# 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

# БАЮРОВА

# Екатерина Олеговна

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА КАНДИДАТНЫЕ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1

Специальность: 1.5.10. – Вирусология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат химических наук

Беликова-Исагулянц Мария Георгиевна

Москва – 2023 г.

# оглавление

ВВЕДЕНИЕ	. 6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Вирус иммунодефицита человека	11
1.1.1 Обратная транскриптаза	15
1.1.2. Интеграза	16
1.1.3. Протеаза	18
1.2. Антиретровирусная терапия	18
1.3. Мутации лекарственной устойчивости	20
1.4. Вакцины против ВИЧ-1	22
1.5. Модели для тестирования вакцин	25
1.5.1. Модели на основе вирусов мышей, близких патогенным вирусам человека	25
1.5.2. Модели на основе трансгенных мышей, моделирующих или симулирующих вирусну	ю
инфекцию	25
1.5.3. Модели на основе ксенографтов в иммуносупрессированых мышах	26
1.5.4. Модели на основе аллографтов в иммунокомпетентных мышах	27
1.6. Принципы конструирования моделей с использованием клеточных линий мышино	эй
природы	29
1.6.1. Выбор клеток «носителей» вирусного белка	29
1.6.2. Выбор вирусного антигена	31
1.6.3. Выбор уровня продукции вирусного антигена	31
1.6.4. Роль молекулярных ко-факторов и их использование	32
1.6.5. Выбор участка присадки (имплантации) клеток	32
1.7. Параметры оценки результатов имплантации опухолевых клеток	34
1.7.1. Формирование опухоли	34
1.7.2. Характеристика опухоли	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Реагенты	38
2.1.1. Праймеры	38

2.1.2. Белки и пептиды	39
2.1.3. Плазмиды	39
2.1.4. Бактериальные среды	42
2.1.5. Реагенты для работы с клетками	42
2.2. Материалы и объекты	42
2.2.1. Бактериальные штаммы	42
2.2.2. Эукариотические клеточные линии	42
2.2.3. Лабораторные животные	42
2.3 Методы исследований	43
2.3.1. Культивирование бактериальных клеток <i>E.coli</i>	43
2.3.2. Получение компетентных клеток <i>E.coli</i>	43
2.3.3. Трансформация клеток <i>E.coli</i>	43
2.3.4. Выделение плазмидной ДНК	43
2.3.5. Культивирование и хранение эукартиотических клеток	44
2.3.6. Хранение и заморозка	44
2.3.7. Получение лентивирусных частиц	45
2.3.8. Определение продукции белка р24 в среде при получении лентивирусных частиц	45
2.3.9. Определение инфекционного титра лентивирусных частиц	45
2.3.10. ПЦР	45
2.3.11. Электрофорез ДНК в агарозном геле	46
2.3.12. Получение моноклональных производных клеточной линии 4T1luc2	46
2.3.13. Работа с лабораторными мышами	47
2.3.14. ДНК-иммунизация и <i>in vivo</i> электропорация мышей	48
2.3.15. Эвтаназия	51
2.3.16. Получение сывороток крови	51
2.3.17. Выделение спленоцитов	51
2.3.18. Оценка клеточного иммунного ответа методом ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	51
2.3.19. Оценка антительного иммунного ответа	52

2.3.20. Оценка туморогенного потенциала субклонов 4T1luc2, продуцирующих антигены
ВИЧ-1 53
2.3.20.1. Мониторинг <i>in vivo</i> биолюминесцентного сигнала
2.3.20.2. Мониторинг миграции опухолевых клеток в дистальные органы <i>ex vivo</i>
2.3.20.3. Гистологическая оценка опухолей
2.3.20.4. Гистологическая оценка метастазирования в печени
2.3.21. Выделение тотальной РНК из опухолей 56
2.3.22. ПЦР с детекцией в реальном времени 57
2.3.23. Статистический анализ результатов 57
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ
3.1 Дизайн консенсусной последовательности RT, PR и IN ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A и
его вариантов с мутациями лекарственной устойчивости
3.2. Дизайн вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A с мутациями лекарственной
устойчивости и амнокислотными заменами, приводящими к инактивации ферментов (мутациями
инактивации)
3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А
3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>
<ul> <li>3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU_A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц</li></ul>

4

3.9. Имплантация 4T1luc2 субклонов экспрессирующих гены ферментов ВИЧ-1	мышам, ДНК-
иммунизированным соответствующими ферментами («челлендж»)	89
3.9.1. Оценка эффекта введения ДНК	
3.9.2. Оценка методом «челленджа» эффективности ДНК-иммунизации	конструктами,
кодирующими варианты обратной транскриптазы ВИЧ-1	
3.9.3. Оценка методом «челленджа» эффективности ДНК-иммунизации	конструктами,
кодирующими варианты интегразы ВИЧ-1	
3.9.4. Оценка методом «челленджа» эффективности ДНК-иммунизации	конструктами,
кодирующими варианты протеазы ВИЧ-1	100
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	
ВЫВОДЫ	
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	125

### введение

### Актуальность темы исследования

По состоянию на конец 2021 года в мире проживало 38,4 млн ВИЧ-инфицированных людей, и только за 2021 год было зафиксировано 5 млн новых случаев заражения и около 650 тыс. случаев смерти от ВИЧ-инфекции. В 2021 году на территории РФ проживало более 1,1 млн людей, инфицированных ВИЧ-1, было выявлено более 70 тыс. новых случаев и 34 тыс. смертей от ВИЧ-инфекции [1; 2]. На сегодняшний день этот вирус стал причиной смерти более 40 млн человек [1], из них 425 тыс. в России [2]. Для сравнения, по данным Всемирной Организации Здравоохранения, вызвавший пандемию SARS-CoV-2, унес жизни 6,8 млн [3]. В силу этого ВИЧ-инфекция и сегодня остается одной из главных проблем мирового здравоохранения.

2021 году 75% ВИЧ-инфицированных людей по всему В миру получали антиретровирусную терапию (АРТ) [1]. В России охват лечением составил 82,2% от состоящих на диспансерном учете пациентов и 56,4% – от тех, у кого был выявлен ВИЧ-1 [2]. Применение АРТ вызывает развитие мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ), требующих перехода на вторую и третью линии терапии, что сильно удорожает лечение. Подавление виремии у лиц, принимающих АРТ, достигается в 76%-78% случаев (данные на 2019 и 2018 гг., соответственно) [4; 5], т.е. с вирусологической неэффективностью терапии сталкиваются не менее 20% ВИЧинфицированных лиц. За последние десятилетия на территории РФ возросла частота встречаемости вирусов с мутациями ЛУ у людей, никогда не принимавших АРТ (с 1% в 2005 г. [6] до 5,4% в 2022 г. [7]), включая множественную ЛУ (1,1% на 2021 г), что предопределяет потенциал дальнейшего снижения эффективности терапии. Большинство механизмов действия препаратов АРТ связаны с ингибированием обратной транскриптазы (RT), интегразы (IN) и протеазы (PR) ВИЧ-1. Терапевтическая вакцинация, нацеленная на ЛУ-формы этих белков, в сочетании с АРТ могла бы отсрочить или даже предотвратить появление и распространение ЛУвариантов вируса. Разработка таких терапевтических вакцин осложняется отсутствием животной модели для функциональной оценки способности вакцинных кандидатов сформировать в организме хозяина эффективный иммунный ответ, в том числе против ВИЧ-1 с мутациями ЛУ, который бы обладал протективными свойствами.

## Степень разработанности темы исследования

Для доклинических исследований протективных свойств вакцин против ВИЧ-1 используют заражение лабораторных мышей, иммунизированных кандидатными вакцинами, химерными вирусами на основе вируса ВИЧ-1 и вируса лейкемии мышей, но такие вирусы

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

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

В задачи работы входило:

- Получить субклоны клеточной линии аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2, продуцирующие обратную транскриптазу (RT), интегразу (IN) и протеазу (PR) ВИЧ-1 без мутаций и с мутациями лекарственной устойчивости;
- 2. Охарактеризовать туморогенный потенциал полученных субклонов линии 4T1luc2, продуцирующих ферменты ВИЧ-1, *in vivo* в сингенных мышах линии BALB/c;
- 3. Охарактеризовать миграционный и метастатический потенциал полученных субклонов линии 4T1luc2, продуцирующих ферменты ВИЧ-1, *in vivo* в сингенных мышах линии BALB/c;
- Для разработаной модели подобрать условия имплантации субклонов 4T1luc2 сингенным мышам и показатели мониторинга, позволяющие адекватно оценивать рост опухолей и процессы миграции и метастазирования опухолевых клеток;

5. В рамках разработанной модели оценить протективный потенциал ДНК-иммунизации, а именно способность иммунизации плазмидными конструктами, кодирующими лекарственно-устойчивые варианты обратной транскриптазы, интегразы и протеазы ВИЧ-1, предотвращать образование, рост и метастазировании опухолей, продуцирующих соответствующие вирусные белки.

## Научная новизна

В работе создана оригинальная модель для тестирования вакцин против ВИЧ-1 в лабораторных имплантации сингенных мышах, основанная на опухолевых клеток, экспрессирующих варианты RT, IN и PR, в том числе с мутациями ЛУ. Для этого были впервые получены производные высоко туморогенной, спонтанно метастазирующей клеточной линии 4T11uc2, экспрессирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 штамма FSU\_A, в том числе с мутациями ЛУ. Была впервые оценена эффективность ДНК-иммунизации против лекарственно устойчивых вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 путем имплантации иммунизированым мышам опухолевых клеток, экспрессирующих соответствующие варианты ферментов ВИЧ-1. Впервые была продемонстрирована возможность использования ex vivo биолюминесцентного сигнала для оценки миграции опухолевых клеток в дистальные органы, а также применимость параметра миграции опухолевых клеток при оценке эффективности индуцированного иммунного ответа. Показано, что в экспериментах с имплантацией опухолевых клеток иммунизированным мышам индуцированный иммунный ответ обладает разной степенью протективности, несмотря на высокую иммуногенность плазмидных конструктов при ДНК-иммунизации.

# Теоретическая и практическая значимость работы

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

иммунного ответа индуцируемого вакциннами на основе субклонов клеточной линии 4T1luc2, экспрессирующих вирусные антигены, может быть распространен на другие вирусы, вызывающие хроническую инфекцию человека, но не инфицирующие лабораторных мышей. В рамках разработанной модели было продемонстрировано, что RT является относительно сильным иммуногеном, пригодным для включения в кандидатную вакцину против ЛУ ВИЧ-1, PR является относительно сильным Т-клеточным иммуногеном, потенциально пригодным для включения в кандидатную вакцину против ЛУ ВИЧ-1 при условии корректного подбора включаемых мутаций ЛУ, а IN является относительно слабым иммуногеном, не эффективным для включения в кандидатную вакцину против ЛУ ВИЧ-1.

## Методология и методы исследования

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

### Положения, выносимые на защиту

- Экспрессия ферментов ВИЧ-1 с мутациями и без мутаций лекарственной устойчивости не приводила к снижению туморогенной и миграционной активности субклонов линии 4T1luc2 в сравнении с исходной линией, а также не приводила к изменению гистологических характеристик формируемых опухолей, что позволяет использовать полученные субклоны для создания разрабатываемой модели.
- 2. В рамках разработанной модели для субклонов 4T1luc2, кодирующих варианты обратной транскриптазы, интегразы и протеазы, оптимальной является доза имплантации в 1×10<sup>4</sup> клеток/сайт введения с мониторингом роста опухоли по кинетике билюминесценции от сайта имплантации клеток с 1-го по 10-й день, и морфометрически по размеру опухолей в конечной точке эксперимента. Для оценки влияния иммунизации на интенсивность миграции опухолевых клеток в дистальные органы после окончания эксперимента необходимо учитывать биолюминесцентный сигнал от органов *ex vivo*. Для оценки

влияния иммунизации на метастатическую активность необходимо проводить гистологический анализ количества и размера метастазов в легких и печени.

 Разработанная модель для функциональной оценки иммунного ответа позволяет произвести оценку эффективности Т-клеточного, гуморального и смешанного иммунного ответа, в том числе специфичного к мутациям лекарственной устойчивости, индуцированного в результате иммунизации ДНК-вакцинными кандидатами.

# Степень достоверности и апробация результатов

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

# Публикации

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

### Структура и объем диссертации.

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

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

# 1.1. Вирус иммунодефицита человека

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относится к роду *Lentivirus* семейства *Retroviridae*. В настоящее время изоляты данного вируса группируют в два основных типа: ВИЧ типа 1 (ВИЧ-1) и ВИЧ типа 2 (ВИЧ-2). Наиболее распространенным является ВИЧ-1, в то время как ВИЧ-2 встречается локально на территории Центральной и Западной Африки. Инфекции лентивирусами обычно сопряжены с латентными формами болезней и персистентной формой инфекции. ВИЧ-1 вызывает у человека развитие синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [8].

Филогенетический анализ изолятов ВИЧ-1 выявил несколько кластеров вируса, различных по географии распространения. Генетические субтипы (клады) были объединены в 4 группы: М, О, N, P. Группа M охватывает более 98% всех изолятов вируса и состоит из 18 субтипов (A, B, C, D, и так далее) и 49 циркулирующих рекомбинантных форм (CRFs) [9]. Изоляты, относимые к группе О, были выделены из образцов, собранных в странах Африки, и их геном на 65% совпадает с изолятами группы М. Изоляты группы N и P были выделены из крови пациентов в Камеруне [10]. Наиболее распространенным во всем мире является субтип С (47,2%), а в развивающихся странах – субтип В (12,3%) [9].

Развитие эпидемии ВИЧ-1 в Росси началось в 1980-х, эпидемия изначально затрагивала потребителей инъекционных наркотиков и их ближайших партнеров. В 2021 году на территории РФ проживало более 1,1 млн людей, инфицированных ВИЧ-1 (ВИЧ(+)), за 2021 год было выявлено более 70 тыс. новых случае ВИЧ-инфекции [2]. В сравнении с началом эпидемии, на сегодняшний день возрастает доля случаев передачи ВИЧ-1 гетеросексуальными путем [11]. Возрастает частота выявления рекомбинантных форм вируса [12]. На территории России превалирует вирус субтипа A, превалирующим вариантом вируса является субтип A6, также известных как «IDU-A» (от injecting drug users) или «FSU-A» (от former Soviet Union) [9; 11; 13]. Этот же вариант вируса связан с развитием эпидемий в Украине, Беларуси, Казахстане, Кыргызстане и других странах бывшего Советского Союза [11]. Вторым по распространенности является субтип B, но выявляются и рекомбинантные формы между субтипами A и B, а также A и G [11; 14].

Вирион ВИЧ представляет собой сферическую частицу диаметром около 100 нм, окруженную липопротеидной мембраной [8]. На своей мембране вирус несет 72 «кнопки», состоящие из тримеров поверхностных гликопротеинов [15]: gp120 – внешнего белка оболочки

и gp41 – трансмембранного белка, объединенных в единую структуру. Белки gp120 и gp41 не связаны ковалентной связью, поэтому gp120 может спонтанно отделяться, белок детектируется в крови и лимфе инфицированных пациентов. Кроме того, в процессе отпочковывания от клетки в мембрану вируса могут встраиваться некоторые клеточные белки, в том числе HLA-I и HLA-II, молекулы адгезии ICAM-1 и другие [8]. С внутренней стороны липопротеидной мембраны находится заякоренный на нее матриксный белок p17. Капсид ВИЧ имеет коническую форму и образован капсидным белком p24. Внутри капсида расположены 2 идентичные молекулы PHK, окруженные белком нуклеокапсида p7, и вирусные ферменты – обратная транскриптаза p51/ p66 (RT, OT), интеграза p32 (IN, ИН) и протеаза p10 (PR, ПР) [8].

Геном ВИЧ, как упомянуто выше, состоит из двух идентичных молекул (+) РНК. Кроме основных генов, характерных для ретровирусов, кодирующих структурные белки (gag, env) и ферменты, необходимые для обратной транскрипции (обратная транскриптаза и интеграза) и созревания вириона (протеаза) (ген pol), в геном ВИЧ входит ряд генов, кодирующих регуляторные белки Tat, Rev, Vpr, Vpu, Vif, Nef. (Рисунок 1). Белок Tat – трансактиватор генов ВИЧ, экспрессирующийся на самых ранних стадиях вирусной инфекции; Rev осуществляет ядерно-цитоплазматический транспорт РНК; Vpr отвечает за арест клеточного цикла и транспорт провирусной ДНК, образовавшейся в результате обратной транскрипции, в ядро неделящихся клеток; Vpu yчаствует в выходе вириона из клетки; Vif увеличивает инфекционность вируса; Nef обладает множеством функций, среди которых внутриклеточный сигналинг и отрицательная регуляция экспрессии CD4 рецептора на поверхности клеток [8; 10; 15].



Рисунок 1 – Строение генома ВИЧ -1 и кодируемые белки. МА – матриксный белок, СА – белок капсида, NC – белок нуклеокапсида, PR - протеаза, RT – обратная транскриптаза, IN - интеграза, SU – внешний белок оболочки, TM – трансмембранный белок оболочки, Vif, Vpr, Tat, Rev, Nef, Vpu – неструктурные белки. LTR – длинные концевые терминальные повторы. Пунктирными линиями показан альтернативный сплайсинг. Адаптировано по [10].

Основной клеточной мишенью для ВИЧ-1 являются клетки, экспрессирующие CD4рецептор – основной рецептор ВИЧ-1. Это активированные периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC), макрофаги и дендритные клетки. В качестве ко-рецептора выступают рецепторы хемокинов CCR5 или CXCR4. Среди CD4+ Т клеток CCR5 рецептор представлен только на поверхности CD4+ Т-клеток памяти, которые широко распространены в нелимфоидных тканях, а CXCR4 представлен на поверхности CD4+ Т-клеток памяти и наивных лимфоцитов. На первых этапах инфекции доминирующей является CCR5-тропная субпопуляция вируса[10].

Проникновение вируса в клетку осуществляется путем слияния клеточной мембраны с оболочкой вируса. После проникновения в клетку вирион без оболочки транспортируется к ядру, внутри вириона в этот момент осуществляется акт обратной транскрипции и формирование прединтеграционного комплекса. Данный комплекс транспортируется в ядро через ядерные поры, взаимодействуя с системой ядерного импорта. Непосредственно в ядре полноразмерная ДНК копия вирусного генома встраивается в ДНК клетки [10]. Интеграция ВИЧ-1 в геном клетки

происходит в основном в интронные области активно транскрибируемых генов [16]. Интегрированная ДНК вируса служит матрицей как для синтеза вирусных белков, так и для синтеза вирусной РНК. В обоих случаях ключевым ферментом является РНК полимераза II. Транспорт несплайсированных РНК в цитоплазму осуществляется благодаря уникальному механизму, использующему вирусный белок Rev. Трансляция полипротеина Env происходит на рибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР), а полипротеинов Gag и Gag-Pol – на свободных рибосомах, после чего компоненты независимо собираются у клеточной мембраны. После освобождения вирусной частицы из клетки происходит протеолитическое расщепление полипротеинов с помощью вирусной протеазы. Только после этого расщепления формируется зрелый вирион с капсидом конической формы, который способен инфицировать другие клетки [10].

К настоящему моменту накоплен также большой массив данных о проникновении ВИЧ-1 в эпителиальные клетки. Вирус был детектирован в интактных орофарингеальных [17], анально/ректальных [18], шейно-влагалищных эпителиальных клетках, клетках крайней плоти/половом члене [17; 19–21], эпителиальных клетках дыхательных путей [22] и желудка [23]. При этом репликация вируса и продуктивная инфекция в эпителиальных клетках была показана только для клеток шейки матки в ранней работе S.N. Asin с соавт. [24], но не для других эпителиальных клеток. Тем не менее, инфекция эпителиальных клеток возможна. Было показано, что ВИЧ-1 может заимствовать белки оболочек других вирусов, т.е. «псевдотипироваться», что позволяет ему инфицировать клетки, имеющие рецепторы этих белков [25–27]. В работе Tang Y. было показано, что ко-инфекция Т-клеток вирусами ВИЧ-1 и у-ретровирусом, родственным вирусу ксенотропного мышиного лейкоза (gammaretrovirus xenotropic murine leukemia virusrelated virus (XMRV)), приводит к формированию вирионов ВИЧ-1, способных заражать эпителиальные клетки, а антитела к гликопротеину XMRV способны предотвратить это заражение [27]. Кроме того, в другой работе Tang Y. с соавт. было показано, что ВИЧ-1 инфицированные Т-клетки могут заражать трофобласты плаценты путем слияния клеточных мембран, если на мембране трофобластов присутствует синцитин – поверхностный гликопротеин эндогенного ретровируса человека [28]. Этот механизм может затрагивать и другие эпителиальные клетки. Например, было показано, что после воздействия ВИЧ-1 на эпителий бронхов клетки продуцируют белок p24 и содержат в геноме провирусную ДНК ВИЧ-1 [29]. Присутствие вируса в эпителиальных тканях и клетках эпителия способствует системному инфицированию циркулирующих в эпителиальных тканях CD4+ Т лимфоцитов, клеток Лангенгариса, дендритных клеток и макрофагов как *in vivo*, так и *ex vivo* [19; 20; 24; 30–34].

### 1.1.1. Обратная транскриптаза

Обратная транскриптаза, или ревертаза, является ключевым вирусным ферментом, обладающим активностями РНК-ДНК-полимеразы, ДНК-ДНК-полимеразы и рибонуклеазы Н (РНКазы Н). Зрелая обратная транскриптаза ВИЧ представляет собой гетеродимер, состоящий из р66 (66 кДа) и р51 (51 кДа) субъединиц (Рисунок 2). Субъединица р51 образуется путем протеолитического отщепления С-конца от субъединицы р66 или большего предшествующего полипротеина вирусной протеазой.



Рисунок 2 – Строение обратной транскриптазы ВИЧ. А) строение р66 (слева) и р51 (справа) субъединиц обратной транскриптазы ВИЧ. Изображен активный сайт полимеразы, домены «ладонь», «пальцы», «большой палец» и соединительный домен. Изображение получено с помощью рентгеноструктурного анализа ревертазы в комплексе с ДНК (не показана). Разрешение 3,0 Å. Б) Строение обратной транскриптазы ВИЧ-1, связанной с РНК/ДНК комплексом. Цветом показаны основные домены активной р66 субъединицы. Адаптировано из [10].

