ региональных различий частоты встречаемости различных вариантов АК-замен в положениях 17, 21, 85 и 90 показал, что варианты ВПЧ16, циркулирующие на территории европейской части РФ, существенно не отличаются от вариантов, циркулирующих в Балтийском регионе. В обоих регионах выявлялись АК-замены белка Е6 только в положениях 17 и 90. Доминирующей АК-заменой в обоих регионах была замена L90V, однако в Балтийском регионе частота встречаемости была достоверно ниже, чем в европейской части РФ. В европейской части РФ замена в положении 17 в основном встречалась только в сочетании с заменой L90V, в то время как в Балтийском регионе встречались как единичные замены в положении 17, так и сочетание замен в положении 17 и L90V. В Южной и Западной Европе кроме замен в положениях 17 и 90 также наблюдались замены в положениях 21 и 85. Доминирующей АК-заменой в этих регионах была также замена L90V, наиболее часто представленная в виде единичной замены, реже в сочетании с вариантами замен в положениях 17, 21 и 85.

АК-замена N29S белка Е7 была распределена равномерно по всей популяции, региональных отличий отмечено не было. Среди образцов собранных на территории Южной и Западной Европы, а также европейской части РФ, данная замена встречалась в единичных

случаях. Среди образцов, собранных на территории Балтийского региона, данной замены обнаружено не было.

Таким образом, наиболее актуальной для европейской популяции и территории европейской части РФ, в частности, являлась только единичная АК-замена L90V в белке E6.

Среди вакцинных платформ вакцины на основе ДНК являются наиболее перспективными с точки зрения простоты и скорости разработки, а также безопасности [140]. Немаловажную роль играет высокая термостабильность вакцин этого типа, что существенно упрощает логистику их доставки и способствует их широкому применению по всему миру [148]. ДНК-вакцины способны индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ [141; 142], кроме того, имеют свойства адъювантов за счет содержания CpG-мотивов [143–146]. Единственной терапевтической вакциной против ВПЧ, прошедшей третью фазу клинических испытаний и показавшей эффективность при предраковых поражениях, ассоциированных с ВПЧ, является ДНК-вакцина VGX-3100, кодирующая гены *E6/E7* ВПЧ16-18 [5]. Эти характеристики ДНК-вакцин и опыт их применения определили выбор вакцинной платформы.

Прототип ДНК-вакцины на основе E6 и E7 ВПЧ16 конструировали с учетом проведенного анализа вариабельности изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории европейской части РФ и ряда европейских стран на основе консенсусных последовательностей E6 и E7. Решение о включении того или иного варианта аминокислоты в положениях 17, 21, 85 и 90 белка E6 и положении 29 белка E7 в состав белка, кодируемого соответствующим антигеном, принималось на основании данных о распознавании аминокислотного варианта иммунной системой и отсутствия ассоциации данного варианта с тяжестью заболевания. Этим критериям соответствовали варианты R17, Q21, H85 и L90 белка E6 и N29 белка E7. Варианты R17, Q21, H85 белка E6 и вариант N29 белка E7 были доминирующими как в популяции в целом, так и в отдельных регионах, поэтому выбор был однозначным. Вариант L90 белка E6 не был доминантным, однако вариант V90 не мог быть включен в силу его ассоциации с канцерогенностью белка E6 и прогрессии ВПЧ-ассоциированных заболеваний к раку, в частности к РШМ [278; 288; 289].

В качестве последовательностей вирусных генов *E6* и *E7* ВПЧ16 для создания прототипа ДНК-вакцины, было решено использовать консенсусные последовательности E6 и E7, соответствующие последовательностям референсного штамма ВПЧ16 (NC_001526.4). E6 и E7-антигены конструировали с учетом требований к уровню синтеза и безопасности антигенов на основе вирусных белков. Гены *E6* и *E7* оптимизировали для экспрессии в эукариотических клетках, а также модифицировали введением точечных мутаций, приводящих к АК-заменам, ингибирующим онкогенную активность белков E6 и E7 за счет

нарушения связывания с p53- и pRb, соответственно [253]. Полученные последовательности *E6* и *E7* синтезировали и клонировали в коммерческий вектор pVax1, рекомендованный для создания ДНК-вакцин человека [298].

Перед введением полученных/разработанных ДНК-вакцинных конструкторов лабораторным животным с целью оценки специфичности и функциональности индуцированного иммунного ответа, необходимо было выбрать оптимальный способ их *in vivo* доставки. Наиболее распространенными методами введения ДНК-вакцин являются внутримышечная инъекция иглой и инъекция, усиленная электропорацией [178]. Само по себе проникновение в клетку «голой» ДНК пассивным транспортом недостаточно эффективно [350], а электропорация (хоть и является самым эффективным методом введения ДНК на сегодняшний день [178]) травматична, требует специализированного дорогостоящего оборудования и высокой квалификации медицинского персонала. Помимо этого, протокол электропорации сильно зависит от места (мест) иммунизации/типа тканей, состава антигена и вакцины, а также характеристик используемого оборудования [193]. Это определяет необходимость оптимизации протоколов электропорации в каждой серии экспериментов. Альтернативные методы доставки используются реже, они недостаточно изучены и в большинстве своем также требуют специализированного оборудования.

В настоящей работе были оптимизированы и протестированы основной метод доставки ДНК — внутрикожная инъекция иглой (ВКИ), а также ВКИ, усиленная сонопорацией (метод ВКИ/СП). Оптимизированные протоколы обоих методов сравнили по эффективности с оптимизированным протоколом доставки ВКИ, усиленной электропорацией (метод ВКИ/ЭЛП). Эксперименты по оптимизации протоколов различных методов проводили с использованием плазмидной ДНК pVaxLuc, кодирующей репортерный ген люциферазы (Luc). Эффективность доставки различными методами определяли путем оценки уровня биолуминесцентного сигнала от мест введения репортерной плазмиды, начиная с ранних этапов после введения. Снижение уровня сигнала биолуминесценции с течением времени служит маркером развития иммунного ответа [243; 322]. Путем оценки падения уровня сигнала биолуминесценции от мест введения плазмиды на 5 и более поздние дни после введения составляли прогноз относительно способности различных протоколов доставки индуцировать иммунный ответ.

Оптимизация метода прямой (непринудительной) доставки ДНК — внутрикожной инъекции иглой, заключалась в подборе оптимальной ионной силы буферного раствора инъекционной смеси, при котором ДНК могла бы быть эффективно доставлена пассивным транспортом через клеточную и ядерные мембраны. Сообщалось, что введение ДНК в гипотонических растворах способствует ее эффективному проникновению в клетку [186]. В

настоящей работе в качестве буфера использовали ФСБ, поскольку он обеспечивает физиологический pH и целостность ДНК [179]. Путем понижения ионной силы фосфатных буферов на основе ФСБ (за счет добавления деионизированной воды) определяли пороговое значение ионной силы буфера, необходимое для эффективной доставки ДНК.

Уровень продукции Luc в месте введения репортерной плазмиды в ФСБ (ионной силы 167 ммоль/л) был достаточно высоким, судя по высокому уровню сигнала биolumинесценции от сайта инъекции. Уровень сигнала биolumинесценции от сайта введения плазмиды в фосфатном буфере на основе ФСБ вдвое меньшей ионной силы (81 ммоль/л) был значительно ниже, но значительно выше фонового уровня сигнала биolumинесценции, определяемого автолюминесценцией [313]. Доставка ДНК в фосфатных буферах более низкой ионной силы (41 и 20 ммоль/л) или деионизированной воде была неэффективной. При введении ДНК в ФСБ и фосфатном буфере на основе ФСБ ионной силы 81 ммоль/л также наблюдалось снижение уровней сигналов биolumинесценции с течением времени, что, по опубликованным ранее данным [351], свидетельствовало о развитии иммунного ответа против Luc-экспрессирующих клеток. Снижение уровня сигнала биolumинесценции было более выражено в случае введения ДНК в ФСБ. При введении ДНК в фосфатных буферах ионной силы 41 ммоль/л и ниже или в деионизированной воде снижения уровней сигнала биolumинесценции не наблюдалось. Таким образом, оптимальным буферным раствором являлся изотонический ФСБ. Минимальная пороговая ионная сила буфера, определяющая пассивный транспорт ДНК в клетку, составляла 81 ммоль/л (половину ионной силы изотонического раствора). В последующих экспериментах по оптимизации методов доставки ДНК сонопорации и электропорации ДНК вводили в ФСБ.

Отмеченное в экспериментах по доставке репортерной плазмиды отсутствие разницы между фосфатным буфером ионной силы 41 ммоль/л и деионизированной водой могло указывать на то, что все свободные ионы Na^+ и K^+ в составе буферного раствора связывались с ДНК, т.е. при использовании в качестве буфера изотонического ФСБ около четверти всех ионов Na^+ и K^+ связывается с ДНК. Оставшаяся часть ионов может вносить вклад в электропроводность, что важно знать при определении условий физических методов принудительной доставки, в частности электропорации.

Метод сонопорации описывается в литературе как альтернативный электропорации эффективный способ доставки ДНК *in vivo* [202; 203]. Он не требует узкоспециализированного оборудования и менее строг к квалификации медицинского персонала. Ультразвуковые генераторы (аппараты УЗИ) имеются во всех поликлиниках, в силу этого вакцинацию сонопорацией возможно было бы проводить в любых медицинских учреждениях. Механизм действия сонопорации основан на образовании временных пор в плазматической мембране

клеток в результате кавитационных явлений, формирующихся в жидкой среде межклеточного пространства под действием ультразвука [352]. Описанные в литературе положительные результаты сонопорации основаны на использовании «экзогенных» микропузырьков, вводимых совместно с плазмидной ДНК для усиления кавитации и, соответственно, эффективного порообразования. Однако, использование «экзогенных» микропузырьков вносит дополнительные параметры в оптимизацию метода (выбор оптимального состава, размера и дозы микропузырьков), а также сопровождается проблемой индивидуальной непереносимости компонентов «экзогенных» микропузырьков и токсичности продуктов их распада [353].

Учитывая эти аспекты, в настоящей работе намеренно не были применены «экзогенные» микропузырьки. Оптимизация метода проводилась только путем изменения физических параметров ультразвука, влияющих на порог кавитации и выживаемость клеток, а именно: интенсивности ультразвука и длительности пакета ультразвуковых колебаний [206; 261]. После введения плазмиды pVaxLus в ФСБ место инъекции озвучивали ультразвуком трех интенсивностей, от минимальной пороговой ($0,6 \text{ Вт/см}^2$) до максимальной возможной ($2,4 \text{ Вт/см}^2$), и двумя вариантами длины пакета ультразвуковых колебаний (1 мс и 2 мс). Нами было показано, что эффективность сонопорации возрастает при увеличении интенсивности ультразвука. При максимально возможной интенсивности ультразвука $2,4 \text{ Вт/см}^2$ оптимальным для доставки репортерной плазмиды был короткий пакет ультразвуковых колебаний длительностью до 1 мс. Этот же режим озвучивания мест введения ДНК обеспечивал максимальный уровень сигнала биолюминесценции в первые дни после озвучивания и снижение уровней сигналов биолюминесценции с течением времени, что косвенно указывало на индукцию иммунного ответа против белка-репортера (люциферазы). Повышение длительности пакета приводило к ухудшению эффективности доставки, вероятно в связи локальным нагревом внутри клеток и их гибелью [261].

«Референсным» методом доставки ДНК служила ВКИ с последующей электропорацией. Эффективность этого метода была показана в целом ряде экспериментов, однако нуждалась в оптимизации в условиях использования конкретного оборудования (электропоратора и электродов). Оптимальные режимы электропорации подбирали на основе двухэтапной схемы электропорации, включающей подачу одного высоковольтного импульса порации с последующей подачей восьми направляющих низковольтных импульсов квадратной формы [314–316]. Поскольку параметры в большей степени влияют на изменения в липидных мембранах клеток, т.е. на порообразование, мы изменяли только такие параметры как амплитуда, длительность, частота и полярность направляющих импульсов. Параметры импульса порации оставляли неизменными. Подача высокочастотных биполярных коротких

импульсов амплитуды 100 В показала наилучшую эффективность доставки как по начальным уровням сигнала биолюминесценции, так и по динамике снижения уровней сигналов биолюминесценции от мест электропорации с течением времени.

В целом, эффективность оптимальных протоколов доставки внутрикожной инъекцией в ФСБ и сонопорации значительно уступала эффективности доставки оптимальным протоколом электропорации. Оба этих метода не обеспечивали такого же высокого уровня доставки ДНК и, соответственно уровня продукции Лус, как при электропорации. Вторым методом по эффективности после электропорации была внутрикожная инъекция в ФСБ. Эффективность сонопорации составляла около 1% от эффективности электропорации.

Первостепенную роль в терапевтической противоопухолевой иммунизации играет выработка клеточного иммунного ответа, направленного на уничтожение опухолевых клеток цитотоксическими Т-клетками [354]. В связи с этим, следующим шагом после выбора оптимального метода доставки ДНК было проведение экспериментов в опытах по доставке модельных ДНК-антигенов. Моделирование проводилось только для методов внутрикожной инъекции в ФСБ и электропорации с использованием оптимальных протоколов. Сонопорация в силу низкой эффективности из модельных экспериментов была исключена. Снижение уровня сигнала биолюминесценции от мест инъекций репортерной плазмиды с/без последующего физического воздействия с течением времени указывает на иммуноопосредованную гибель Лус-экспрессирующих клеток [351]. Таким образом, наблюдая за динамикой снижения сигнала BLI на 5-ые сутки после введения плазмидной ДНК, мы ожидали развитие антительного или клеточного иммунного ответа.

В экспериментах по «прогнозированию» развития иммунного ответа в качестве модельных ДНК-антигенов были выбраны плазмиды, кодирующие ОТ ВИЧ-1 клада А (pVaxRT_Ain) и Т-ОТ крысы (pVax-TERT). Оба модельных ДНК-иммуногена были сконструированы по тем же правилам, что и разработанные в рамках настоящего исследования Е6 и Е7 ДНК-иммуногены. При этом они обладали разными иммуногенными свойствами, а именно индуцировали разные ветви иммунного ответа: антительный (ОТ ВИЧ-1, [324]) и клеточный (Т-ОТ крысы, [246]). Плазмиду pVaxRT_Ain вводили мышам методами электропорации и внутрикожной инъекции в ФСБ, фосфатном буфере на основе ФСБ ионной силы 81 ммоль/л, а также в деионизированной воде. Антительный ответ вызывала доставка методами электропорации и внутрикожной инъекцией в ФСБ и фосфатном буфере на основе ФСБ ионной силы 81 ммоль/л. Доставка ДНК в деионизированной воде антительного ответа не вызывала. Уровни титров антител при электропорации были на порядок выше уровней антител, вызываемых внутрикожной инъекцией в ФСБ и фосфатном буфере на основе ФСБ ионной силы 81 ммоль/л. Различия в уровнях антител, достигнутых каждым из методов, были

пропорциональны разнице в уровнях экспрессии репортерного белка, определяемых по уровням сигналов биolumинесценции от мест введения репортерной ДНК.

Плазмиду pVax-TERT вводили мышам только методом электропорации. Способность pVax-TERT вызывать специфический Т-клеточный ответ на вводимый антиген была подтверждена в серии более ранних экспериментов [246]. Введенная методом ВКИ с последующей электропорацией pVax-TERT вызывала выраженный Т-клеточный ответ на иммунодоминантные эпитопы белка Т-ТО.

Таким образом, только электропорация являлась оптимальным методом введения ДНК-антигенов. Этот метод использовался в дальнейших экспериментах по ДНК-иммунизации.

Введение обоих Е6 и Е7 ДНК-антигенов «одним уколом» привлекательно ввиду упрощения процесса вакцинации. Однако, при совместном одновременном введении могут наблюдаться нежелательные антагонистические эффекты [355]. Подобные наблюдения снижения антиген-специфического ответа против одного или нескольких компонентов были зарегистрированы при совместном введении многокомпонентных вакцин, в т.ч. ДНК-вакцин против ВИЧ-1 [356; 357]. Неспособность индуцировать адекватный иммунный ответ против введенных совместно иммуногенов может быть результатом того, что один из компонентов является иммунодоминантным, с последующим подавлением иммунного ответа против одного компонента за счет сильного иммунного ответа против другого/других [356; 358–360]. Известно, что у онкобольных с ремиссией коррелирует иммунный ответ на Е6, но не на Е7 [361]. Это указывает на то, что Е6 и Е7 обладают, по-видимому, различной иммуногенностью. Кроме того, при транзientной трансфекции эукариотических клеток разработанными ДНК-конструкциями уровень экспрессии *Е6* значительно превышал уровень экспрессии *Е7*. При совместном введении ДНК Е6 и Е7, экспрессия Е7 могла быть подавлена за счет конкуренции за транскрипционный аппарат клетки [117].

Для прогнозирования антагонистических эффектов при введении двух ДНК-антигенов, отличающихся друг от друга по уровням экспрессии и иммуногенным свойствам, нами был проведен модельный эксперимент с использованием ДНК-антигенов, сходных по свойствам с Е6 и Е7. В качестве ДНК-антигена, моделирующего Е6, была выбрана плаزمид, кодирующая Т-ОТ крысы, являющейся высокоэкспрессируемым сильным иммуногеном [246]. В качестве модельного ДНК-антигена для Е7 была выбрана плазмид, кодирующая белок нуклеокапсида вируса гепатита С, являющегося низкоэкспрессирующимся слабым иммуногеном с иммуносупрессивными (иммуномодулирующими) свойствами [245]. Результаты модельного эксперимента подтвердили наши опасения – совместное введение двух иммуногенов, различающихся по уровню экспрессии и иммуногенности приводит к подавлению иммунного

ответа против сильного иммуногена. Эти результаты указывали на необходимость введения Е6 и Е7 отдельными инъекциями.

Следующим этапом работы было определение иммуногенности ДНК-вакцинных конструкторов, кодирующих Е6 и Е7 ВПЧ16, эффективность которых планировалось в последующем оценить в терапевтическом эксперименте с подсадкой опухолевых клеток [306].

Мышей иммунизировали только ДНК Е6, только ДНК Е7 или ДНК Е6 и ДНК Е7 (Е6/Е7), но введенными инъекциями в разнесенные анатомические участки. Спленоциты иммунизированных мышей стимулировали панелями пептидов или отдельными пептидами, представляющими области Е6 и Е7, содержащие большое количество эпитопов. У мышей, ДНК-иммунизированных только Е6, наблюдалась индукция иммунного ответа Th1 типа, выражающаяся в продукции тройных цитокинов ИФН- γ /ИЛ-2/ФНО- α CD4⁺ Т-клетками, специфичными к нескольким эпитопам по всей длине белка Е6, а также CD8⁺Т-клетками, специфичными к эпитопам на С-конце белка Е6. Специфического ответа на ДНК-иммунизацию Е7 не наблюдалось. Полученные нами данные согласовывались с результатами других исследований, в которых было показано, что ответ на Е7 возможен только после его модификации путем слияния антигена с сигналами, направленными на улучшение процессинга [218; 362; 363]. При ДНК-иммунизации Е6/Е7 процент реагирующих мышей не отличался от процента реагирующих на ДНК-иммунизацию Е6 мышей, однако общий процент индуцируемых иммунизацией специфических Т-клеток был ниже. Это могло быть связано с системной иммуносупрессией, вызванной Е7. Подобное явление наблюдалось при тестировании экспериментальных вакцин, включающих компоненты на основе Е6 и Е7 ВПЧ16 [111].

Еще одним важным наблюдением было повышение уровня продукции нестимулированными спленоцитами реципиентов ДНК Е7 маркера воспаления – цитокина ФНО- α , что свидетельствовало об индукции Е7 воспалительной реакции.