По данным рентгеноструктурного анализа обе субъединицы имеют одинаковые субдомены, организованные в различные структуры [10]. Субединица р66 имеет классическую архитектуру полимеразы и состоит из 4 субдоменов: «пальцы» (1-90; 111-160 а.о.), «ладонь» (90-110; 161-240 а.о.), «большой палец» (241-310 а.о.), и соединительный субдомен (311-430 а.о.) [35]. Домен РНКазы Н (431-550 а.о.) находится на С-конце субъединицы р66 и связан с полимеразным доменом с помощью соединительного субдомена. Домен РНКазы Н имеет структурное сходство с таковым у *E. coli* [10]. В активном сайте субъединицы р66 полимеразы находятся три остатка Asp, координирующие ион  $Mg^{2+}$ , вовлеченные в катализ, в то время как в аналогичном центре субъединицы p51 они спрятаны, в результате чего она выполняет лишь структурную роль [35; 36]. Во время работы внутри полимеразы находится олигонуклеотид длиной около 18 п.о. [10].

Важным является то, что у RT нет корректирующей активности, а в процессе обратной транскрипции происходит несколько смен матрицы. Быстрый цикл репликации и отсутствие системы исправления ошибок делает RT ВИЧ-1 одной из самый неточных полимераз, она совершает  $3,4 \times 10^{-5}$  ошибки в результате каждого цикла репликации [37]. Всего в результате различных процессов (сдвиг рамки считывания, мутации, ошибки в репликации) в каждом цикле репликации уровень мутаций достигает ~  $1-3 \times 10^{-5}$ , что обеспечивает высокий уровень разнообразия вирусной популяции и является основой для быстрого возникновения вариантов вируса с лекарственной устойчивостью, в том числе множественной [38].

### 1.1.2. Интеграза

Интеграза ВИЧ-1 осуществляет интеграцию вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Интеграза имеет доменную структуру и состоит из трех основных доменов – N-концевого, каталитического и С-концевого [39]. Анализ аминокислотных последовательностей интегразы различных ретровирусов, ретротранспозонов и других транспозонов выявил абсолютную консервативность а.о. D64, D116 и E152 среди всех интеграз. Мутации в любом из этих а.о. приводят к потере 3'-процессивной активности и способности переносить ДНК цепь [40]. В виду высокой склонности интегразы и ее отдельных доменов к агрегации получить структуру полноразмерного белка долгое время не представлялось возможным [40], однако относительно недавно, в 2017 году была разрешена структура интасомы ВИЧ-1 [41]. Интасома – обобщающий термин для рибонуклеопротеидных комплексов с интегразой, образующихся в ходе жизненого цикла ретровирусов. В составе интасомы интеграза представляет собой тетрамер, состоящих из двух димеров интегразы. Взаимодействие с ДНК опосредовано внутренними протомерами. N- концевой домен каждого из внутренних протомеров вытянут по направлению к активному сайту другого внутреннего протомера. Внутренние протомеры «оборачивают» свои три домена вокруг пары концов вирусной ДНК и стыкуются с клеточной ДНК, сближая две группы 3'-ОН вирусной ДНК и катализируя согласованную интеграцию с формированием комплекса переноса цепи (strand transfer complex, STC). С-концевые домены внешних протомеров тоже взаимодействуют с вирусной ДНК (Рисунок 3) [41]. Расположение и взаимодействия N-концевых доменов внешних протомеров разрешить не удалось [41]. Кроме того, было показано, что интеграза способна формировать комплексы более высокого порядка, сохраняя расположение отдельных доменов [40].



Рисунок 3 – Структура тетрамерной интасомы комплекса переноса цепи ВИЧ-1 (pdb: 5U1C). А – интасома комплекса переноса цепи ВИЧ-1. Внутренние протомеры изображены фиолетовым и бирюзовым, внешние – зеленым и оранжевым. Б – Интасома комплекса переноса цепи ВИЧ-1, ДНК удалена с рисунка; В – аналогично Б, вид сверху. Адаптировано из [40].

## 1.1.3. Протеаза

Протеаза ВИЧ-1 разрезает полученный в результате репликации полипротеид Gag и Gag-Pol на отдельные белки, обеспечивая созревание вирулентного вириона [10; 42]. Протеаза представляет собой гомодимер, состоящий из двух субъединиц по 99 а.о. [43; 44] (Рисунок 4). Активный сайт сформирован двумя остатками аспарагина в 25 позиции (D25), по одному от каждой субъединицы [42]. Активный сайт прикрывает область лоскута, представляющего собой подвижный, глицин богатый β-слой. Эта область претерпевает конформационные изменения и закрывает активный сайт, когда в нем находится субстрат. Естественный субстрат протеазы имеет вытянутую конформацию с минимум 7 а.о., взаимодействующими с ферментом [45].



Рисунок 4 – Структура протеазы ВИЧ-1 в открытой (бордовый) и закрытой (зеленый) конформации. Остаток D25 активного сайта изображен стержнями (sticks). Пептидный ингибитор протеазы изображен в активном центре стержнями (серый). Адаптировано из [45].

### 1.2. Антиретровирусная терапия

Эпоха антиретровирусной терапии (APT) началась в 1987 г. с препарата Зидовудин (Zidovudine), также известного как азидотимидин (AZT) [46; 47]. На российском рынке был создан фосфазид (коммерческое название – никавир), более эффективный и менее токсичный, чем AZT [48]. Вскоре стали появляться и другие препараты данного класса, среди которых 2',3'-дидеоксиинозин (ddI) и 2',3'-дидеоксицитидин (ddC). По своей природе это нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ). Применение данных препаратов приводит к

снижению уровня вирусной нагрузки, замедляет развитие заболевания, тем самым увеличивая продолжительность жизни. Однако в качестве монотерапии они не приводят к длительной супрессии вирусной активности и восстановлению иммунологических функций вследствие быстрого появления лекарственно устойчивых форм вируса [49]. Проблема лекарственной устойчивости, решалась сменой используемого препарата или применением комбинированной терапии [15; 50]. Открытие в 1996 г. препаратов класса ингибиторов протеазы снизило остроту проблемы лекарственной устойчивости. В 2007 году был одобрен первый ингибитор переноса цепи интегразой – ралтегравир, что расширило панель возможных комбинаций АРТ [51]. Началась эра комплексной или высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) [52]. Лечение комбинацией как минимум трех препаратов двух классов (ингибиторов ОТ, ИН, ПР) привело к снижению уровня вирусной РНК ниже детектируемого, и, что очень важно, к восстановлению функциональности иммунной системы [49]. Монотерапия, основанная на одном классе антиретровирусных препаратов перестала использоваться с 1996 года [49], что привело к тому, что термины ВААРТ и АРТ стали взаимозаменяемыми [53]. Часть препаратов, используемых ранее, более не рекомендована к применению в составе АРТ, например, ddC. По состоянию на сентябрь 2022 г. FDA разрешило к применению 25 препаратов (без учета их комбинаций), принадлежащих к шести различным классам (Таблица 1). На территории РФ в составе АРТ применяется 25 препаратов (без учета их комбинаций; Таблица 1).

Таблица 1 – Различные классы антиретровирусных препаратов, одобренных к применению Food and drug administration (FDA) в США и рекомендованные к применению в составе АРТ на территории РФ (по стоянию на февраль 2023 года). НИОТ – нуклеозидный или нуклеотидный ингибитор обратной транскриптазы, ННИОТ – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, ИПЦИ – ингибитор переноса цепи интегразой, ИП – ингибитор протеазы. В скобках указаны применимые сокращения. \*не разрешены к применению на территории РФ. \*\*не одобрены FDA.

Класс препарата	Препараты
ССR5 антагонист	Маравирок (MVC)
Ингибитор слияния	Энфувиртид (ENF)*
НИОТ	Зидовудин (ZDV, AZT); ламивудин (3TC); абакавир (ABC); тенофовир (TDF); эмтрицитабин (FTC); ставудин (d4T)**; диданозин (ddI)**; тенофовира алафенамид (TAF)**; фосфазид (Ф- A3T)**
ННИОТ	Невирапин (NVP); эфавиренз (EFV); этравирин (ETR); рилпивирин (RPV); доравирин (DOR); элсульфавирин (ESV)**

ипци	Ралтегравир (RAL); каботегравир (CAB)*; долутегравир (DTG); биктегравир (BIC)*
ИП	Ритонавир (RTV); фосампренавир (fAPV); атазанавир (ATV); типранавир (TPV)*; даруновир (DRV); лопинавир (LPV); саквинавир (SQV)**
Ингибиторы прикрепления	Фостемсавир (FTR)*
Ингибитор проникновения	Ibalizumab-uiyk (Hu5A8, IBA, Ibalizumab, TMB-355, TNX-355)*
Энхансеры фармакокинетики	Кобицистат (COBI, c)

Основу АРТ составляют ингибиторы обратной транскриптазы. Они могут представлять собой аналог субстрата: нуклеозидные или нуклеотидные ингибиторы (НИОТ, NRTI) или ингибировать ее работу другим способом – ненуклеозидные ингибиторы (ННИОТ, NNRTI). У препаратов класса НИОТ отсутствует 3'-ОН группа, поэтому, присоединяясь к растущей комплементарной ДНК (кДНК) цепи, они блокируют процесс обратной транскрипции. Для активации данных препаратов они должны быть фосфорилированы клеточными киназами, активность которых зависит от типа клетки, что позволяет достигать различного эффекта для разных клеточных популяций и избегать излишней токсичности. Препараты класса ННИОТ – это вещества различной химической природы, которые воздействуют на обратную транскриптазу в месте, отличном от сайта связывания нуклеотидов. Это воздействие приводит к конформационным изменениям фермента, приводящим к неспособности связать субстрат [10]. Ингибиторы обратной транскриптазы дополняют ингибиторами протеазы или интегразы. Ингибиторы протеазы (ИП, PI) блокируют разрезание Gag-Pol, конкурентно связываясь с протеолитическим сайтом протезы [45]. Большинство ИП являются псевдопептидами и основаны на изостерах гидроксиэтилена и гидроксиэтиламина. Их центральная гидроксильная группа имитирует переходное состояние стадии гидролиза, связываясь с каталитическими остатками аспарагиновой кислоты [45; 54]. Ингибиторы переноса цепи интегразой (ИПЦИ, INSTI) блокируют интеграцию вирусной ДНК в геном клетки [55].

## 1.3. Мутации лекарственной устойчивости

Мутации лекарственной устойчивости (ЛУ) принято делить на первичные и вторичные. Первичные непосредственно вызывают снижение чувствительности вируса к АРТ, но при этом, как правило, ухудшают и его репликативную способность. Вторичные мутации ЛУ восстанавливают репликативную способность вируса, имеющего первичные мутации. Сами по себе вторичные мутации не обеспечивают полной ЛУ, но могут снижать эффективность терапии. В 2005 году для территории Российской Федерации было характерно единичное присутствие первичных мутаций в первичной вирусной популяции (у инфицированных людей, не принимавших препараты APT) с частотой не более 1%, при этом зачастую выявлялись не первичные, а вторичные мутации, являющиеся естественными полиморфизмами вируса [6]. В 2022 году частота первичных мутаций ЛУ на территории РФ увеличилась до 5,4% [7].

В целом, с началом применения ВААРТ частота возникновение мутаций ЛУ снизилось в сравнении с частотой при АРТ монотерапии. Это связано с двумя основными причинами. Вопервых, ввиду низкая представленность в первичной популяции вариантов вируса с множественными мутациями ЛУ, вероятность первичного заражения таким вирусом очень низка. Во-вторых, комбинированная терапия включает препараты с высоким генетическим барьером (требующие множественных мутаций для резистентности), такие как новые ингибиторы переноса цепи интегразой (ИПЦИ), или мутации имеют высокую конформационную стоимость [56]. Согласно рекомендациям ВОЗ и клиническим рекомендациям РФ, применение АРТ начинается вне зависимости от стадии болезни и ее клинических проявлений, а также для профилактики контактного и вертикального путей передачи вируса [53]. Кроме того, в Росии не проводят генотипирование ВИЧ-1 и выявление мутаций ЛУ до начала АРТ [57; 58] Широкое распространение АРТ приводит к возрастанию встречаемости мутаций ЛУ в популяции [13]. За последние 10 лет общая частота встречаемости мутаций ЛУ в популяции ВИЧ(+) людей на территории РФ более чем удвоилась [9], при этом частота выявления мутаций у людей, никогда не получавщих АРТ, также увеличивается, хоть и остается сравнительно низкой [9; 13]. Так, в период 2006–2011 гг. частота выявления заражения лекарственно устойчивым вариантом вируса составила 3,7%, а в период 2012–2017 гг. – уже 5,5% от общего числа случаев инфицирования [13]. Распространение ЛУ форм ВИЧ-1 также возрастает в связи с неудовлетворительной приверженностью АРТ среди определенных групп населения [59].

Большинство мутаций являются мутациями ЛУ к ингибиторам RT [9; 13; 60]. Превалирующими мутациями ЛУ к препаратам ННИОТ являются K103N и G190A/S, определяющие резистентность высокого уровня к NVP и EFV [9; 13]. При этом замена 190A свойственна для субтипов ВИЧ-1 кроме A, а 190S характерна для субтипа A6 [61; 62]. Распространение мутации 190A на территории РФ связано с циркуляцией субтипов B, G и рекомбинантных форм. Среди выявленых мутаций к препаратам класса НИОТ доминирующей является мутация M184V/I, следующая по распространенности – K101E [9; 13]. Из 99 а.о. протеазы в 45 позициях были детектированы мутации ЛУ [63], из них только 11 а.о. расположены в активном сайте фермента, т.е. являются первичными мутациями ЛУ [63]. Большинство вторичных мутаций локализованы в области лоскута, прикрывающего активный сайт (а.о. 39–57) [64]. Данная область является регулятором связывания субстрата [65], мутации в этой области ограничивают доступность активного центра фермента [45]. Наиболее распространенной на территории РФ является мутация M46I/L [9; 13] которая снижает чувствительность ко всем ИП, кроме DRV. Так же выявляются мутации L89T [9], V82A, ассоциированная с ЛУ среднего уровня, и I85V [13], имеющей незначительное влияние на чувствительность к ИП. Сниженная частота возникновения мутаций ЛУ к ИП в сравнении с ингибиторами RT может быть связана как с высоким генетическим барьером этих мутаций, так и с более редким применением ИП в составе АРТ [9].

Мутации ЛУ к ИПЦИ редко встречаются у людей, никогда не принимавших АРТ, как в мире [66; 67], так и на территории РФ, что связано с относительно недавним включением ИПЦИ в состав АРТ [7; 62; 68; 69]. Среди мутаций, возникающих на фоне АРТ, выявляют 29, характерных для интеграз различных субтипов ВИЧ-1, но не связанных с полиморфизами: H51Y, T66A/I/K, V75I, E92G/Q, Q95K, H114Y, G118R, F121Y, E138A/K/T, G140A/C/S, Y143C/H/R/S, Q146R, S147G, Q148H/K/R, N155H, S230R и R263K, распространенность которых варьирует в зависимости от распространенности субтипа ВИЧ-1 [66]. Для субтипа А6 на территории РФ были выявлены мутации T6TK, G140A, Q148R и N155H [62]. При этом мутации Q148H/K/R и N155H связаны со снижением чувствительности к целому ряду препаратов класса ИПЦИ [66].

Распространение мутаций ЛУ в популяции приводит к удорожанию терапии, уменьшению доступных комбинаций терапии и последующим летальным исходам ВИЧ-инфекции [70].

## 1.4. Вакцины против ВИЧ-1

Несмотря на десятилетия испытаний профилактических вакцин против ВИЧ-инфекции, к концу 2022 года только 7 клинических испытаний дошли до фазы 2b и 3 [71]. Максимальная эффективность в защите от ВИЧ-инфекции, 31,2% после трех лет наблюдения, была получена в испытаниях RV144 вакцины. RV144 включала прайм вакцинным компонентом на основе вирусного вектора ALVAC-HIV [vCP1521], кодирующего белки ВИЧ-1 Env, Gag и PR, и две бустерные иммунизации рекомбинантной субъединичной вакциной на основе белка 120 (AIDSVAX B/E) [72]. Клинические исследования данной вакцины и вклада ее отдельных компонентов в иммунный ответ против ВИЧ-1 продолжаются до сих пор [73].

В последнее время большое внимание уделяется комбинации профилактических ВИЧ-1 вакцин и доконтактной профилактики APT в рамках программы PrEPVacc. В клинических испытаний по этой программы исследуют две комбинации вакцин и режимов иммунизации ДНК/AIDSVAX (недели 0, 4, 24, 48) и ДНК/CN54gp140 (недели 0, 4) + MVA/CN54gp140 (недели 24, 48), а также два варианта ежедневной доконтактной APT TAF/FTC (недели 0–26) и TDF/FTC (недели 0–26) [74]. Аналогично построен другой масштабный проект по испытаниям терапевтических вакцин - European HIV Vaccine Alliance Therapeutic Trial 02 (EHVA T02). В рамках этого проекта на когорте ВИЧ-инфицированных людей исследуют Vedolizumab с и без применения вакцины на основе MVA - ANRS MVA HIV-B, кодирующей белки Gag, Pol и Nef BИЧ-1 субтипа B [75].

Индуцируемый в ходе абсолютного большинства клинических испытаний ВИЧ-1 специфический иммунный ответ не был способен предотвратить ВИЧ-1 инфекцию. Это связано, в частности, с конформационной подвижностью белка Env как в виде мономера, так и в виде тримера. Основные эпитопы для вирус нейтрализующих антител представлены в закрытой конформации белка перед слиянием, тогда как антитела, нацеленные на области, экспонированные в открытой конформации, индуцированной связыванием с CD4, имеют низкую нейтрализующую активность или не нейтрализуют вообще и в силу этого не эффективны для предотвращения инфекции [71]. Дизайн вакцины на основе структуры антигена позволяет стабилизировать вирусный белок слияния первого типа в закрытой конформации, что важно для индукции нейтрализующих антител широкого спектра. Этот подход, показавший свою эффективность при создании вакцины против COVID-19 [76], интенсивно используется для разработки новых вакцин против ВИЧ-1. С использованием растворимых тримеров белка Env стабилизированных в закрытой конформации созданы вакцины BG505 SOSIP.664 gp140 и BG505 SOSIP.GT1.1 gp140, ([77; 78] соответственно). Вакцина Trimer 4571 (BG505 DS-SOSIP.664) уже показала свою безопасность в испытании на здоровых людях [71] и на данных момент проходит испытания на ВИЧ-инфицированных людях [79]. Вакцина Trimer 4571 также используется в качестве бустерной в I фазе испытаний вакцин против ВИЧ-1 на основе аденовирусных векторов [80].

Пандемия COVID-19 показала преимущества и открыла дорогу для масштабного применения вакцин на основе нуклеиновых кислот и аденовирусных векторов. Подобные вакцинные платформы и ранее использовались для создания вакцинных кандидатов, однако вопрос об их безопасности оставался открытым. Массовая вакцинация мРНК вакцинами против COVID-19 [81] и вакцинами на основе аденовирусных векторов [82–84] доказала их безопасность. На сегодняшний момент проводятся серии клинических испытаний вакцин против

ВИЧ-1 на основе мРНК, в частности кодирующие тримеры BG505 MD39.3, BG505 MD39.3 gp151, и BG505 MD39.3 gp151 CD4KO HIV [85] и ряда других [86; 87], ДНК вакцин с гетерологичной (белковой) бустерной иммунизацией [88; 89] и вакцины на основе аденовирусных, поксвирусных и цитомегаловирусных векторов [90–92].

Так как АРТ не позволяет полностью подавить репликацию вируса, а также может быть прервана из-за появления ЛУ или развития побочных эффектов, важной исследовательской задачей является терапевтическая вакцинация ВИЧ(+) людей, направленная на иммунное подавление виремии и предотвращение появления и распространения вариантов вируса с мутациями ЛУ. Ранее в качестве терапевтической вакцинации для поддержки иммунного ответа на ВИЧ-1, снижающегося при эффективной АРТ, пытались использовать структурнопрерываемую АРТ, однако эти исследования были прекращены по соображениям безопасности [93]. Проведенные до настоящего момента испытания ряда терапевтических вакцин в различных группах ВИЧ(+) лиц однозначных результатов не дали. Так, ДНК-вакцинация вакциной GTU®multi-HIVB не приводила к усилению предсуществующего иммунного ответа [94]. Применение ДНК-вакцины, кодирующей Gag, Pol и Nef субтипа В и Env субтипов A, B и C, с бустерной иммунизацией вакциной на основе репликативно-дефектного аденовируса 5 типа, кодирующего все вирусные антигены, кроме Nef [95], и ДНК VRC-HVDNA 009-00-VP [96] не привело к снижению уровня латентной инфекции спящих CD4 (+) клеток и вирусной нагрузки в плазме. Однако, при исследовании ДНК-вакцин, кодирующих Env/Rev и Gag/Pol белки было показано, что вакцинация этими препаратами снижает уровень виремии в сравнении с уровнем в плацебо группе [97]. Среди терапевтических вакцин на сегодняшний момент испытаваются вакцины на основе аденовирусных и поксвирусных векторных платформ [98–100]. Как было суммировано в обзорной статье [101], ни одна из исследуемых на настоящий момент терапевтических вакцин не нацелена на мутации ЛУ, несмотря на значимые изменения в Т клеточных эпитопах, связанных с мутациями ЛУ и их специфическое разпознавание иммунной системой пациентов [102–104].

Относительно малое число профилактических и терапевтических ВИЧ-1 вакцин, прошедших на поздние стадии клинических испытаний и их низкая эффективность в этих испытаниях связана с отсутствием удобных моделей для доклинических испытаний эффективности вакцинных кандидатов на мелких лабораторных животных, в частности, мышах, что препятствует быстрому и экономичному отбору потенциально эффективных вакцинных кандидатов. Это связано с тем, что ВИЧ-1 является ярким примером антропонозного заболевания и не может инфицировать лабораторных животных. В то же время, как для ВИЧ-1, так и для других антропонозных заболеваний разрабатываются «суррогатные» модели для тестирования эффективности противовирусных вакцин и препаратов.

### 1.5. Модели для тестирования вакцин

Лабораторная мышь (*Mus musculus*) является хорошо изученной моделью для изучения процессов, связанных с вирусной инфекцией и противовирусным иммунитетом. Основными преимуществами этих лабораторных животных является их малый размер, короткая продолжительность жизни, и легкость разведения. Их иммунная система, физиология и молекулярно-биологические процессы сходны с аналогичными процессами человека, а полностью секвенированный геном упрощает генетические манипуляции. Все это делает лабораторных мышей прекрасными моделями для доклинических испытаний вакцин, в том числе против патогенных вирусов человека [105]. Ниже будут рассмотрены различные базы для создания таких моделей.

### 1.5.1. Модели на основе вирусов мышей, близких патогенным вирусам человека

В исследованиях эффективности вакцин против патогенных вирусов человека могут быть использованы модели на основе вирусов грызунов, близких к патогенным вирусам человека. Такие модели уже использовали для изучения механизма вирус-индуцированного канцерогенеза, в частности, мышиного вируса папилломы 1 типа [106–108] и γ-герпесвируса мышей 68 типа [109; 110]. Вирус мышей, схожий с патогенным вирусом человека, может быть использован для создания химерных вирусов. Так, для моделирования ВИЧ-1 инфекции на мышах был создан химерный псевдовирус на основе вируса ВИЧ-1 и вируса лейкемии мышей (MuLV), позднее успешно использованный в доклинических испытаниях вакцин против ВИЧ-1 [111]. Однако, такие вирусы воспрозводят только один цикл размножения вируса, не позволяя моделировать хроническую инфекцию с постоянным синтезом клетками антигенов ВИЧ-1.

# 1.5.2. Модели на основе трансгенных мышей, моделирующих или симулирующих вирусную инфекцию

Принципиально возможны модели, использующие трансгенных мышей, экспрессирующих экзогенные факторы (рецепторы и внутриклеточные ко-факторы), необходимые для вирусной инфекции, однако их использование до сих пор весьма органичено. Такие модели применялись для оценки эффективности вакцин, разрабатываемых против SARS-CoV-2. Используемые трансгенные мыши экспрессировали рецептор вируса – ангиотензин I превращающий фермент под контролем промотора цитокератина 18 типа [112; 113]. К сожалению, для большинства вирусов специфичность к клеткам человека определяется не только

рецептором (рецепторами), но и целым набором клеточных факторов, обеспечивающих вирусную репликацию [111; 114]. Для некоторых вирусов, как, например, вируса гепатита С (ВГС), полная панель клеточных этих факторов еще не определена [115; 116], что является препятствием для систематического использования моделей такого типа.

Для изучения патогенеза гепатотропных вирусов применяют трансгенных мышей, экспрессирующих целый вирусный геном или отдельные вирусные гены [117–119], что позволяет «симулировать» вирусную инфекцию. Такие модели характеризуют высоким уровнем конститутивной экспрессией экзогенного гена во всех клетках организма [117; 120]. Использование этих моделей было впервые применено для гепатотропных вирусов в связи с возможностью использовать конструировании генно-инженерных конструктов при гепатоспецифичные промоторы и сделать экспрессию вирусных генов органоспецифичной [119]. Для ВИЧ-1 аналогично были созданы трансгенные мыши, экспрессирующие полный геном ВИЧ-1 [111; 121; 122] или отдельные гены [123; 124]. Такие модели позволяют изучать патогенез вирусной инфекции, однако отсутствие рецепторов и клеточных ко-факторов не позволяет полноценно воспроизвести вирусную инфекцию. Также в этих моделях невозможна элиминация вируса, что не позволяют использовать их для тестирования профилактических вакцин и противовирусных препаратов.

### 1.5.3. Модели на основе ксенографтов в иммуносупрессированых мышах

Широко используемым является подход с использованием ксенографтов тканей и клеток человека. Такие модели использовали для изучения вирус-ассоциированного канцерогенеза при инфекции ВЭБ [125–128]. Ксенографты могут состоять как из опухолевых [129–131], так и из нормальных тканей [132], могут быть получены из тканей, зараженных вирусом [125; 129]. Альтерантивно, вирусную инфекцию тканей осуществляют непосредственно перед подсадкой ксенографтов мышам [126; 132]. Этот подход позволяет быстро получить большую панель для тестирования, и его часто применяют для тестирования противоопухолевых препаратов [131–133]. Чувствительность ксенографтов к противоопухолевым препаратам обычно совпадает с чувствительность ю исходной опухоли, в результате чего подобные «аватары» применяют в том числе для создания персонализированной противоопухолевой терапии [133]. Основным недостатком этой группы моделей является иммунокопрометированный статус используемых мышей, что не позволяет использовать эту модель для оценки параметров иммунного ответа и эффективности вакцинации. Кроме того, в таких моделях возможна непроизвольная элиминация вируса. Так, для ксенографтов ВГС(+) гепатоцеллюлярной карциномы было показано, что со временем РНК ВГС становится недетсктируемой [131].

Одним из вариантов моделей на основе ксенографтов являются модели с использованием клеточных линий, зараженных вирусом перед имплантацией. Так, на основе гепатоцитов человека, адаптированных к мышам, была получена целая панель ксенографтов, кодирующих геномную или субгеномные РНК ВГС и репортерные гены люциферазы или GFP [134; 135]. При подкожной имплантации таких ксенографтов scid мышам они формировали опухоли и метастазировали в печень. Как в опухолях, так и в метастазах детектировали репликацию ВГС. Аналогичную модель получили и с использованием клеток гепатомы Huh7 [136]. К сожалению обе модели не позволяют оценивать эффективность вакцин связи в c иммуннокомпрометированным статусом мышей.

Особым вариантом таких моделей являются иммунодефицитные мыши с трансплантированными элементами иммунной системы человека. Такие модели наилучшим образом подходят для изучения лимфотропных вирусов человека, в том числе ВИЧ-1, так как позволяют изучать механизмы патогенеза и инфекции [137–141], моделировать заражение [142; 143] и тестировать эффективность противовирусных препаратов [110; 142; 143]. Тем не менее, данные модели не нашли широкого применения для оценки эффективности противовирусных вакцин, ввиду их высокой стоимости.

### 1.5.4. Модели на основе аллографтов в иммунокомпетентных мышах

Аналогичные модели, но на основе клеточных линий мышиной природы, позволяют использовать иммунокомпетентных животных. Трансформированные клетки имплантируют сингенным мышам, обладающих идентичным генетическим фоном, где они формируют алографты. Сингенные клеточные линии могут быть получены как из опухолей, так и быть искусственно трансформированны in vitro. Полученные клеточные линии можно дополнительно модифицировать для экспрессии одного или нескольких вирусных антигенов. Модели такого типа обладают рядом преимуществ. В частности, опухолевые клетки легко поддерживать в культуре и при необходимости получить большое количество клеток для имплантации. Формируемые при имплантации опухоли обладают стандартной, охарактеризованной скоростью роста, и предсказуемо влияют на выживаемость мышей. При низкой приживаемости сингенных клеток их все равно можно использовать для оценки эффективности иммунного ответа, опосредованного ЦТЛ *in vitro*, как это было сделано для испытания вакцин против вируса Эбола [144]. К недостаткам данного типа моделей можно отнести генетическое однообразие имплантируемых клеток, что сказывается на тестировании противоопухолевых препаратов (так как спонтанно-образованная опухоль представляет собой генетически разнородную группу клеток), но не существенно для тестирования противовирусных вакцин [145].

Модели для тестирования противовирусных вакцин на основе клеточных линий мышей, продуцирующих вирусные антигены, были разработаны для целого ряда вирусов. Ниже рассмотрено их применение для испытания вакцин против ВГС, вируса гепатита В, вируса папилломы человека, вируса Эпштейна-Барр и полиомивируса клеток Меркеля.

### Вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР)

Наиболее широко применяемой и хорошо описанной является модель на основе клеточной линии TC-1, полученной из первичных клеток эпителия, иммортализованных коэкспрессией *E6* и *E7* ВПЧ-16 и *RAS*. Клеточную линию TC-1 и ее производную, экспрессирующую репортерный ген люциферазы светлячка (*luc2*), используют для оценки эффективности вакцин против ВПЧ(+) опухолей при интравагинальном [146; 147], подкожном [148–152], внутривенном [153] введении, имплантации в ротовую полость [154] и других путях имплантации [155].

Модель на основе клеток C3/C3-luc, полученных путем трансфекции эмбриональных клеток мыши плазмидой, кодирующей полноразмерный геном ВПЧ-16 и *RAS*, была использована для оценки вакцинации против ВПЧ. В сравнении с моделью на основе клеток TC-1 опухоли, формируемые данными клетками, обладают сниженной кинетикой роста и меньшей агрессивностью [156–158]. Путем трансформации отдельными онкогенами *E6* и *E7* в сочетании с *RAS* были получены также модели на основе клеток эпителия гланд [159–161] и плоскоклеточного рака ротовой полости [162].

Вакцины, показавшие свою эффективность в доклинических испытаниях с использованием опухолевой модели TC-1, продуцирующей вирусный антиген, находятся на поздних стадиях клинических испытаний на людях [163].

### Вирус Эпштейна-Барр

Аналогично моделям ВПЧ ВКР была получена модель для тестирования вакцин против ВЭБ. Клетки TC-1, продуцирующие латентный мембранный белок 1 (LMP1) и люциферазу, были использованы в доклинических исследованиях кандидатных вакцин против ВЭБ [164]. Клетки рака толстой кишки мыши CT-26, продуцирующие LMP1 [165] или BARF1 [166], были использованы для оценки ДНК-иммунизации в качестве подхода к терапии ВЭБ-индуцированных опухолей. Также были созданы модели на основе клеток спонтанной аденокарциномы молочной железы S6C, продуцирующие панель антигенов ВЭБ [167].

# <u>Вирус гепатита С</u>

Панель субклонов, продуцирующих различные неструктурные белки ВГС, была создана на базе клеток миеломы SP2-0. Одной из первых, в 1998 году была получена линия SP2/19, которая продуцирует белок кора ВГС. Эта линия была неоднократно использована для исследований эффективности вакцин [168; 169]. Также были созданы субклоны, продуцирующие неструктурные белки NS3 и NS5 [170], NS3/NS4a [171; 172], NS3/NS4a в сочетании с NS5 [170; 173]. Кроме того, были созданы модели на основе линии лимфомы EL-4, продуцирующих NS3/NS4a [172], и клеток гепатомы Нер-53.4 продуцирующих неструктурные белки ВГС [174].

## <u>Вирус гепатита В</u>

Группой Weu Y. с коллегами была получена клеточная линия Hepa1-6 на основе клеток гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) мышей C57BL/6, стабильно продуцирующая HBx белок ВГВ. Эти клетки использовали были использованы для оценки эффективности иммунизации аденовирусной вакциной, кодирующей *HBx* [175].

### <u>Полиомавирус клеток Меркеля (МСРуV)</u>

Полиомавирус клеток Меркеля (МСРуV) вызывает развитие карциномы Меркеля – редкого и агрессивного вида рака кожи, распространенного в основном среди пожилых и иммунокомпрометированных людей [176; 177]. Производная клеточной линии B16-F10, экспрессирующая малый *t-ag* MCPyV, была использована для оценки эффективности ДНК вакцины [178].

# 1.6. Принципы конструирования моделей с использованием клеточных линий мышиной природы

1.6.1. Выбор клеток «носителей» вирусного белка

## Первичные клетки, трансформированные при помощи вирусных белков

Первичные клетки могут быть трансформированы *in vivo*, как это было сделано в работе Jin-liang Peng и др. [179]. Для тестирования эффективности ДНК-иммунизации против вируса гепатита В (ВГВ), с последующей электропорацией, методом гидродинамической трансфекции были *in vivo* трансфицированы первичные клетки печени. В полученных клетках детектировали гиперпродукцию HBsAg. [179]. В работе Ya-Hui Huang с соавторами было описано создание иммунокомпетентной модели инфекции ВГВ на мышах [180]. Для этого клетки печени трансдуцировали геномом ВГВ с использованием аденоассоциированного вирусного вектора. Через 12–16 месяцев у всех трансдуцированных мышей в печени сформировались опухоли,

схожие с ГЦК. Позднее такая модель была использована для оценки эффективности вакцинации против ВГВ [181]. Аналогично, группа под руководством Weiner D.B. провела трансфекцию клеток печени *in vivo* плазмидой, кодирующей неструктурные белки ВГС, для оценки функционального иммунного ответа при ДНК-иммунизации плазмидой, кодирующей аналогичный антиген [182; 183]. Полученные результаты по элиминации гепатоцитов, продуцирующих неструктурные белки ВГС, позволили дойти до ранней стадии клинических испытаний данной ДНК-вакцины [184; 185].

Намного чаще первичные клетки трансформируют вирусными белками *in vitro*, как, например, было сделано в случае клеток TC-1 и белков ВПЧ ВКП, описанных выше.

### Опухолевые клеточные линии, в которые вводят вирусные гены

Модификация клеток вирусными генами не всегда ассоциирована с трансформацией клеток, для создания аналогичных моделей можно использовать и существующие опухолевые клеточные линии. Так, по аналогии с клетками TC-1 была создана модель для тестирования вакцин против ВПЧ-ассоциированных опухолей на основе клеточной линии AT-84. AT-84 была получена из плоскоклеточной карциномы мышей линии C3H. Производные этой линии, экспрессирующие *E7* ВПЧ-16 и *E7* в сочетании с *luc2* (AT-84\_E7 и AT-84\_E7-Luc соответственно), при имплантации в ротовую полость сингенным мышам формировали опухоли и метастазировали сходно с естественно возникающими ВПЧ-индуцированными опухолями [162]. Позднее эту линию использовали для оценки эффективности терапевтической вакцинации против нацеленной на белок E7 ВПЧ-16 [162].

Другой часто используемой линией в данном контексте является высокоагрессивная и метастазирующая линия B16-F10, полученная из клеток меланомы мышей C57BL/6 [186]. Данная клеточная линия чаще всего используется для тестирования противоопухолевых препаратов [187; 188], но также может быть модифицирована для экспрессии вирусных генов, и использована для оценки эффективности терапии, нацеленной на этот вирусный антиген [189].

Используемая в данной работе линия 4T1 является одной из наиболее часто используемой моделью опухоли молочной железы. Данная клеточная линия была получена из опухоли молочной железы мышей BALB/с и обладает высоким уровенем приживаемости и метастатическим потенциалом при ортотопическом введении. Опухолевая прогрессия и метастазирование при имплантации данных клеток сходны с таковыми при раке молочной железы человека, благодаря чему линию 4T1 часто используют в доклинических испытания противоопухолевых препаратов [190–194].

# 1.6.2. Выбор вирусного антигена

При создании профилактических вакцин основным вирусным антигеном выступает поверхностный белок вируса, а иммунный ответ, специфичный к этому антигену, служит коррелятом протекции. Однако из-за высокой иммуногенности поверхностных вирусных белков их редко используют при создании клеточных линий для оценки эффективности иммунного ответа. Так, мышиные фибробласты, экспрессирующие gp120/gp160 ВИЧ-1 IIIB при введении сингенным мышам без иммунизации вызывают формирование антител, специфичных к gp120, и клеточного ЦТЛ-опосредованного иммунного ответа [195]. Такая «фоновая» иммуногенность не позволяет оценить эффективность иммунного ответа, вызванного вакциной, а также может привести к отторжению опухолевых клеток, продуцирующих поверхностные вирусные белки.

При создании терапевтических вакцин для хронических вирусных инфекций и вирусассоциированных опухолей основной мишенью для создания вакцин часто служат регуляторные вирусные белки, такие как Еб и Е7 белки ВПЧ ВКР [162], НВх белок ВГВ [175], неструктурные белки ВГС [174] и другие. Стоит отметить, что большинство этих белков являются вирусными онкогенами, что может изменить исходные характеристики клеточных линий. Так, было показано, что HBх и HbsAg, одни или в сочетании с клеточными генами, способствуют развитию ГЦК по механизму, опосредованному АФК и нарушением экспрессии клеточных генов [119; 196]. Белки EBNA1 и EBNA3C ВЭБ способствуют росту опухолевых клеток *in vivo*, хотя поздние стадии роста опухоли не зависят от уровня их продукции [197]. Белок LMP1 ВЭБ связан с трансформацией В клеток и способен трансформировать фибробласты *in vitro* [198–200]. Белок, кодируемый ОРФ BILF1 ВЭБ, тоже ассоциирован с новообразованиями и способен индуцировать рост опухоли в 90% nude мышей [201]. При длительной продукции клетками белок кора ВГС способен трансформировать клетки [202]. Эту особенность регуляторных вирусных белков необходимо учитывать.

### 1.6.3. Выбор уровня продукции вирусного антигена

Уровень продукции регуляторных вирусных белков при естественной инфекции относительно низкий, в сравнении с белками капсида и оболочки. Высокий уровень продукции вирусного белка клеточными линиями может негативно сказаться на предсказательных свойствах используемой модели. В частности, продукция экзогенного белка может вызвать индукцию иммунного ответа против экспрессируемого антигена [195], приводящую к отторжению опухолевых клеток [203]. Также в работе [162] авторы отметили, что высокий уровень продукции Е6 и Е7 в модели на основе TC-1 в сравнении с естественно инфицированными клетками

приводит к высокому уровню ложноположительных результатов доклинических испытаний вакцин, нацеленных против этих антигенов. Кроме того, стоит принимать во внимание и влияние, оказываемое данными белками на продуцирующие клетки. Продукция экзогенного белка может вызвать иммуносупрессию [204]. При этом уровень иммуносуппрессии будет коррелировать с уровнем продукции вирусного антигена пропорциональным повышением туморогенности клеток [205], хотя для некоторых белков, как, например, для НВх белка ВГВ, такой корреляции обнаружено не было [196]. Исходя из представленных данных, уровень продукции вирусного белка из представленных данных, уровень продукции вирусного белка может обнаружено не было [196]. Исходя из представленных данных, уровень продукции вирусного белка «мишени» необходимо подбирать индивидуально.

### 1.6.4. Роль молекулярных ко-факторов и их использование

При использовании моделей, на основе первичных клеток, трансформированных с использованием вирусных антигенов, следует учитывать, что для опухолевой трансформации клеток может быть недостаточно продукции только вирусных антигенов. Было показано, что продукция большого T-антигена SV-40 может только продлить жизнь клеток в культуре, но не иммортализовать их. Для иммортализации необходима ко-экспрессия *hTERT* [206]. Для *E6* и *E7* ВПЧ ВКР для трансформации экспрессирующих клеток необходима кооперация с геном *ras* [207; 208]. Для белка HBx ВГВ литературные данные неоднозначны. Многие исследования показывают, что экспрессия HBx сама по себе способна трансформировать клетки [209–212], в тоже время данные, полученные *in vitro*, указывают на то, что для трансформации необходима кооперация с другими событиями [196].

#### 1.6.5. Выбор участка присадки (имплантации) клеток

В 1954 году группа исследователей поставила эксперимент, целью которого было определить зависимость метастазирования и уровня смертности для различных опухолей от места имплантации и количества сайтов имплантации при одинаковой суммарной дозе имплантированных клеток. Они выяснили, что в случае лейкемии уровень смертности животных не зависел от выбора сайта имплантации, однако для солидных опухолей интракавитальная имплантация приводила к ранней смертности животных. Кроме того, было отмечено, что имплантация клеток во множество сайтов приводила к увеличению количества формируемых метастаз и ранней смертности животных [213].

Важным является не только количество сайтов имплантации, но и природа этих сайтов. Полученные клетки могут быть имплантированы ортотопически, то есть в тот же орган, из которого были получены имплантируемые клетки, или эктотопически, то есть в другой орган, в

том числе системно (при внутривенном введении). Различные сайты имплантации клеток обладают различными характеристиками, что может сказаться на итоговых характеристиках модели.

Исследования последних лет показывают, что результаты, полученные на опухолях, имплантированных ортотопически, имеют большую предсказательную способность при исследовании противоопухолевых препаратов [214-217]. В этих исследованиях также отмечалось, что только при ортотопическом введении метастазирование схоже с таковым при естественном росте опухоли. Важно также отметить, что для моделирования особенностей опухолей важно воссоздать ее микроокружение [214] и «ландшафт» генетической экспресии Перечисленные параметры чрезвычайно важны при [217]. моделировании вирусассоциированного канцерогенеза, однако они уходят на второй план при использовании моделей на основе опухолевых клеток для доклинических испытаний противовирусных вакцин. При таком сценарии эктотопическое введение обладает рядом преимуществ. Так, клетки ТС-1, широко используемые для тестирования противоопухолевых вакцин, направленных на онкогены ВПЧ, были получены из эпителия легкого, но имплантируются интравагинально, чтобы смоделировать естественную инфекцию ВПЧ [158]. Выбор сайта имплантации также зависит от предполагаемого способа мониторинга роста опухоли. При интравагинальной имплантации клеток ТС-1 требуется не менее 25000 клеток/сайт имплантации для корректного мониторинга роста опухоли в связи с толстой жировой прослойкой в этой области [218]. Рост опухолей, имплантированных подкожно, варьирует сильнее, в сравнении с таковым при ортотопной имплантации, однако его легко мониторировать с использованием пальпируемого объема и сигнала от репортерных белков, в том числе при подсадке малого количества опухолевых клеток [217].

Сайт имплантации также важен с точки зрения последующей вакцинации. В зависимости от используемого способа вакцинации тот или иной сайт имплантации клеток может быть предпочтительней. Накопленные данные показывают, что для контроля над мукозальной инфекцией и ростом опухоли индукции системного иммунного ответа может быть недостаточно и необходима индукция локального иммунного ответа [219]. Исходя из этого многие недавние исследования сосредоточены на активации резидентных Т клеток в аногенитальной слизистой и слизистой носоглотки. Эффективность таких вакцин наилучшим образом может быть оценена *in vivo* с помощью моделей на основе ортотопно имплантированных клеток, например, ВПЧ(+) опухолевых клеток, имплантированных в слизистый эпителий [219].

### 1.7. Параметры оценки результатов имплантации опухолевых клеток

# 1.7.1. Формирование опухоли

Результатом имплантации опухолевых клетов наивным животным и животным, не защищенным иммунизацией, является образование опухоли. Формирование опухоли может быть оценено постфактум путем измерения ее веса и/или объема. Для опухолей, сформированных подкожно, кинетика роста может быть оценена путем морфометрических измерений. Дополнительная экспрессия опухолевыми клетками генов, кодирующих репортерные белки, позволяет мониторировать кинетику роста опухоли, приживаемость и другие параметры с помощью мониторинга сигнала репортерного белка *in vivo*. Наиболее часто используемым для этого репортерным геном является ген люциферазы светлячка или ген люциферазы морских кнедарий *Renilla reniformis*. Подкожное введение их субстратов, D-люциферина или коэлентеразина, соответственно, приводит к формированию устойчивого люминесцентного сигнала, который может быть зарегистрирован с помощью системы *in vivo* визуализации. Для ферментативной реакции, катализируемой люциферазами, также необходимы кислород, магний  $(Mg^{2+})$  и АТФ, поэтому данная реакция возможна только в живых активно метаболизирующих клетках в присутствии достаточного количества кислорода [220].

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) также может быть использован как репортерный [193]. В следствие поглощения флуоресцетного сигнала тканями, он не позволяет отслеживать рост опухоли *in vivo*, но может быть использован позднее, как маркер опухолевых клеток при анализе методом проточной цитометрии [221], гистологическом анализе [222; 223] или при *ex vivo* анализе миграции опухолевых клеток в органы [224]. Кроме того, могут использоваться и другие репортерные белки, например, красный флуоресцентный белок [225], однако, стоит иметь ввиду, что флуоресцентные белки высоко иммуногенны и экспрессия их генов существенно снижает туморогенный и метастатический потенциал опухоли и может привести к ее спонтанному отторжению [226]. Люцифераза относительно низко иммуногенна, она вызывает слабый Т клеточный иммунный ответ, который не мешает образованию опухолей, хотя и приводит к некоторому снижению метастатического потенциала опухолевых клеток [227].