После оценки иммуногенности была проведена оценка способности разработанных ДНК-вакцинных конструкторов, кодирующих Е6 и Е7 ВПЧ16, ограничивать рост и миграционную активность опухолевых клеток, экспрессирующих Е6 и Е7. Эксперимент проводили с использованием наиболее распространенной модели мышинных опухолевых клеток для тестирования терапевтических вакцин против ВПЧ16 – клеточной линии ТС-1/luc2 [6]. Мышам подкожно имплантировали клетки ТС-1/luc2 в дозе, использованной другими исследователями в аналогичных экспериментах [331]. Затем животным дважды вводили разработанные ДНК-вакцинные конструкторы, отдельно ДНК Е6, отдельно ДНК Е7, либо ДНК Е6 и Е7, введенные отдельными инъекциями. ДНК-иммунизация Е6 позволяла ограничить рост опухолей, что выражалось в снижении объемов конечных опухолей на 20% по сравнению

с контрольной группой. Наши результаты совпадают с результатами других исследователей, которые показали, что иммунизация Е6 полностью или частично ограничивает рост опухолей ТС-1 [109; 110; 112–116]. ДНК-иммунизации Е7 и Е6/Е7 эффектов не имели. В целом, полученные результаты согласовывались с результатами тестирования иммуногенности вакцинных конструкторов. Отсутствие эффекта ограничения роста опухолевых клеток в случае введения только ДНК Е7, вероятно, было связано с отсутствием ответа Т-клеток на антиген. В случае введения ДНК Е6/Е7 отдельными инъекциями рост опухолей не ограничивался из-за совокупности факторов, включающих системный эффект Е7 и снижение дозы ДНК Е6 при введении двух плазмид.

Помимо оценки влияния ДНК-иммунизации на рост опухолей, оценивали также ее влияние на метастатическую активность опухолевых клеток. Оценка миграционной активности клеток ТС-1/luc2 проводили методом детекции биолуминесцентного сигнала *ex vivo* благодаря наличию в этих клетках репортерного гена. Скринингу подвергались органы, которые чаще всего поражаются метастазами у пациентов с ВПЧ-ассоциированными злокачественными заболеваниями – легкие, селезенка и печень [39; 41; 332; 333]. Признаков инфильтрации опухолевыми клетками указанных органов не было. Уровни сигналов биолуминесценции от всех органов не превышали фонового уровня. Ранее в литературе указывалось, что клетки ТС-1 не способны метастазировать при подкожной имплантации [220]. В настоящей работе было подтверждено, что при подкожной имплантации клетки ТС-1/luc2 имеют ограниченную миграционную активность и не способны образовывать метастазы в дистальных органах.

Особого внимания заслуживало обнаружение кластеров атипичных эпителиоидных клеток/иммунных инфильтратов в печени групп мышей, ДНК-иммунизированных Е6 и Е7, особенно после ДНК-иммунизации Е7. Наблюдаемые микрогранулёмы были схожи с теми, что наблюдались в ранее описанных экспериментах по введению мышам Конканавалина А (ConA) для моделирования фиброза и цирроза печени [364–366]. Их образование указывало на системную реакцию воспаления в ответ на введение ДНК Е7.

Поскольку метастазирование – существенный аспект патогенеза злокачественных новообразований, а эффект от терапии оценивается по способности ограничить рост и вызвать регрессию первичных опухолей, и по ограничению развития метастазов, модель ТС-1/luc2 (и ТС-1) оказалась непригодной для полноценного тестирования вакцинных конструкторов в терапевтических условиях. Для более строгой оценки необходимо было разработать новую высокометастатическую модель опухолевых клеток, экспрессирующих Е6 и Е7 ВПЧ16.

В качестве платформы для новой модели опухолевых клеток, экспрессирующих Е6 и Е7 ВПЧ16, была выбрана хорошо изученная и охарактеризованная клеточная линия

аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 [256]. В отличие от клеток TC-1, клетки 4T1 происходят из спонтаннообразованной опухоли, имеют высокий туморогенный и миграционный потенциалы [256]. Клетки 4T1 способны метастазировать из первичной опухоли в различные удалённые участки, включая лимфатические узлы, кровь, печень и лёгкие [241; 243; 271; 338]. Кроме того, клеточная линия 4T1 имеет низкую мутационную нагрузку. Количество мутаций (однонуклеотидных вариантов, сокр. SNV и инсерций/делеций, indel), возникающих в линии 4T1, на порядок меньше, чем у других опухолевых клеточных линий [256]. Производная 4T1, клон 4T1luc2, экспрессирующий ген люциферазы светлячка *luc2*, широко используется в доклинических исследованиях, поскольку репортер позволяет мониторировать процесс роста опухоли *in vivo*, а также оценивать метастазирование *ex vivo* [271]. Многочисленными исследованиями было показано, что способность клеток 4T1luc2 образовывать первичные опухоли и метастазировать в дистальные органы не нарушается при экспрессии клетками чужеродных антигенов [241; 243; 338]. В силу этого, клетки 4T1luc2 являлись идеальной платформой для экспрессии белков E6 и E7 ВПЧ16.

Субклоны 4T1luc2, экспрессирующие E6 и E7 ВПЧ16, получали путем лентивирусной трансдукции. В качестве встраиваемых последовательностей E6/E7 использовали последовательности E6 и E7 референсного штамма ВПЧ16 (NC_001526.4), как было ранее сделано в случае линии TC-1 [367]. Для обеспечения высокого уровня экспрессии E6 и E7 в лентивирусном векторе, вставку E6/E7 помещали под контроль промотора EF1- α , известного своей способностью обеспечения высокого уровня экспрессии трансгенов [335], и содержащего в своем составе мотива Sp1, способного трансаактивировать E6 и E7 [337].

Были подробно охарактеризованы *in vitro* и *in vivo* свойства четырех случайно отобранных субклонов 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16 (B2, H6, D10, H12), которые сравнили с характеристиками клеток TC-1/4T1luc2.

Все четыре субклона 4T1luc2 имели по одной вставке ДНК E6 и E7. Субклоны отличались между собой по уровням экспрессии мРНК тотального E6 и E7. Уровни экспрессии тотального E6 различались от 1,3 до 15,8 раз, в экспрессии E7 – от 2,9 до 5,5 раз.

В мышинных конструкциях промотор EF1- α склонен к эпигенетическому подавлению экспрессии встроенных трансгенов посредством метилирования [368]. В силу этого важно было оценить стабильность экспрессии E6 и E7 при длительном культивировании. С этой целью нами был проведен эксперимент по длительному культивированию полученных субклонов (40 пассажей) и проведена сравнительная оценка уровней экспрессии тотального E6 и E7 в ранних (10 пассажей) и поздних (40 пассажей) пассажах. Все поздние пассажи показали значительное повышение экспрессии E6 и E7 по сравнению с ранними пассажами.

Маловероятно, что наблюдаемое повышение было связано со снижением уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *Hprt1*, используемого в анализе для нормализации уровней экспрессии. Ген *Hprt1* является одним из наиболее устойчиво экспрессируемых генов как в здоровых, так и опухолевых клетках мышей [339]. Кроме того, для агрессивных опухолевых клеток (плоскоклеточных карцином, которые мы моделируем, а также аденокарцином, как 4T1-клетки) характерны высокие уровни экспрессии *Hprt1* [340]. Было показано, что при прогрессировании опухоли уровень экспрессии *Hprt1* увеличивается, а не снижается [369]. В нашем случае, такое повышение уровня экспрессии *Hprt1* привело бы к относительному снижению уровней экспрессии *E6* и *E7*, а этого не наблюдалось. В связи с этим повышение уровней экспрессии *E6* и *E7* рассматривалось как объективное событие, происходящее в клетках 4T1luc2, экспрессирующих *E6/E7* ВПЧ16, при длительном культивировании. Полученные результаты подтвердили, что промотор EF1- α оптимален для обеспечения высокого стабильного уровня экспрессии *E6* и *E7* в клетках 4T1luc2 при длительном культивировании.

Клетки TC-1/luc2 были любезно предоставлены профессором TC Wu в 2019 году и культивировались в условиях нашей лаборатории периодами не менее чем 40 циклов, сопровождающихся перерывами. В силу этого, получить данные о стабильности уровней *E6* и *E7* при длительном культивировании этих клеток не представлялось возможным. С учетом длительного культивирования в лаборатории, мы приравнивали данную культуру клеток к «поздним пассажам» 4T1luc2 субклонов и сравнили уровни экспрессии мРНК тотального *E6* и *E7* в клетках TC-1/luc2 с таковыми уровнями в «поздних» пассажах субклонов 4T1luc2. Было обнаружено, что уровень экспрессии как тотального *E6*, так и *E7*, в клетках TC-1/luc2 значительно ниже таковых в клетках субклонов 4T1luc2.

В тканях предраковых поражений, ассоциированных с ВПЧ, а также в ВПЧ-ассоциированных опухолях обнаруживается широкий спектр изоформ *E6*, образующихся путём альтернативного сплайсинга мРНК [84; 370]. Практически все изоформы *E6* поддерживают трансляцию *E7*, в то время как несплайсированная мРНК поддерживает экспрессию полноразмерной формы *E6* (*E6FL*) и низкий уровень экспрессии *E7* [84; 371; 372]. Две изоформы *E6*, *E6*I* и *E6*II*, являются основными и играют роль в канцерогенезе, ассоциированном с ВПЧ16 (в основном *E6*I*) [82; 373–376]. Функции *E6FL* и *E6*I* неоднократно описывались как противоположные, в частности, *E6FL* в отличие от *E6*I*, может препятствовать онкогенной активности *E6* [305; 372; 376].

Нами было показано, что непосредственно после получения все субклоны 4T1luc2 демонстрировали преимущественную экспрессию *E6*I* перед полноразмерной формой *E6*. При длительном культивировании данная тенденция сохранялась для трех из четырех

субклонов (H6, D10, H12), для одного субклона (B2) доля *E6FL* незначительно превышала долю *E6*I*. Напротив, для клеток TC-1/luc2 было показано значительное превышение содержания *E6FL* по сравнению с *E6*I* и *E6*II* (в долях). Таким образом, полученные субклоны 4T1luc2, но не TC-1/luc2, воспроизводили профиль экспрессии изоформ E6, наблюдаемый в ВПЧ-ассоциированных опухолях [377].

Процесс альтернативного сплайсинга регулируется цис-действующими элементами и транс-факторами. Инфекция ВПЧ16 вызывает гиперэкспрессию факторов сплайсинга SRSF1, SRSF2 и SRSF3, ключевым из которых при РШМ является SRSF2 [83]. Амплификация гена *SRSF2* была также зафиксирована в 6–13% случаев рака молочной железы [378; 379], а опухоли трижды негативного рака молочной железы (TNBC) составляют более 20–40% всех типов опухолей молочной железы, сверхэкспрессирующих *SRSF2* [380]. Клетки 4T1 моделируют TNBC [381]. Гиперэкспрессия клетками 4T1luc2 факторов сплайсинга могла бы объяснить высокую долю в них сплайсоформ E6 по сравнению с *E6FL*.

Совокупность всех факторов подтверждала правильность выбора клеток 4T1luc2 (4T1) в качестве платформы для мышинной модели ВПЧ16 и указывала на преимущество новой модели перед другими.

После подкожной имплантации мышам все субклоны 4T1luc2, экспрессирующие *E6* и *E7*, показали хорошую приживаемость. В течение 6–7 дней после имплантации клетки образовывали пальпируемые опухоли, по объемам и морфологии неотличимые от опухолей, формируемых родительскими клетками 4T1luc2. Опухоли достигали размера 1 см³ в течение 3–4 недель после имплантации. Во всех опухолях подтверждалась экспрессия мРНК *E6* и *E7*. Методом визуализации биолюминесцентного сигнала (методом BLI) *ex vivo* была подтверждена способность всех субклонов 4T1luc2 к миграции от первичных опухолей к легким, селезенке и печени. В легких метастазы были подтверждены гистологически. Таким образом, новая модель подходила для проведения оценки влияния терапевтической вакцинации на рост опухолей и их метастазирование в экспериментах с продолжительностью до одного месяца.

Клетки 4T1luc2 известны своей агрессивностью и способностью давать крупные метастазы, в особенности в легких [271]. Поток эмиссии фотонов от крупных метастазов, в которых наблюдается гипоксия, может быть ниже, чем от мелких метастазов, из-за снижения активности люциферазы при недостатке кислорода [382]. Подобное явление было продемонстрировано в ряде ранних исследований [383; 384]. Гипоксия затрудняет детекцию крупных метастазов методом BLI. Для того, чтобы обойти это ограничение, было решено дополнительно подтверждать наличие метастазов/скоплений опухолевых клеток в органах методом ПЦР. Нами была разработана методика количественной *in-house* ПЦР, позволяющей

детектировать единичные молекулы E6 ВПЧ16 в фиксированных в формалине и залитых в парафин тканях мышей. Также была подтверждена валидность использования для выявления единичных молекул E6 и E7 ВПЧ16 в тканях мышей двух коммерческих тест-систем для выявления ВПЧ16 в тканях, Anyplex II HR HPV Detection и Allplex HPV Detection (обе Seegene, Южная Корея).

Нами были описаны редкие случаи, когда наличие метастазов могло быть подтверждено исключительно методом ПЦР, на примере крупного гипоксичного метастаза, который не детектировался методом BLI, а также обратной ситуации, когда инфильтрирующие орган единичные опухолевые клетки генерировали достаточный для обнаружения с помощью метода BLI уровень биолуминесцентного излучения, однако, ввиду сильной рассеянности клеток в органе, не детектировались методом ПЦР.

В целом, данные in-house ПЦР совпадали с данными, полученными методом BLI, хотя и не позволили определить точное количество опухолевых клеток, инфильтрирующих орган, поскольку реакция ПЦР проводилась с ДНК, выделенной из отдельных срезов, а не целого органа.

Для тестирования новых клеточных линий в модели терапевтической ДНК-иммунизации нами были выбраны два субклона 4T1luc2 (B2 и H6), отличающихся по уровням экспрессии мРНК тотального *E6*, *E7*, а также имеющих разный профиль распределения изоформ E6 в поздних пассажах. Неспособность ДНК-вакцинного конструкта, кодирующего E7, сдерживать рост опухолей, образуемых клетками TC-1/luc2, высокий уровень продукции провоспалительного цитокина ФНО- α спленоцитами реципиентов ДНК E7, а также повышенный риск образования у реципиентов ДНК E7 иммунных инфильтратов в печени, побудило нас исключить E7-антиген из дальнейшего тестирования. Мышей ДНК-иммунизировали только E6.

Иммунная микросреда опухоли играет решающую роль в прогрессии опухоли и ее ответе на иммунотерапию. ВПЧ использует множество взаимосвязанных механизмов ускользания от иммунного надзора хозяина, в том числе путем создания хронической иммуносупрессивной опухолевой микросреды. Эти процессы осуществляются путем нарушения презентации опухолевых антигенов, нарушении сигналов, опосредованных интерфероном (IFN- γ -signaling), метилирования промоторных областей генов HLA и стимулируемых интерфероном, а также метаболического перепрограммирования [385]. В целом, оба белка, и E6 и E7, обладают иммуносупрессивными свойствами, влияя как на врождённые, так и на адаптивные формы иммунного ответа [327; 328] с синергетическим подавляющим эффектом [42]. Ключевую роль в уклонении от иммунного надзора хозяина за счет ингибирования сигнальных путей иммунитета и изменения экспрессии генов цитокинов

и хемокинов, участвующих в воспалении, играет E6 [328; 386; 387]. В связи с этим, положительный эффект ДНК-иммунизации E6 в модели TC-1/luc2 мог быть обусловлен более низкими уровнями экспрессии как E6, так и E7 в этих клетках, а значит, его пониженным системным эффектом. В новой модели на основе клеток 4T1luc2, экспрессирующих высокие уровни E6 и E7, можно было ожидать других (худших) результатов на терапевтическую ДНК-иммунизацию. Наши предположения подтвердились. ДНК-иммунизация E6 не ограничивала ни рост, ни метастатическую активность (по оценке BLI) субклонов 4T1luc2. Единственным положительным эффектом ДНК-иммунизации E6 было обнаружение у мышей с имплантированными клетками H6 меньшего количества органов, инфильтрированных опухолевыми клетками (по данным ПЦР). Такого снижения не наблюдалось у мышей с опухолями, образованными клетками B2. Это могло быть связано с более высокой агрессивностью субклона H6 по сравнению с B2, с различиями в паттернах экспрессии как тотального E6 и E7, так и изоформ E6. Субклон H6 экспрессировал более высокие уровни тотального E6 и E7 *in vitro*. Также у субклона H6, в отличие от субклона B2, на протяжении длительного периода культивирования наблюдалось преобладание доли E6*I над E6FL. Необходимо отметить, что наблюдение не было объективным, поскольку анализ наличия в органах опухолевых клеток с методом ПЦР проводился только в выборке срезов, а не в целых органах.

В целом, в работе была продемонстрирована важность выбора адекватной доклинической модели, позволяющей более строго и надежно оценить эффективность экспериментальных терапевтических вакцин на основе E6/E7 против ВПЧ-ассоциированных агрессивных опухолей. Полученные в работе данные о различиях в уровнях экспрессии E6 и E7, а также изоформ E6, демонстрируют важность согласования этих параметров модели с таковыми в естественно-инфицированных опухолевых клетках человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена разработке методологии испытаний терапевтических ДНК-вакцин против злокачественных новообразований, ассоциированных с хронической инфекцией вирусом папилломы человека 16 типа, основанных на белках вируса Е6 и Е7.

Методология конструирования ДНК-иммуногена на основе белка Е6 учитывала высокий полиморфизм гена *Е6* внутри ВПЧ16, с четкой региональной представленностью и отличием в его трансформирующей способности для разных этнических групп. Для этого был проведен анализ изменчивости белков Е6 и Е7 изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории РФ и стран Европы. Были выявлены региональные различия белка Е6, а также проведен анализ влияния выявленных изменений в аминокислотном составе белка Е6 на его биологические и иммуногенные свойства. Белок Е7 в анализируемой популяции был консервативен. ДНК-иммуногены, кодирующие гены *Е6* и *Е7* ВПЧ16, были сконструированы с учетом актуальных для исследуемой популяции АК-замен в составе Е6 и консервативности Е7. Гены были представлены синтетическими нуклеотидными последовательностями, оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих. Доказана экспрессия обоих генов после их транзитной трансфекции в клетках мышей. Уровень экспрессии гена *Е6* существенно превосходил уровень экспрессии *Е7*.

Перед тестированием разработанных ДНК-иммуногенов на мышинной модели был выбран оптимальный способ доставки ДНК *in vivo*, обеспечивающий максимальный уровень продукции целевого белка. В ходе этой работы нами были протестированы и оптимизированы метод доставки ДНК путем внутрикожных инъекций в гипотонических буферных растворах, а также методы его принудительной доставки путем сонопорации и электропорации. Результаты показали, что только электропорация способствует эффективному введению плазмидной ДНК в клетки. Введение ДНК-иммуногенов методом электропорации обеспечивало индукцию как антительного, так и клеточного иммунного ответа против различных закодированных белков.

Ввиду того, что Е6 и Е7 обладают различной иммуногенностью, а Е7 выраженными иммуносупрессивными свойствами, было сделано предположение, что их совместное введение может негативно влиять на иммунный ответ, индуцируемый против каждого из введенных иммуногенов. Данная гипотеза была подтверждена в серии модельных экспериментов по совместному введению ДНК-иммуногенов, обладающих различными иммуногенными свойствами и отличающихся по уровню экспрессии в клетке. На основании полученных результатов, а также того факта, что уровень экспрессии гена *Е6* существенно превосходил уровень экспрессии *Е7*, что могло мешать экспрессии *Е7* при попадании плазмид

в одну клетку, было предложено вводить ДНК-иммуногены E6 и E7 только отдельными инъекциями.

Оценка иммуногенности разработанных ДНК-иммуногенов показала, что иммунизация ДНК E6 индуцирует специфический Т-клеточный ответ по типу Th1, в то время как иммунизация ДНК E7 специфического ответа не вызывает. Было показано, что ДНК-иммунизация E6 и E7, несмотря на отдельное введение, приводит к снижению иммунного ответа на E6. Также было выявлено повышение уровня продукции цитокина ФНО- α нестимулированными спленocyтaми реципиентов ДНК E7.