# 1.7.2. Характеристика опухоли

### <u>Кинетика роста опухоли</u>

В процессе опухолевого роста могут присутствовать как ускорение, так и замедление кинетики роста. Одним из предполагаемых механизмов замедления опухолевого роста является гипоксия и некроз, возникающие в результате слабой васкуляризации [228; 229]. Это приводит к тому, опухоль, сформированная при имплантации опухолевых клеток, резко замедляет свой рост, достигая примерно 1 см<sup>3</sup> [230].

### Архитектура опухоли

В естественно-возникающих опухолях опухолевые очаги могут быть окружены перитуморальной капсулой и разделены прослойками стромы. Клетки стромы могут быть привлечены из окружающих нормальных тканей или могут возникать в результате дифференциации мезенхимальных клеток, привлекаемых через кровеносные сосуды [231; 232]. Культивируемые долгое время *in vitro* опухолевые клетки часто претерпевают эпителиальномезенхимальный переход (ЕМТ) и приобретают маркеры фибробластов, такие как продукция gp38 и фибронектина. Опухоли, сформированные при имплантации таких клеток, никогда не формируют опухолевые очаги, окруженные клетками стромы, что связано со сходством клеток стромы и опухолевых клеток после ЕМТ. Подобные изменения в архитектуре опухоли приводят к снижению числа и разнообразия иммунных клеток, привлекаемых в опухоль, что сказывается на иммунном контроле за ростом опухоли [230].

Важной характеристикой архитектуры опухоли является ее васкуляризация. В отличие от естественных опухолей, при имплантации опухолевых клеток моментально начинается секреция проангиогенных факторов, способствующих росту опухоли васкуляризации. И ee Васкуляризация трансплантируемых опухолей начинается уже через 18 часов после имплантации [233]. При этом было показано, что недостаточное снабжение опухоли кровеносными сосудами приводит к развитию гипоксии и стресса эндоплазматического ретикулума, что в свою очередь способствует росту опухоли [234]. Для опухолей, продуцирующих люциферазу, гипоксия и области некроза могут приводить к снижению уровня эмиссии фотонов, мешая адекватному отслеживанию роста опухоли ПО сигналу биолюминесценции.

### <u>Метастазирование</u>

Метастатический потенциал может быть оценен путем «классического» гистопатологического исследования срезов органов или с помощью рентгеновского мониторинга

животных. Использование опухолевых клеток, продуцирующих репортерные белки, позволяет детектировать опухолевые клетки в крови с помощью анализа методом проточной цитометрии [221] или с использованием флуоресцентной микроскопии срезов органов [222; 223]. Эти анализы требуют сложного дорогостоящего лабораторного оборудования, что затрудняет масштабный скрининг. Кроме того, они высокоэффективны, когда известны основные органы мишени метастазирования для используемой модели. Если таких данных нет, то изучение метастатического потенциала требует большого объема гистологической работы. Чтобы этого избежать, можно использовать *ex vivo* анализ уровня биолюминесцентного или флуоресцентного сигнала от органов, как это было сделано на модели клеток, продуцирующих GFP [224]. В работах нашей лаборатории было показано, что этот метод может применяться и для детекции опухолевых клеток, продуцирующих люциферазу (Рисунок 5), а детектируемый биолюминесцентный коррелирует сигнал с числом метастаз, выявленных при гистопатологическом исследовании органов [203].



Рисунок 5 – Схема эксперимента по *ex vivo* детекции клеток, продуцирующих люциферазу, в дистальных органах мышей.

Таким образом, не смотря на успехи АРТ, ВИЧ-1 остается важной проблемой для мирового здравоохранения, а возрастающая частота первичных мутаций ЛУ снижает эффективность АРТ. За долгие годы интенсивных разработок профилактических вакцин против ВИЧ-1 лишь несколько кандидатных вакцин дошли до поздних стадий клинических испытаний, и только 1 из 7 таких испытаний показало защитный эффект, относительно низкой эффективности. Проводятся испытания терапевтических вакцин против ВИЧ-1, результаты их не однозначны. Также испытываются возможности сочетания терапевтической иммунизации с АРТ, их результаты еще не известны. На настоящий момент отсутствуют данные о клиничсеких испытаниях вакцин, нацеленых на мутации ЛУ ВИЧ-1. Одним из лимитирующих факторов при
разработке вакцин против ВИЧ-1 как профилактического, так и терапевтического характера, является отсутствие подходящей животной модели для ранних этапов доклинических исследований, которые бы позволили более эффективный масштабный отбор новых вакцинных кандидатов. Используемые на сегодняшний день гуманизированные мыши дороги и требуют специализированных условий содержания, а тестирование с их использованием вакцин, нацеленых на мутации лекарственной устойчивости, ограничевается пулом доступных вариантов вируса. В тоже время, для разработки вакцин против ряда других вирусов, таких как ВГС или ВПЧ ВКР, успешно используются мышиные модели на основе сингенных опухолевых линий, продуцирующих вирусный антиген. Целью данной работы является создание модели для испытания вакцин против ВИЧ-1 на мышах на основе сингенных клеточных линий, экспрессирующих ферменты ВИЧ-1 с мутациями и без мутаций лекарственной устойчивости. Для достижения этой цели было решено использовать клеточную линию опухолевого происхождения 4T11uc2, экспрессирующую ген люциферазы luc2, позволяющий мониторировать процесс роста опухоли и метастазирования in vivo. Использование люциферазы в качестве репортерного белка позволит легко детектировать малые количества раковых клеток in vivo и ex vivo независимо от их локализации, а также избежать снижения их туморогенного потенциала за счет иммунного ответа на репортерный белок. Подкожная имплантация клеточных линий облегчит мониторинг формирования опухолей. В качестве экспрессируемых генов «мишеней» ВИЧ-1 будут использованы RT, IN, PR, с первичными мутациями лекарственной устойчиости как основные мишени АРТ и потенциальные кандидаты вакцин против лекарственно устойчивого ВИЧ-1.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1. Реагенты

При проведении экспериментов были использованы реактивы отечественного производства: кислоты, спирты, неорганические соли, органические растворители – марки «осч» (особо чистые) или «хч» (химически чистые).

Также были использованы: FuGene6 (Promega, США), трипановый синий (Life Technologies, США), XenoLight D-люциферин K+ (Perkin Elmer, США), изофлуран (Baxter, США), гематоксилин (Vector, США), эозин (Vector, США), параформальдегид (Life Technologies, США).

## 2.1.1. Праймеры

Праймеры, использованные в работе суммированы в Таблица 2.

Таблица 2 – Праймеры, использованные в работе.

Ген	Названи	Праймер	Примен	нение
	e			
5'-участок	GAG-F	GAGCTAGAACGATTCGCAGTTA-	Da	
генома	GAG-R	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC	Дти	
провируса	GAG-P	(FAM)-	F	
		ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCA		
		GG-(BHQ1)	0	
бета-актин	HB2-F	TCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA	ние /са	
человека	HB2-R	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	ыру	
	HB2-P	(HEX)-	еде	ие ой
		CCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCA-	цп	сен) /сн
		(BHQ2)	OĔ	трж Иру
Лентивирус	PGKseq	GGTGTTCCGCATTCTGCAAG		тве [сд
	LVT-	GACAACGGGCCACAACTCC		од снт зан
	200R			
Ген Gapdh	D1	GCATCCTGCACCACCAACTG	Оценка	ı
мыши	R1	GAGCTTCCCGTTCAGCTCTG	экспрес	ссии
ген	RT-dir	CTGGAGCTTGCTGAGAATAGAG	гена	
ревертазы	RT-rev	CACTGGTCCTGTCCTTGTTT		
ВИЧ-1				
ген	IN-dir	CTGGAAGGCAAGGTCATCAT		
интегразы	IN-rev	GCCAGTTTGAGCAGGAAGTA		
ВИЧ-1				
ген протеазы	PR-dir	GGGAAGTGGAAACCCAAGAT		
ВИЧ-1	PR-rev	CTGGTCGTACTGTCTGACTTTG		

## 2.1.2. Белки и пептиды

В работе были использованы рекомбинантные белки RT\_A, IN\_a, IN\_r1, IN\_r2, IN\_in, IN\_in\_r1, IN\_in\_r2, PR\_A, PR\_A2mut, PR\_A3mut или RT\_B, IN и PR\_B ВИЧ-1 субтипа В штамма HXB2, полученные ранее в лаборатории [235; 236], а также пептиды, представленные в Таблица 3 (GL Biochem Ltd, Китай).

Иммуноген	Сокращение	Аминокислотные позиции	Аминокислотная последовательность
RT	RT145-168	145-168	OYNVLPOGWKGSPSIFOSSMTKIL
	RT528-543	528-543	KEKVYLAWVPAHKGIG
IN	IN169	169-196	AEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGGIGG
			YSA
	MIN169	169-190	AEHLKTAVQMAVFIHNFKRKGG
	IN209	209-239	QTKELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDPI
			WKGPA
	MIN219	219-238	KIQNFRVYYRDSRDPIWKGP
	MIN79	79-98	VASGYIEAEVIPAETGQETA
	MIN79r1	79-98	VASGYIEAEVIPAQTGQETA
PR	A1-15	1-15	QITLWQRPLVTVRI
	A31-56	31-56	TVLEDINLPGKWKPKMIGGIGGFIKV
	A31-56DR	31-56	TVLEDINLPGKWKPKIIGGIGGFVKV
	A56-70	56-70	VRQYDQILIEICGKK
	AB71-85	71-85	AIGTVLVGPTVNII
	AB71-85DR	71-85	AIGTVLVGPTANII
	AB75-84	75-84	VLVGPTVNI
	A76-90	76-90	LVGPTVNIIGRNM
	A76-90DR	76-90	LVGPTANIIGRNM

Таблица 3 – Пептиды, использованные в работе.

## 2.1.3. Плазмиды

В работе были испольщованы плазмиды pMD.G и  $\Delta$ R8.91, pVAX1 (Invitrogen, CША), pRRLSIN.cPPT.PGK (Addgene plasmid #12252), а также полученные на их основе производные, суммированные в Таблица 4.

Назначение	Название конструкта	Плазмидный вектор, использованный за основу	Устойчивость к антибиотику	Промотор	Клонированный синтетический ген ВИЧ-1	Сокращенное название	Внесенные мутации	Полученные в ходе данной работы
	pVAX1 pVax_RT_Anin				none Консенсусный вариант RT	- RT_Anin	- D185N, D186N,	- +
сках					FSU_A с мутациями ЛУ к НИОТ и с инактивированной ферментативной активностью		E478Q, M184V, K65R/N	
тических клел	pVax_RT_Annin	trogen)			Консенсусный вариант RT FSU_A с мутациями ЛУ к ННИОТ и с инактивированной ферментативной активностью	RT_Annin	D185N, D186N, E478Q, K103N, G190S	+
і в эукарио	pVax_IN_in_r1	VAX1 (Invi	KanR		Консенсусный вариант IN FSU_A с мутациями ЛУ к RAL и с инактивированной ферментативной активностью	IN_in_r1	D64V, N155H, L74M, E92Q, V151I, G163R	+
экспрессик	pVax_IN_in_r2	p <sup>1</sup>			Консенсусный вариант IN FSU_A с мутациями ЛУ к RAL и с инактивированной ферментативной активностью	IN_in_r2	D64V, Q148K, E138K, G140S	+
оры для	pVax_PR_Ai			MV	Консенсусный вариант PR FSU_A с инактивированной ферментативной активностью	PR_Ai	D25N	+
Вект	pVax_PR_Ai2mut			IE CI	Консенсусный вариант PR FSU_A с мутациями ЛУ и с	PR_Ai2mut	D25N; M46I, I54V	+

Таблица 4 – Плазмидные конструкты, полученные и использованные в работе.

		инактивированной ферментативной активностью			
	pVax_PR_Ai3mut	Консенсусный вариант PR FSU_A с мутациями ЛУ и с инактивированной ферментативной активностью	PR_Ai3mut	D25N; M46I, I54V, V82A	+
	pLV_RT_An	Консенсусный вариант RT FSU_A с мутациями ЛУ к НИОТ	RT_An	M184V, K65R/N	+
	pLV_RT_Ann	Консенсусный вариант RT FSU_A с мутациями ЛУ к ННИОТ	RT_Ann	K103N, G190S	+
	pLV_IN_A	Консенсусный вариант IN FSU_A	IN_A	-	+
	pLV_IN_a_r1	Консенсусный вариант IN FSU_A с мутациями ЛУ к RAL	IN_a_r1	N155H, L74M, E92Q, V151I, G163R	+
đ	pLV_IN_a_r2	Консенсусный вариант IN FSU_A с мутациями ЛУ к RAL	IN_a_r2	Q148K, E138K, G140S	+
BekTC	pLV_PR_A2mut	Консенсусный вариант PR FSU_A с мутациями ЛУ	PR_A2mut	M46I, I54V	+
усный	pLV_PR_A3mut	Консенсусный вариант PR FSU_A с мутациями ЛУ	PR_A3mut	DM46I, I54V, V82A	+
Лентивир	pLV_PR_Ai3mut	Консенсусный вариант PR FSU_A с мутациями ЛУ и инактивированной ферментативной активностью	PR_Ai3mut	D25N; M46I, I54V, V82A	+

## 2.1.4. Бактериальные среды

В работе использовали жидкая среда для *E. coli* Luria-Bertani (LB, 1% бакто-триптон, 0,5% бакто-дрожжевой экстракт, 1% NaCl) и SOB (2% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 2,5 мМ KCl, 10 мМ NaCl, 10 мМ MgCl2, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>) на стерильной дистиллированной воде и твердая питательная среда для *E. Coli* LB-агар 1,5% (м/о).

## 2.1.5. Реагенты для работы с клетками

Среда RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (ПанЭко, Россия), Среда ДМЕМ (ПанЭко), Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), смесь пенициллин-стрептомицин (ПанЭко), раствор Трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин – 0,03% ЭДТА) (ПанЭко), ДМСО (ПанЭко).

## 2.2. Материалы и объекты

## 2.2.1. Бактериальные штаммы

Для получения плазмид в работе использовали бактерии E. coli Top10 (Invitrogen).

## 2.2.2. Эукариотические клеточные линии

В работе использовали эукариотические линии клеток 4T1luc2 аденокарциномы молочной железы мыши (http://www.caliperls.com/assets/014/7158.pdf, (просмотрено 20.02.2015); Caliper Life Sciences Inc., США), HT-1080 (Евроген, Россия) и HEK293T (Евроген).

## 2.2.3. Лабораторные животные

В работе использовали мышей линии BALB/с из питомников Charles River Laboratories (Sandhofer, Германия), Университета Тарту (Laboratory Animal Center University of Tartu, Тарту, Эстония) и питомника ИБХ РАН «Пущино» (Пущино, Россия).

## 2.3 Методы исследований

## 2.3.1. Культивирование бактериальных клеток E.coli

В ходе работы клетки *E. coli* штамма Top10 хранили в течение не более 4 недель при 4°C на поверхности питательной среды LB-агар в чашках Петри. Для выращивания культуры единичную колонию переносили бактериальной петлей в жидкую среду LB и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 180 оборотов/минуту.

## 2.3.2. Получение компетентных клеток E.coli

Одиночную колонию клеток *E. coli* Top10 переносили в 5 мл среды LB и растили в течение ночи при 37°С и перемешивании 180 оборотов/мин. При достижении OD 0,6 (OD600) бактериальную суспензию центрифугировали при  $2500 \times g$  в течение 5 мин при 4°С. Осадок ресуспендировали в 40 мл буфера TB (250 мМ KCl, 10 мМ HEPES pH 6,7, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 55 мМ MnCl<sub>2</sub>) и инкубировали на льду в течение 10 мин. Бактериальную суспензию повторно центрифугировали в ледяном буфере TB с добавлением 7% ДМСО и инкубировали на льду в течение 10 мин. Полученные компетентные клетки замораживали в аликвотах по 200 мкл погружая в жидкий азот. Компетентные клетки хранили при  $-70^{\circ}$ С.

## 2.3.3. Трансформация клеток E.coli

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* проводили в соответствии со стандарнтым протоколом [237]. Аликвоты компетентных клеток размораживали на льду. К оттаявшей суспензии добавляли 100 нг плазмидной ДНК и аккуратно перемешивали. Клетки инкубировали на льду в течение 30 мин, после чего подвергали тепловому шоку, помещая в водяную баню 42°C на 1 мин, после чего клетки возвращали в лед на 2 мин. К суспензии клеток добавляли 1 мл LB и инкубировали при 37°C в течение 30–60 мин, после чего клетки осаждали центрифугированием в течение 20 сек при 6000×g. Бактериальный осадок ресуспендировали в 70 мкл среды LB, и распределяли суспензию клеток по поверхности твердой среды LB-агар с добавлением канамицина (50 мкг/мл). Бактериальные колонии растили при 37°C в течение ночи.

## 2.3.4. Выделение плазмидной ДНК

Отдельную колонию клеток *E. coli*, трансформированных плазмидной ДНК, инокулировали в среду LB объемом 10 мл с добавлением канамицина (50 мкг/мл) и растили 7 ч

при 37°С при перемешивании. 5 мл полученной суспензии бактериальных клеток добавляли в 2,5 л среды LB с добавлением антибиотика и растили в течение ночи при температуре 37°С при перемешивании 180 оборотов/мин. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Plasmid Giga Kit EndoFree(Qiagen, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Плазмидную ДНК растворяли в TE буфере без эндотоксинов. Концентрацию плазмид определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop. Препараты плазмидной ДНК для иммунизации разводили в PBS до концентрации 1 мг/мл и хранили при температуре –20°С.

## 2.3.5. Культивирование и хранение эукартиотических клеток

Клетки линии 4T1luc2 культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячей сыворотки и смеси антибиотиков: 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки НЕК293T культивировали в полной среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной телячей сыворотки и смеси антибиотиков: 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, пересевая каждые 2–3 дня при достижении 80% конфлюэнтности монослоя для поддержания экспоненциального роста культуры. Для пересева клеточную среду отбирали и промывали клеточный слой PBS буфером (80мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100мМ NaCl). Для снятия клеток с поверхности флаконов во флакон площадью 25 см<sup>2</sup> добавляли 1,5 мл раствора Трипсин-ЭДТА 0,025% и помещали флакон в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 2–5 мин. Открепление контролировали с помощью световой микроскопии. После открепления действие трипсина инактивировали добавлением 4-5 мл среды для культивирования и тщательно суспендировали. Суспензию клеток разводили 1:5 или 1:10 и помещали в новый флакон.

## 2.3.6. Хранение и заморозка

Культуры эукариотических клеток хранили в жидком азоте в аликвотах по 1 мл с концентрацией 1×10<sup>6</sup> клеток/мл. Для заморозки клетки снимали с поверхности флаконов в экспоненциальной фазе роста с помощью раствора Трипсин-ЭДТА, как описано выше. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и центрифугировали 10 мин при 600×g. Осадок клеток суспендировали в среде для заморозки (50% культуральная среда, 40% эмбриональная телячья сыворотка, 10% ДМСО) в концентрации 1×10<sup>6</sup> клеток/мл и расфасовывали по 1 мл в пробирки для криоконсервации клеточных линий (Corning, США). Для постепенного охлаждения криопробирки с клетками на сутки помещали на –70°С в специальном

контейнере с изопропанолом, позволяющем опускать температуру на 1-2 °С/час, после чего переносили в жидкий азот.

## 2.3.7. Получение лентивирусных частиц

Культуру клеток HEK293T ко-трансфецировали ДНК лентивирусных векторов pLV\_RT\_A, pLV\_RT\_An, pLV\_RT\_Ann, pLV\_IN\_A, pLV\_IN\_a\_r1, pLV\_IN\_a\_r2, pLV\_PR\_A, pLV\_PR\_A2mut, pLV\_PR\_A3mut, pLV\_PR\_Ai3mut и вспомогательными плазмидами pMD.G и  $\Delta$ R8.91 с помощью реагента FuGene6 (Promega) согласно протоколу производителя. Через 48 часов после трансфекции культуралную среду, содержащую лентивирусные частицы, центрифугировали 5 мин при 1000×g для удаления клеточного дебриса и фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,45  $\mu$ M, после чего концентрировали в 10 раз с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra-15 100K (Merck-Millipore, Германия).

## 2.3.8. Определение продукции белка p24 в среде при получении лентивирусных частиц

Концентрацию капсидного белка p24 в среде оценивали с помощью набора «Антиген p24 ИФА-Бест» (НПО Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

#### 2.3.9. Определение инфекционного титра лентивирусных частиц

Клетки HT-1080 высаживали на 6-ти луночный планшет и трансдуцировали разными объемами полученных лентивирусных частиц. Клетки культивировали в течение 10 дней после чего из них выделяли геномную ДНК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) или ЭкстрактДНК Кровь (Евроген) согласно протоколам производителей. Титр вируса определяли методом ПЦР с детекцией в реальном времени с парой праймеров, специфичных к участку генома провируса (Таблица 2) с использованием калибровочной прямой, полученной по результатам амплификации стандартных образцов ДНК HT-1080 с известным количеством провируса.

## 2.3.10. ПЦР

Реакцию амплификации и анализ результатов проводили на амплификаторе Mx3005P (Agilent Technologies, CША) с программным обеспечением MxPro QPCR Software (Agilent Technologies) с использованием ПЦР-микс 5X HS-PCR mix (Евроген) или 5X ScreenMix

(Евроген). Реакционная смесь содержала праймеры в конечной концентрации 0.2 мкМ каждого, 2 мкл ДНК с концентрацией 50-100 мкг/мкл в 25 мкл реакционной смеси. Реакция амплификации включала следующие стадии: денатурация при 95°C 5 минут, 30 циклов амплификации (денатурация при 96°C 15 с, отжиг праймеров при 65°C 30 с, элонгация при 72°C 90 с), достраивание при 72°C 7 мин.

## 2.3.11. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез образцов ДНК, полученных в результате амплификации, проводили в 1% агарозном геле в ТАЕ буфере (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кистота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0). Для этого образцы полученные в результате амплификации, смешивали с 6×буфером нанесения (Thwrmo Fisher Scientific). Для визуализации ДНК в буфер ТАЕ вносили бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Ампликоны детектировали в ультрафиолетовом свете в системе гель-документации Gel Doc XR+ (Bio-Rad, CША). Для определения размера ДНК ампликонов использовали маркер 100+ bp DNA Ladder (Евроген). Визуализацию и регистрацию полученных результатов производили с помощью программы Quantity One (Bio-Rad), обработку полученных изображений проводили в программе Image Lab (Bio-Rad).