Результаты исследования иммуногенности были подтверждены в оценке способности разработанных ДНК-вакцинных конструkтов ограничивать рост и миграционную активность опухолевых клеток, экспрессирующих E6 и E7 в терапевтических условиях на широко используемой мышинной модели TC-1/luc2. ДНК-иммунизация E6 ограничивала рост опухолей, в то время как ДНК-иммунизация E7 и композицией E6 и E7, эффекта не имели. Кроме того, отмечалось наличие в печени мышей-реципиентов ДНК E7 большого скопления иммунных инфильтратов, схожих по структуре с наблюдаемыми у мышей повреждениями печени. Совокупность этих факторов свидетельствовала не только о нецелесообразности ДНК-иммунизации E7, но также о ее негативных последствиях. Проведенные нами эксперименты так же показали, что модель TC-1/luc2 не позволяет в полной мере оценить эффективность терапевтической ДНК-иммунизации ввиду отсутствия метастатического потенциала клеток TC-1/luc2.

Для создания модели, позволяющей оценить эффект иммунизации на рост опухоли и ее метастатическую активность, в рамках настоящей работы была создана новая модель опухолевых клеток, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16. Модель была создана на основе агрессивной высокометастатической клеточной линии клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2. Ряд проведенных *in vitro* и *in vivo* тестов показал преимущество новой модели по сравнению с моделью TC-1/luc2, а также подтвердил высокое сходство новой модели с естественно-инфицированными опухолями человека, экспрессирующими E6 и E7 ВПЧ16. Большим преимуществом новой модели была ее более строгая оценка терапевтического потенциала экспериментальных вакцин на основе E6/E7 против злокачественных новообразований, ассоциированных с инфекцией ВПЧ16. В частности, было показано, что при тестировании на адекватной модели, ДНК-иммунизация E6 не дает терапевтического эффекта. Эти результаты согласуются с результатами ряда клинических испытаний, показавших неэффективность иммуногенов на основе E6 и E7 ВПЧ16 несмотря на положительные результаты доклинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. В циркулирующих на территории Европы изолятах ВПЧ16 аминокислотная последовательность белка Е6 вариабельна, а белка Е7 – консервативна. Наиболее распространенной аминокислотной заменой в последовательности Е6 в европейской популяции является единичная замена L90V. Показано сходство набора аминокислотных замен в последовательности Е6 изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории европейской части РФ и в Северной Европе (Балтийском регионе). На основании полученных данных сконструированы консенсусные последовательности Е6 и Е7. Созданы кодирующие их векторы, оптимизированные для экспрессии в клетках млекопитающих, показана экспрессия соответствующих мРНК после трансфекции клеток мышей.

2. С использованием плазмидной ДНК, кодирующей репортерный белок, подобраны оптимальные режимы для трех методов доставки плазмидных ДНК *in vivo*: (1) инъекции ДНК в буферах с различной ионной силой, (2) сонопорации и (3) электропорации. На модельных ДНК-иммуногенах показано, что наиболее эффективным методом доставки является электропорация.

3. Совместное введение в один анатомический сайт гена, кодирующего белок с иммуномодулирующими свойствами, совместно с сильным иммуногеном нежелательно, так как приводит к ингибированию Т-клеточного иммунного ответа против последнего.

4. ДНК-иммунизация Е6 индуцирует развитие специфического Т-клеточного иммунного ответа Th1-типа. ДНК-иммунизация Е7 выраженного специфического ответа не вызывает, однако индуцирует продукцию цитокина ФНО- α и вызывает усиленное образование воспалительных инфильтратов в печени. Одновременное введение ДНК-иммуногенов Е6 и Е7, несмотря на разделение сайтов введения, приводит к снижению иммунного ответа на Е6.

5. На модели ТС-1/luc2 показана ограниченная терапевтическая активность ДНК-вакциной конструкции, кодирующей консенсусный белок Е6 ВПЧ16 и низкая терапевтическая активность ДНК-вакциной конструкции, кодирующей консенсусный белок Е7 ВПЧ16.

6. Экспериментальная модель на основе опухолевых клеток ТС-1/luc2 не позволяет в полной мере оценить терапевтический потенциал кандидатных терапевтических вакцинных препаратов против ВПЧ-ассоциированного рака ввиду неспособности этих клеток к метастазированию. Получена и охарактеризована в экспериментах *in vitro* и *in vivo* новая модель мышинных опухолевых клеток, экспрессирующих Е6 и Е7 ВПЧ16, на основе клеточной линии аденокарциномы молочной железы мыши 4Т1luc2.

7. Несмотря на индукцию специфического Т-клеточного иммунного ответа и терапевтическую активность в ТС-1/luc2 модели, ДНК-вакцинная конструкция, кодирующая консенсусный белок Е6 ВПЧ16, не способна ограничивать рост и метастатическую активность полученных субклонов 4Т1luc2, экспрессирующих *Е6* и *Е7* ВПЧ16.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Необходимо оценивать уровни экспрессии закодированных ДНК-иммуногенов по мРНК, в случае E6 ВПЧ16, проводить характеристику профиля изоформ. Необходимо оценивать изменение иммуногенности компонентов композитных ДНК-вакцин при совместном введении. Важно проводить оценку метастатической активности опухолей методом ВЛІ с подтверждением ПЦР и патоморфологическими методами. Проводить оценку вариабельности белков E6 и E7 ВПЧ для того региона, на территории которого предполагается использование терапевтической вакцины на основе E6 и E7 ВПЧ. Оптимизировать условия электропорации для ДНК-иммунизации с учетом конфигурации используемого оборудования.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Необходим мониторинг циркулирующих в Российской Федерации (в том числе в азиатском регионе, не затронутом в этой работе) вариантов ВПЧ16 с целью своевременного обнаружения новых изолятов, а также вариантов, обладающих повышенной онкогенностью. Эти данные необходимо использовать для конструирования новых актуализированных терапевтических вакцин против неоплазий и опухолей, ассоциированных с ВПЧ16 инфекцией. Необходима модификация разработанных ДНК-вакцинных конструкторов для усиления их иммуногенности. Требуется изучение детальных аспектов иммунного ответа, связанного с предотвращением опухолевого роста субклонов 4T1luc2, экспрессирующих гены *E6* и *E7* ВПЧ16.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК – аминокислотный

а. о. – аминокислотный остаток

АПК – антиген-презентирующие клетки

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ВГС – вирус гепатита С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

в/к – внутрикожно

ВКИ – внутрикожная инъекция

ВПЧ – вирус папилломы человека

ВПЧ ВКР – вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска

ВПЧ НКР – вирус папилломы человека низкого канцерогенного риска

ДССС – детекция сверхмалых световых сигналов

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИП – иммунные инфильтраты в печени

ИЛ – интерлейкины

ИФА – иммуноферментный анализ

ИФН – интерферон

КИ – клинические исследования

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НК – нуклеиновые кислоты

ОМК – опухолевые мышечные клетки

ОП – оптическая плотность

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ – обратная транскриптаза

ОТ-ПРЦ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЗС – прибор с зарядовой связью

п. о. – пар олигонуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

РШМ – рак шейки матки

СО – стандартное отклонение

СП – сонопорация

Т-ОТ – теломеразная обратная транскриптаза

УЗ – ультразвук

УЗИ – ультразвуковое исследование

УФ – ультрафиолет

ФБ – фосфатный буфер

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФНО – фактор некроза опухоли

цкПЦР – цифровая капельная ПЦР

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

ЭЛП – электропорация

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

AIN – anal intraepithelial neoplasia; анальная интраэпителиальная неоплазия

BLI – bioluminescence imaging; биолюминесцентный имеджинг

CIN – cervical intraepithelial neoplasia; интраэпителиальная неоплазия шейки матки

СКII – Casein Kinase II; Казеинкиназа II

CMV – Cytomegalovirus, цитомегаловирус

ConA – Concanavalin A; конканавалин А

CR – conservation region; консервативный домен

Е6АР – E6-associated protein; белок, связанный с Е6 EF1 α – Elongation factor 1-alpha 1; фактор элонгации 1-альфа

EGFP – green fluorescent protein; модифицированный зеленый флуоресцентный белок

FFPE – Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; фиксированный в формалине и заключенный в парафин

HIF-1 α – Hypoxia-inducible factor 1-alpha; фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа

HLA – Human Leukocyte Antigens; человеческий лейкоцитарный антиген

HNSCC – Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; плоскоклеточная карцинома головы и шеи

HSIL – high grade squamous intraepithelial lesion; плоскоклеточное интраэпителиальное поражение высокой степени

IFN- γ – interferon gamma; интерферон-гамма

LCR – Locus Control Region; длинная контрольная область

LLO – listeriolysin O; листериолизин O

LSIL – low grade squamous intraepithelial lesion; плоскоклеточное интраэпителиальное поражение низкой степени

MHC – major histocompatibility complex; главный комплекс гистосовместимости

MVA – Modified Vaccinia Virus Ankara; модифицированный вирус осповакцины Анкара

NLS – Nuclear Localization Signal; сигнал ядерной локализации

p53 – онкосупрессорный белок

PAMP – Pathogen Associated Molecular Patterns; патоген-ассоциированных молекулярных паттернов

PDX - Patient-Derived Xenografts; трансплантаты от пациента

PDZ – домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия; название от первых букв белков, где он был обнаружен: PSD-95, DlgA и ZO-1.

pRb – белок-супрессор ретинобластомы

ROI – region of interest; область интереса

SFV – Semliki Forest virus; вирус леса Семлики

SNV – Single Nucleotide Variant, однонуклеотидный вариант

SRSFs – Serine/arginine-rich splicing factors; факторы сплайсинга, богатые серином/аргинином

TNBC – Triple-negative breast cancer; трижды негативный рак молочной железы

TSA – Tumor-Specific Antigen; опухоль-ассоциированный антиген

UBE3A – Ubiquitin-protein ligase E3A; убиквитин-протеинлигаза E3A

URR – upstream regulatory region; восходящая регуляторная область вирусного генома

UTR– untranslated regions; нетранслируемая область

VAIN – vaginal intraepithelial neoplasia; вагинальная интраэпителиальная неоплазия

VIN – vulvar intraepithelial neoplasia; интраэпителиальная неоплазия вульвы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anna Szymonowicz, K. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers / K. Anna Szymonowicz, J. Chen // *Cancer Biology and Medicine*. – 2020. – Vol. 17. – № 4. – P. 864-878. – DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370.
2. Gonçalves, C.A. Safety, Efficacy, and Immunogenicity of Therapeutic Vaccines for Patients with High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN 2/3) Associated with Human Papillomavirus: A Systematic Review / C.A. Gonçalves, G. Pereira-da-Silva, R.C.C.P. Silveira [et al.] // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16. – № 3. – P. 672. – DOI: 10.3390/cancers16030672.
3. Alouini, S. Therapeutic Vaccines for HPV-Associated Cervical Malignancies: A Systematic Review / S. Alouini, C. Pichon // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 4. – P. 428. – DOI: 10.3390/vaccines12040428.
4. Demidova, A. Comparison of preclinical efficacy of immunotherapies against HPV-induced cancers / A. Demidova, L. Douguet, I. Fert [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2024. – Vol. 23. – № 1. – P. 674-687. – DOI: 10.1080/14760584.2024.2374287.
5. Martín, E. Advances in Therapeutic Vaccines Against HPV: A Review of Human Clinical Trials / E. Martín, G. Reina, S. Carlos // *Current Oncology*. – 2025. – Vol. 32. – № 11. – P. 600. – DOI: 10.3390/curroncol32110600.
6. Li, Y.-L. Immunization with mutant HPV16 E7 protein inhibits the growth of TC-1 cells in tumor-bearing mice / Y.-L. Li, Z.-L. Ma, Y. Zhao, J. Zhang // *Oncology Letters*. – 2015. – Vol. 9. – № 4. – P. 1851-1856. – DOI: 10.3892/ol.2015.2911.
7. Zottnick, S. Inducing Immunity Where It Matters: Orthotopic HPV Tumor Models and Therapeutic Vaccinations / S. Zottnick, A.L. Voß, A.B. Riemer // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1750. – DOI: 10.3389/fimmu.2020.01750.
8. Smalley Rumfield, C. Therapeutic Vaccines for HPV-Associated Malignancies / C. Smalley Rumfield, N. Roller, S.T. Pellom [et al.] // *ImmunoTargets and Therapy*. – 2020. – Vol. Volume 9. – P. 167-200. – DOI: 10.2147/ITT.S273327.
9. Назарова, Н.М. Новые возможности диагностики «малых» форм поражений эпителия шейки матки, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией (обзор литературы) / Н.М. Назарова, В.Н. Прилепская, Е.Г. Сычева [и др.] // *Гинекология*. – 2015. – Т. 17. – № 5. – С. 32-36.
10. Garolla, A. HPV-related diseases in male patients: an underestimated conundrum / A. Garolla, A. Graziani, G. Grande [et al.] // *Journal of Endocrinological Investigation*. – 2023. – Vol. 47. – № 2. – P. 261-274. – DOI: 10.1007/s40618-023-02192-3.

11. Вонский, М.С. Карциногенез, ассоциированный с инфекцией вирусами папилломы человека, его механизмы и возможности иммунотерапии / М.С. Вонский, М.Г. Шабаета, А.Л. Рунов [и др.] // Биохимия. – 2019. – Т. 84. – № 7. – Р. 995-1015. – DOI: 10.1134/S0320972519070091.
12. Zhang, Y. Roles of human papillomavirus in cancers: oncogenic mechanisms and clinical use / Y. Zhang, K. Qiu, J. Ren [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2025. – Vol. 10. – № 1. – Р. 44. – DOI: 10.1038/s41392-024-02083-w.
13. Mlynarczyk-Bonikowska, B. HPV Infections—Classification, Pathogenesis, and Potential New Therapies / B. Mlynarczyk-Bonikowska, L. Rudnicka // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 14. – Р. 7616. – DOI: 10.3390/ijms25147616.
14. Schiffman, M. Carcinogenic human papillomavirus infection / M. Schiffman, J. Doorbar, N. Wentzensen [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. – 2016. – Vol. 2. – № 1. – Р. 16086. – DOI: 10.1038/nrdp.2016.86.
15. International Human Papillomavirus Reference Center. – Mode of access: <https://www.hpvcenter.se/> (date of access: 10.02.2026). – [Electronic resource].
16. Nelson, C.W. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity / C.W. Nelson, L. Mirabello // Tumour Virus Research. – 2023. – Vol. 15. – Р. 200258. – DOI: 10.1016/j.tvr.2023.200258.
17. Burk, R.D. Human papillomavirus genome variants / R.D. Burk, A. Harari, Z. Chen // Virology. – 2013. – Vol. 445. – № 1-2. – Р. 232-243. – DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.018.
18. Pimenoff, V.N. Transmission between Archaic and Modern Human Ancestors during the Evolution of the Oncogenic Human Papillomavirus 16 / V.N. Pimenoff, C.M. De Oliveira, I.G. Bravo // Molecular Biology and Evolution. – 2017. – Vol. 34. – № 1. – Р. 4-19. – DOI: 10.1093/molbev/msw214.
19. Rogovskaya, S.I. Human Papillomavirus Prevalence and Type-Distribution, Cervical Cancer Screening Practices and Current Status of Vaccination Implementation in Russian Federation, the Western Countries of the former Soviet Union, Caucasus Region and Central Asia / S.I. Rogovskaya, I.P. Shabalova, I.V. Mikheeva [et al.] // Vaccine. – 2013. – Vol. 31. – Р. H46-H58. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.06.043.
20. Донников, А.Е. Анализ распространенности и вирусной нагрузки различных типов вируса папилломы человека в регионах Российской Федерации / А.Е. Донников, М.И. Маркелов, Т.Ю. Пестрикова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2019. – Т. 4. – С. 39-47. – DOI: 10.18565/aig.2019.4.39-47.
21. Дмитриюкова, М.Ю. Молекулярно-биологические особенности инфекции ВПЧ 16 типа и риск развития цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражений и рака

- шейки матки / М.Ю. Дмитриюкова, Л.И. Короленкова, Т.Н. Романюк [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2019. – Т. 2. – С. 113-119. – DOI: 10.18565/aig.2019.2.113-119.
22. Афанасьев, М.С. Типовое разнообразие папилломавирусов человека высокого канцерогенного риска при клинических формах инфекции шейки матки в Российской Федерации / М.С. Афанасьев, А.Д. Душкин, С.С. Афанасьев [и др.] // *Инфекция и иммунитет*. – 2025. – Т. 15. – № 2. – С. 271-286. – DOI: 10.15789/2220-7619-ТРО-17690.
 23. Раевская, Н.М. Перспективы разработки терапевтических вакцин против папилломавирусной инфекции / Н.М. Раевская, Т.Н. Никитина, А.С. Симбирцев [и др.] // *Инфекция и иммунитет*. – 2024. – Т. 14. – № 4. – С. 655-671. – DOI: 10.15789/2220-7619-POD-17636.
 24. Moody, C.A. Regulation of the Innate Immune Response during the Human Papillomavirus Life Cycle / C.A. Moody // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – P. 1797. – DOI: 10.3390/v14081797.
 25. Egawa, N. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia / N. Egawa, K. Egawa, H. Griffin, J. Doorbar // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – № 7. – P. 3863-3890. – DOI: 10.3390/v7072802.
 26. Arroyo-Mühr, L.-S. The HPV16 Genome Is Stable in Women Who Progress to In Situ or Invasive Cervical Cancer: A Prospective Population-Based Study / L.-S. Arroyo-Mühr, C. Lagheden, E. Hultin [et al.] // *Cancer Research*. – 2019. – Vol. 79. – № 17. – P. 4532-4538. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3933.
 27. Roy-Biswas, S. The Epithelial Immune Response to Human Papillomavirus Infection / S. Roy-Biswas, M. Hibma // *Pathogens*. – 2025. – Vol. 14. – № 5. – P. 464. – DOI: 10.3390/pathogens14050464.
 28. Guerendiain, D. HPV status and HPV16 viral load in anal cancer and its association with clinical outcome / D. Guerendiain, R. Grigorescu, A. Kirk [et al.] // *Cancer Medicine*. – 2022. – Vol. 11. – № 22. – P. 4193-4203. – DOI: 10.1002/cam4.4771.
 29. DiMaio, D. The E5 proteins / D. DiMaio, L.M. Petti // *Virology*. – 2013. – Vol. 445. – № 1-2. – P. 99-114. – DOI: 10.1016/j.virol.2013.05.006.
 30. Janiszewska, J. HPV-driven oncogenesis—much more than the E6 and E7 oncoproteins / J. Janiszewska, M. Kostrzewska-Poczekaj, M. Wierzbička [et al.] // *Journal of Applied Genetics*. – 2025. – Vol. 66. – № 1. – P. 63-71. – DOI: 10.1007/s13353-024-00883-y.
 31. Greco, D. Human Papillomavirus 16 E5 Modulates the Expression of Host MicroRNAs / D. Greco, N. Kivi, K. Qian [et al.] // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. e21646. – DOI: 10.1371/journal.pone.0021646.

32. Berti, F.C.B. The role of interleukin 10 in human papilloma virus infection and progression to cervical carcinoma / F.C.B. Berti, A.P.L. Pereira, G.C.M. Cebinelli [et al.] // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2017. – Vol. 34. – P. 1-13. – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.03.002.
33. Castro-Muñoz, L.J. The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response / L.J. Castro-Muñoz, J. Manzo-Merino, J.O. Muñoz-Bello [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 13620. – DOI: 10.1038/s41598-019-49886-4.
34. Baedyananda, F. Role of HPV16 E1 in cervical carcinogenesis / F. Baedyananda, T. Sasivimolrattana, A. Chaiwongkot [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 955847. – DOI: 10.3389/fcimb.2022.955847.
35. Dzhidzhikhiya, L.K. Squamous intraepithelial lesions of the cervix of low severity. Diagnostics and management tactics / L.K. Dzhidzhikhiya, N.V. Zarochentseva, M.G. Dzhavakhishvili // *Issues of practical colposcopy. Genital infections*. – 2022. – № 1. – P. 32-41. – DOI: 10.46393/27826392_2022_1_32.
36. Luhn, P. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer / P. Luhn, J. Walker, M. Schiffman [et al.] // *Gynecologic Oncology*. – 2013. – Vol. 128. – № 2. – P. 265-270. – DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.11.003.
37. Ибрагимова, М.К. Интегративная и эписомальная формы генотипа 16 вируса папилломы человека при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки / М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, И.В. Карабут [и др.] // *Вопросы вирусологии*. – 2016. – Т. 61. – № 6. – С. 270-274. – DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-6-270-274.
38. Chen, X. Risk factors and prognostic predictors for Cervical Cancer patients with lung metastasis / X. Chen, L. Chen, H. Zhu, J. Tao // *Journal of Cancer*. – 2020. – Vol. 11. – № 20. – P. 5880-5889. – DOI: 10.7150/jca.46258.
39. Zhou, S. Patterns of metastases in cervical cancer: a population-based study / S. Zhou, F. Peng // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2020. – Vol. 13. – № 7. – P. 1615-1623.
40. Theocharopoulos, C. Metachronous Isolated Splenic Metastasis From Cervical Squamous Cell Carcinoma Directly Invading the Stomach: A Case Report / C. Theocharopoulos, G. Stanc, C.-C. Douligieris [et al.]. – [Electronic resource] // *Cureus*. – 2025. – Mode of access: <https://www.cureus.com/articles/341731-metachronous-isolated-splenic-metastasis-from-cervical-squamous-cell-carcinoma-directly-invading-the-stomach-a-case-report> (date of access: 10.02.2026).
41. Schulte, J.J. Metastatic HPV-Associated Oropharyngeal Versus Primary Pulmonary Squamous Cell Carcinoma: is p16 Immunostain Useful? / J.J. Schulte, J. Steinmetz, L.V. Furtado [et

- al.] // *Head and Neck Pathology*. – 2020. – Vol. 14. – № 4. – P. 966-973. – DOI: 10.1007/s12105-020-01165-9.
42. James, C.D. Human Papillomavirus 16 E6 and E7 Synergistically Repress Innate Immune Gene Transcription / C.D. James, C.T. Fontan, R. Otoa [et al.] // *mSphere*. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. e00828-19. – DOI: 10.1128/mSphere.00828-19.
 43. Prins, R. HPV16 E6 and E7 expressing cancer cells suppress the antitumor immune response by upregulating KLF2-mediated IL-23 expression in macrophages / R. Prins, D.J. Fernandez, O. Akbari [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2025. – Vol. 13. – № 8. – P. e011915. – DOI: 10.1136/jitc-2025-011915.
 44. Ling, J. Human papillomavirus 16 E6/E7 contributes to immune escape and progression of cervical cancer by regulating miR-142–5p/PD-L1 axis / J. Ling, Q. Sun, Q. Tian [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2022. – Vol. 731. – P. 109449. – DOI: 10.1016/j.abb.2022.109449.
 45. Lepique, A.P. HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses / A.P. Lepique, K.R.P. Daghashtanli, I.M. Cuccovia, L.L. Villa // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15. – № 13. – P. 4391-4400. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0489.
 46. Martinez-Zapien, D. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53 / D. Martinez-Zapien, F.X. Ruiz, J. Poirson [et al.] // *Nature*. – 2016. – Vol. 529. – № 7587. – P. 541-545. – DOI: 10.1038/nature16481.
 47. Xie, X. Targeting HPV16 E6-p300 interaction reactivates p53 and inhibits the tumorigenicity of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma / X. Xie, L. Piao, B.N. Bullock [et al.] // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – № 8. – P. 1037-1046. – DOI: 10.1038/onc.2013.25.
 48. Patel, D. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300 / D. Patel // *The EMBO Journal*. – 1999. – Vol. 18. – № 18. – P. 5061-5072. – DOI: 10.1093/emboj/18.18.5061.
 49. Tomaić, V. Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites / V. Tomaić // *Cancers*. – 2016. – Vol. 8. – № 10. – P. 95. – DOI: 10.3390/cancers8100095.
 50. Cruz-Gregorio, A. Lipid metabolism and oxidative stress in HPV-related cancers / A. Cruz-Gregorio, A.K. Aranda-Rivera, A.J. Ortega-Lozano [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 172. – P. 226-236. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.009.
 51. Cosper, P.F. HPV16 E6 induces chromosomal instability due to polar chromosomes caused by E6AP-dependent degradation of the mitotic kinesin CENP-E / P.F. Cosper, L.C.F. Hrycyniak, M. Paracha [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2023. – Vol. 120. – № 14. – P. e2216700120. – DOI: 10.1073/pnas.2216700120.

52. Cui, X. miR-106a Regulates Cell Proliferation and Autophagy by Targeting LKB1 in HPV-16-Associated Cervical Cancer / X. Cui, X. Wang, X. Zhou [et al.] // *Molecular Cancer Research*. – 2020. – Vol. 18. – № 8. – P. 1129-1141. – DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-1114.
53. Songock, W.K. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription / W.K. Songock, S. Kim, J.M. Bodily // *Virus Research*. – 2017. – Vol. 231. – P. 56-75. – DOI: 10.1016/j.virusres.2016.10.017.
54. Wang, Q. HPV16 E6 promotes cervical cancer cell migration and invasion by downregulation of NHERF1 / Q. Wang, R. Song, C. Zhao [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 144. – № 7. – P. 1619-1632. – DOI: 10.1002/ijc.31876.
55. Ganti, K. The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy / K. Ganti, J. Broniarczyk, W. Manoubi [et al.] // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – № 7. – P. 3530-3551. – DOI: 10.3390/v7072785.
56. Zerfass-Thome, K. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein / K. Zerfass-Thome, W. Zwerschke, B. Mannhardt [et al.] // *Oncogene*. – 1996. – Vol. 13. – № 11. – P. 2323-2330.
57. Funk, J.O. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein / J.O. Funk, S. Waga, J.B. Harry [et al.] // *Genes & Development*. – 1997. – Vol. 11. – № 16. – P. 2090-2100. – DOI: 10.1101/gad.11.16.2090.
58. Yadav, C. Overview of genetic and epigenetic regulation of human papillomavirus and apoptosis in cervical cancer / C. Yadav, R. Yadav, R. Chhabra [et al.] // *Apoptosis*. – 2023. – Vol. 28. – № 5-6. – P. 683-701. – DOI: 10.1007/s10495-023-01812-w.
59. He, S. Human papillomavirus E7 protein induces homologous recombination defects and PARPi sensitivity / S. He, A. Wang, J. Wang [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2024. – Vol. 150. – № 1. – P. 27. – DOI: 10.1007/s00432-023-05511-6.
60. Sitz, J. Human papillomavirus E7 oncoprotein targets RNF168 to hijack the host DNA damage response / J. Sitz, S.A. Blanchet, S.F. Gameiro [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Vol. 116. – № 39. – P. 19552-19562. – DOI: 10.1073/pnas.1906102116.
61. Matarrese, P. Physical Interaction between HPV16E7 and the Actin-Binding Protein Gelsolin Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition via HIPPO-YAP Axis / P. Matarrese, R. Vona, B. Ascione [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 353. – DOI: 10.3390/cancers13020353.
62. Azevedo Martins, J.M. Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis / J.M. Azevedo Martins, S.H. Rabelo-Santos, M.C. Do Amaral Westin, L.C. Zeferino // *BMC Cancer*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 660. – DOI: 10.1186/s12885-020-07150-3.

63. Tao, M. Signals That Dictate Nuclear Localization of Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6 in Living Cells / M. Tao, M. Kruhlak, S. Xia [et al.] // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol. 77. – № 24. – P. 13232-13247. – DOI: 10.1128/JVI.77.24.13232-13247.2003.
64. Ruttkay-Nedecky, B. Relevance of infection with human papillomavirus: The role of the p53 tumor suppressor protein and E6/E7 zinc finger proteins / B. Ruttkay-Nedecky, A.M.J. Jimenez, L. Nejdl [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2013. – Vol. 43. – № 6. – P. 1754-1762. – DOI: 10.3892/ijo.2013.2105.
65. Kim, R.H. Bmi-1 cooperates with human papillomavirus type 16 E6 to immortalize normal human oral keratinocytes / R.H. Kim, M.K. Kang, K.-H. Shin [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2007. – Vol. 313. – № 3. – P. 462-472. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.10.025.
66. Delury, C.P. The Role of Protein Kinase A Regulation of the E6 PDZ-Binding Domain during the Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomavirus Type 18 / C.P. Delury, E.K. Marsh, C.D. James [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 17. – P. 9463-9472. – DOI: 10.1128/JVI.01234-13.
67. Spanos, W.C. Deletion of the PDZ motif of HPV16 E6 preventing immortalization and anchorage-independent growth in human tonsil epithelial cells / W.C. Spanos, J. Geiger, M.E. Anderson [et al.] // *Head & Neck*. – 2008. – Vol. 30. – № 2. – P. 139-147. – DOI: 10.1002/hed.20673.
68. Yoshimatsu, Y. Roles of the PDZ-binding motif of HPV 16 E6 protein in oncogenic transformation of human cervical keratinocytes / Y. Yoshimatsu, T. Nakahara, K. Tanaka [et al.] // *Cancer Science*. – 2017. – Vol. 108. – № 7. – P. 1303-1309. – DOI: 10.1111/cas.13264.
69. Arroyo, M. Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. / M. Arroyo, S. Bagchi, P. Raychaudhuri // *Molecular and Cellular Biology*. – 1993. – Vol. 13. – № 10. – P. 6537-6546. – DOI: 10.1128/MCB.13.10.6537.
70. Giarre, M. Induction of pRb Degradation by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Is Essential To Efficiently Overcome p16^{INK4a}-Imposed G₁ Cell Cycle Arrest / M. Giarre, S. Caldeira, I. Malanchi [et al.] // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75. – № 10. – P. 4705-4712. – DOI: 10.1128/JVI.75.10.4705-4712.2001.
71. Collins, A.S. Interactions with Pocket Proteins Contribute to the Role of Human Papillomavirus Type 16 E7 in the Papillomavirus Life Cycle / A.S. Collins, T. Nakahara, A. Do, P.F. Lambert // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 23. – P. 14769-14780. – DOI: 10.1128/JVI.79.23.14769-14780.2005.
72. Chellappan, S. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. / S. Chellappan, V.B. Kraus, B. Kroger [et al.] // *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89. – № 10. – P. 4549-4553. – DOI: 10.1073/pnas.89.10.4549.
73. Singh, M. Molecular Determinants for the Complex Formation between the Retinoblastoma Protein and LXCXE Sequences / M. Singh, M. Krajewski, A. Mikolajka, T.A. Holak // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 45. – P. 37868-37876. – DOI: 10.1074/jbc.M504877200.
74. Bodily, J.M. Human Papillomavirus E7 Enhances Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Transcription by Inhibiting Binding of Histone Deacetylases / J.M. Bodily, K.P.M. Mehta, L.A. Laimins // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 3. – P. 1187-1195. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2626.
75. Lee, H.S. Molecular Analysis of the Interaction between Human PTPN21 and the Oncoprotein E7 from Human Papillomavirus Genotype 18 / H.S. Lee, M.W. Kim, K.S. Jin [et al.] // *Molecules and Cells*. – 2021. – Vol. 44. – № 1. – P. 26-37. – DOI: 10.14348/molcells.2020.0169.
76. Liu, X. Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor / X. Liu, A. Clements, K. Zhao, R. Marmorstein // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. – № 1. – P. 578-586. – DOI: 10.1074/jbc.M508455200.
77. Eberhard, J. Nuclear import of high risk HPV16 E7 oncoprotein is mediated by its zinc-binding domain via hydrophobic interactions with Nup62 / J. Eberhard, Z. Onder, J. Moroianu // *Virology*. – 2013. – Vol. 446. – № 1-2. – P. 334-345. – DOI: 10.1016/j.virol.2013.08.017.
78. Huh, K. Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Cullin 2 Ubiquitin Ligase Complex, Which Contributes to Degradation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor / K. Huh, X. Zhou, H. Hayakawa [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 18. – P. 9737-9747. – DOI: 10.1128/JVI.00881-07.
79. Avvakumov, N. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase / N. Avvakumov, J. Torchia, J.S. Mymryk // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22. – № 25. – P. 3833-3841. – DOI: 10.1038/sj.onc.1206562.
80. Edmonds, C. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein / C. Edmonds, K.H. Vousden // *Journal of Virology*. – 1989. – Vol. 63. – № 6. – P. 2650-2656. – DOI: 10.1128/jvi.63.6.2650-2656.1989.
81. Todorovic, B. Systematic Analysis of the Amino Acid Residues of Human Papillomavirus Type 16 E7 Conserved Region 3 Involved in Dimerization and Transformation / B. Todorovic, P. Massimi, K. Hung [et al.] // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85. – № 19. – P. 10048-10057. – DOI: 10.1128/JVI.00643-11.

82. Olmedo-Nieva, L. The Role of E6 Spliced Isoforms (E6*) in Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis / L. Olmedo-Nieva, J. Muñoz-Bello, A. Contreras-Paredes, M. Lizano // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – № 1. – P. 45. – DOI: 10.3390/v10010045.
83. McFarlane, M. Human Papillomavirus 16 Oncoprotein Expression Is Controlled by the Cellular Splicing Factor SRSF2 (SC35) / M. McFarlane, A.I. MacDonald, A. Stevenson, S.V. Graham // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89. – № 10. – P. 5276-5287. – DOI: 10.1128/JVI.03434-14.
84. Ajiro, M. Intron Definition and a Branch Site Adenosine at nt 385 Control RNA Splicing of HPV16 E6*I and E7 Expression / M. Ajiro, R. Jia, L. Zhang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 10. – P. e46412. – DOI: 10.1371/journal.pone.0046412.
85. Antonio-Véjar, V. New insights into the interactions of HPV-16 E6*I and E6*II with p53 isoforms and induction of apoptosis in cancer-derived cell lines / V. Antonio-Véjar, E. Ortiz-Sánchez, P. Rosendo-Chalma [et al.] // *Pathology - Research and Practice*. – 2022. – Vol. 234. – P. 153890. – DOI: 10.1016/j.prp.2022.153890.
86. Filippova, M. The Human Papillomavirus 16 E6 Protein Binds to Fas-associated Death Domain and Protects Cells from Fas-triggered Apoptosis / M. Filippova, L. Parkhurst, P.J. Duerksen-Hughes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 24. – P. 25729-25744. – DOI: 10.1074/jbc.M401172200.
87. Filippova, M. Complexes of Human Papillomavirus Type 16 E6 Proteins Form Pseudo-Death-Inducing Signaling Complex Structures during Tumor Necrosis Factor-Mediated Apoptosis / M. Filippova, V.A. Filippov, M. Kagoda [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – № 1. – P. 210-227. – DOI: 10.1128/JVI.01365-08.
88. Ajiro, M. E6^{E7}, a Novel Splice Isoform Protein of Human Papillomavirus 16, Stabilizes Viral E6 and E7 Oncoproteins via HSP90 and GRP78 / M. Ajiro, Z.-M. Zheng // *mBio*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. e02068-14. – DOI: 10.1128/mBio.02068-14.
89. Walline, H.M. Integration of high-risk human papillomavirus into cellular cancer-related genes in head and neck cancer cell lines / H.M. Walline, C.M. Goudsmit, J.B. McHugh [et al.] // *Head & Neck*. – 2017. – Vol. 39. – № 5. – P. 840-852. – DOI: 10.1002/hed.24729.
90. Baker, C.C. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines / C.C. Baker, W.C. Phelps, V. Lindgren [et al.] // *Journal of Virology*. – 1987. – Vol. 61. – № 4. – P. 962-971. – DOI: 10.1128/jvi.61.4.962-971.1987.
91. Cerasuolo, A. Comparative analysis of HPV16 gene expression profiles in cervical and in oropharyngeal squamous cell carcinoma / A. Cerasuolo, C. Annunziata, M. Tortora [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 21. – P. 34070-34081. – DOI: 10.18632/oncotarget.15977.
92. Walline, H.M. Genomic Integration of High-Risk HPV Alters Gene Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma / H.M. Walline, C.M. Komarck, J.B. McHugh [et al.] //

Molecular Cancer Research. – 2016. – Vol. 14. – № 10. – P. 941-952. – DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0105.

93. Cornelissen, M.T.E. Uniformity of the Splicing Pattern of the E6/E7 Transcripts in Human Papillomavirus Type 16-transformed Human Fibroblasts, Human Cervical Premalignant Lesions and Carcinomas / M.T.E. Cornelissen, H.L. Smits, M.A. Briet [et al.] // Journal of General Virology. – 1990. – Vol. 71. – № 5. – P. 1243-1246. – DOI: 10.1099/0022-1317-71-5-1243.

94. Guimerà, N. Human papillomavirus 16 is an aetiological factor of scrotal cancer / N. Guimerà, L. Alemany, G. Halc [et al.] // British Journal of Cancer. – 2017. – Vol. 116. – № 9. – P. 1218-1222. – DOI: 10.1038/bjc.2017.74.

95. Islam, S. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication / S. Islam, H. Dasgupta, A. Roychowdhury [et al.] // PLOS ONE. – 2017. – Vol. 12. – № 2. – P. e0172760. – DOI: 10.1371/journal.pone.0172760.

96. Nakagawa, M. HLA Class I Binding Promiscuity of the CD8 T-Cell Epitopes of Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein / M. Nakagawa, K.H. Kim, T.M. Gillam, A.-B. Moscicki // Journal of Virology. – 2007. – Vol. 81. – № 3. – P. 1412-1423. – DOI: 10.1128/JVI.01768-06.

97. Nakagawa, M. Persistence of Human Papillomavirus Type 16 Infection Is Associated with Lack of Cytotoxic T Lymphocyte Response to the E6 Antigens / M. Nakagawa, D.P. Stites, S. Patel [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2000. – Vol. 182. – № 2. – P. 595-598. – DOI: 10.1086/315706.

98. Ma, W. Control of immune escaped human papilloma virus is regained after therapeutic vaccination / W. Ma, C.J. Melief, S.H. Van Der Burg // Current Opinion in Virology. – 2017. – Vol. 23. – P. 16-22. – DOI: 10.1016/j.coviro.2017.02.005.

99. Kumar, A. Identification of human papillomavirus-16 E6 variation in cervical cancer and their impact on T and B cell epitopes / A. Kumar, S. Hussain, I.S. Yadav [et al.] // Journal of Virological Methods. – 2015. – Vol. 218. – P. 51-58. – DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.03.008.

100. Bourgault Villada, I. Spontaneous regression of grade 3 vulvar intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus-16-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses / I. Bourgault Villada, M. Moyal Barracco, M. Ziol [et al.] // Cancer Research. – 2004. – Vol. 64. – № 23. – P. 8761-8766. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2455.

101. Bourgault Villada, I. Human papillomavirus 16-specific T cell responses in classic HPV-related vulvar intra-epithelial neoplasia. Determination of strongly immunogenic regions from E6 and E7 proteins / I. Bourgault Villada, M. Moyal Barracco, S. Berville [et al.] // Clinical and Experimental Immunology. – 2010. – Vol. 159. – № 1. – P. 45-56. – DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.04006.x.