## 2.3.12. Получение моноклональных производных клеточной линии 4T1luc2

Культуру клеток 4T1luc2 высевали 24-луночный планшет. На следующий день клетки трансдуцировали полученными лентивирусными частицами с множественностью инфекции 1, 5 и 20 Т.Е./клетку в случае лентивирусных частиц, кодирующих  $RT_A$ ,  $IN_A$ ,  $IN_a_r2$ , и  $PR_Ai3mut$ , а также с множественностью инфекции 1 и 10 Т.Е./клетку для частиц, кодирующих  $RT_An$ ,  $RT_Ann$ . Через 24 часа инкубации проводили замену культуральной среды. Оценку возможной цитотоксичности проводили ежедневно в течение недели, начиная со вторых суток после трансдукции. Через 7 дней ДНК гетерогенных клеточных линий выделяли с использованием набора DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) или ЭкстрактДНК Кровь (Евроген) согласно протоколам производителей и оценивали наличие вставки провируса методом ПЦР с парой праймеров, специфичных к участку провируса (Таблица 2), как описано выше. Полученные гетерогенные клеточные популяции были расклонированы до единичных клеток методом предельных разведений в 96-луночных планшетах. Количество клеток в каждой лунке оценивали визуально с помощью световой микроскопии на 3-й и 6-й день после клонирования. Через 12-14 дней культивирования колонии, появившиеся в лунках с единственной клеткой и достигшие размера 50-80% площади лунки, были пересажены в 12-луночные планшеты. Полученные

производные единичных клеток наращивали, из них была выделена ДНК и оценено наличие вставки провируса, как описано выше. Полученные субклоны линии 4T1luc2, продуцирующие антигены ВИЧ-1 культивировали и замораживали как описано для исходной линии.

## 2.3.13. Работа с лабораторными мышами

Эксперименты по ДНК-иммунизации были выполнены в группе Б. Варрен Департамента микробиологии, онкобиологии и клеточной биологии Каролинского института (Стокгольм, Швеция). Эксперименты по оценки туморогенного потенциала субклонов линии 4T1luc2 были выполнены в лаборатории молекулярного патогенеза хронических вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также в лаборатории Даце Скрастины в Латвийском центре биомедицинских исследований (Dace Skrastina, Laboratory animal care facility, Latvian Biomedical Research and study Centre, Рига, Латвия). Эксперименты по оценке эффективности ДНК-иммунизации с подсадкой опухолевых клеток проводились в группе проф. Бритты Варрен (Швеция) и в лаборатории Др. Даце Скрастины (Латвия).

Во всех экспериментах использовали самок мышей BALB/с в возрасте 8 недель и весом около 20 гр. Для ДНК-иммунизации с *in vivo* электропорацией и для оценки эффективности ДНК-иммунизации с подсадкой опухолевых клеток использовали мышей из питомника Charles River Laboratories (Sandhofer, Германия) или из питомника Университета Тарту (Laboratory Animal Center University of Tartu, Тарту, Эстония). Для оценки роста опухолей использовали мышей, полученных из питомника ИБХ РАН «Пущино» или из питомника Университета Тарту.

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) и приказом Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 23 августа 2010 года № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики». Экспериментальные процедуры были одобрены этическим разрешением N66\_13, выданным этической комиссией северного Стокгольма (the Northern Stockholm Commission for Animal Research/Stockholms Norra Djurförsöksetiska Nämnd) от 16 мая 2013 года, этическим комитетом НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол №10, 14 марта 2017) и Латвийским комитетом по этике защиты животных Латвийской продовольственной и ветеринарной службы (лицензия № 99 от 1 июня 2018), выданными на срок 5 лет каждый. Мыши содержались в клетках с обогащенной внешней средой в группах по 5–8 мышей с 12-ти часовым

циклом дня/ночи и свободным доступом к еде и воде. Состояние животных регулярно контролировалось по подъедаемости корма/воды, изменениям массы тела, изменениям сотояния кожи и шерсти, а также макроскопическим изменениям в сайте иммунизации. Во время всех инвазивных процедур мыши находились под анестезией смесью 4% изофлуорана с кислородом для индукции и 2,5% изофлуорана с кислородом для поддержания анастезии, подаваемой через лицевую маску.

## 2.3.14. ДНК-иммунизация и in vivo электропорация мышей

Мышей подвергали ингаляционной анастезии как описано выше и дезинфицировали сайт инъекции раствором 70% этанола. Плазмиды, растворенные в PBS, или PBS вводили с помощью иглы 29 G внутрикожно в область спины слева и справа от основания хвоста. Для этого иглу после введения продвигали на 7 мм по направлению к голове. Мыши получали инъекцию 20 мкг плазмиды, растворенной в 20 мкл PBS, или 20 мкл PBS согласно Таблице 3. Непосредственно после введения проводили электропорацию сайтов инъекции. Для серии II (Таблица 5) был использован прибор DermaVax (Cellectis, Франция) и многоигольчатый электрод (1,5 × 4 мм; Cellectis), который накладывали непосредственно на место введения ДНК, после чего проводили электропорацию режимом, оптимальным для мелких грызунов [238]. В остальных экспериментах (Таблица 5) для электропорации использовали прибор CUY21EditII (BEX Ltd, Япония) и электрод типа пластина-вилка (fork-plate) CUY663-5x10 (ВТХ, Япония). Электрод состоял из вводимой под кожу трехзубой вилки и накладываемой сверху участка электропорации пластины. Вилку вводили в кожу под инъекционный пузырь и прижимали сверху пластиной. Электрод устанавливали так, чтобы предварительно измеренное электрическое сопротивление было в диапазоне от 2.0 до 2.5 kΩ. Затем проводили электропорацию по следующему режиму: инициирующий пульс с напряжением 400 В, восемь последующих импульсов чередуемой полярности с напряжением 100 В [239].

Мышей нумеровали с использованием ушных меток и распределяли на группы по 4–8 особей. В случае экспериментов с бустерной иммунизацией через 28 дней после первой иммунизации проводили повторную иммунизацию согласно изложенному выше описанию.

				Иммлиизания		Метод электропорации	«Челлендж» опухолевыми	I Tectu hamajiliofo otreta	
		Кол-во мышей		тымунизация			клетками		
			ДНК-иммуноген						Антиетльный
				Прайм, доза	Буст, доза		(субклон)	Т-клеточный иммунный	і иммунный
Серия	Группа							ответ	ответ
Ŭ	I-1	5	RT_Anin			CUY21EditII, электро	д		
т	I_2	5	RT Annin	20 мкг х 2 сайта	20 мкг х 2 сайта	вилка-пластина	UPT	ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	ИФА
1	1-2	5							11471
	I-3	5	pVAX1						
	<b>II-</b> 1	4	IN_in_r1			DermaVax,			
II	П 2	4	IN in a			многоигольчатый электрод	Į	ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	ИФА
	11-2	4	11 <b>N_</b> 111_12	2 ^ 10 MKI	нег		her		ΜΨΑ
	<b>II-</b> 3	4	pVAX1						
	III_1	0	PR Ai			CUV21EditII DIEKTRO	л		
	111-1	,					<u>д</u>		
III	III-2	9	PR_Ai2mut			вилка-пластина			
	111-3	9	PR Ai3mut	20 мкг х 2 сайта	20 мкг х 2 сайта		нет	ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	ИФА
	III J	,	r n_r nonnat						
	III-4	9	pVAX1						
IV	IV-1	5	pVAX1			CUY21EditII, электро	д		
	11/2	2	DDC	20 мкг х 2 сайта	20 мкг х 2 сайта	вилка-пластина	4T1luc2	ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	нет
	1 <b>v</b> -2	5	FDS						
	V-1	5	PR_Ai			CUY21EditII, электро	д		
V	V_2	5	PR Ai2mut	20 мкг х 2 сайта	20 мит у 2 сайта	вилка-пластина	PR 20 2	ИФH_y/ИЛ_2 FluoroSpot	цет
	v -2	5			20 MAI A 2 Carila		1 1/20.2	riwii-y/riji-2 i iuoiospot	1101
	V-3	5	PR_Ai3mut						

## Таблица 5 – Схемы иммунизации, использованные в работе.

	V-4	9	PBS							
	VI-1	5	IN_in_r1			CUY21EditII,	электрод	IN_a_1.2		
	VI-2	3	PBS	-		вилка-пластина				
VI				20 мкг х 2 сайта	20 мкг х 2 сайта				ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	нет
	VI-3	5	IN_in_r2					IN a r2 15		
	VI-4	3	PBS					11 <b>1</b> _a_12_1.5		
	VII-1	5	RT_Anin			CUY21EditII,	электрод	1		
						вилка-пластина		RT-An-10.1		
	VII-2	3	PBS							
VII				20 мкг х 2 сайта	20 мкг х 2 сайта				ИФН-ү/ИЛ-2 FluoroSpot	нет
	VII-3	5	RT_Annin							
				_				RT-Ann-10.2		
	VII-4	3	PBS							

## 2.3.15. Эвтаназия

Через 22 дня после первой иммунизации (Серия II, Таблица 5) или через 24 дня после бустерной иммунизации (Таблица 5) мышей выводили из эксперимента. Мышей подвергали анестезии, согласно описанному выше протоколу, после чего проводили цервикальную дислокацию. После чего кожу и шерсть дезинфицировали раствором 70% этанола. Кровь отбирали из сердца с помощью иглы 29 G (пункция сердца). Кровь собрали в пробирки 1,5 мл и использовали для получения сыворотки. Селезенку вырезали с помощью хирургических ножниц, переносили в 3 мл среды RPMI-1640 и хранили на льду до выделения спленоцитов.

## 2.3.16. Получение сывороток крови

Кровь отбирали из хвостовой вены, инкубировали 2 часа при комнатной температуре, после чего пробирки с кровью центрифугировали 1500×g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант (сыворотка) переносили в новую пробирку и замораживали при температуре –80 °C для дальнейшего анализа.

## 2.3.17. Выделение спленоцитов

Селезенки переносили в нейлоновый клеточный фильтр с диаметром пор 70мкм (Corning), помещали его в чашку Петри в 500 мкл среды RPMI-1640 и растирали селезенки поршнем от шприца. Клетки дважды промывали 2–3 мл полной среды RPMI-1640 и переносили в 15 мл пробирку. Клеточную суспензию центрифугировали при 390×g в течение 10 мин при 4°C. К осадку добавляли 4 мл буфера лизиса эритроцитов (EBioscience, CША) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Действие буфера останавливали добавлением 10 мл PBS и тщательно перемешивали. Клетки центрифугировали при 390х g в течение 10 мин при 4°C. Осадок суспендировали в 5 мл полной среды RPMI-1640. Концентрацию спленоцитов определяли с помощью камеры Горяева и доводили до значения 5×10<sup>6</sup> клеток/мл полной средой RPMI-1640.

## 2.3.18. Оценка клеточного иммунного ответа методом ИФН-у/ИЛ-2 FluoroSpot

Для оценки числа клеток, секретирующих ИФН-ү и ИЛ-2, использовали коммерческие наборы Mouse FlouroSpot ИФН-ү/ИЛ-2 (Mabthech, Швеция). Набор включал планшеты, антитела и реагент для усиления флуоресцентного сигнала. Мембрану планшета смачивали 35% этанолом

(15 мкл/лунку) в течение 1 мин, после чего лунки промыли 5 раз 200 мкл дистиллированной воды. Антиетела к ИФН-γ и ИЛ-2 (AN18 и 1A12 соответственно) разводили в стерильном PBS (pH 7.4) до конечной концентрации 15 мкг/мл и вносили 100 мкл в каждую лунку планшета. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при температуре 4°C. Несвязавшиеся антитела отмывали, промывая планшет 5 раз стерильным PBS (200 мкл/лунку). Для блокирования неспецифического связывания в лунки добавляли 200 мкл стерильной среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, и инкубировали не менее 30 мин.

Далее, из планшетов удаляли блокирующий раствор и вносили 50 мкл смеси 0.2 мкг/мл стимулирующих пептидов (Таблица 3) или неспецифический митоген Конканавалин A (КонA, 5 мкг/мл), моноклональные антитела к CD28, а также 50 мкл клеточной суспензии спленоцитов. Планшеты инкубировали в течение 18 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, после чего клетки удаляли, планшеты промывали 5 раз PBS. Детектирующие антитела к ИФН-ү и ИЛ-2 (R4-6A2-BAM и 5H4-biotin соответственно) разводили в PBS, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), до конечной концентрации 2мкг/мл и вносили 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали при комнатной температуре 2 часа, несвязавшиеся антитела отмывали 5 раз PBS. Вторичные антитела Анти-BAM и SA-Red разводили 1:200 в PBS, содержащем 0,1% БСА, и вносили 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали 1 час при комнатной температуре. Планшеты промывали 5 раз PBS. После чего вносили в каждую лунку 50 мкл усилителя флуоресценции-II (fluorescence enhancer-II) и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Затем раствор стряхивали и планшеты высушивали в темноте при комнатной температуре. Чтение планшетов и подсчет точек производили на приборе FluoroSpot reader.

## 2.3.19. Оценка антительного иммунного ответа

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили на 96-луночных планшетах MaxiSorb (Nunc Maxisorp, Дания) и Nunc Immuno 96 MicroWell Solid Plates (Thermo Scientific). На планшеты сорбировали рекомбинантные белки RT\_A, IN\_a, IN\_r1, IN\_r2, IN\_in, IN\_in\_r1, IN\_in\_r2, PR\_A, PR\_A2mut, PR\_A3mut или RT\_B, IN и PR\_B BИЧ-1 субтипа В штамма HXB2. Варианты IN и RT сорбировали в PBS в концентрации 0,3 мкг/мл. Варианты PR в концентрации 0,2 мкг/мл в карбонатном/бикарбонатном буфере (pH 9,3). Сорбцию проводили в течение ночи при 4°C, после чего удаляли несорбированный белок промывая планшет 3 раза буфером промывки (PBS с 0,05% Tween 20). Сыворотки последовательно разводили, начиная с 1:200 в буфере Scan (PBS, 0,5% БСА, 2% сыворотка козы, 0,05% Tween 20) и инкубировали в предсорбированных планшетах в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 3 раза буфером промывки и вносили HRP-коньюгированные антитела козы, специфичные к IgG мыши,

разведенные 1:2000 в буфере Scan. Планшеты инкубировали при 37°С в течение 1 часа, после чего промывали 3 раза буфером промывки. В планшеты вносили 100 мкл/лунку субстрата 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Dako, США). После проявления колориметрической реакции ее останавливали добавлением 50 мкл 2,5 М серной кислоты. Детекцию колориметрического сигнала (OD) проводили при длинах волн 450 нм и 690 нм. Пороговым значением позитивного сигнала принимали среднее значение сигнала (OD450-OD690) от контрольной группы, иммунизированной рVAX1. Для сывороток со значениями OD, превосходящими пороговые, конечные титры рассчитывали по кривым титрования.

## 2.3.20. Оценка туморогенного потенциала субклонов 4T1luc2, продуцирующих антигены ВИЧ-1

Перед имплантацией клетки линии 4T1luc2 и ее производных, продуцирующих антигены ВИЧ-1, культивировали, как описано выше. В день имплантации клетки открепляли трипсинизацией, инактивировали трипсин добавлением полной среды для культивирования и переносили в 15 мл пробирку, после чего центрифугировали 10 мин при 600×g и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI-1640. От каждой культуры отбирали аликвоту для подсчета с использованием камеры Горяева и окрашивали на жизнеспособность трипановым синим. Для имплантации были подготовлены аликвоты, содержащие 10<sup>4</sup>, 2×10<sup>4</sup>, и 4×10<sup>4</sup> клеток субклонов, продуцирующих различные варианты RT\_A в 50 мкл RPMI-1640,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$  и  $2 \times 10^4$ клеток в 50 мкл RPMI-1640 в случае субклонов, продуцирующих варианты IN A, и 10<sup>4</sup> клеток в 50 мкл RPMI-1640 в случае субклонов, продуцирующих варианты PR\_A. Исходную клеточную линию 4T11uc2 подготавливали аналогично описанным субклонам. Клетки вводили подкожно в объеме 50 мкл с помощью инсулинового шприца с иглой 25G. Субклоны, продуцирующие PR\_Ai3mut вводили в один сайт на спине у основания хвоста, остальные субклоны и исходную линию 4T1luc2 вводили в два сайта на спине слева и справа от основания хвоста. Кинетику формирования опухолей регулярно оценивали морфометрически с помощью штангенциркуля, объем опухоли рассчитывали по стандартной формуле для оценки объема ксенографтов [240]:  $V = xy^2/2$ . Дополнительно, кинетику формирования опухолей оценивали с помощью *in vivo* детекции биолюминесцентного сигнала (bioluminescent imaging (BLI)) на приборе Spectrum (в Латвийском центре биомедицинских исследований) или Lumina (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) (оба Perkin Elmer, США). Мониторинг биолюминесцентного сигнала производили в день имплантации, далее на 1-й, 2-й, 4-й и 6-й день после имплантации и далее с интервалами 2–3 дня до достижения первой опухолью размера 1 см<sup>3</sup>, установленного как точка гуманного завершения эксперимента. В каждый день мониторинга мышей взешивали. При достижении любой опухоли размера 1 см<sup>3</sup> мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации, органы

вырезали и использовали для оценки *in vivo* миграции опухолевых клеток, после чего парафинизировали для последующего гистологического анализа. Опухоли вырезали, <sup>1</sup>/<sub>2</sub> каждой опухоли парафинизировали для гистологического анализа, <sup>1</sup>/<sub>2</sub> каждой опухоли помещали в жидкий азот для последующего анализа мРНК экспрессии вариантов *RT\_A*, *IN\_A* или *PR\_A*.

## 2.3.20.1. Мониторинг in vivo биолюминесцентного сигнала

*In vivo* мониторинг роста опухолей производили методом визуализации *in vivo* на приборах Lumina и Spectrum (IVIS, PerkinElmer). Для этого мышам внутрибрюшинно вводили свежеприготовленный раствора соли XenoLight D-luciferin K+ (15 мг/мл) в PBS из расчета 150 мкг/г веса и инкубировали в течение 10 мин. После этого мышей подвергали ингаляционной анестезии как описано выше и переносили спящих животных в светонепроницаемую камеру прибора, оснащенную высокочувствиетльной ССD камерой, где поддерживали анестезию с помощью 2.5% смеси изофлуорана с кислородом, подающуюся со скоростью 1 л/мин. Мышей взвешивали и измеряли размер образовавшейся опухоли. После проведения измерений мышей возвращали в клетку, укладывая их рядом друг к другу, чтобы избежать переохлаждения. Данную процедуру повторяли на 1-й, 2-й, 4-й и 6-й день после имплантации и далее с интервалами 2–3 дня. Для оценки полученных данных использовали программу Living Image 4.5 Software® (PerkinElmer).

## 2.3.20.2. Мониторинг миграции опухолевых клеток в дистальные органы ex vivo

Мониторинг миграции опухолевых клеток в дистальные органы проводили *ex vivo* непосредственно после эвтаназии. Для этого перед эвтаназией мышам вводили раствор соли XenoLight D-luciferin K+ (15 мг/мл) как описано выше и ожидали 10 мин. После чего мышей подвергали ингаляционной анестезии, согласно описанному выше протоколу, и проводили цервикальную дислокацию. Кожу и шерсть животных дезинфицировали раствором 70% этанола, вскрывали и с помощью хирургических ножниц вырезали орагны – легкие, печень и селезенку, а также вырезали опухоли. Органы переносили в черный 24-луночный планшет (Wallac, Финляндия), предварительно наполненный PBS, и проводили мониторинг биолюминесцентного сигнала на приборе IVIS, после этого все образцы тканей переносили в 3 мл 4% раствора формальдегида и инкубировали при температуре 4°C в течение 1–2 суток, после чего переносили в PBS, отмывали и заливали парафиновые блоки по стандартной методике.

## 2.3.20.3. Гистологическая оценка опухолей

Парафиновые блоки разрезали на секции толщиной до 5 мкм и фиксировали на стеклах по стандартной методике. Далее образцы депарафинизировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическую оценку проводили на основе стандартных параметров, таких как ацинарные образования, размер и плеоморфизм ядра, митотическая активность (Таблица 6). Параметры суммировали, стадию развития опухоли определяли согласно классическим критериями, применяемыми при оценке опухолей молочной железы [241].

Таблица 6 – Гистологические параметры опухоли, оцениваемые для определения стадии развития опухоли.

Оцениваемый параметр	Характеристика	Присваиваемое значение
Суммарная площадь	>75%	1
ацинарных образований (по	10-75%	2
всему образцу опухоли)	<10%	3
Размер и плеоморфизм ядра	Маленькие ядра, очень	1
(по худшей области)	похожие по размеру и форме	
	на доброкачественные	
	эпителиальные ацинарные	
	клетки или клетки протоков.	
	Минимальный плеоморфизм	
	и даже хроматиновые	
	паттерны. Ядрышки	
	незаметны.	
	Ядра большие с низким или	2
	средним уровнем	
	плеоморфизма. Ядрышки	
	видимы, но маленькие и	
	неприметные	
	Везикулярные ядра, часто с	3
	видимыми ядрышками.	
	Заметные вариации в размере	
	и форме – плеоморфизм	

Митотическую	<или = 7 на 10 hpf	1
активность оценивали по	8-14 на 10 hpf	2
наиболее активному по этому	> 15 на 10 hpf	3
параметру участку препарата,		
при увеличении x400 (hpf –		
high power field – поле зрение		
при высоком увеличении		
объектива)		
Суммарное значение	Общий результат 3 - 5	G1
	Общий результат 6 или 7	G2
	Общий результат 8 или 9	G3

## 2.3.20.4. Гистологическая оценка метастазирования в печени

Полученные образцы печени мышей, фиксированные в формальдегиде, нарезали на гистологические слайды. Слайды окрашивали гемотоксилином и эозином для морфологической оценки. Наличие метастазов проверяли с помощью светового микроскопа. Размер обнаруженных метастазов оценивали с помощью программы NIS-Elements (Nikon, Япония). Количество метастазов в зависимости от их числа подсчитывали по всему слайду (при низком числе метастазов в образце), 25 случайным (при большом числе метастазов в образце) полям слайда. Выбор метода зависел от суммарного количества метастаз, при этом было показано, что количество метастазов в случайных полях коррелируют с количеством в специально выбраных полях (Спирман r=0,81; p<<0,0001), а количество метастазов в специально выбраных полях коррелирует с суммарным количеством метастазов на слайде (Спирман r=1; p=0,0004). Внутри одного эксперимента исследуемая группа и контрольная были подсчитаны с использованием одного и того же метода.

## 2.3.21. Выделение тотальной РНК из опухолей

Тотальная РНК была выделена из образцов опухолей с помощью реагента ExtractRNA (Евроген). Для удаления примеси геномной ДНК образцы РНК обрабатывали ДНКазой I (New England Biolabs, США) в течение 30 мин при 37°С, после чего проводили очистку РНК из реакционной смеси при помощи набора CleanRNA Standard (Евроген). Эффективность обработки ДНКазой I контролировали методом ПЦР в реальном времени. Очистку повторяли до получения

полностью негативных результатов при ПЦР с праймерами, специфичными к гену *Gapdh* мыши (Таблица 2).