102. Chenzhang, Y. Identification of the impact on T- and B- cell epitopes of human papillomavirus type-16 E6 and E7 variant in Southwest China / Y. Chenzhang, Q. Wen, X. Ding [et al.] // *Immunology Letters*. – 2017. – Vol. 181. – P. 26-30. – DOI: 10.1016/j.imlet.2016.09.013.
103. Evans, M. Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6 / M. Evans, L.K. Borysiewicz, A.S. Evans [et al.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). – 2001. – Vol. 167. – № 9. – P. 5420-5428. – DOI: 10.4049/jimmunol.167.9.5420.
104. Gallagher, K.M.E. Identification of HLA-DR1- and HLA-DR15-restricted human papillomavirus type 16 (HPV16) and HPV18 E6 epitopes recognized by CD4+ T cells from healthy young women / K.M.E. Gallagher, S. Man // *The Journal of General Virology*. – 2007. – Vol. 88. – № Pt 5. – P. 1470-1478. – DOI: 10.1099/vir.0.82558-0.
105. Nakagawa, M. Patterns of CD8 T-cell epitopes within the human papillomavirus type 16 (HPV 16) E6 protein among young women whose HPV 16 infection has become undetectable / M. Nakagawa, K.H. Kim, A.-B. Moscicki // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. – 2005. – Vol. 12. – № 8. – P. 1003-1005. – DOI: 10.1128/CDLI.12.8.1003-1005.2005.
106. Wang, X. Memory T cells specific for novel human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 epitopes in women whose HPV16 infection has become undetectable / X. Wang, A.-B. Moscicki, L. Tsang [et al.] // *Clinical and vaccine immunology: CVI*. – 2008. – Vol. 15. – № 6. – P. 937-945. – DOI: 10.1128/CVI.00404-07.
107. Jabbar, B. Antigenic Peptide Prediction From E6 and E7 Oncoproteins of HPV Types 16 and 18 for Therapeutic Vaccine Design Using Immunoinformatics and MD Simulation Analysis / B. Jabbar, S. Rafique, O.M.H. Salo-Ahen [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 3000. – DOI: 10.3389/fimmu.2018.03000.
108. Вонский, М.С. Терапевтические вакцины против вирусов папилломы человека, достижения и перспективы / М.С. Вонский, А.Л. Рунов [и др.] // *Биохимия*. – 2019. – Т. 84. – № 7. – С. 1016-1035. – DOI: 10.1134/S0320972519070108.
109. Samorski, R. Codon optimized expression of HPV 16 E6 renders target cells susceptible to E6-specific CTL recognition / R. Samorski, L. Gissmann, W. Osen // *Immunology Letters*. – 2006. – Vol. 107. – № 1. – P. 41-49. – DOI: 10.1016/j.imlet.2006.07.003.
110. Ma, Y. Characterization of HPV18 E6-specific T cell responses and establishment of HPV18 E6-expressing tumor model / Y. Ma, A. Yang, S. Peng [et al.] // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 31. – P. 3850-3858. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.081.
111. Wlazlo, A.P. DNA vaccines against the human papillomavirus type 16 E6 or E7 oncoproteins / A.P. Wlazlo, H. Deng, W. Giles-Davis, H.C.J. Ertl // *Cancer Gene Therapy*. – 2004. – Vol. 11. – № 6. – P. 457-464. – DOI: 10.1038/sj.cgt.7700723.

112. Bissa, M. A prime/boost strategy using DNA/fowlpox recombinants expressing the genetically attenuated E6 protein as a putative vaccine against HPV-16-associated cancers / M. Bissa, E. Illiano, S. Pacchioni [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 13. – № 1. – P. 80. – DOI: 10.1186/s12967-015-0437-9.
113. Peng, S. Development of a DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6 / S. Peng, H. Ji, C. Trimble [et al.] // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 16. – P. 8468-8476. – DOI: 10.1128/JVI.78.16.8468-8476.2004.
114. Azoury-Ziadeh, R. Low level expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) E6 in squamous epithelium does not elicit E6 specific B- or T-helper immunological responses, or influence the outcome of immunisation with E6 protein / R. Azoury-Ziadeh, K. Herd, G.J.P. Fernando [et al.] // *Virus Research*. – 2001. – Vol. 73. – № 2. – P. 189-199. – DOI: 10.1016/S0168-1702(00)00241-0.
115. Lin, C.-T. A DNA Vaccine Encoding a Codon-Optimized Human Papillomavirus Type 16 E6 Gene Enhances CTL Response and Anti-tumor Activity / C.-T. Lin, Y.-C. Tsai, L. He [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2006. – Vol. 13. – № 4. – P. 481-488. – DOI: 10.1007/s11373-006-9086-6.
116. Peng, S. Characterization of HPV-16 E6 DNA vaccines employing intracellular targeting and intercellular spreading strategies / S. Peng, C. Trimble, H. Ji [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. – 2005. – Vol. 12. – № 5. – P. 689-700. – DOI: 10.1007/s11373-005-9012-3.
117. Kenter, G.G. Phase I Immunotherapeutic Trial with Long Peptides Spanning the E6 and E7 Sequences of High-Risk Human Papillomavirus 16 in End-Stage Cervical Cancer Patients Shows Low Toxicity and Robust Immunogenicity / G.G. Kenter, M.J.P. Welters, A.R.P.M. Valentijn [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14. – № 1. – P. 169-177. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1881.
118. Ikeda, Y. A Placebo-Controlled, Double-Blind Randomized (Phase IIB) Trial of Oral Administration with HPV16 E7-Expressing *Lactobacillus*, GBL101c, for the Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 (CIN2) / Y. Ikeda, K. Adachi, K. Tomio [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 4. – P. 329. – DOI: 10.3390/vaccines9040329.
119. Kawana, K. Phase I and II randomized clinical trial of an oral therapeutic vaccine targeting human papillomavirus for treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2 and 3 / K. Kawana, O. Kobayashi, Y. Ikeda [et al.] // *JNCI Cancer Spectrum*. – 2023. – Vol. 7. – № 6. – P. pkad101. – DOI: 10.1093/jncics/pkad101.
120. Borcoman, E. Phase Ib/II trial of tipapkinogene sovavivec, a therapeutic human papillomavirus16-vaccine, in combination with avelumab in patients with advanced human papillomavirus16-positive cancers / E. Borcoman, A. Lalanne, J.-P. Delord [et al.] // *European Journal of Cancer*. – 2023. – Vol. 191. – P. 112981. – DOI: 10.1016/j.ejca.2023.112981.

121. Brun, J.-L. Regression of high-grade cervical intraepithelial neoplasia with TG4001 targeted immunotherapy / J.-L. Brun, V. Dalstein, J. Leveque [et al.] // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2011. – Vol. 204. – № 2. – P. 169.e1-169.e8. – DOI: 10.1016/j.ajog.2010.09.020.
122. Lee, S.Y. Intratumoral injection of therapeutic HPV vaccinia vaccine following cisplatin enhances HPV-specific antitumor effects / S.Y. Lee, T.H. Kang, J. Knoff [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2013. – Vol. 62. – № 7. – P. 1175-1185. – DOI: 10.1007/s00262-013-1421-y.
123. Eerkens, A.L. Vvax001, a Therapeutic Vaccine, for Patients with HPV16-Positive High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia: A Phase II Trial / A.L. Eerkens, M.D. Esajas, K. Brummel [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2025. – Vol. 31. – № 6. – P. 1016-1026. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-1662.
124. Floudas, C.S. PRGN-2009 and bintrafusp alfa for patients with advanced or metastatic human papillomavirus-associated cancer / C.S. Floudas, M. Goswami, R.N. Donahue [et al.] // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2025. – Vol. 74. – № 5. – P. 155. – DOI: 10.1007/s00262-025-04009-z.
125. Nakagawa, M. A peptide-based human papillomavirus therapeutic vaccine, PepCan, or *Candida* adjuvant alone in treatment of cervical intraepithelial neoplasia 2/3 (CIN2/3). / M. Nakagawa, T. Evans, H. Coleman [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 41. – № 16_suppl. – P. 5538-5538. – DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.5538.
126. Maeng, H. Cancer vaccines: translation from mice to human clinical trials / H. Maeng, M. Terabe, J.A. Berzofsky // *Current Opinion in Immunology*. – 2018. – Vol. 51. – P. 111-122. – DOI: 10.1016/j.coi.2018.03.001.
127. Sousa, L.G.D. ISA101 and nivolumab for HPV-16⁺ cancer: updated clinical efficacy and immune correlates of response / L.G.D. Sousa, K. Rajapakshe, J. Rodriguez Canales [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2022. – Vol. 10. – № 2. – P. e004232. – DOI: 10.1136/jitc-2021-004232.
128. Price, K.A.R. Safety and efficacy of immune checkpoint inhibitor (ICI) naïve cohort from study of PDS0101 and pembrolizumab in HPV16-positive head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). / K.A.R. Price, J.M. Kaczmar, F.P. Worden [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2023. – Vol. 41. – № 16_suppl. – P. 6012-6012. – DOI: 10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.6012.
129. Hibbitts, S. TA-CIN, a vaccine incorporating a recombinant HPV fusion protein (HPV16 L2E6E7) for the potential treatment of HPV16-associated genital diseases / S. Hibbitts // *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. – 2010. – Vol. 12. – № 5. – P. 598-606.
130. Van Damme, P. GTL001, A Therapeutic Vaccine for Women Infected with Human Papillomavirus 16 or 18 and Normal Cervical Cytology: Results of a Phase I Clinical Trial / P. Van

- Damme, M. Bouillette-Marussig, A. Hens [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – № 13. – P. 3238-3248. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0085.
131. Santin, A.D. Human Papillomavirus Type 16 and 18 E7-Pulsed Dendritic Cell Vaccination of Stage IB or IIA Cervical Cancer Patients: a Phase I Escalating-Dose Trial / A.D. Santin, S. Bellone, M. Palmieri [et al.] // *Journal of Virology*. – 2008. – Vol. 82. – № 4. – P. 1968-1979. – DOI: 10.1128/JVI.02343-07.
132. Vernet, R. A First-in-Human Phase I Clinical Study with MVX-ONCO-1, a Personalized Active Immunotherapy, in Patients with Advanced Solid Tumors / R. Vernet, E. Fernandez, D. Migliorini [et al.] // *Cancer Research Communications*. – 2024. – Vol. 4. – № 8. – P. 2089-2100. – DOI: 10.1158/2767-9764.CRC-24-0150.
133. Hancock, G. Therapeutic HPV vaccines / G. Hancock, K. Hellner, L. Dorrell // *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. – 2018. – Vol. 47. – P. 59-72. – DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.09.008.
134. Einstein, M.H. Safety Run-in of Intramuscular pNGVL4a-Sig/E7(detox)/HSP70 DNA and TA-CIN Protein Vaccination as Treatment for HPV16+ ASC-US, ASC-H, or LSIL/CIN1 / M.H. Einstein, R.B.S. Roden, L. Ferrall [et al.] // *Cancer Prevention Research*. – 2023. – Vol. 16. – № 4. – P. 219-227. – DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-22-0413.
135. Akhatova, A. The Efficacy of Therapeutic DNA Vaccines Expressing the Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins for Treatment of Cervical Cancer: Systematic Review / A. Akhatova, C.K. Chan, A. Azizan, G. Aimagambetova // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 53. – DOI: 10.3390/vaccines10010053.
136. Choi, Y.J. A Phase II, Prospective, Randomized, Multicenter, Open-Label Study of GX-188E, an HPV DNA Vaccine, in Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia 3 / Y.J. Choi, S.Y. Hur, T.-J. Kim [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2020. – Vol. 26. – № 7. – P. 1616-1623. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1513.
137. Lim, M.C. GX-188E DNA vaccine plus pembrolizumab in HPV 16- and/or 18-positive recurrent or advance cervical cancer: a phase 2 trial / M.C. Lim, Y.J. Choi, S.-Y. Hur [et al.] // *eClinicalMedicine*. – 2024. – Vol. 74. – P. 102716. – DOI: 10.1016/j.eclinm.2024.102716.
138. Hasan, Y. A Phase 1 Trial Assessing the Safety and Tolerability of a Therapeutic DNA Vaccination Against HPV16 and HPV18 E6/E7 Oncogenes After Chemoradiation for Cervical Cancer / Y. Hasan, L. Furtado, A. Tergas [et al.] // *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. – 2020. – Vol. 107. – № 3. – P. 487-498. – DOI: 10.1016/j.ijrobp.2020.02.031.
139. Morris, V.K. Phase II Trial of MEDI0457 and Durvalumab for Patients With Recurrent/Metastatic Human Papillomavirus-Associated Cancers / V.K. Morris, A. Jazaeri, S.N.

- Westin [et al.] // *The Oncologist*. – 2023. – Vol. 28. – № 7. – P. 618-623. – DOI: 10.1093/oncolo/oyad085.
140. Li, L. The future of human DNA vaccines / L. Li, F. Saade, N. Petrovsky // *Journal of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 162. – № 2-3. – P. 171-182. – DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.012.
141. Leitner, W.W. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects / W.W. Leitner, H. Ying, N.P. Restifo // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 18. – № 9-10. – P. 765-777. – DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00271-6.
142. Kutzler, M.A. DNA vaccines: ready for prime time? / M.A. Kutzler, D.B. Weiner // *Nature Reviews Genetics*. – 2008. – Vol. 9. – № 10. – P. 776-788. – DOI: 10.1038/nrg2432.
143. Yang, Y. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance / Y. Yang, C.-T. Huang, X. Huang, D.M. Pardoll // *Nature Immunology*. – 2004. – Vol. 5. – № 5. – P. 508-515. – DOI: 10.1038/ni1059.
144. Desmet, C.J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination / C.J. Desmet, K.J. Ishii // *Nature Reviews Immunology*. – 2012. – Vol. 12. – № 7. – P. 479-491. – DOI: 10.1038/nri3247.
145. Hemmi, H. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA / H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 408. – № 6813. – P. 740-745. – DOI: 10.1038/35047123.
146. Tudor, D. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines / D. Tudor, C. Dubuquoy, V. Gaboriau [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – № 10. – P. 1258-1264. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.09.001.
147. Zhou, Z.P. DNA-Based Vaccines: Advances, Applications, and Future Prospects / Z.P. Zhou, Z.R. Chen, R.A. Bandara [et al.] // *Genes & Diseases*. – 2026. – P. 102025. – DOI: 10.1016/j.gendis.2025.102025.
148. Pushko, P. Experimental DNA-Launched Live-Attenuated Vaccines Against Yellow Fever / P. Pushko, A.A. Ishmukhametov, P.P. Bredenbeek, I.S. Lukashevich // *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – P. 18-25. – DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-1-18-25.
149. Kisakov, D.N. Delivery of a DNA vaccine encoding SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD) by electroporation / D.N. Kisakov, L.A. Orlova, S.V. Sharabrin [et al.] // *Medical academic journal*. – 2022. – Vol. 22. – № 2. – P. 191-196. – DOI: 10.17816/MAJ108614.
150. Li, Z. Biosafety assessment of delivery systems for clinical nucleic acid therapeutics / Z. Li, L. Zhang, K. Jiang [et al.] // *Biosafety and Health*. – 2022. – Vol. 4. – № 2. – P. 105-117. – DOI: 10.1016/j.bsheal.2022.03.003.
151. Plotkin's Vaccines. – Elsevier, 2018. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20130189143> (date of access: 08.02.2026). – [Electronic resource].

152. Kowalczyk, D.W. Immune responses to DNA vaccines / D.W. Kowalczyk, H.C.J. Ertl // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 1999. – Vol. 55. – № 5. – P. 751-770. – DOI: 10.1007/s000180050330.
153. Li, L. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity / L. Li, N. Petrovsky // *Expert Review of Vaccines*. – 2016. – Vol. 15. – № 3. – P. 313-329. – DOI: 10.1586/14760584.2016.1124762.
154. Fonteneau, J.F. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells / J.F. Fonteneau, D.G. Kavanagh, M. Lirvall [et al.] // *Blood*. – 2003. – Vol. 102. – № 13. – P. 4448-4455. – DOI: 10.1182/blood-2003-06-1801.
155. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology* / Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S. – 2021. – Mode of access: <https://shop.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-75748-5> (date of access: 08.02.2026). – [Electronic resource].
156. O'Garra, A. Development and Function of T Helper 1 Cells / A. O'Garra, D. Robinson. – [Electronic resource] // *Advances in Immunology*. – Elsevier, 2004. – Vol. 83. – P. 133-162. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277604830049> (date of access: 11.02.2026).
157. Th2 Cells: Orchestrating Barrier Immunity / [Electronic resource] // *Advances in Immunology*. – Elsevier, 2004. – Vol. 83. – P. 163-189. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277604830050> (date of access: 11.02.2026).
158. Alamri, S.S. Synthetic SARS-CoV-2 Spike-Based DNA Vaccine Elicits Robust and Long-Lasting Th1 Humoral and Cellular Immunity in Mice / S.S. Alamri, K.A. Alluhaybi, R.Y. Alhabbab [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 727455. – DOI: 10.3389/fmicb.2021.727455.
159. Feria-Romero, I.A. Intranasal Anti-rabies DNA Immunization Promotes a Th1-related Cytokine Stimulation Associated with Plasmid Survival Time / I.A. Feria-Romero, K. Chávez-Rueda, S. Orozco-Suárez [et al.] // *Archives of Medical Research*. – 2011. – Vol. 42. – № 7. – P. 563-571. – DOI: 10.1016/j.arcmed.2011.10.009.
160. Seyed, N. Th1 concomitant immune response mediated by IFN- γ protects against sand fly delivered *Leishmania* infection: Implications for vaccine design / N. Seyed, S. Rafati // *Cytokine*. – 2021. – Vol. 147. – P. 155247. – DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155247.
161. Laddy, D.J. From Plasmids to Protection: A Review of DNA Vaccines Against Infectious Diseases / D.J. Laddy, D.B. Weiner // *International Reviews of Immunology*. – 2006. – Vol. 25. – № 3-4. – P. 99-123. – DOI: 10.1080/08830180600785827.