## 2.3.22. ПЦР с детекцией в реальном времени

Для анализа экспрессии генов *PR*, *IN*, *RT* использовали набор OneTube SYBR RT-PCR (Евроген), предназначенный для проведения обратной транскрипции (OT) и амплификации кДНК в одну стадию в режиме реального времени. В реакциях обратной транскрипции и амплификации были использованы пары праймеров, специфичные к генам ВИЧ-1 (Таблица 2). Параллельно те же образцы анализировали с парой праймеров, специфичных к гену *Gapdh* мыши (Таблица 2). Реакции обратной транскрипции и амплификации проводили на приборе BioRAD по протоколу: обратная транскрипция при 45°C 15 мин., денатурация при 95°C – 1 мин., 40 циклов: денатурация при 95°C – 15 с, отжиг праймеров и элонгация при 62°C – 20 с. Специфичность продуктов амплификации подтверждали анализом кривых плавления.

## 2.3.23. Статистический анализ результатов

Статистический анализ данных в работе проводили с использованием программы GraphPad Prism 8 (Prism, США). Для оценки кинетики биолюминесцентного сигнала использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторяющихся измерений (RM twoway ANOVA) или Moдель смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса (Mixed effect model with Geisser-Greenhouse correction) с последующими коррекциями для множественного сравнения: Даннета при сравнении с контрольной группой, Тьюки при сравнении всех групп. Пальпируемый размер опухоли, биолюминесцентный сигнал от сайта введения клеток или от орагнов *ex vivo* анализировали с использованием теста Краскел-Уоллиса, при необходимости применяя поправку множественного сравнения Данна. При попарном сравнении двух выборок использовали тест Манна-Уитни. Уровень секреции цитокинов при ДНК-иммунизации анализировали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с тестом Тьюки для множественного сравнения Ална-Уитни. Для выявления корреляций использовали критерий ранговой корреляции Спирмана. Значения p<0,05 считали значимыми, 0,05<p<0,1 – имеющими тенденцию к значимым.

## ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ

# 3.1 Дизайн консенсусной последовательности RT, PR и IN ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A и его вариантов с мутациями лекарственной устойчивости

Для создания консенсусной аминоксилотной последовательности RT (reverse transcriptase; обратная транскриптаза) и PR (protease, протеаза) использовали информацию из базы данных последовательностей ВИЧ-1, GeneBank, базы данных устойчивости к лекарственным средствам против ВИЧ и базы данных HIV Los Alamos. Были извлечены аминокислотные последовательности RT (n=44) и PR (n=326) изолятов ВИЧ-1 FSU\_A от пациентов, ранее не получавших лечения, без известных мутаций лекарственной устойчивости. Для RT большинство последовательностей, датированных 1999 и 2012 гг., были из Российской Федерации (41%), а остальные – из других стран бывшего Советского Союза: Украины (23%), Узбекистана (18%), Казахстана (14%), Беларуси и Грузии (по 2% каждая) (Рисунок 6А). В подтверждение ранее опубликованных данных [242], мы наблюдали очень низкий средний уровень аминокислотного разнообразия в последовательностях RT, что позволило нам построить достоверную консенсусную последовательность RT FSU A ВИЧ-1 (RT\_A) [236]. Для PR использованные последовательности относились к двум равным временным промежуткам с 1997 по 2003 гг., (1й; n=206) и с 2009 по 2015 (2-й; n=120). Последовательности, датированные 1997-2003 гг., относились к изолятам вируса, выделенным на территории Украины (58%), Азербайджана (18%), Грузии (14%), Узбекистана (3%), Молдовы (2%), Российской Федерации (2%), Кыргызстана (1%), Беларуссии (1%) и Эстонии (1%) (Рисунок 6Б). Большинство последовательностей, датированных 2009–2015 гг., происходили из Казахстана (83%), а остальные – из Кыргызстана (13%), Российской федерации (3%) и Узбекистана (1%) (Рисунок 6В). После выравнивании обе выборки дали одну и ту же консенсусную последовательность PR.







Рисунок 6 – Географическое и временное распределение аминокислотных последовательностей RT (A) и PR (Б, В) HIV-1 субтипа А штамма FSU\_A использованных для

построения консенсусных последовательностей. Цифры внутри шкалы обозначают количество последовательностей, полученных из данной страны в данный год. ВҮ – Беларусь, GE – Грузия, KZ – Казахстан, RU – Россия, UA – Украина, UZ – Узбекистан, ES – Эстония, MD – Молдова, AZ – Азербайджан, KG – Кыргызстан.

Ген консенсусной последовательности интегразы (integrase, IN) ВИЧ-1, используемый в данной работе, был получен ранее в лаборатории [243] на основе аминокислотных последовательностей IN (n=34) изолятов ВИЧ-1 FSU\_A от пациентов, ранее не получавших лечения, без известных мутаций лекарственной устойчивости выделенных на территории Беларуси, Эстонии, Грузии, Российской Федерации, Украины и Узбекистана. Консенсусные аминокислотные последовательности белков RT, PR и IN представлены на Рисунок 7 А-В.

	!Domain=Data:									
	#RT_A	PISPIETVPV	TLKPGMDGPK	VKQWPLTEEK	IKALIDICKE	MEKEGKISKI	GPENPYNTPV	FVIKKKDSTK	WRKLVDFREL	[ 80]
	#RT_An							R		[ 80]
	#RT_Ann									[ 80]
	#K03455.1_HIV-1_subtype_B_(HXB2)		K		VET.			.A		[ 80]
	#RT A	NKRTQDFWEV	QLGIPHPAGL	KKKKSVTVLD	VGDAYFSVPL	DESFRK YTAF	TIPSINNETP	GIRYQYNVLP	QGWKGSPSIF	[160]
	#RT An									[160]
	#RT Ann			N						[160]
	#K03455.1_HIV-1_subtype_B_(HXB2)					D			A	[160]
	#RT_A	QSSMTKILEP	FRLKNPEIVI	YQ YMDDL YVG	SDLEIGQHRT	KIEELRAHLL	SWGFTTPDKK	HQKEPPFLWM	GYELHPDKWT	[240]
	#RT_An			V						[240]
	#RT Ann			s						[240]
	#K03455.1 HIV-1 subtype B (HXB2)		KQD			Q	RL			[240]
	#RT A	VQPIMLPDKD	SWTVNDIQKL	VGKLNWASQI	YPGIKVRQLC	KLLRGAKALT	DIVTLTEEAE	LELAENREIL	KEPVHGV YYD	[320]
	#RT An									[320]
	#RT_Ann									[320]
	#K03455.1 HIV-1 subtype B (HXB2)	VE				т	EVIP			[320]
	#RT A	PSKDLVAEIQ	KQGQDQWTYQ	IYQEPFKNLK	TGK YAKKGSA	HTNDVKQLTA	VVQKVATESI	IIWGKTPKFR	LPIQKETWEA	[400]
	#RT An									[400]
	#RT Ann									[400]
	#K03455.1 HIV-1 subtype B (HXB2)	I	G		RMRG.	Е	AIT	VK	т	[400]
	#RT A	WWME YWQATW	IPEWEFVNTP	PLVKLWYQLE	KEPIVGAETF	YVDGAANRET	KIGKAGYVTD	RGRQKVVPLT	ETTNQKTELH	[480]
	#RT_An	~						~ ~	~	[480]
	#RT_Ann									[480]
	#K03455.1 HIV-1 subtype B (HXB2)	т					.LN	т.	DO	[480]
	#RT A	AIHLALODSG	SEVNIVTDSO	YALGIIQAOP	DRSESEIVNK	IIEKLIEKER	VYLSWVPAHK	GIGGNEQVDK	LVSNGIRRVL	[560]
	#RT An									[560]
	#RT Ann									[560]
٨	#K03455.1 HIV-1 subtype B (HXB2)	Y	L		.0LO	ок. к			AK.	[560]
$\mathbf{A}$	"				- ~ · · · · · ×					[]

PR B HXB2	v	IK		EMS	R		H.		L.	I
PRA	PQITLWQRPL	VTVRIGGQLK	EALLDTGADD	TVLEDINLPG	KWKPKMIGGI	GGFIKVRQ	YD QILIEICGKK	AIGTVLVGPT	PVNIIGRNML	TQLGCTLNF
PR_Ai		• • • • • • • • • • • •	N							
PR_Ai2mut			N	<mark></mark> .	I	V				· · · · · · · · · ·
5 PR Ai3mut		<mark></mark>	N		I	V	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		.A	



Рисунок 7 – Консенсусные аминокислотные последовательности обратной транскриптазы (А), протеазы (Б) и интегразы (В) ВИЧ-1 субтипа А штамма FSU\_A и их вариантов с мутациями лекарственной устойчивости и заменами аминокислот, приводящими к потере ферментативной активности. В рамку обведены области, содержащие В и Т клеточные эпитопы, представленные синтетическими пептидами.

# 3.2. Дизайн вариантов RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A с мутациями лекарственной устойчивости и амнокислотными заменами, приводящими к инактивации ферментов (мутациями инактивации)

На основе консенсусной последовательности RT мы разработали варианты, несущие мутации лекарственной устойчивости (ЛУ) к НИОТ и ННИОТ ингибиторам, характерным для изолятов FSU\_A. Одной из наиболее распространненных в мире и часто встречающимся для штамма FSU\_A мутацией устойчивости к НИОТ является M184V, следующей по частоте распространения является мутация K65R/N [244; 245]. Наиболее распространенной для штамма FSU\_A мутацией устойчивости к НИОТ оказалась G190S [61; 246]. Мутация G190S часто встречается в сочетании с другими мутациями, в частности K103N, и никогда не обнаруживается у пациентов с ВИЧ-1, ранее не получавших лечение ННИОТ. На основании этого мы разработали варианты RT\_A с набором мутаций M184V в сочетании с K65R (RT\_An) и K103N в сочетании с G190S (RT\_Ann) (Рисунок 7A).

В консенсусную последовательность IN были внесены два набора мутаций устойчивости к RAL (raltegravir) [247]: один на основе первичной мутации N155H и вторичных мутаций L74M, E92Q, V151I, G163R (IN\_a\_r1), и другой – на основе первичной мутации Q148K и вторичных мутаций E138K и G140S (IN\_a\_r2) [248; 249] (Рисунок 7Б).

Для PR были отобраны наиболее частые мутации ЛУ, к препаратам, стандартно применяемым на территории стран бывшего Советского Союза в контексте антиретровирусной терапии [246; 250]. Были отобраны три мутации, обуславливающие высокий уровень устойчивости – M46I, I54V и V82A и сконтеруированы два варианта PR с комбинациями мутаций M46I/I54V (PR\_A2mut) и M46I/I54V/V82A (PR\_A3mut) (Рисунок 7В).

Активность вирусных ферментов может быть токсична для клеток [251], и является источником потенциальной опасности при испльзовании ДНК-вакцин на их основе. В силу этого в полученные последовательности вариантов генов RT, IN с мутациями ЛУ, и PR с и без мутаций ЛУ были внесены точечные нуклеотидные замены, приводящие к замене аминокислот в активных центрах ферментов, а именно: D185N, D186N, E478Q – для вариантов RT, D64V – для вариантов IN и D25N – для вариантов PR. Таким образом были получены варианты генов, кодирующих инактивированные варианты ревертаз  $RT_Ain$ ,  $RT_Ainn$ , интеграз  $IN_in_r1$ ,  $IN_in_r2$ , и протеаз  $PR_Ai$ ,  $PR_Ai2mut$ ,  $PR_Ai3mut$  (Рисунок 7).

На основе синтетических генов был получен целый ряд плазмидных векторов, все конструкции, как использованные, так и впервые полученные в данной работе приведены в

Таблица 4. Последовательности генов, кодирующих инактивированные ферменты *RT\_Ain, RT\_Ainn, IN\_in\_r1, IN\_in\_r2, PR\_Ai, PR\_Ai2mut, PR\_Ai3mut*, снабженные последовательностью Коzak для эффективной трансляции [252], были клонированы в вектор pVAX1 (Invitrogen), рекомендованный для ДНК-иммунизации.

## 3.3. Дизайн лентивирусных векторов, кодирующих варианты RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU A, и получение экспрессирующих их лентивирусных частиц

Для создания системы «опухолевой угрозы» («челендж», от англ. challenge) – опухолевых клеток, экспрессирующих гены ВИЧ-1, необходимо было получить кодирующие их лентивирусные векторы. Для более адекватного моделирования инфекции в лентивирусный вектор встраивали гены, кодирующие активные вирусные ферменты. В лентивирусный вектор pRRLSIN.cPPT.PGK под контроль промотора фосфоглицераткиназы (PGK) были клонированы последовательности генов ферментов ВИЧ-1 как с мутациями, так и без мутаций ЛУ RT\_An, RT\_Ann, IN\_A, IN\_a\_r1, IN\_a\_r2, PR\_A, PR\_A2mut, PR\_A3mut. Для получения лентивирусных частиц, проводили ко-трансфекцию клеток НЕК293Т ДНК лентивирусных векторов (pLV\_RT\_An, pLV\_RT\_Ann, pLV\_IN\_A, pLV\_IN\_a\_r1, pLV\_IN\_a\_r2, pLV\_PR\_A, pLV\_PR\_A2mut, pLV\_PR\_A3mut) и вспомогательными плазмидами pMD.G и ΔR9.91, кодирующими гликопротеин оболочки и структурные белки лентивирусов соответственно. Эффективность продукции лентивирусных частиц, оценивали по концентрации капсидного белка ВИЧ-1 р24 в вируссодержащей среде в сравнении с контрольным образцом лентивирусных частиц, кодирующих RFP (pLV-TagRFP, Евроген) с известным титром (6×10<sup>5</sup> Т.Е./мл). Результаты представлены в Таблица 7. Низкая концентрация белка р24 в культуральной среде при трансфекции конструктами, кодирующими ферментативно активные протеазы PR\_A, PR A2mut и PR A3mut, свидетельствала о нарушении продукции лентивирусных частиц, что могло говорить как о низком титре полученных вирионов, так и о полном отсутствии полноценных вирионов с образованием только свободного капсидного белка p24, что связали с токсичностью фермента для экспрессирующих клеток. Для решения этой проблемы был получен лентивирусный вектор pLV\_PR\_A3imut, несущий ген инактивированной протеазы PR\_Ai3mut. С его помощью удалось получить лентивирусные частицы, экспрессирующие PR\_Ai3mut.

Оценка инфекционного титра лентивирусных частиц, несущих гены  $IN\_A$ ,  $IN\_a\_r2$ ,  $PR\_A3mut$  и  $PR\_Ai3mut$  (Серия 1), гены  $RT\_An$ ,  $RT\_Ann$ ,  $IN\_a\_r1$ ,  $PR\_A$ ,  $PR\_A2mut$  (Серия 2), проводили путем заражения культуры клеток HT-1080 с последующей детекцией провируса методом ПЦР в режиме реального времени в сравнении с клетками HT-1080 с известным количеством провируса. Инфекционный титр полученных частиц представлен в Таблица 7. Было

отмечено, что лентивирусные векторы pLV\_PR\_A, pLV\_PR\_A2mut и pLV\_PR\_A3mut, а также pLV\_IN\_a\_r1 при трансфекции клеток HEK293T в сочетании со вспомогательными плазмидами, кодирующими гликопротеин оболочки и структурные белки, не образовывали инфекционных вирусных частиц. Набор мутаций r2 в IN не влиял на образование лентивирусных частиц и на инфекционный титр вирусов. Известно, что мутация D25N инактивирующая ферментативную активность PR, приводит к снижению ее токсичности на клетках [251; 253]. В то время как высокая токсичность PR, связанная с ее ферментативной активностью, не позволила получить жизнеспособные вирусные частицы, комбинация мутаций ЛУ, приводящих к снижению ферментативной активности, с инактивирующей аминокислотной заменой D25N позволила получить вирусные частицы в высоком титре (Таблица 7).

Встраиваемый ген	Лентивирусные	Концентрация р24	Инфекционный титр
	частицы	В	лентивирусных
		вируссодержащей	частиц, Т.Е./мл
		жидкости, нг/мл	
RT_An	+	Не определяли	$1,6 \times 10^{6}$
RT_Ann	+	Не определяли	$5 \times 10^{5}$
IN_A	+	221±26	3×10 <sup>5</sup>
IN_a_r1	-	-	-
IN_a_r2	+	204±11	3×10 <sup>5</sup>
PR_A	-	19±8	-
PR_A2mut	-	-	-
PR_A3mut	-	-	-
PR_Ai3mut	+	700±65	$1,5 \times 10^{6}$
RFP	+	272,5±38	6×10 <sup>5</sup>

Таблица 7 – Характеристика эффективности продукции лентивирусных частиц.

## 3.4. Создание производных линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, кодирующих варианты генов RT, IN и PR ВИЧ-1 подтипа А штамма FSU\_A

В качестве основы для создания клеток, продуцирующих антигены ВИЧ-1, была выбрана производная от хорошо охарактеризованной линии клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 [254]. Линия 4T1luc2 была получена путем трансдукции клеток 4T1 лентивирусом, несущим последовательность гена *luc2*, кодирующего люциферазу светлячка [255]. Наличие сильного биолюминесцетного сигнала от репортерного белка дает возможность детектировать *in vivo* единичные опухолевые клетки, что позволяет количественно оценивать кинетику роста опухолей на ранних этапах, а также оценивать инфильтрацию опухолевыми клетками тканей и органов с образованием метастазов. Клетки аденокарциномы легко дифференциировать от клеток внутренних органов мышей, что облегчает как гистологическую характеристику формируемых опухолей, так и идентификацию метастазов. Высокий туморогенный потенциал обеспечивает хорошую приживаемость клеток после имплантации, что позволяет варьировать количество подсаживаемых клеток в широком диапазоне от 10<sup>3</sup> до 10<sup>6</sup> клеток [227; 254, с. 4].

Полученные на предыдущем этапе лентивирусные частицы были использованы для трансдукции клеток 4T1luc2. Трансдукцию проводили с множественностью инфекции 1, 5 и 20 Т.Е./клетку в случае лентивирусных частиц, кодирующих  $IN_A$ ,  $IN_a_r2$ , и  $PR_Ai3mut$ , а также с множественностью инфекции 1 и 10 Т.Е./клетку для частиц, кодирующих RT\_An, RT\_Ann. Через 48 часов после трансдукции были выявлены признаки цитотоксичности в клетках, трансдуцированных лентивирусными частицами, кодирующими IN\_А при множественности инфекции 5 и 20 Т.Е./кл, и IN\_a\_r2 при множественности инфекции 20 Т.Е./кл (Рисунок 8). При примененеии других конструктов признаков цитотоксичности выявлено не было. Полученные гетерогенные культуры были расклонированны до одиночных клеток методом последовательного разведения, что позволило получить гомогенные субклоны 4T1luc2 из единичных клеток. Наличие вставок ДНК, кодирующих ферменты ВИЧ-1, было подтверждено методом ПЦР с парой праймеров, специфичных к лентивирусному вектору (Рисунок 9, Таблица 2). Всего было получено 9 субклонов, представленных в Таблица 8.



Рисунок 8 – Клетки 4T1luc2 после трансдукции лентивирусными частицами, кодирующими ферментативно активый вариант IN\_A, или вариант IN\_a\_r2 с мутациями ЛУ. A)1 Т.Е./клетку; Б) 5 Т.Е./клетку; В) 20 Т.Е./клетку. 48 часов после трансдукции. Световая микроскопия, 100×.





Рисунок 9 – Результаты ПЦР геномной ДНК моноклональных клеточных линий, A – с праймерами PGKseq и LVT200, Б – с праймерами на ген бета-актина: 1. H<sub>2</sub>O, 2. 4T1luc2, 3. IN\_a\_1.2, 4. IN\_a\_1.4, 5. IN\_a\_r2\_1.5, 6. PR-20.1, 7. PR-20.2, 8. RT-An-1.4, 9. RT-An-10.1, 10. RT-Ann-1.5, 11. RT-Ann-10.2. Длина ампликонов, содержащих клонированные фрагменты: IN\_A, IN\_a\_r2 – 1190 п.н., PR\_Ai3mut – 623 п.н., RT\_An, RT\_Ann– 2021 п.н.

Таблица 8 – Субклоны линии 4T1luc2, полученные в работе.

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

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

## 3.5.1. Подбор дозы имплантируемых клеток линии 4T1luc2 и ее субклонов

Известно, что продукция экзогенного белка может замедлить рост опухоли или вызывать отторжение имплантированных клеток [203; 256]. Для того чтобы оценить, как продукция антигенов ВИЧ-1 влияет на туморогенный потенциал полученных субклонов, клетки были имплантированны подкожно мышам линии BALB/c, сингенным подсаживаемым клеткам. Формирование опухолей мониторировали по детекции биолюминесцентного сигнала *in vivo* (Рисунок 10) и морфометрически, измеряя пальпируемый размер опухоли. Все полученые субклоны при подкожном введении мышам линии BALB/c оказались способными формировать солидные опухоли. Для исходной линии и всех полученных субклонов была характерна экспоненциальная кинетика роста биолюминесцентного сигнала с последующим выходом

уровня сигнала на плато. В работе были опробованы имплантации 4-мя дозами клеток в расчете на сайт введения:  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ . Уровень приживаемости клеток, оцененный как процент формирования пальпируемых опухолей, составлял 44%, 87%, 89% и 100% соответственно. При этом введение  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  клеток в сайт приводило к быстрому выходу биолюминесцентного сигнала на плато. Так биолюминесцентный сигнал в контрольной группе, получавшей  $2 \times 10^4$  или  $4 \times 10^4$  клеток 4T1luc2 на сайт введения, с 6 по 18 день наблюдения увеличился в  $1.52\pm0.39$  и  $3.34\pm2.88$  раз, соответственно, при этом при введении  $1\times10^4$  за тот же период наблюдения он увеличился в 40,80±12,76 раз. На 6-й день мониторинга уровень биолюминесцентного сигнала от места введения коррелировал с дозой имплантированных клеток (Спирман; r=0,45, p<0,0001), однако в конце мониторинга (день 18) зависимость пропадала (Спирман; r=0,16, p=0,06), что так же связано с выходом сигнала н аплато. При этом день, обнаруживалась статистически значимая 18-й корреляция одзой на между имплантированных клеток и пальпируемым объемом опухоли (Спирман; r=0,40, p<0,0001). Снижение значимости биолюминесцентного сигнала для мониторинга роста опухоли в конце периода наблюдения было связано с недостатком снабжения клеток кислородом в центральной части опухоли, приводящему к снижению уровня ферментативной активности люциферазы. В конечном итоге недостаток снабжения центарльной части опухоли кислородом приводил к развитию некроза, наблюдаемого при in vivo визуализации как небиолюминисцирующие («черные») зоны, наличие некроза подтверждалось гистологически. Таким образом, было показано, что оптимальными параметрами мониторинга роста опухоли являлись уровень биолюминесцентного сигнала в фазе его экспоненциального роста и пальпируемый размер опухоли в конце эксперимента.