162. Bråve, A. Multigene/Multisubtype HIV-1 Vaccine Induces Potent Cellular and Humoral Immune Responses by Needle-Free Intradermal Delivery / A. Bråve, K. Ljungberg, A. Boberg [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2005. – Vol. 12. – № 6. – P. 1197-1205. – DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.06.473.
163. Moise, L. Harnessing the power of genomics and immunoinformatics to produce improved vaccines / L. Moise, L. Cousens, J. Fueyo, A.S. De Groot // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. 9-15. – DOI: 10.1517/17460441.2011.534454.
164. O'Rourke, S.M. Mutation at a Single Position in the V2 Domain of the HIV-1 Envelope Protein Confers Neutralization Sensitivity to a Highly Neutralization-Resistant Virus / S.M. O'Rourke, B. Schweighardt, P. Phung [et al.] // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84. – № 21. – P. 11200-11209. – DOI: 10.1128/JVI.00790-10.
165. Leifert, J.A. Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways / J.A. Leifert, M.P. Rodriguez-Carreno, F. Rodriguez, J. Lindsay Whitton // *Immunological Reviews*. – 2004. – Vol. 199. – № 1. – P. 40-53. – DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.0135.x.
166. Grujic, M. Fusion of a viral antigen to invariant chain leads to augmented T-cell immunity and improved protection in gene-gun DNA-vaccinated mice / M. Grujic, P.J. Holst, J.P. Christensen, A.R. Thomsen // *Journal of General Virology*. – 2009. – Vol. 90. – № 2. – P. 414-422. – DOI: 10.1099/vir.0.002105-0.
167. Van Tienhoven, E.A.E. Induction of antigen specific CD4+ T cell responses by invariant chain based DNA vaccines / E.A.E. Van Tienhoven, C.T.B. Ten Brink, J. Van Bergen [et al.] // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19. – № 11-12. – P. 1515-1519. – DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00330-3.
168. Wang, S. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine / S. Wang, D.J. Farfan-Arribas, S. Shen [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24. – № 21. – P. 4531-4540. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.023.
169. Ramakrishna, L. Codon Optimization of the Tat Antigen of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Generates Strong Immune Responses in Mice following Genetic Immunization / L. Ramakrishna, K.K. Anand, K.M. Mohankumar, U. Ranga // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 17. – P. 9174-9189. – DOI: 10.1128/JVI.78.17.9174-9189.2004.
170. Liu, X. COStar: A D-star Lite-based dynamic search algorithm for codon optimization / X. Liu, R. Deng, J. Wang, X. Wang // *Journal of Theoretical Biology*. – 2014. – Vol. 344. – P. 19-30. – DOI: 10.1016/j.jtbi.2013.11.022.
171. Barouch, D.H. A Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Regulatory Element Enhances the Immunogenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Vaccines in Mice and Nonhuman

- Primates / D.H. Barouch, Z. Yang, W. Kong [et al.] // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – № 14. – P. 8828-8834. – DOI: 10.1128/JVI.79.14.8828-8834.2005.
172. Capitani, M. Plasmids Encoding Protein Aggregation Domains Act As Molecular Adjuvants for DNA Vaccines / M. Capitani, F. Saade, K. Havas [et al.] // *Current Gene Therapy*. – 2014. – Vol. 14. – № 3. – P. 161-169. – DOI: 10.2174/1566523214666140509114838.
173. Flingai, S. Synthetic DNA Vaccines: Improved Vaccine Potency by Electroporation and Co-Delivered Genetic Adjuvants / S. Flingai, M. Czerwonko, J. Goodman [et al.]. – [Electronic resource] // *Frontiers in Immunology*. – 2013. – Vol. 4. – Mode of access: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00354/abstract> (date of access: 08.02.2026).
174. Saade, F. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines / F. Saade, N. Petrovsky // *Expert Review of Vaccines*. – 2012. – Vol. 11. – № 2. – P. 189-209. – DOI: 10.1586/erv.11.188.
175. Song, X. Immune protection duration and efficacy stability of DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2 against coccidiosis / X. Song, X. Zhao, L. Xu [et al.] // *Research in Veterinary Science*. – 2017. – Vol. 111. – P. 31-35. – DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.11.012.
176. Hirao, L.A. Comparative Analysis of Immune Responses Induced by Vaccination With SIV Antigens by Recombinant Ad5 Vector or Plasmid DNA in Rhesus Macaques / L.A. Hirao, L. Wu, A. Satishchandran [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2010. – Vol. 18. – № 8. – P. 1568-1576. – DOI: 10.1038/mt.2010.112.
177. Kozak, M. DNA Vaccines: Their Formulations, Engineering and Delivery / M. Kozak, J. Hu // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 1. – P. 71. – DOI: 10.3390/vaccines12010071.
178. Wang, S. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun methods / S. Wang, C. Zhang, L. Zhang [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – № 17. – P. 2100-2110. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.02.033.
179. Wang, S. DNA Immunization / S. Wang, S. Lu. – [Electronic resource] // *Current Protocols in Microbiology*. – 2013. – Vol. 31. – № 1. – Mode of access: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc1803s31> (date of access: 30.01.2026).
180. Villemejane, J. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications / J. Villemejane, L.M. Mir // *British Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 157. – № 2. – P. 207-219. – DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00032.x.
181. Cheng, Y. Similarities and differences in interaction of K⁺ and Na⁺ with condensed ordered DNA. A molecular dynamics computer simulation study / Y. Cheng, N. Korolev, L. Nordenskiöld // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34. – № 2. – P. 686-696. – DOI: 10.1093/nar/gkj434.

182. Singh, A. Structure and Dynamics of dsDNA in Cell-like Environments / A. Singh, A. Maity, N. Singh // *Entropy*. – 2022. – Vol. 24. – № 11. – P. 1587. – DOI: 10.3390/e24111587.
183. Lipfert, J. Understanding Nucleic Acid–Ion Interactions / J. Lipfert, S. Doniach, R. Das, D. Herschlag // *Annual Review of Biochemistry*. – 2014. – Vol. 83. – № 1. – P. 813-841. – DOI: 10.1146/annurev-biochem-060409-092720.
184. Yoo, J. The structure and intermolecular forces of DNA condensates / J. Yoo, A. Aksimentiev // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – № 5. – P. 2036-2046. – DOI: 10.1093/nar/gkw081.
185. Teif, V.B. Condensed DNA: Condensing the concepts / V.B. Teif, K. Bohinc // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 105. – № 3. – P. 208-222. – DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.07.002.
186. Chesnoy, S. Enhanced Cutaneous Gene Delivery Following Intradermal Injection of Naked DNA in a High Ionic Strength Solution / S. Chesnoy, L. Huang // *Molecular Therapy*. – 2002. – Vol. 5. – № 1. – P. 57-62. – DOI: 10.1006/mthe.2001.0511.
187. Cruz-León, S. Twisting DNA by salt / S. Cruz-León, W. Vanderlinden, P. Müller [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Vol. 50. – № 10. – P. 5726-5738. – DOI: 10.1093/nar/gkac445.
188. Zhang, C. Counterintuitive DNA destabilization by monovalent salt at high concentrations due to overcharging / C. Zhang, F.-J. Tian, H.-W. Zuo [et al.] // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 113. – DOI: 10.1038/s41467-024-55404-6.
189. Ensign, L.M. Enhanced vaginal drug delivery through the use of hypotonic formulations that induce fluid uptake / L.M. Ensign, T.E. Hoen, K. Maisel [et al.] // *Biomaterials*. – 2013. – Vol. 34. – № 28. – P. 6922-6929. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.039.
190. Zheng, S. Osmotic Pressure and Its Biological Implications / S. Zheng, Y. Li, Y. Shao [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 6. – P. 3310. – DOI: 10.3390/ijms25063310.
191. Pirc, E. Electronic Emulator of Biological Tissue as an Electrical Load during Electroporation / E. Pirc, B. Balosetti, D. Miklavčič, M. Reberšek // *Applied Sciences*. – 2020. – Vol. 10. – № 9. – P. 3103. – DOI: 10.3390/app10093103.
192. Daftarian, P. *In vivo* Electroporation and Non-protein Based Screening Assays to Identify Antibodies Against Native Protein Conformations / P. Daftarian, R. Chowdhury, P. Ames [et al.] // *Hybridoma*. – 2011. – Vol. 30. – № 5. – P. 409-418. – DOI: 10.1089/hyb.2010.0120.
193. Kisakov, D.N. The use of electroporation to deliver DNA-based vaccines / D.N. Kisakov, I.M. Belyakov, L.A. Kisakova [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2024. – Vol. 23. – № 1. – P. 102-123. – DOI: 10.1080/14760584.2023.2292772.

194. Kotnik, T. Role of pulse shape in cell membrane electroporation / T. Kotnik, G. Pucihar, M. Reberšek [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2003. – Vol. 1614. – № 2. – P. 193-200. – DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00173-1.
195. Rols, M.-P. Electroporation, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells / M.-P. Rols // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2006. – Vol. 1758. – № 3. – P. 423-428. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.01.005.
196. Reberšek, M. Cell membrane electroporation-Part 3: the equipment / M. Reberšek, D. Miklavcic, C. Bertacchini, M. Sack // *IEEE Electrical Insulation Magazine*. – 2014. – Vol. 30. – № 3. – P. 8-18. – DOI: 10.1109/MEI.2014.6804737.
197. Rols, M.-P. Electroporation of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration / M.-P. Rols, J. Teissié // *Biophysical Journal*. – 1998. – Vol. 75. – № 3. – P. 1415-1423. – DOI: 10.1016/S0006-3495(98)74060-3.
198. Kotnik, T. Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses / T. Kotnik, D. Miklavčič, L.M. Mir // *Bioelectrochemistry*. – 2001. – Vol. 54. – № 1. – P. 91-95. – DOI: 10.1016/S1567-5394(01)00115-3.
199. Pucihar, G. Equivalent Pulse Parameters for Electroporation / G. Pucihar, J. Krmelj, M. Reberšek [et al.] // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2011. – Vol. 58. – № 11. – P. 3279-3288. – DOI: 10.1109/TBME.2011.2167232.
200. Faurie, C. Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells / C. Faurie, E. Phez, M. Golzio [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2004. – Vol. 1665. – № 1-2. – P. 92-100. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.06.018.
201. Kotnik, T. Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses / T. Kotnik, L.M. Mir, K. Flisar [et al.] // *Bioelectrochemistry*. – 2001. – Vol. 54. – № 1. – P. 83-90. – DOI: 10.1016/S1567-5394(01)00114-1.
202. Walsh, A.P.G. Ultrasonic particles: An approach for targeted gene delivery / A.P.G. Walsh, H.N. Gordon, K. Peter, X. Wang // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2021. – Vol. 179. – P. 113998. – DOI: 10.1016/j.addr.2021.113998.
203. Liu, Y. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery / Y. Liu, H. Miyoshi, M. Nakamura // *Journal of Controlled Release*. – 2006. – Vol. 114. – № 1. – P. 89-99. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.05.018.
204. De Cock, I. Ultrasound and microbubble mediated drug delivery: Acoustic pressure as determinant for uptake via membrane pores or endocytosis / I. De Cock, E. Zagato, K. Braeckmans [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – Vol. 197. – P. 20-28. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.10.031.

205. Lo, C.-W. Stabilizing in vitro ultrasound-mediated gene transfection by regulating cavitation / C.-W. Lo, C. Desjouy, S.-R. Chen [et al.] // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2014. – Vol. 21. – № 2. – P. 833-839. – DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.10.017.
206. Shapiro, G. Multiparameter evaluation of in vivo gene delivery using ultrasound-guided, microbubble-enhanced sonoporation / G. Shapiro, A.W. Wong, M. Bez [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 223. – P. 157-164. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.12.001.
207. Pan, H. Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle / H. Pan, Y. Zhou, O. Izadnegahdar [et al.] // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2005. – Vol. 31. – № 6. – P. 849-856. – DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2005.03.014.
208. Johns, L.D. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis / L.D. Johns // *Journal of Athletic Training*. – 2002. – Vol. 37. – № 3. – P. 293-299.
209. Microbubbles for Sonoporation Gene Expression and Gene Transfection. – Mode of access: <https://articles.sonidel.com/> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
210. Wang, M. Sonoporation-induced cell membrane permeabilization and cytoskeleton disassembly at varied acoustic and microbubble-cell parameters / M. Wang, Y. Zhang, C. Cai [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 3885. – DOI: 10.1038/s41598-018-22056-8.
211. Fan, Z. Mechanisms of Microbubble-Facilitated Sonoporation for Drug and Gene Delivery / Z. Fan, R.E. Kumon, C.X. Deng // *Therapeutic Delivery*. – 2014. – Vol. 5. – № 4. – P. 467-486. – DOI: 10.4155/tde.14.10.
212. Dorfer, S. Model systems for papillomavirus-associated skin disease / S. Dorfer, A. Handisurya // *Drug Discovery Today: Disease Models*. – 2020. – Vol. 32. – P. 7-16. – DOI: 10.1016/j.ddmod.2020.10.002.
213. Kast, W.M. HPV protein peptide vaccines from animal models to clinical trials / W.M. Kast // *Frontiers in Bioscience*. – 2003. – Vol. 8. – № 6. – P. s81-91. – DOI: 10.2741/1009.
214. Venuti, A. Immunotherapy of HPV-associated cancer: DNA/plant-derived vaccines and new orthotopic mouse models / A. Venuti, G. Curzio, L. Mariani, F. Paolini // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2015. – Vol. 64. – № 10. – P. 1329-1338. – DOI: 10.1007/s00262-015-1734-0.
215. Peng, S. Control of HPV-associated tumors by innovative therapeutic HPV DNA vaccine in the absence of CD4⁺ T cells / S. Peng, L. Song, J. Knoff [et al.] // *Cell & Bioscience*. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 11. – DOI: 10.1186/2045-3701-4-11.
216. Domingos-Pereira, S. Intravaginal TLR agonists increase local vaccine-specific CD8 T cells and human papillomavirus-associated genital-tumor regression in mice / S. Domingos-Pereira, L. Decrausaz, L. Derré [et al.] // *Mucosal Immunology*. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 393-404. – DOI: 10.1038/mi.2012.83.

217. Smalley Rumfield, C. Immunomodulation to enhance the efficacy of an HPV therapeutic vaccine / C. Smalley Rumfield, S.T. Pellom, Y.M. Morillon Li [et al.] // *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. e000612. – DOI: 10.1136/jitc-2020-000612.
218. Garza-Morales, R. A DNA Vaccine Encoding SA-4-1BBL Fused to HPV-16 E7 Antigen Has Prophylactic and Therapeutic Efficacy in a Cervical Cancer Mouse Model / R. Garza-Morales, J.J. Perez-Trujillo, E. Martinez-Jaramillo [et al.] // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 96. – DOI: 10.3390/cancers11010096.
219. Souders, N.C. Listeria-based vaccines can overcome tolerance by expanding low avidity CD8+ T cells capable of eradicating a solid tumor in a transgenic mouse model of cancer / N.C. Souders, D.A. Sewell, Z.-K. Pan [et al.] // *Cancer Immunity*. – 2007. – Vol. 7. – P. 2.
220. Ji, H. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein / H. Ji, E.Y. Chang, K.-Y. Lin [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 1998. – Vol. 78. – № 1. – P. 41-45. – DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980925)78:1%3C41::AID-IJC8%3E3.0.CO;2-X.
221. Mondini, M. Synergy of Radiotherapy and a Cancer Vaccine for the Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer / M. Mondini, M. Nizard, T. Tran [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2015. – Vol. 14. – № 6. – P. 1336-1345. – DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1015.
222. Downham, L. Accuracy of HPV E6/E7 oncoprotein tests to detect high-grade cervical lesions: a systematic literature review and meta-analysis / L. Downham, I. Jaafar, M.L. Rol [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2024. – Vol. 130. – № 4. – P. 517-525. – DOI: 10.1038/s41416-023-02490-w.
223. Hong, D. Viral E6 is overexpressed via high viral load in invasive cervical cancer with episomal HPV16 / D. Hong, J. Liu, Y. Hu [et al.] // *BMC Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 136. – DOI: 10.1186/s12885-017-3124-9.
224. Wu, M.-Z. Diagnostic Utility of HPV16 E6 mRNA or E7 mRNA Quantitative Expression for Cervical Cells of Patients with Dysplasia and Carcinoma / M.-Z. Wu, W.-N. Li, N. Cha [et al.] // *Cell Transplantation*. – 2018. – Vol. 27. – № 9. – P. 1401-1406. – DOI: 10.1177/0963689718788521.
225. Wu, Z. The association between human papillomavirus 16, 18 DNA load and E6 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia and cancer / Z. Wu, L. Yu, X. Lei [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2018. – Vol. 108. – P. 6-11. – DOI: 10.1016/j.jcv.2018.08.008.
226. Jacquin, E. The level of expression of HPV16 early transcripts is not associated with the natural history of cervical lesions / E. Jacquin, M. Saunier, Q. Lepiller [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2024. – Vol. 96. – № 9. – P. e29875. – DOI: 10.1002/jmv.29875.
227. Saucedo-Cárdenas, O. Invasion of TC-1 cells to skeletal muscle fibers protect them from peroxisomicine A1 (T-514) treatment in a murine model of cancer / O. Saucedo-Cárdenas, R. García-

- Garza, R. Ramírez-Durón [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2017. – Vol. 10. – № 7. – P. 8062-8071.
228. Li, L.-L. C3-Luc Cells Are an Excellent Model for Evaluation of Cellular Immunity following HPV16L1 Vaccination / L.-L. Li, H.-R. Wang, Z.-Y. Zhou [et al.] // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – № 2. – P. e0149748. – DOI: 10.1371/journal.pone.0149748.
229. Paolini, F. Immunotherapy in new pre-clinical models of HPV-associated oral cancers / F. Paolini, S. Massa, I. Manni [et al.] // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2013. – Vol. 9. – № 3. – P. 534-543. – DOI: 10.4161/hv.23232.
230. Авдошина, Д.В. Мышиные модели хронических вирусных инфекций и ассоциированных с ними опухолей / Д. В. Авдошина, А. С. Кондрашова, М. Г. Беликова [и др.] // Молекулярная биология. – 2022. – Т. 56. – № 5. – С. 710-731. – DOI: 10.31857/S0026898422050020.
231. He, L. Increased Growth of a Newly Established Mouse Epithelial Cell Line Transformed with HPV-16 E7 in Diabetic Mice / L. He, P.T.Y. Law, S.S. Boon [et al.] // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – № 10. – P. e0164490. – DOI: 10.1371/journal.pone.0164490.
232. Dharmaraj, N. Anti-tumor immunity induced by ectopic expression of viral antigens is transient and limited by immune escape / N. Dharmaraj, S.L. Piotrowski, C. Huang [et al.] // OncoImmunology. – 2019. – Vol. 8. – № 4. – P. e1568809. – DOI: 10.1080/2162402X.2019.1568809.
233. Modic, Z. HPV-positive murine oral squamous cell carcinoma: development and characterization of a new mouse tumor model for immunological studies / Z. Modic, M. Cemazar, B. Markelc [et al.] // Journal of Translational Medicine. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 376. – DOI: 10.1186/s12967-023-04221-4.
234. Vermeer, D.W. Metastatic model of HPV+ oropharyngeal squamous cell carcinoma demonstrates heterogeneity in tumor metastasis / D.W. Vermeer, J.D. Coppock, E. Zeng [et al.] // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – № 17. – P. 24194-24207. – DOI: 10.18632/oncotarget.8254.
235. Domingos-Pereira, S. Vaccination with a nanoparticle E7 vaccine can prevent tumor recurrence following surgery in a human papillomavirus head and neck cancer model / S. Domingos-Pereira, V. Roh, A. Hiou-Feige [et al.] // OncoImmunology. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 1912473. – DOI: 10.1080/2162402X.2021.1912473.
236. Mermod, M. Mouse model of postsurgical primary tumor recurrence and regional lymph node metastasis progression in HPV-related head and neck cancer / M. Mermod, A. Hiou-Feige, E. Bovay [et al.] // International Journal of Cancer. – 2018. – Vol. 142. – № 12. – P. 2518-2528. – DOI: 10.1002/ijc.31240.

237. Peng, S. Characterization of HLA-A2-restricted HPV-16 E7-specific CD8⁺ T-cell immune responses induced by DNA vaccines in HLA-A2 transgenic mice / S. Peng, C. Trimble, L. He [et al.] // *Gene Therapy*. – 2006. – Vol. 13. – № 1. – P. 67-77. – DOI: 10.1038/sj.gt.3302607.
238. Santos, C. HPV-transgenic mouse models: Tools for studying the cancer-associated immune response / C. Santos, M. Vilanova, R. Medeiros, R.M. Gil Da Costa // *Virus Research*. – 2017. – Vol. 235. – P. 49-57. – DOI: 10.1016/j.virusres.2017.04.001.
239. Facompre, N.D. Barriers to generating PDX models of HPV-related head and neck cancer / N.D. Facompre, V. Sahu, K.T. Montone [et al.] // *The Laryngoscope*. – 2017. – Vol. 127. – № 12. – P. 2777-2783. – DOI: 10.1002/lary.26679.
240. James, C.D. HPV16 genome structure analysis in oropharyngeal cancer PDXs identifies tumors with integrated and episomal genomes / C.D. James, R.O. Otoa, A.H. Youssef [et al.] // *Tumour Virus Research*. – 2024. – Vol. 18. – P. 200285. – DOI: 10.1016/j.tvr.2024.200285.
241. Bayurova, E. HIV-1 Reverse Transcriptase Promotes Tumor Growth and Metastasis Formation via ROS-Dependent Upregulation of Twist / E. Bayurova, J. Jansons, D. Skrastina [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1-28. – DOI: 10.1155/2019/6016278.
242. atcc.org/products/45113d. – Mode of access: <https://www.atcc.org/products/45113d> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
243. Isaguliants, M. 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 [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 6. – P. 1219. – DOI: 10.3390/microorganisms9061219.
244. Latanova, A. Fusion to Flaviviral Leader Peptide Targets HIV-1 Reverse Transcriptase for Secretion and Reduces Its Enzymatic Activity and Ability to Induce Oxidative Stress but Has No Major Effects on Its Immunogenic Performance in DNA-Immunized Mice / A. Latanova, S. Petkov, Y. Kuzmenko [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-16. – DOI: 10.1155/2017/7407136.
245. Jansons, J. The Immunogenicity in Mice of HCV Core Delivered as DNA Is Modulated by Its Capacity to Induce Oxidative Stress and Oxidative Stress Response / J. Jansons, I. Sominskaya, N. Petrakova [et al.] // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – № 3. – P. 208. – DOI: 10.3390/cells8030208.
246. Jansons, J. Expression of the Reverse Transcriptase Domain of Telomerase Reverse Transcriptase Induces Lytic Cellular Response in DNA-Immunized Mice and Limits Tumorigenic and Metastatic Potential of Murine Adenocarcinoma 4T1 Cells / J. Jansons, E. Bayurova, D. Skrastina [et al.] // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – № 2. – P. 318. – DOI: 10.3390/vaccines8020318.