Рисунок 10 – Примеры фотографий кинетики биолюминесцентного сигнала от места введения опухолевых клеток. А – RT-An-1.4, Б – RT-An-10.1, В – RT-Ann-1.5, Г – RT-Ann-10.2, Д – IN\_a\_1.2, Е – IN\_a\_1.4, Ж – IN\_a\_r2\_1.5, З – PR20.1, И – PR20.2, К – 4T1luc2. На каждой фотографии области минимального биолюминесцентного сигнала обозначены синим цветом, области максимального – красным цветом.Шкала интенсивности отличается для каждой фотографии. Красным кругом обозначен выбранный сайт регистрации биолюминесцентного сигнала.

## 3.5.2. Туморогенный потенциал субклонов 4T1luc2 кодирующих варианты генов RT ВИЧ-1

На первом этапе способность формировать опухоли оценивали для субклонов, продуцирующих различные варианты RT\_A. Для этого клетки вводили в количестве 1×10<sup>4</sup>, 2×10<sup>4</sup>, 4×10<sup>4</sup> клеток на сайт иньекции. Биолюминесцентный сигнал после введения субклонов RT-An-10.1 и RT-Ann-10.2 был выше, чем от RT-An-1.4 и RT-Ann-1.5, соответственно (p<0,05; двухфакторный дисперсионный анализ для повторяющихся измерений с тестом Тьюки для множественного сравнения) (Рисунок 11А-В). Начиная с 10-го дня наблюдения у всех животных детектировались пальпируемые опухоли, однако пальпируемый размер в большинстве случаев не коррелировал с уровнем биолюминесцентного сигнала, что косвенно свидетельствовало о развитии некроза в центре опухоли и подтверждало, что кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала является достоверным инструментом для оценки динамики формирования опухоли только в первые 10 дней до появления пальпируемого новообразования. К 15-му дню наблюдения уровень биолюминесцентного сигнала во всех группах выходил на плато (Рисунок 11А-В).



Рисунок 11 – Кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала от участков введения и пальпируемый объем опухолей субклонов линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, несущих вставки генов, кодирующих варианты RT. А – 1×10<sup>4</sup> клеток на сайт; Б – 2×10<sup>4</sup> клеток на

сайт; В –  $4 \times 10^4$  клеток на сайт. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, анализ проведен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Тьюки для множественного сравнения. \* – RT-An-1.4 в сравнении с RT-An-10.1, p<0,05; # – RT-Ann-1.5 в сравнении с RT-Ann-10.2, p<0,05.

Статистический анализ пальпируемого размера опухоли показал, что внутри групп, получивших инъекции различного количества клеток одного и того же субклона, не было различий по размеру опухоли на 18-й день наблюдений (Краскел-Уоллис, р>0,05 для всех), что позволило объединить данные. Различий в размере опухолей, формируемых субклономи, экспрессирующими варианты RT, в сравнении с опухолями, формируемыми родительской линией 4T1luc2, выявлено не было (Краскел-Уоллис, р>0,05). Следует отметить, что для субклона RT-Ann-1.5 пальпируемый размер формируемых опухолей был статистически меньше, чем для субклона RT-Ann-10.2 (Манн-Уитни, р<0,0001) (Рисунок 11Г), что согласуется с данными по уровню биолюминесцентного сигнала, описанными выше.

## 3.5.3. Туморогенный потенциал субклонов 4T1luc2 кодирующих варианты генов IN ВИЧ-1

На втором этапе туморогенный потенциал был оценен для субклонов, продуцирующих IN\_A, для этого клетки вводили в количестве  $5 \times 10^3$  (Рисунок 12А),  $1 \times 10^4$  (Рисунок 12Б) и  $2 \times 10^4$ (Рисунок 12В). При введении 5×10<sup>3</sup> клеток пальпируемые опухоли не детектировали в 3 из 4 сайтов, получивших субклон IN\_a\_r2\_1.5, и в 2 из 6 сайтов, получивших исходные клетки 4T1luc2 (Рисунок 13Б). Субклон IN\_a\_1.4 при введении 5×10<sup>3</sup> клеток не обнаружил признаков роста опухоли (Рисунок 12А), при введении 1×10<sup>4</sup> клеток было зарегистрировано нарастание биолюминесцетного сигнала, однако его уровень был ниже в сравнении с сигналом исходной линии (p<0,05; Модель смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса с тестом Данна для множественного сравнения) и детектировался только в 2 из 4 сайтов введения клеток. Кинетика биолюминесцентного сигнала от места введения клеток субклонов IN\_a\_1.2 и IN\_a\_r2\_1.5 не отличалась от таковой для исходной линиии 4T1luc2, кроме точки, снятой для субклона IN\_a\_1.2 на 4-й день при введении 1×10<sup>4</sup> клеток (Рисунок 12, p<0,05; Модель смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса с тестом Данна для множественного сравнения). При введении 2×10<sup>4</sup> клеток субклона IN\_a\_1.4 биолюминесцентный сигнал детектировали во всех сайтах введения клеток, однако рост опухолей был замедлен относительно исходной линии 4T1luc2, о чем можно судить по статистически более низкому уровню биолюминесцентного сигнала на 7-й день наблюдения (Манн-Уитни, p<0,01, Рисунок 12В).


Рисунок 12 – Кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала от участков введения субклонов линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, несущих вставки генов, кодирующих варианты IN. А –  $5 \times 10^3$  клеток на сайт; Б –  $1 \times 10^4$  клеток на сайт; В –  $2 \times 10^4$  клеток на сайт. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, анализ проведен с использованием модели смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса с тестом Данна для множественного сравнения (a, б, б\*) или с использованием теста Манн-Уитни (бб). IN\_a\_1.2 в сравнении с 4T1luc2: a – p<0,05. IN\_a\_1.4 в сравнении с 4T1luc2: б – p<0,05; б\* – p<0,1, бб – p<0,01.

Размер опухолей, образовавшихся в конечной точке эксперимента, был оценен морфометрически, как описано выше для RT\_A субклонов. Несмотря на детектируемый биолюминесцентный сигнал, ни в одной из групп, импланированных клетками IN\_a\_1.4, пальпируемые опухоли не сформировались (Рисунок 13). Размер опухолей, сформированных субклонами IN\_a\_1.2 и IN\_a\_r2\_1.5, не отличалася от опухолей, сформированных клетками 4T1luc2 (Рисунок 13). В отличие от данных, полученных для RT\_A субклонов, пальпируемый объем опухолей, образуемых субклонами IN\_a\_1.2 и IN\_a\_r2\_1.5, возрастал с увеличением количества имплантированных клеток (Краскел-Уоллис, p<0,05, Рисунок 13).



Рисунок 13 – Пальпирумый объем опухоли, сформированных субклонами, продуцирующими IN. А – 5×10<sup>3</sup>, Б – 1×10<sup>4</sup>, В – 2×10<sup>4</sup> клеток/сайт имплантации. Данные проанализированны с использованием критерия Краскел-Уоллис с поправкай множественного сравнения Данна или). \*– p<0,05.

#### 3.5.4. Туморогенный потенциал субклонов 4T1luc2 кодирующих варианты генов PR ВИЧ-1

На третьем этапе туморогенный потенциал был оценен для субклонов, продуцирующих PR\_Ai3mut (Рисунок 14). На основании данных, полученных в ходе выполнения первых двух этапов была выбрана доза 1×10<sup>4</sup> клеток на сайт инъекции, позволяющая избежать низкой приживаемости введенных клеток при низкой быстрого дозе клеток И выхода биолюминесцентного сигнала на плато и раннего формирования некрозов при высокой дозе клеток. Начиная с 11-го дня мониторинга уровень биолюминесцентного сигнала для субклона PR20.2 был статистически выше, чем для исходной линии (двухфакторный дисперсионный анализ для повторяющихся измерений с поправкой Даннета для множественного сравнения p<0,05), в то время как для субклона PR20.1 он не отличался от сигнала материнской линии

клеток на протяжении всего периода наблюдения (двухфакторный дисперсионный анализ для повторяющихся измерений с поправкой Даннета для множественного сравнения p>0,05) (Рисунок 14А). Пальпируемый размер опухолей, сформированных субклоном PR20.2 на 18-й день наблюдения, имел тенденцию быть больше, чем размер опухолей, формируемых исходной линией 4T1luc2 (Краскел-Уоллис, p=0,05) (Рисунок 14Б).



Рисунок 14 – Кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала от участков введения (А) и пальпируемый объем опухолей (Б) субклонов линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, несущих вставки генов, кодирующих PR\_Ai3mut. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, анализ проведен с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с поправкой Даннета для множественного сравнения (А) или теста Краскел-Уоллис (Б). \*– p<0,05; \*\*\*\*– p<0,0001.

Все пальпируемые опухоли были вырезаны для дальнейшего анализа экспрессии генов ВИЧ-1 и гистологического анализа. Экспрессия мРНК генов ВИЧ-1 была подтверждена во всех исследованных образцах (Таблица 9)

Таблица 9 – Экспрессия мРНК генов ВИЧ-1 в образцах опухолей.

Субклон	Экспрессируемый	dCt гена ВИЧ-1 (относительно Gapdh)
	ген ВИЧ-1	
RT-An-1.4	RT	1,45
RT-An-10.1		10,97
RT-Ann-1.5		5,86
RT-Ann-10.2		4,47
IN_a_1.2	IN	1,49
IN_a_r2_1.5		4,56
PR20.1	PR	3,63
PR20.2		12,64

3.5.5. Общая характеристика и гистологический анализ опухолей, образованных субклонами линии клеток аденокарциномы мышей 4T1luc2, кодирующими варианты ферментов ВИЧ-1

Из 9 полученных субклонов линии 4T1luc2, экспрессирующих варианты ферментов ВИЧ-1, 8 давали детектируемые опухоли. Субклон IN\_a\_1.4 был неспособен формировать пальпируемые опухоли при подсадке сингенным иммунокомпетентным мышам линии BALB/с и был исключен из дальнейшего анализа. Гистологический анализ показал, что все опухоли, сформированные как исходной клеточной линией 4T1luc2, так и ее производными, экспрессирующими варианты ферментов BИЧ-1, представляли собой позднюю стадию (G3) слабодифферинцированной аденокарциномы с повышенной клеточной и ядерной атипией и частыми областями некроза и воспаления. Характерные изображения гистологических образцов, окрашенных гематаксилином и эозином, представленны на Рисунок 15. Таким образом, продукция антигенов ВИЧ-1 не меняла гистологическую характеристику опухолей. Основные характеристики процесса формирования опухолей суммированны в Таблица 10. Субклоны RT\_An-1.4 и RT\_Ann-1.5 были исключены из дальнейшей работы, так как давали меньшие по размеру опухоли, в сравнении с субклонами RT\_An-10.1 и RT\_Ann-10.2, продуцирующими аналогичный вариант RT-А с мутациями ЛУ (Таблица 10).



Рисунок 15 – Гистологическая характеристика опухолей, сформированных клетками исходной линии 4T1luc2 (А) и ее субклонами, продуцирующими различные антигены ВИЧ-1 FSU\_A после эктотопного введения сингенным мышам BALB/c. 4T1luc2\_RT-An-1.4 (Б);

4T1luc2\_RT-An-10.1 (В); 4T1luc2\_RT-Ann-1.5 (Г); 4T1luc2\_RT-Ann-10.2 (Д); IN\_a\_1.2 (Е); IN\_a\_r2\_1.5 (Ж); PR20.1(3); PR20.2 (И). Окрашивание гематоксилин и эозин, увеличение 400× (кроме Е, Ж, З, 200×).

Таблица 10 – Основные характеристики кинетики роста опухолей субклонами линии 4T1luc2, продуцирующими варианты ферментов ВИЧ-1 FSU\_A, после эктотопного введения сингенным мышами BALB/c

Субклон	Имплантированная доза	BLI день 6-7	Пальпируемый объем опухоли, мм3, день 18	Приживаемость
4T1luc2	5000	$6,48 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^8$	44,30±54,49	4/6 (66,67%)
	10000	$2,23 \times 10^8 \pm 2,22 \times 10^8$	67,83±34,09	4/4 (100%)
	20000	$3,88 \times 10^8 \pm 5,02 \times 10^8$	141,76±225,2	9/9 (100%)
	40000	$4,46 \times 10^8 \pm 2,20 \times 10^8$	440,00±101,82	2/2 (100%)
RT-An-1.4	10000	$1,33 \times 10^8 \pm 7,02 \times 10^7$	119,75±55,62	4/4 (100%)
	20000	$3,77 \times 10^8 \pm 2,70 \times 10^8$	116,92±79,47	4/4 (100%)
	40000	$2,70 \times 10^8 \pm 7,46 \times 10^7$	117,17±77,38	4/4 (100%)
RT-An-10.1	10000	$3,02 \times 10^8 \pm 1,22 \times 10^8$	227,28±105,50	4/4 (100%)
	20000	$7,84 \times 10^8 \pm 4,53 \times 10^8$	168,88±108,34	4/4 (100%)
	40000	$4,43 \times 10^8 \pm 1,30 \times 10^8$	305,50±226,69	4/4 (100%)
RT-Ann-1.5	10000	$4,19 \times 10^8 \pm 1,69 \times 10^8$	58,66±89,52	3/4 (75%)
	20000	$2,76 \times 10^8 \pm 2,34 \times 10^8$	58,66±89,52	3/4 (75%)
	40000	$2,96 \times 10^8 \pm 1,24 \times 10^8$	179,03±109,36	4/4 (100%)
RT-Ann-10.2	10000	$4,95 \times 10^8 \pm 3,14 \times 10^8$	182,94±64,05	4/4 (100%)
	20000	$5,06 \times 10^8 \pm 3,12 \times 10^8$	296,50±106,78	4/4 (100%)
	40000	$2,96 \times 10^8 \pm 1,24 \times 10^8$	179,03±109,36	4/4 (100%)
IN_a_1.2	5000	$4,78 \times 10^{6} \pm 5,18 \times 10^{6}$	24,75±10,25	4/4 (100%)
	10000	$4,85 \times 10^{7} \pm 4,37 \times 10^{7}$	61,63±41,36	4/4 (100%)
	20000	$2,36 \times 10^7 \pm 2,70 \times 10^7$	60,17±42,55	4/4 (100%)
IN_a_1.4	5000	$2,79 \times 10^{4} \pm 1,72 \times 10^{3}$	0±0	0/4 (0%)
	10000	$4,91 \times 10^{4} \pm 1,31 \times 10^{5}$	0±0	0/4 (0%)
	20000	$2,67 \times 10^{4} \pm 2,47 \times 10^{3}$	0±0	0/4 (0%)
IN_a_r2_1.5	5000	$2,54 \times 10^{5} \pm 3,84 \times 10^{5}$	3,38±6,75	1/4 (25%)
	10000	$3,20 \times 10^{6} \pm 3,58 \times 10^{6}$	51,88±81,01	3/4 (75%)
	20000	$3,53 \times 10^7 \pm 4,42 \times 10^7$	103,73±107,03	4/4 (100%)
PR20.1	10000	$9,94 \times 10^{7} \pm 6,61 \times 10^{7}$	31,28±26,66	3/3 (100%)
PR20.2	10000	$4,34 \times 10^8 \pm 1,02 \times 10^8$	309,87±177,20	3/3 (100%)

#### 3.6. Миграция опухолевых клеток в дистальные органы in vivo

Наличие репортерного гена люциферазы позволяло оценить наличие единичных опухолевых клеток, мигрировавших в дистальные органы. Для этого перед эвтаназией мышам вводили раствор люциферина, после чего проводили эвтаназию и вырезали отдельные органы. Органы помещали в черный планшет для измерения флуоресценции в раствор PBS и мониторировали на приборе IVIS (Рисунок 16). Так как суммарное количество введенных опухолевых клеток могло сказаться на миграции клеток, для сравнительного анализа миграционной способности клеток *in vivo* использовали только органы, полученные от мышей, которым было имплантировано одно и то же количество –  $1 \times 10^4$  - клеток.

Для линии 4T1luc2 paнее показали, что при измерении *in vitro* 1 клетка испускает около фотонов/сек [255]. При этом, уровень биолюминесцентного сигнала от органа 6500 пропорционален количеству клеток 4T1luc2, введенных в ткань [257]. Исходя из измерений биолюминесцентного сигнала от органов наивных мышей уровень фонового сигнала принимали равным 8000 фотонов/сек. Ранее было показано, что экспрессия люциферазы снижает метастатический потенциал клеток 4T1luc2 в сравнении с исходной линией 4T1 [227]. Для 2 из 6 проанализированных субклонов суммарное значение биолюминесцентного сигнала от легких, печени и селезенки не превышало троекратного значения фонового сигнала, что указывало на дальнейшее снижение миграционной активности клеток (Рисунок 16А). Однако экспрессия ряда ферментов ВИЧ-1 не только не снижала метастатический потенциал, но, напротив, усиливала его, относительно линии 4T11uc2 (Рисунок 16А). Для клеток 4T11uc2 ранее было показано, что основным органом для метастазирования являются легкие [227]. При имплантации субклонов, экспрессирующих варианты ферментов ВИЧ-1, основным органом, в котором детектировали биолюминесцентный сигнал также являлись легкие (Рисунок 16Б). Однако, для субклона PR20.2 биолюминесцентный сигнал детектировали также и от печени (Рисунок 16В). Также для IN\_a\_r2\_1.5 и PR20.2 было субклонов RT-An-10.2, отмечено повышение уровня биолюминесцентного сигнала от селезенки (Рисунок 16Г). Экспрессия антигенов ВИЧ-1 в целом не влияла на миграционную активность клеток аденокарциномы *in vivo* (при сравнении 4T1luc2 с савокупностью данных от всех субклонов p>0,1, Краскел-Уоллис). Хотя для отдельных субклонов было отмечено усиление миграционной активности как в отношении количества мигрирующих клеток, так и в отношении спектра поражаемых органов с включением в процесс печени и селезенки, статистически значимой разницы в уровне биолюминесцентного сигнала между отдельными субклонами и линией 4T1luc2 выявлено не было ни при анализе сигнала от



отдельных органов, ни при анализе суммарного биолюминесцентного сигнала от всех органов (p>0,1, Краскел-Уоллис с поправкой Данна для множественного сравнения).

Рисунок 16 – Инфильтрация опухолевых клеток в дистальные органы. Инфильтрация клеток, продуцирующих люциферазу была оценена с помощью детекции биолюминесцентного сигнала *ex vivo*. Суммарный биолюминесцентный сигнал от органов (А), сигнал от легких (Б), печени (В) и селезенки (Г). Значения представляют среднее ± CO (n=3). Красной линией изображен уровень фонового биолюминесцентного сигнала 8000 фотонов/сек для индивидуальных органов и 24000 фотонов/секунду для суммарного сигнала от органов. Статистически значимых различий в уровне сигнала выявлено не было (Краскел-Уоллис, p>0,05)

### 3.7. Метастазирование

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

Суммарный биолюминесцентный сигнал от легких мышей, несущих опухоли, образованные субклонами  $IN_a_1.4$  и  $IN_a_r2_1.5$ , не превышал таковой от контрольной группы (Рисунок 16Б). Гистологический анализ подтвердил наличие в органах отдельных метастазов (в среднем  $1\pm0,5$  на мышь, Рисунок 17), состоящих из единичных опухолевых клеток, окруженных тяжелыми воспалительным инфильтратом, особенно выраженным у мышей, которым имплантировали родительские клетки 4T1luc2 (Рисунок 17А-В, И). Воспалительный паттерн имел мультифокальный, а не диффузный вид (Рисунок 17Б).



Рисунок 17 – Гистохимическая характеристика легких мышей, имплантированных клетками исходной линии 4T1luc2 и ее субклонами, продуцирующими IN\_A. Окрашивание гематоксилином и эозином фиксированных формалином и залитых в парафиновые блоки (FFPE) образцов легких мышей, получивших 4T1luc2 (A–B), IN\_a\_1.2 (Г–Е), IN\_a\_r2\_1.5 (Ж–И). Увеличение 100× (Б) и 400× для остальных панелей.

Оценка уровня метастазирования на фоне иммунизации является одним из существенных оценочных параметров эффективности вакцинации. В легких описанное выше воспаление существенно затрудняло гистологический анализ полученных образцов образцов на наличие метастазов. В силу этого для субклонов, продуцирующих различные варианты RT-A и PR\_Ai3mut, для гистологической оценки была выбрана печень, уровень биолюминесцентного

сигнала от которой для некоторых субклонов и контрольной линии превышал фоновые значения (Рисунок 16В). Гистологический анализ препаратов печени мышей подтвердил наличие метастазов, состоящих из единичных клеток, часто окруженных инфильтратами иммунных клеток (Рисунок 18). В печени мышей, имлпантированных клетками субклона PR20.1 метастазов выявлено не было (Рисунок 19А). При этом, метастазы, сформированные субклонами, продуцирующими RT-Ann (RT-Ann-10.2) и PR\_Ai3mut (PR20.2), были большего размера, в сравнении с метастазами, сформированными исходной линией клеток (Рисунок 19Б, Краскел-Уоллис с поправкой множественного сравнения Данна, p<0,01 для всех).



Рисунок 18 – Гистохимическая характеристика печени мышей, имплантированными клетками исходной линии 4T1luc2 (А) или ее субклонами, продуцирующими варианты RT\_A (Б-E) и PR\_A (Ж). Окрашивание гематоксилином и эозином FFPE образцов печени мышей, получивших 4T1luc2 (А), RT-An-10.1 (Б), RT-Ann-10.2 (В), PR20.2 (Г). Увеличение 400×.



Рисунок 19 – Оценка процесса метастазирования в печень мышей субклонов 4T1luc2 продуцирующих различные варианты RT-A и PR\_Ai3mut. А – суммарное количество метастазов на 10 hpf; Б – средний размер метастазов. Данные проанализрованы с использованием теста Краскел-Уоллис с поправкай множественного сравнения Данна. \*\*\*\*– p<0,0001.

На финальном этапе работы на основании полученных данных по воспроизводимости присадок опухолевых клеток, равномерности и воспроизводимости процесса роста опухолей, миграционной активности в дистальные органы и уровня метастазирования для оценки эффективности ДНК-иммунизации нами были выбраны субклоны RT-An-10.1, RT-Ann-10.2, IN\_a\_1.4, IN\_a\_r2\_1.5 и PR20.2, с введением в количестве 1×10<sup>4</sup> клеток на участок иньекции.