247. Addgene: pLJM1-EGFP. – Mode of access: <https://www.addgene.org/19319/> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
248. Lin, K.Y. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen / K.Y. Lin, F.G. Guarnieri, K.F. Staveley-O'Carroll [et al.] // *Cancer Research*. – 1996. – Vol. 56. – № 1. – P. 21-26.
249. Home - Nucleotide - NCBI. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
250. Jalview Home Page - Jalview. – Mode of access: <https://www.jalview.org/> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
251. Codon Optimization Program from EnCor Biotechnology Inc. – Mode of access: <https://files.encorbio.com/protocols/Codon.htm> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
252. Codon Optimization Tool | VectorBuilder. – Mode of access: <https://en.vectorbuilder.com/tool/codon-optimization.html> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
253. Chandra, J. DNA Vaccine Encoding HPV16 Oncogenes E6 and E7 Induces Potent Cell-mediated and Humoral Immunity Which Protects in Tumor Challenge and Drives E7-expressing Skin Graft Rejection / J. Chandra, J.L. Dutton, B. Li [et al.] // *Journal of Immunotherapy*. – 2017. – Vol. 40. – № 2. – P. 62-70. – DOI: 10.1097/CJI.0000000000000156.
254. Škalamera, D. Generation of a Genome Scale Lentiviral Vector Library for EF1 α Promoter-Driven Expression of Human ORFs and Identification of Human Genes Affecting Viral Titer / D. Škalamera, M. Dahmer, A.S. Purdon [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e51733. – DOI: 10.1371/journal.pone.0051733.
255. Tang, Y. Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection / Y. Tang, K. Garson, L. Li, B.C. Vanderhyden // *Oncology Letters*. – 2015. – Vol. 9. – № 1. – P. 55-62. – DOI: 10.3892/ol.2014.2684.
256. Schrörs, B. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model / B. Schrörs, S. Boegel, C. Albrecht [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1195. – DOI: 10.3389/fonc.2020.01195.
257. Livak, K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402-408. – DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
258. Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies / T.C. Lorenz // *Journal of Visualized Experiments*. – 2012. – № 63. – P. 3998. – DOI: 10.3791/3998.

259. Hesselink, A.T. Clinical validation of Anyplex™ II HPV HR Detection according to the guidelines for HPV test requirements for cervical cancer screening / A.T. Hesselink, R. Sahli, J. Berkhof [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. – 2016. – Vol. 76. – P. 36-39. – DOI: 10.1016/j.jcv.2016.01.009.
260. byjus.com/chemistry/ionic-strength-unit/. – Mode of access: <https://byjus.com/chemistry/ionic-strength-unit/> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
261. Fan, Z. Improving ultrasound gene transfection efficiency by controlling ultrasound excitation of microbubbles / Z. Fan, D. Chen, C.X. Deng // *Journal of Controlled Release*. – 2013. – Vol. 170. – № 3. – P. 401-413. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.05.039.
262. Datta, S. Ultrasound-Enhanced Thrombolysis Using Definity® as a Cavitation Nucleation Agent / S. Datta, C.-C. Coussios, A.Y. Ammi [et al.] // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2008. – Vol. 34. – № 9. – P. 1421-1433. – DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.01.016.
263. Humphrey, V.F. Ultrasound and matter—Physical interactions / V.F. Humphrey // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 93. – № 1-3. – P. 195-211. – DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.024.
264. Shin, H.-C. Estimation of Average Speed of Sound Using Deconvolution of Medical Ultrasound Data / H.-C. Shin, R. Prager, H. Gomersall [et al.] // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2010. – Vol. 36. – № 4. – P. 623-636. – DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.01.011.
265. Soorani, M. Modelling insertion behaviour of PVP (Polyvinylpyrrolidone) and PVA (Polyvinyl Alcohol) microneedles / M. Soorani, Q.K. Anjani, E. Larrañeta [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 664. – P. 124620. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.124620.
266. Equation for Calculation Duty Cycle - BINARYUPDATES.COM. – Mode of access: <https://binaryupdates.com/pwm-in-lpc2148-arm7/equation-for-calculation-duty-cycle/> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
267. Chen, N. Nanosecond electric pulses penetrate the nucleus and enhance speckle formation / N. Chen, A.L. Garner, G. Chen [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 364. – № 2. – P. 220-225. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.09.125.
268. IVIS Spectrum software manual | Cornell Institute of Biotechnology | Cornell University. – Mode of access: <https://www.biotech.cornell.edu/media/235> (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
269. Ayers, G.D. Volume of Preclinical Xenograft Tumors Is More Accurately Assessed by Ultrasound Imaging Than Manual Caliper Measurements / G.D. Ayers, E.T. McKinley, P. Zhao [et al.] // *Journal of Ultrasound in Medicine*. – 2010. – Vol. 29. – № 6. – P. 891-901. – DOI: 10.7863/jum.2010.29.6.891.

270. Rashid, O.M. Resection of the primary tumor improves survival in metastatic breast cancer by reducing overall tumor burden / O.M. Rashid, M. Nagahashi, S. Ramachandran [et al.] // *Surgery*. – 2013. – Vol. 153. – № 6. – P. 771-778. – DOI: 10.1016/j.surg.2013.02.002.
271. Baklaushev, V.P. Luciferase Expression Allows Bioluminescence Imaging But Imposes Limitations on the Orthotopic Mouse (4T1) Model of Breast Cancer / V.P. Baklaushev, A. Kilpeläinen, S. Petkov [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 7715. – DOI: 10.1038/s41598-017-07851-z.
272. Kokkat, T.J. Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein / T.J. Kokkat, M.S. Patel, D. McGarvey [et al.] // *Biopreservation and Biobanking*. – 2013. – Vol. 11. – № 2. – P. 101-106. – DOI: 10.1089/bio.2012.0052.
273. Zulian, V. HPV16 E6 and E7 Genetic Variability in Oral and Anal Samples from HIV-Positive MSM / V. Zulian, S. Pauciullo, R. Sciamanna [et al.] // *Pathogens*. – 2025. – Vol. 14. – № 12. – P. 1210. – DOI: 10.3390/pathogens14121210.
274. Bernard, H. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications / H. Bernard, I.E. Calleja-Macias, S.T. Dunn // *International Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 118. – № 5. – P. 1071-1076. – DOI: 10.1002/ijc.21655.
275. Зеленова, Е.Е. Паттерны аминокислотных замен в белках Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа: филогеография и эволюция / Е.Е. Зеленова, А.А. Карлсен, Д.В. Авдошина [и др.]. // *Молекулярная биология*. – 2024. – Т. 58. – № 4. – С. 549-574. – DOI: 10.31857/S0026898424040036.
276. Galati, L. HPV16 Phylogenetic Variants in Anogenital and Head and Neck Cancers: State of the Art and Perspectives / L. Galati, P. Di Bonito, M. Marinaro [et al.] // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 6. – P. 904. – DOI: 10.3390/v16060904.
277. Lichtig, H. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6 / H. Lichtig, M. Algrisi, L.E. Botzer [et al.] // *Virology*. – 2006. – Vol. 350. – № 1. – P. 216-227. – DOI: 10.1016/j.virol.2006.01.038.
278. He, J. The polymorphism analysis and epitope predicted of Alphapapillomavirus 9 E6 in Sichuan, China / J. He, Q. Li, S. Ma [et al.] // *Virology Journal*. – 2022. – Vol. 19. – № 1. – P. 14. – DOI: 10.1186/s12985-021-01728-4.
279. Crook, T. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation / T. Crook, K.H. Vousden, J.A. Tidy // *Cell*. – 1991. – Vol. 67. – № 3. – P. 547-556. – DOI: 10.1016/0092-8674(91)90529-8.

280. Matsumoto, K. Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer / K. Matsumoto, T. Yasugi, S. Nakagawa [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 106. – № 6. – P. 919-922. – DOI: 10.1002/ijc.11332.
281. Rader, J.S. Genetic variations in human papillomavirus and cervical cancer outcomes / J.S. Rader, S. Tsaih, D. Fullin [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2019. – Vol. 144. – № 9. – P. 2206-2214. – DOI: 10.1002/ijc.32038.
282. Ellis, J. Antibody responses to HPV16 virus-like particles in women with cervical intraepithelial neoplasia infected with a variant HPV16 / J. Ellis, I. Etherington, D. Galloway [et al.] // *The Lancet*. – 1997. – Vol. 349. – № 9058. – P. 1069-1070. – DOI: 10.1016/S0140-6736(05)62292-1.
283. Du, J. Human Papillomavirus (HPV) 16 E6 Variants in Tonsillar Cancer in Comparison to Those in Cervical Cancer in Stockholm, Sweden / J. Du, C. Nordfors, A. Näsman [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. e36239. – DOI: 10.1371/journal.pone.0036239.
284. Ai, W. Deep Sequencing of HPV16 E6 Region Reveals Unique Mutation Pattern of HPV16 and Predicts Cervical Cancer / W. Ai, C. Wu, L. Jia [et al.] // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10. – № 4. – P. e01401-22. – DOI: 10.1128/spectrum.01401-22.
285. Zhao, J. Genetic variability and functional implication of HPV16 from cervical intraepithelial neoplasia in Shanghai women / J. Zhao, J. Zhu, J. Guo [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2020. – Vol. 92. – № 3. – P. 372-381. – DOI: 10.1002/jmv.25618.
286. Dai, M.-Z. Association of cervical carcinogenesis risk with HPV16 E6 and E7 variants in the Taizhou area, China / M.-Z. Dai, Y. Qiu, X.-H. Di [et al.] // *BMC Cancer*. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 769. – DOI: 10.1186/s12885-021-08531-y.
287. Kottaridi, C. The T350G Variation of Human Papillomavirus 16 E6 Gene Prevails in Oropharyngeal Cancer from a Small Cohort of Greek Patients / C. Kottaridi, P. Resta, D. Leventakou [et al.] // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – P. 1724. – DOI: 10.3390/v14081724.
288. Chansaenroj, J. Whole Genome Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Multiple Infection in Cervical Cancer Patients / J. Chansaenroj, A. Theamboonlers, P. Junyangdikul [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2012. – Vol. 13. – № 2. – P. 599-606. – DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.2.599.
289. Bletsa, G. Genetic variability of the HPV16 early genes and LCR. Present and future perspectives / G. Bletsa, F. Zagouri, G.D. Amoutzias [et al.] // *Expert Reviews in Molecular Medicine*. – 2021. – Vol. 23. – P. e19. – DOI: 10.1017/erm.2021.18.
290. Zine El Abidine, A. A naturally occurring variant of HPV-16 E7 exerts increased transforming activity through acquisition of an additional phospho-acceptor site / A. Zine El Abidine, V. Tomaic,

- R. Bel Haj Rhouma [et al.] // *Virology*. – 2017. – Vol. 500. – P. 218-225. – DOI: 10.1016/j.virol.2016.10.023.
291. Boumba, L.M.A. Genetic variability in E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus Type 16 from Congolese cervical cancer isolates / L.M.A. Boumba, S.Z. Assoumou, L. Hilali [et al.] // *Infectious Agents and Cancer*. – 2015. – Vol. 10. – № 1. – P. 15. – DOI: 10.1186/s13027-015-0010-4.
292. Li, T. Genetic variation of E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 from central China / T. Li, Z. Yang, C. Zhang [et al.] // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 217. – DOI: 10.1186/s12985-023-02188-8.
293. Duperret, E.K. Designing consensus immunogens to break tolerance to self-antigens for cancer therapy / E.K. Duperret, J. Yan, D.B. Weiner // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 85. – P. 35513-35514. – DOI: 10.18632/oncotarget.26275.
294. Muthumani, K. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus / K. Muthumani, K.M. Lankaraman, D.J. Laddy [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – № 40. – P. 5128-5134. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.060.
295. Walters, J.N. A Novel DNA Vaccine Platform Enhances Neo-antigen-like T Cell Responses against WT1 to Break Tolerance and Induce Anti-tumor Immunity / J.N. Walters, B. Ferraro, E.K. Duperret [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2017. – Vol. 25. – № 4. – P. 976-988. – DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.01.022.
296. The use of consensus sequence information to engineer stability and activity in proteins / [Electronic resource] // *Methods in Enzymology*. – Elsevier, 2020. – Vol. 643. – P. 149-179. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687920302500> (date of access: 11.02.2026).
297. Makrides, S.C. Vectors for gene expression in mammalian cells / S.C. Makrides. – [Electronic resource] // *New Comprehensive Biochemistry*. – Elsevier, 2003. – Vol. 38. – P. 9-26. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167730603380020> (date of access: 11.02.2026).
298. Pavlenko, M. A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer / M. Pavlenko, A.-K. Roos, A. Lundqvist [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 2004. – Vol. 91. – № 4. – P. 688-694. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6602019.
299. Westphal, K. Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures / K. Westphal, B. Akgül, A. Storey, I. Nindl // *Cellular Oncology: The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*. – 2009. – Vol. 31. – № 3. – P. 213-226. – DOI: 10.3233/CLO-2009-0476.

300. Degenkolbe, R. Chelating Agents Stabilize the Monomeric State of the Zinc Binding Human Papillomavirus 16 E6 Oncoprotein / R. Degenkolbe, P. Gilligan, S. Gupta, H.U. Bernard // *Biochemistry*. – 2003. – Vol. 42. – № 13. – P. 3868-3873. – DOI: 10.1021/bi027390h.
301. Messa, L. The Dimeric Form of HPV16 E6 Is Crucial to Drive YAP/TAZ Upregulation through the Targeting of hScrib / L. Messa, M. Celegato, C. Bertagnin [et al.] // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 16. – P. 4083. – DOI: 10.3390/cancers13164083.
302. Illiano, E. Production of functional, stable, unmutated recombinant human papillomavirus E6 oncoprotein: implications for HPV-tumor diagnosis and therapy / E. Illiano, O.C. Demurtas, S. Massa [et al.] // *Journal of Translational Medicine*. – 2016. – Vol. 14. – № 1. – P. 224. – DOI: 10.1186/s12967-016-0978-6.
303. Isaguliants, M. Enzymatic activity of HIV-1 protease defines migration of tumor cells in vitro and enhances their metastatic activity in vivo / M. Isaguliants, A. Zhitkevich, S. Petkov [et al.] // *Biochimie*. – 2025. – Vol. 228. – P. 32-43. – DOI: 10.1016/j.biochi.2024.08.009.
304. Rosàs-Canyelles, E. Multimodal detection of protein isoforms and nucleic acids from low starting cell numbers / E. Rosàs-Canyelles, A.J. Modzelewski, A.E. Gomez Martinez [et al.] // *Lab on a Chip*. – 2021. – Vol. 21. – № 12. – P. 2427-2436. – DOI: 10.1039/D1LC00073J.
305. Filippova, M. The Large and Small Isoforms of Human Papillomavirus Type 16 E6 Bind to and Differentially Affect Procaspase 8 Stability and Activity / M. Filippova, M.M. Johnson, M. Bautista [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 8. – P. 4116-4129. – DOI: 10.1128/JVI.01924-06.
306. Jansons, J. New mouse model based on adenocarcinoma 4T1 cells expressing HPV16 E6 and E7 applied to assess the efficacy of therapeutic and prophylactic E6/E7-based HPV16 vaccines / J. Jansons, D. Avdoshina, A. Dudorova [et al.] // *Infectious Agents and Cancer*. – 2025. – Vol. 20. – № 1. – P. 51. – DOI: 10.1186/s13027-025-00682-y.
307. Du, X. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation / X. Du, J. Wang, Q. Zhou [et al.] // *Drug Delivery*. – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 1516-1525. – DOI: 10.1080/10717544.2018.1480674.
308. Ledesma-Feliciano, C. Improved DNA Vaccine Delivery with Needle-Free Injection Systems / C. Ledesma-Feliciano, R. Chapman, J.W. Hooper [et al.] // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. 280. – DOI: 10.3390/vaccines11020280.
309. Ruzzante, B. Harnessing osmotic shock for enhanced intracellular delivery of (nano)cargos / B. Ruzzante, F. Fruzzetti, M. Cattaneo [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2025. – Vol. 669. – P. 125008. – DOI: 10.1016/j.ijpharm.2024.125008.

310. Lyons, B. Sonosensitive Cavitation Nuclei—A Customisable Platform Technology for Enhanced Therapeutic Delivery / B. Lyons, J.P.R. Balkaran, D. Dunn-Lawless [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28. – № 23. – P. 7733. – DOI: 10.3390/molecules28237733.
311. Yu, W.H. Topical Gene Delivery to Murine Skin / W.H. Yu, D. Moore, R.J. Debs [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1999. – Vol. 112. – № 3. – P. 370-375. – DOI: 10.1046/j.1523-1747.1999.00513.x.
312. Osorio, F.G. Luminescence-based in vivo monitoring of NF- κ B activity through a gene delivery approach / F.G. Osorio, J. De La Rosa, J.M. Freije // *Cell Communication and Signaling*. – 2013. – Vol. 11. – № 1. – P. 19. – DOI: 10.1186/1478-811X-11-19.
313. Troy, T. Quantitative Comparison of the Sensitivity of Detection of Fluorescent and Bioluminescent Reporters in Animal Models / T. Troy, D. Jekic-McMullen, L. Sambucetti, B. Rice // *Molecular Imaging*. – 2004. – Vol. 3. – № 1. – P. 15353500200403196. – DOI: 10.1162/15353500200403196.
314. Novickij, V. Does the shape of the electric pulse matter in electroporation? / V. Novickij, N. Rembiałkowska, W. Szlasa, J. Kulbacka // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – P. 958128. – DOI: 10.3389/fonc.2022.958128.
315. Potter, H. Transfection by Electroporation / H. Potter. – [Electronic resource] // *Current Protocols in Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 62. – № 1. – Mode of access: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mb0903s62> (date of access: 30.01.2026).
316. Demiryurek, Y. Transport, resealing, and re-poration dynamics of two-pulse electroporation-mediated molecular delivery / Y. Demiryurek, M. Nickaeen, M. Zheng [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2015. – Vol. 1848. – № 8. – P. 1706-1714. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.04.007.
317. Saulis, G. Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses / G. Saulis, R. Saulė // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2012. – Vol. 1818. – № 12. – P. 3032-3039. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.06.018.
318. Satkauskas, S. Mechanisms of in Vivo DNA Electrotransfer: Respective Contributions of Cell Electroporabilization and DNA Electrophoresis / S. Satkauskas, M.F. Bureau, M. Puc [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2002. – Vol. 5. – № 2. – P. 133-140. – DOI: 10.1006/mthe.2002.0526.
319. Pedron-Mazoyer, S. New anti angiogenesis developments through electro-immunization: Optimization by in vivo optical imaging of intradermal electrogenetransfer / S. Pedron-Mazoyer, J. Plouët, L. Hellaudais [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2007. – Vol. 1770. – № 1. – P. 137-142. – DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.09.014.

320. Starodubova, E. Cellular immunogenicity of novel gene immunogens in mice monitored by in vivo imaging / E. Starodubova, O. Krotova, D. Hallengård [et al.] // *Molecular Imaging*. – 2012. – Vol. 11. – № 6. – P. 471-486.
321. Petkov, S.P. Evaluation of immunogen delivery by DNA immunization using non-invasive bioluminescence imaging / S.P. Petkov, F. Heuts, O.A. Krotova [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2013. – Vol. 9. – № 10. – P. 2228-2236. – DOI: 10.4161/hv.25561.
322. Kupper, T.S. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences / T.S. Kupper, R.C. Fuhlbrigge // *Nature Reviews Immunology*. – 2004. – Vol. 4. – № 3. – P. 211-222. – DOI: 10.1038/nri1310.
323. Avdoshina, D. Efficacy of Plasmid DNA Delivery into Mice by Intradermal Injections Alone and Facilitated by Sonoporation or Electroporation / D. Avdoshina, V. Valuev-Elliston, M. Belikova [et al.] // *Vaccines*. – 2026. – Vol. 14. – № 1. – P. 82. – DOI: 10.3390/vaccines14010082.
324. Latanova, A. Fusion to Flaviviral Leader Peptide Targets HIV-1 Reverse Transcriptase for Secretion and Reduces Its Enzymatic Activity and Ability to Induce Oxidative Stress but Has No Major Effects on Its Immunogenic Performance in DNA-Immunized Mice / A. Latanova, S. Petkov, Y. Kuzmenko [et al.] // *Journal of Immunology Research*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-16. – DOI: 10.1155/2017/7407136.
325. Verma, S.K. Influence of Th1 versus Th2 immune bias on viral, pathological, and immunological dynamics in SARS-CoV-2 variant-infected human ACE2 knock-in mice / S.K. Verma, F. Ana-Sosa-Batiz, J. Timis [et al.] // *eBioMedicine*. – 2024. – Vol. 108. – P. 105361. – DOI: 10.1016/j.ebiom.2024.105361.
326. Jansons, J. Reciprocal Inhibition of Immunogenic Performance in Mice of Two Potent DNA Immunogens Targeting HCV-Related Liver Cancer / J. Jansons, D. Skrastina, A. Kurlanda [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – № 5. – P. 1073. – DOI: 10.3390/microorganisms9051073.
327. Lo Cigno, I. High-risk HPV oncoproteins E6 and E7 and their interplay with the innate immune response: Uncovering mechanisms of immune evasion and therapeutic prospects / I. Lo Cigno, F. Calati, C. Girone [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2024. – Vol. 96. – № 6. – P. e29685. – DOI: 10.1002/jmv.29685.
328. Westrich, J.A. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus / J.A. Westrich, C.J. Warren, D. Pyeon // *Virus Research*. – 2017. – Vol. 231. – P. 21-33. – DOI: 10.1016/j.virusres.2016.11.023.
329. Jemon, K. Suppression of the CD8 T cell response by human papillomavirus type 16 E7 occurs in Langerhans cell-depleted mice / K. Jemon, C.-M. Leong, K. Ly [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 34789. – DOI: 10.1038/srep34789.

330. Le Buanec, H. Induction of cellular immunosuppression by the human papillomavirus type 16 E7 oncogenic protein / H. Le Buanec, A. Lachgar, R. D'Anna [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 1999. – Vol. 53. – № 7. – P. 323-328. – DOI: 10.1016/S0753-3322(00)88505-4.
331. Ji, H. Targeting Human Papillomavirus Type 16 E7 to the Endosomal/Lysosomal Compartment Enhances the Antitumor Immunity of DNA Vaccines against Murine Human Papillomavirus Type 16 E7-Expressing Tumors / H. Ji, T.-L. Wang, C.-H. Chen [et al.] // *Human Gene Therapy*. – 1999. – Vol. 10. – № 17. – P. 2727-2740. – DOI: 10.1089/10430349950016474.
332. Liu, Q. The clinical course and management of cervical cancer with splenic metastasis: Case report and review of the literature / Q. Liu, M. Wang, V. Gayam [et al.] // *Clinical Case Reports*. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 689-693. – DOI: 10.1002/ccr3.3621.
333. Kumar, A. A Rare Case of Splenic Metastasis From Squamous Cell Carcinoma of the Cervix Detected on 18F-Fluorodeoxyglucose PET/CT / A. Kumar, A. Upadhyay, V. Pandey [et al.]. – [Electronic resource] // *Cureus*. – 2022. – Mode of access: <https://www.cureus.com/articles/125792-a-rare-case-of-splenic-metastasis-from-squamous-cell-carcinoma-of-the-cervix-detected-on-18f-fluorodeoxyglucose-petct> (date of access: 11.02.2026).
334. Egan, C.E. CCR2 and CD44 Promote Inflammatory Cell Recruitment during Fatty Liver Formation in a Lithogenic Diet Fed Mouse Model / C.E. Egan, E.K. Daugherty, A.B. Rogers [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. e65247. – DOI: 10.1371/journal.pone.0065247.
335. Wang, X. The EF-1 α promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells / X. Wang, Z. Xu, Z. Tian [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 21. – № 11. – P. 3044-3054. – DOI: 10.1111/jcmm.13216.
336. N, W.-I. Characterization of the regulatory elements in the promoter of the human elongation factor-1 alpha gene / W.-I. N, N. S. – [Electronic resource] // *The Journal of biological chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – № 47. – Mode of access: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7961976/> (date of access: 28.01.2026).
337. Peralta-Zaragoza, O. E6 and E7 Oncoproteins from Human Papillomavirus Type 16 Induce Activation of Human Transforming Growth Factor β_1 Promoter throughout Sp1 Recognition Sequence / O. Peralta-Zaragoza, V. Bermúdez-Morales, L. Gutiérrez-Xicotencatl [et al.] // *Viral Immunology*. – 2006. – Vol. 19. – № 3. – P. 468-480. – DOI: 10.1089/vim.2006.19.468.
338. Petkov, S. 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 [et al.] // *Cancers*. – 2022. – Vol. 15. – № 1. – P. 238. – DOI: 10.3390/cancers15010238.

339. Sounbuli, K. Tbp and Hpvt1 Are Appropriate Reference Genes for Splenic Neutrophils Isolated from Healthy or Tumor-Bearing Mice / K. Sounbuli, L.A. Alekseeva, A.V. Sen'kova [et al.] // *Biomedicines*. – 2024. – Vol. 12. – № 11. – P. 2571. – DOI: 10.3390/biomedicines12112571.
340. Lu, Y. Prognostic significance and immunological role of HPRT1 in human cancers / Y. Lu, R. Chen, H. Zhang [et al.] // *Biomolecules and Biomedicine*. – 2024. – Vol. 24. – № 2. – P. 262-291. – DOI: 10.17305/bb.2023.9775.
341. Souza, J.L.N. Screening and validating the optimal panel of housekeeping genes for 4T1 breast carcinoma and metastasis studies in mice / J.L.N. Souza, A.R. Antunes-Porto, I. Da Silva Oliveira [et al.] // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 26476. – DOI: 10.1038/s41598-024-77126-x.
342. Lu, Z. Potential Therapeutic Targets for the Treatment of HPV-Associated Malignancies / Z. Lu, S. Haghollahi, M. Afzal // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16. – № 20. – P. 3474. – DOI: 10.3390/cancers16203474.
343. DeFilippis, V.R. Evidence of Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 E6 But Not E7 Oncogenes / V.R. DeFilippis, F.J. Ayala, L.P. Villarreal // *Journal of Molecular Evolution*. – 2002. – Vol. 55. – № 4. – P. 491-499. – DOI: 10.1007/s00239-002-2344-y.
344. Kirnbauer, R. A Virus-Like Particle Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detects Serum Antibodies in a Majority of Women Infected With Human Papillomavirus Type 16 / R. Kirnbauer, N.L. Hubbert, C.M. Wheeler [et al.] // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 1994. – Vol. 86. – № 7. – P. 494-9. – DOI: 10.1093/jnci/86.7.494.
345. Mirabello, L. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis / L. Mirabello, M. Yeager, K. Yu [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 170. – № 6. – P. 1164-1174.e6. – DOI: 10.1016/j.cell.2017.08.001.
346. Nejo, Y.T. Molecular characterisation of genital human papillomavirus among women in Southwestern, Nigeria / Y.T. Nejo, D.O. Olaleye, G.N. Odaibo // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 11. – P. e0224748. – DOI: 10.1371/journal.pone.0224748.
347. Quiros-Fernandez, I. Dual T cell receptor/chimeric antigen receptor engineered NK-92 cells targeting the HPV16 E6 oncoprotein and the tumor-associated antigen L1CAM exhibit enhanced cytotoxicity and specificity against tumor cells / I. Quiros-Fernandez, S. Libório-Ramos, L. Leifert [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2024. – Vol. 96. – № 5. – P. e29630. – DOI: 10.1002/jmv.29630.
348. Stern, A. Viral Evolution / A. Stern, R. Andino. – [Electronic resource] // *Viral Pathogenesis*. – Elsevier, 2016. – P. 233-240. – Mode of access: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009642000173> (date of access: 11.02.2026).

349. Duvvuri, V.R.S.K. Role of Positive Selection Pressure on the Evolution of H5N1 Hemagglutinin / V.R.S.K. Duvvuri, B. Duvvuri, W.R. Cuff [et al.] // *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 7. – № 1-2. – P. 47-56. – DOI: 10.1016/S1672-0229(08)60032-7.
350. Wells, D.J. Intramuscular injection of plasmid DNA / D.J. Wells. – [Electronic resource] // *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics* / G. Dickson ed. . – Dordrecht : Springer Netherlands, 1995. – P. 83-103. – Mode of access: http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-0547-7_5 (date of access: 11.02.2026).
351. Podetz-Pedersen, K.M. Cellular Immune Response Against Firefly Luciferase After *Sleeping Beauty* –Mediated Gene Transfer *In Vivo* / K.M. Podetz-Pedersen, V. Vezys, N.V. Somia [et al.] // *Human Gene Therapy*. – 2014. – Vol. 25. – № 11. – P. 955-965. – DOI: 10.1089/hum.2014.048.
352. Miller, D.L. Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation / D.L. Miller, S.V. Pislaru, J.E. Greenleaf // *Somatic Cell and Molecular Genetics*. – 2002. – Vol. 27. – № 1-6. – P. 115-134. – DOI: 10.1023/a:1022983907223.
353. He, J. Ultrasonic Microbubble Cavitation Enhanced Tissue Permeability and Drug Diffusion in Solid Tumor Therapy / J. He, Z. Liu, X. Zhu [et al.] // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – P. 1642. – DOI: 10.3390/pharmaceutics14081642.
354. Yan, F. Therapeutic Vaccination for HPV-Mediated Cancers / F. Yan, L.G. Cowell, A. Tomkies, A.T. Day // *Current Otorhinolaryngology Reports*. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. 44-61. – DOI: 10.1007/s40136-023-00443-8.
355. Ga, E. Assessment of the immune interference effects of multivalent vaccine for influenza epidemic strain in 2022–2023 and evaluation of its efficacy / E. Ga, J.-A. Kang, J. Hwang [et al.] // *Heliyon*. – 2024. – Vol. 10. – № 6. – P. e28326. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e28326.
356. Garrod, T.J. Loss of long term protection with the inclusion of HIV pol to a DNA vaccine encoding gag / T.J. Garrod, T. Gargett, W. Yu [et al.] // *Virus Research*. – 2014. – Vol. 192. – P. 25-33. – DOI: 10.1016/j.virusres.2014.08.008.
357. Kjerrström, A. Interactions of Single and Combined Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) DNA Vaccines / A. Kjerrström, J. Hinkula, G. Engström [et al.] // *Virology*. – 2001. – Vol. 284. – № 1. – P. 46-61. – DOI: 10.1006/viro.2001.0905.
358. Van Montfort, T. Optimizing cellular immunity against HIV-1 Gag and preventing suppression by HIV-1 gp120 / T. Van Montfort, R.W. Sanders // *Expert Review of Vaccines*. – 2012. – Vol. 11. – № 10. – P. 1175-1177. – DOI: 10.1586/erv.12.102.
359. Kallas, E.G. Antigenic competition in CD4⁺ T cell responses in a randomized, multicenter, double-blind clinical HIV vaccine trial / E.G. Kallas, N.A. Grunenberg, C. Yu [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2019. – Vol. 11. – № 519. – P. eaaw1673. – DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw1673.

360. Zhang, Y. Enhancement of Gag-Specific But Reduction of Env- and Pol-Specific CD8⁺ T Cell Responses by Simian Immunodeficiency Virus Nonstructural Proteins In Mice / Y. Zhang, C. Sun, L. Feng [et al.] // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2012. – Vol. 28. – № 4. – P. 374-383. – DOI: 10.1089/aid.2011.0061.
361. Cai, H. HPV16 E6-specific T cell response and HLA-A alleles are related to the prognosis of patients with cervical cancer / H. Cai, Y. Feng, P. Fan [et al.] // *Infectious Agents and Cancer*. – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 61. – DOI: 10.1186/s13027-021-00395-y.
362. Pokorná, D. Combined immunization with fusion genes of mutated E7 gene of human papillomavirus type 16 did not enhance antitumor effect / D. Pokorná, J. Macková, M. Dušková [et al.] // *The Journal of Gene Medicine*. – 2005. – Vol. 7. – № 6. – P. 696-707. – DOI: 10.1002/jgm.733.
363. Šmahel, M. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules / M. Šmahel, P. Šíma, V. Ludvíková [et al.] // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – № 11-12. – P. 1125-1136. – DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00519-4.
364. Heymann, F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice / F. Heymann, K. Hamesch, R. Weiskirchen, F. Tacke // *Laboratory Animals*. – 2015. – Vol. 49. – № 1_suppl. – P. 12-20. – DOI: 10.1177/0023677215572841.
365. Kimura, K. Immunopathogenesis of hepatic fibrosis in chronic liver injury induced by repeatedly administered concanavalin A / K. Kimura, K. Ando, H. Ohnishi [et al.] // *International Immunology*. – 1999. – Vol. 11. – № 9. – P. 1491-1500. – DOI: 10.1093/intimm/11.9.1491.
366. Kobayashi, S. Apoptosis of T cells in the hepatic fibrotic tissue of the rat: a possible inducing role of hepatic myofibroblast-like cells / S. Kobayashi, S. Seki, N. Kawada [et al.] // *Cell and Tissue Research*. – 2003. – Vol. 311. – № 3. – P. 353-364. – DOI: 10.1007/s00441-002-0670-4.
367. Cellosaurus cell line TC-1 [Mouse lung] (CVCL_4699). – Mode of access: https://www.cellosaurus.org/CVCL_4699 (date of access: 11.02.2026). – [Electronic resource].
368. Battulin, N. The human EF1a promoter does not provide expression of the transgene in mice / N. Battulin, A. Korablev, A. Ryzhkova [et al.] // *Transgenic Research*. – 2022. – Vol. 31. – № 4-5. – P. 525-535. – DOI: 10.1007/s11248-022-00319-5.
369. Yuan, L. Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1, a target of miR-125b-5p, promotes cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma / L. Yuan, Z. Xiao, R. Lu // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9. – № 9. – P. e20174. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e20174.
370. Camus, C. Quantification of HPV16 E6/E7 mRNA Spliced Isoforms Viral Load as a Novel Diagnostic Tool for Improving Cervical Cancer Screening / C. Camus, S. Vitale, C. Loubatier [et al.] // *Journal of Clinical Medicine*. – 2018. – Vol. 7. – № 12. – P. 530. – DOI: 10.3390/jcm7120530.

371. Tang, S. The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6*I Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation / S. Tang, M. Tao, J.P. McCoy, Z.-M. Zheng // *Journal of Virology*. – 2006. – Vol. 80. – № 9. – P. 4249-4263. – DOI: 10.1128/JVI.80.9.4249-4263.2006.
372. Zheng, Z.-M. Splicing of a Cap-proximal Human Papillomavirus 16 E6E7 Intron Promotes E7 Expression, but can be Restrained by Distance of the Intron from its RNA 5' Cap / Z.-M. Zheng, M. Tao, K. Yamanegi [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 337. – № 5. – P. 1091-1108. – DOI: 10.1016/j.jmb.2004.02.023.
373. Wanichwatanadecha, P. Transactivation activity of human papillomavirus type 16 E6*I on aldo-keto reductase genes enhances chemoresistance in cervical cancer cells / P. Wanichwatanadecha, S. Sirisrimangkorn, J. Kaewprag, M. Ponglikitmongkol // *Journal of General Virology*. – 2012. – Vol. 93. – № 5. – P. 1081-1092. – DOI: 10.1099/vir.0.038265-0.
374. Pim, D. Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth / D. Pim, P. Massimi, L. Banks // *Oncogene*. – 1997. – Vol. 15. – № 3. – P. 257-264. – DOI: 10.1038/sj.onc.1201202.
375. Williams, V.M. Human Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage / V.M. Williams, M. Filippova, V. Filippov [et al.] // *Journal of Virology*. – 2014. – Vol. 88. – № 12. – P. 6751-6761. – DOI: 10.1128/JVI.03355-13.
376. Pim, D. The Human Papillomavirus (HPV) E6* Proteins from High-Risk, Mucosal HPVs Can Direct Degradation of Cellular Proteins in the Absence of Full-Length E6 Protein / D. Pim, V. Tomaić, L. Banks // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – № 19. – P. 9863-9874. – DOI: 10.1128/JVI.00539-09.
377. Lin, K. E6-associated transcription patterns in human papilloma virus 16-positive cervical tissues / K. Lin, X. Lu, J. Chen [et al.] // *Oncology Letters*. – 2015. – Vol. 9. – № 1. – P. 478-482. – DOI: 10.3892/ol.2014.2698.
378. Urbanski, L.M. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics / L.M. Urbanski, N. Leclair, O. Anczuków // *WIREs RNA*. – 2018. – Vol. 9. – № 4. – P. e1476. – DOI: 10.1002/wrna.1476.
379. Read, A. Splicing dysregulation as a driver of breast cancer / A. Read, R. Natrajan // *Endocrine-Related Cancer*. – 2018. – Vol. 25. – № 9. – P. R467-R478. – DOI: 10.1530/ERC-18-0068.
380. Park, S. Differential Functions of Splicing Factors in Mammary Transformation and Breast Cancer Metastasis / S. Park, M. Brugiolo, M. Akerman [et al.] // *Cell Reports*. – 2019. – Vol. 29. – № 9. – P. 2672-2688.e7. – DOI: 10.1016/j.celrep.2019.10.110.

381. Anders, C.K. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer / C.K. Anders, L.A. Carey // *Clinical Breast Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – P. S73-S81. – DOI: 10.3816/CBC.2009.s.008.
382. Hoffmann, B. The initial engraftment of tumor cells is critical for the future growth pattern: a mathematical study based on simulations and animal experiments / B. Hoffmann, T. Lange, V. Labitzky [et al.] // *BMC Cancer*. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 524. – DOI: 10.1186/s12885-020-07015-9.
383. Haider, M.-T. Comparison of ex vivo bioluminescence imaging, Alu-qPCR and histology for the quantification of spontaneous lung and bone metastases in subcutaneous xenograft mouse models / M.-T. Haider, V. Freytag, L. Krause [et al.] // *Clinical & Experimental Metastasis*. – 2024. – Vol. 41. – № 2. – P. 103-115. – DOI: 10.1007/s10585-024-10268-4.
384. Todd, V.M. Hypoxia in bone metastasis and osteolysis / V.M. Todd, R.W. Johnson // *Cancer Letters*. – 2020. – Vol. 489. – P. 144-154. – DOI: 10.1016/j.canlet.2020.06.004.
385. Zhou, X. Cervical cancer immune microenvironment: Mechanisms of HPV-mediated immune evasion and advances in immunotherapy (Review) / X. Zhou, R. An, X. Li // *Oncology Letters*. – 2025. – Vol. 31. – № 1. – P. 22. – DOI: 10.3892/ol.2025.15375.
386. Balasubramaniam, S.D. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development / S.D. Balasubramaniam, V. Balakrishnan, C.E. Oon, G. Kaur // *Medicina*. – 2019. – Vol. 55. – № 7. – P. 384. – DOI: 10.3390/medicina55070384.
387. Bhattacharjee, R. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies / R. Bhattacharjee, S.S. Das, S.S. Biswal [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2022. – Vol. 174. – P. 103675. – DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103675.