Материалы разделов 3.1 – 3.7 опубликованы в [235; 236; 258]

### 3.8. ДНК-вакцинные конструкты

Иммуногенность ДНК-вакцинных конструктов, кодирующих различные варианты антигенов ВИЧ-1, оценивали с помощью подкожной иммунизации сопровождающейся электропорацией по протоколу, разработанному ранее в лаборатории, с последующей оценкой иммунного ответа [239]. Иммунный ответ спленоцитов, стимулированных пептидами из состава вирусных белков, был оценен с помощью метода, оценивающего одновременную продукцию клетками, в данном случае спленоцитами мышей, интерферона гамма (ИФН-ү) и интерлейкина 2 (ИЛ-2), детектируемых флуоресцентно мечеными специфическим антителами (метод FluoroSpot).

Спленоциты мышей, иммунизированных вариантами RT, стимулировали рекомбинантным белком (ферментативно активной формой) и пептидами RT-Ai 145–168 и RT-

А 528–543 из состава RT из участков, общих для вариантов RT с мутациями ЛУ для прямого сравнения. Пептиды представляли кластеры известных B и T клеточных эпитопов RT [239; 259]. В ответ на стимуляцию пептидом RT-A 528–543 детектировали слабый иммунный ответ во всех группах (Рисунок 20А). Стимуляция рекомбинантным белком приводила к преимущественной секреции ИЛ-2, а пептидом RT-A 145–168 – к секреции ИФН-γ во всех группах, иммунизированных RT (Рисунок 20Б, В). Все варианты RT вызывали сходный иммунный ответ, статистически выше, чем ответ на не содержащий вставки («пустой») вектор. Иммунизация RT\_Ainn вызывала сравнительно более низкий иммунный ответ, чем RT\_Ain, но разница была статистически не достоверна (р>0,1 Рисунок 20).



Рисунок 20 – Продукция цитокинов интерферона гамма (ИФН- $\gamma$ ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2) спленоцитами мышей, ДНКиммунизированных плазмидами, кодирующими инактивированные (RT\_Anin/RT\_Annin) обратные транскриптазы ВИЧ-1. Суммарный профиль продукции цитокинов в ответ на стимуляцию спленоцитов синтетическими пепитами из состава RT (A), сравнительная оценка продукции ИФН- $\gamma$  (Б), ИЛ-2 (В), сочетанной продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 (Г). Данные анализировали с применением двухфакторного дисперсионного анализа с тестом Тьюки для множественного сравнения. В сравнении с pVAX1: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001; в сравнении различных стимулов: # – p<0,05, ## – p<0,01, #### – p<0,0001.

После иммунизации IN, спленоциты IN-иммунизированных мышей стимулировали пептидами из участков IN, богатых Т-клеточными эпитопами. Стимуляция вызывала специфическую продукцию ИФН-ү, ИЛ-2 и ИФН-ү/ИЛ-2 спленоцитами (p<0,01 в сравнении с контрольной группой, Манн-Уитни тест). Все использованные варианты IN вызывали схожий высокий уровень иммунного ответа при стимуляции пептидами из состава сильного CD8(+) Т-клеточного эпитопа интегразы а.о. 209–239 (пептиды MIN219 и IN209, Рисунок 21). Варианты IN\_in\_r1 и IN-in\_r2 имели сходную иммуногенность (p>0,1, Рисунок 21).



Рисунок 21 – Продукция цитокинов интерферона гамма (ИФН-γ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2) спленоцитами мышей, ДНКиммунизированных плазмидами, кодирующими инактивированные интегразы ВИЧ-1 с мутациями ЛУ (IN\_in\_r1, IN\_in\_r2). Суммарный профиль продукции цитокинов в ответ на стимуляцию спленоцитов синтетическими пептидами из состава IN (A), сравнительная оценка продукции ИФН-γ (Б), ИЛ-2 (В), сочетанной продукции ИФН-γ и ИЛ-2 (Г). Данные проанализированны с использованием критерия Манна-Уитни в сравнении с контрольной группой. \* – p<0,05.

В отличие от RT и IN, PR – короткий белок с ограниченным количеством эпитопов. Это позволило оценить распознавание иммунизированными мышами большего количества отдельных эпитопов, что было практически невозможно для протяженных RT (55 кДа) и IN (36 кДа). В силу этого, после иммунизации мышей вариантами PR спленоциты стимулировали пептидами, одинаковыми для PR-A и PR-B и уникальными пептидами из состава PR-B и PR-A, в том числе содержащими мутации ЛУ. Пептид А1-15 распознавали спленоциты всех иммунизированных мышей, хотя в группе, иммунизированной PR Ai3mut, иммунный ответ был слабее, чем в других группах (Рисунок 22). Спленоциты мышей, иммунизированных вариантами PR Ai и PR Ai2mut, были способны узнавать пептиды без и с мутациями ЛУ, в частности, AB71-85 и АВ75-84 ЛУ (двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки для множественного сравнения, p>0,05; Рисунок 22). При стимулировании пептидами, покрывающими a.o. 31–56 как с мутациями, так и без мутаций ЛУ, продукцию цитокинов не детектировали (Рисунок 22). Уровень иммунного ответа на пептид A31-56dr, индуцированного бустерной иммунизацией конструктом PR\_Ai2mut, не достигал статистической значимости (двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Тьюки для множественного сравнения, p>0,05; Рисунок 22). Пептид, покрывающий участок, содержащий мутацию V82A, но не содержащий данной замены (А76-90), индуцировал иммунный ответ в группах, иммунизированных вариантами PR с мутациями ЛУ, а пептид A76-90dr – только в группе, иммунизированной PR Ai3mut (различий в силе иммунного ответа между плазмидами не было, p>0,05; Рисунок 22). Эти наблюдения указывают на то, что у мышей, иммунизированных PR\_Ai3mut, развивался иммунный ответ, специфический к мутации V82A. В ходе более детального изучения иммунного ответа было показано, что индуцируемый иммунный ответ опосредован CD8+ Т клетками [258].



Рисунок 22 – Продукция цитокинов интерферона гамма (ИФН-γ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2) спленоцитами мышей, ДНКиммунизированных плазмидами, кодирующими варианты PR: PR\_Ai, PR\_Ai2mut, PR\_Ai3mut. Суммарный профиль продукции цитокинов в ответ на стимуляцию спленоцитов синтетическими пепитами из состава PR на 21-й день после бустерной иммунизации (А). Сравнительная оценка продукции ИФН-γ (Б), ИЛ-2 (В), сочетанной продукции ИФН-γ и ИЛ-2 (Г). Данные проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с тестом Тьюки для множественного сравнения. \*– p<0,05, \*\*– p<0,01, \*\*\*\*– p<0,001.

Сыворотки иммунизированных мышей были проанализированны на наличие антигенспецифичных антител. Титр антител против RT, определенный в предшествующих работах лаборатории, составлял от  $6 \times 10^4$  до  $1 \times 10^5$  и не зависел от природы ДНК конструктов, использованных для иммунизации [239; 259]. Одинаковый титр антител субкласса IgG, специфичных к IN, в среднем равный  $1 \times 10^3$  был детектирован во всех группах, иммунизированных вариантами IN (p>0,1) [235]. Ранее было показано, что при ДНКиммунизации PR вызывает сильный Т-клеточный ответ и не индуцирует образование антител [251]. В настоящей работе у мышей, ДНК-иммунизированных вариантами PR, также не обнаружили специфических антител [258].

Суммируя, можно сказать, что иммммунизация конструктами, кодирующими RT, вызывала в основном образование высокого титра специфических антител [260; 261], кодирующими IN, вызывала как T-клеточный ответ, так и гуморальный иммунный ответ [235], в то время как конструкты, кодирующие PR, были иммуногенны только на T-клеточном уровне.

Таким образом, нами были получены плазмидные ДНК, кодирующие различные варинаты ферментов ВИЧ с мутациями и без мутаций ЛУ, индуцирующие различные типы иммунного ответа. Далее предстояло оценить способность иммунного ответа, вызываемого этими конструктами, защитить иммунизированных мышей от «челленджа» опухолевыми клетками, экспрессирующими соответствующие ферменты ВИЧ-1 (эффективность вакцинации).

## 3.9. Имплантация 4T1luc2 субклонов экспрессирующих гены ферментов ВИЧ-1 мышам, ДНК-иммунизированным соответствующими ферментами («челлендж»)

### 3.9.1. Оценка эффекта введения ДНК

Введение плазмидной ДНК может привести к развитию воспалительной реакции, что в свою очередь может привести к изменению параметров роста опухоли. Исходя из этого, для корректной оценки эффекта иммунизации необходимо было подобрать адекватную контрольную группу. Для того, чтобы оценить вклад некодирующей плазмидной ДНК, введенной подкожной иньекцией с последующей электропорацией, мышам подкожно вводили вектор pVAX1 или раствор PBS и проводили электропорацию в условиях, ранее оптимизированных для ДНК-иммунизации [239] (Таблица 5). После этого мышам подкожно имплантировали 1×10<sup>4</sup> клеток 4T1luc2 в два сайта в основании хвоста, не менее чем в 1 см от участка иньекции/электропорации. Рост опухоли оценивали по биолюминесцентному сигналу и морфометрически (Рисунок 23). Различий между подгруппами, иммунизированными pVAX1 и PBS как в кинетике

биолюминесцентного сигнала, так и в объеме опухоли в конце эксперимента выявлено не было (Модель смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса с тестом Тьюки для множественного сравнения, р>0,05, и Манн-Уитни, р>0,05, соответственно). При оценке миграции опухолевых клеток в органы *in vivo* различий между группами так же выявлено не было (Манн-Уитни, р>0,05). Гистологическое исследование срезов печени так же не выявило различий в количестве и размере метастазов в группах, получавших pVAX1 и PBS с последующей электропорацией (Манн-Уитни, р>0,05). Метастазы, формируемые в обеих группах, состояли из опухолевых клеток, окруженных иммунными клетками, как и в наивных мышах, имплантированных клетками 4T1luc2 (Рисунок 18А).



Рисунок 23 – Сравнительная характеристика влияния иммунизации плазмидной ДНК на рост и миграцию опухолевых клеток. А – кинетика биолюминесцентного сигнала, Б –

пальпируемый размер опухоли, В – суммарная миграция опухолевых клеток в дистальные органы: Г – легкие, Д – печень, Е – селезенку. Число (Ж) и размер (З) единичных метастазов в печени при гистологическом исследовании. Данные проанализированы с использованием модели смешанного эффекта с поправкой Гейссера-Гринхауса с тестом Тьюки для множественного сравнения или теста Манна-Уитни. Статистических различий выявлено не было.

Таким образом введение плазмидной ДНК не оказывало дополнительного влияния ни на рост опухолей, ни на миграцию опухолевых клеток в дистальные органы и метастазирование в сравнении с введением PBS, что позволяло рассматривать в качестве контролей как мышей, получавших PBS, так и pVAX1 с последующей электропорацей.

# 3.9.2. Оценка методом «челленджа» эффективности ДНК-иммунизации конструктами, кодирующими варианты обратной транскриптазы ВИЧ-1

Эффективность иммунного ответа при иммунизации конструктами RT-Anin и RT-Annin, кодирующими инактивированную RT с мутациями ЛУ, была оценена с последующим «челленджем» субклонами RT-An-10.1 и RT-Ann-10.2, продуцирующими соответствующие белки в ферментативно активном варианте, отличающимся от иммуногена на 3 а.о. в активном центре. Кинетика роста опухолей в иммунизированных группах была замедлена относительно контрольных групп, иммунизированных PBS и получивших инъекцию тех же субклонов (Рисунок 24А): как уровень биолюминесцентного сигнала в начале наблюдения (Рисунок 24В), так и пальпируемый размер опухолей в конце эксперимента (Рисунок 24Г) в иммунизированных группах был статистически ниже, чем в контрольных. Иммунизация RT-Anin полностью предотвращала формирование пальпируемых опухолей (Рисунок 24Б, Г). В 4 из 10 сайтов имплантации клеток на 19-й день наблюдения происходило нарастание биолюминесцентного сигнала, но его прирост был в 1100 раз ниже, чем в контрольной группе, иммунизированной PBS (Рисунок 24Б). Иммунизация вариантом RT-Annin была способна лишь замедлить развитие опухолей, в 8 из 10 сайтов имплантации клеток происходило увеличение биолюминесцентного сигнала, хотя прирост биолюминесцентного сигнала был в 8,5 раз ниже, чем в контрольной группе (Рисунок 24 А-В). В 2 из 10 сайтов наблюдали образование пальпируемых опухолей (Рисунок 24Б, Г). Гистологически, RT экспрессирующие опухоли, сформированные в группах, иммунизированых конструктами, кодирующими варианты RT, и в контрольной, группе не отличались от таковых, сформированных в наивных мышах (Рисунок 15).

Интересно, что в ряде сайтов имплантации пальпируемые опухоли не детектировались до конца эксперимента, несмотря на прирост биолюминесцентного сигнала от участка имплантации клеток (Рисунок 24). Это подчеркивает важность использования сочетания биолюминесцентного сигнала с морфометрией. Использование одного биолюминесцентного сигнала недостаточно, так как не позволяет оценить рост опухолей при наличии гипоксии и некроза, а также при снижении уровня экспрессии репортера [227]. Настоящая работа показывает, что также недостаточна и чисто морфометрическая оценка процесса образования опухоли, так как она не позволяет оценить процесс прироста нарастания числа опухолевых клеток, не образующих солидную опухоль.

*Ex vivo* оценка миграции клеток в легкие, печень и селезенку показала, что иммунизация RT-Annin несколько снижала миграцию клеток в легкие по сравнению с таковой в контрольных животных (Рисунок 24E, p<0,1), а иммунизация RT-Anin не оказала влияние на миграцию клеток RT-An-10.1 (Рисунок 24E, p<0,5). В целом, миграционная активность данных субклонов была низкой, что не позволило выявить различий между иммунизированными и контрольными группами для остальных орагнов (печени, селезенки), а также для суммарного сигнала от органов (Рисунок 16). В виду низкого метастатического потенциала субклонов RT-An-10.1 и RT-Ann-10.2 для оценки влияния иммунизации на метастазирование срезы печени были исследованы не в случайно выбранных областях, а целиком (по всей площади среза). Гистологическое исследование подтвердило снижение числа метастаз на фоне иммунизации RT-Anin и RT-Annin (Рисунок 25А). Иммунизация RT-Anin не привела к изменению размера формируемых метастазов, в то время как на фоне иммунизации RT-Annin наблюдали увеличение размера метастазов, состоящих из опухолевых клеткок, окруженных инфильтратом из иммунных клеток (Рисунок 25Б).



Рисунок 24 – Кинетика роста опухолей и миграции опухолевых клеток субклонов 4T1luc2, представляющих варианты RT (RT-An-10.1, RT-Ann-10.2) на фоне иммунизации ДНКвакцинными конструктами, кодирующими аналогичный антиген (RT\_Anin, RT\_Annin cooтветственно). А – кинетика роста биолюминесцентного сигнала; Б – процент приживаемости клеток по нарастанию биолюминесцентного сигнала и формированию пальпируемой опухоли; В – анализ прироста биолюминесцентного сигнала на 8-й день наблюдения; Г – пальпируемый объем опухоли в конце эксперимента; Д – миграция опухолевых клеток в дистальные органы по *ex vivo* биолюминесцентному сигналу; Е – биолюминесцентный сигнал от печени; Ж – биолюминесцентный сигнал от легких; З – биолюминесцентный сигнал от селезенки. Данные

проанализированы с использовнием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (А) и теста Манна-Уитни для попарных сравнений (Б-3). \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001, ns – статистически не значимо (not significant).



Рисунок 25 – Оценка процесса метастазирования в печень мышей опухолевых клеток субклонов 4T1luc2, представляющих варианты RT (RT-An-10.1, RT-Ann-10.2) на фоне иммунизации ДНК-вакцинными конструктами, кодирующими аналогичный антиген (RT\_Anin, RT\_Annin соответственно). А — количество метастазов; Б – средний размер метастазов. Метастазы, сформированные: только опухолевыми клетками (Tu), опухолевыми клетками, окруженными нейтрофилами (mix mts). Для панели A даны средние величины  $\pm$  стандартное отклонение после оценки всей площади 1 среза печени от каждой мыши в группе. Данные проанализированны с использованием попарного сравнения тестом Манн-Уитни (A) или двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (B). \* – p<0,05, \*\*\*\* – p<0,0001, ns – не значимо (not significant).



Рисунок 26 – Иммунный ответ мышей, ДНК-иммунизированных RT\_Anin, RT\_Annin на фоне челленджа опухолевыми клетками, продуцирующими варианты RT. Стимуляция пептидом

RT-A 145-168. Панели представляют секрецию цитокинов: ИФН-γ (А); ИЛ-2 (Б); сочетанную секрецию ИФН-γ и ИЛ-2 (В). Данные проанализированы с использовнием теста Манна-Уитни. Бокс-плот иллюстрирует 95% доверительный интервал, горизонтальная черта – среднее знаечние, усы – стандартное отклонение.

В конце эксперимента методом FluoroSpot был оценен иммунный RT-специфичный иммунный ответ, индуцированный при иммунизации конструктами, кодирующими варианты RT. Для спленоциты мышей, ДНК иммунизированных этого вариантами RT И имплантированных RT субклонами, стимулировали пептидом из состава RT RT145-168. RTспецифичного иммунного ответа в контрольных мышах обнаруженно не было, что говорит о том, что имплантация клеток, экспрессирующих RT, сама по себе не способна вызвать иммунный ответ, нацеленный на данный вирусный антиген. В группе мышей, иммунизированных конструктом RT-Anin и защищенных от образования опухолей RT-An-10.1, детектировали самый высокий уровень иммунного ответа, выраженного как в продукции отдельных цитокинов ИФНу (Рисунок 26А) и ИЛ-2 (Рисунок 26Б), так и в ко-продукции ИФН-у/ИЛ-2 (Рисунок 26В). В группе мышей, иммунизированных RT-Annin и частично защищенных от формирования RT-Ann опухолей, также детектировали развитие RT-специфичного иммунного ответа (Рисунок 26). Была выявлена статистически значимая обратная корреляция уровня продукции ИФН-у и ИЛ-2 и уровня биолюминесцентного сигнала от опухоли, а также уровня продукции ИФН-у и пальпируемого размера опухоли в конце эксперимента (Таблица 11).

Таблица 11 – Обратная корреляция размеров RT-экспрессирующих опухолей, образующихся в мышах, ДНК-иммунизированных RT\_Anin, RT\_Annin, с иммунным ответом на пептид, представляющий а.о. 145-168 RT (RT145-168; Таблица 3).

	ИФН-ү	ИЛ-2	ИФН-ү/ИЛ-2
	RT145-168	RT145-168	RT145-168
Объем опухоли, мм <sup>3</sup>	R= -0,5975	Не значимо	Не значимо
	p<0,05		
Биолюминесцентный	R= -0,5552	R=-0,6326	Не значимо
сигнал на день 19,	p<0,05	p<0,05	
фотонов/сек			

Таким образом ДНК-иммунизация всеми конструктами, кодирующими RT, была способна затормозить рост опухоли, продуцирущей аналогичный вариант RT. Наиболее сильно эффект

был выражен для варианта RT\_Anin при «челлендже» субклоном, кодирующим ферментативно активный вариант этой обратной транскриптазы (RT-An-10.1).

# 3.9.3. Оценка методом «челленджа» эффективности ДНК-иммунизации конструктами, кодирующими варианты интегразы ВИЧ-1

Для оценки протективности ДНК-иммунизации конструктами, кодирующими IN, были использованы субклоны IN\_a\_1.2 и IN\_a\_r2\_1.5, выбор субклона был основан на максимальном совпадении аминокислотных последовательностей белка, закодированного в вакцинном конструкте, и белка, представляемого опухолевыми клетками. Так, при иммунизации конструктом IN\_in\_r2 мышам имплантировали клетки, продуцирующие вариант IN\_a\_r2, отличающегося лишь мутацией, инактивирующей ферментативную активность. В случае конструкта IN in r1 ввиду невозможности получить субклон, кодирующий данный вариант IN, мышам имплантировали субклон IN\_a 1.2, экспрессирующий вариант IN\_A, отличающийся от иммуногена на 6 аминокислотных остатков (Рисунок 7, Таблица 4). Иммунизация обоими вариантами IN приводила К замедлению роста опухолей (снижению кинетики биолюминесцентного сигнала, Рисунок 27А). Иммунизация вариантом IN\_in\_r1 приводила также к заметному снижению приживаемости клеток при оценке формирования пальпируемых опухолей (Рисунок 27Б), при этом сформированные опухоли были значительно меньшего размера, чем в контрольной группе (Рисунок 27Г). Тем не менее, в целом, нарастание биолюминесцентного сигнала в местах имплантации клеток было детектировано в 9 из 10 сайтов (Рисунок 27Б). Иммунизация вариантом IN\_in\_r2 приводила к снижению приживаемости как по уровню биолюминесцентного сигнала, так и по числу сформированных пальпируеммых опухолей (Рисунок 27Б). Пальпируемые опухоли детектировали в 7 из 10 сайтов имплантации клеток, при этом их размер был в 2,3 раза меньше, чем размер опухолей в контрольной группе (Рисунок 27Г, p<0,001). Иммунизация обоими вариантами интегразы приводила также к снижению уровня биолюминесцентного сигнала от органов (Рисунок 27Д). Как и в случае наивных мышей, биолюминесцентный сигнал от селезенки (Рисунок 27Е) и печени (Рисунок 27Ж) не превышал уровеня фона, миграция клеток была направлена преимущественно в легкие (Рисунок 273).

Стоит отметить, что в отличае от данных, полученных для субклонов, кодирующих RT, для субклона IN\_a\_r2\_1.5 приживаемость после ДНК-иммунизации, оцененная по уровню прироста биолюминесцентного сигнала была ниже, чем оцененная по формированию пальпируемых опухолей, что говорит либо о подавлении реакции люминесценции (ввиду недостатка кислорода и сниженной жизнеспособности клеток внутри опухоли (некроза)), либо об *in vivo* селекции опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии репортера (как в работе [227]). Это еще раз подчеркивает важность сочетанного мониторинга процесса формирования опухоли с использованием методов биолюминесценции и морфометрии.



Рисунок 27 – Кинетика роста опухолей и миграции опухолевых клеток субклонов 4T1luc2, продуцирующих варианты IN, на фоне иммунизации ДНК-вакцинными конструктами, кодирующими варианты интегразы. А – кинетика роста биолюминесцентного сигнала; Б –

процент приживаемости клеток по нарастанию биолюминесцентного сигнала и формированию пальпируемой опухоли; В – анализ прироста биолюминесцентного сигнала на 8-й день наблюдения;  $\Gamma$  – пальпируемый объем опухоли в конце эксперимента; Д – миграция опухолевых клеток в дистальные органы по суммарному *ex vivo* биолюминесцентному сигналу от легких, печени и селезенки; Е – биолюминесцентный сигнал от печени; Ж – биолюминесцентный сигнал от легких; З – биолюминесцентный сигнал от селезенки. Данные проанализированы с использовнием двухфакторного дисперсионного анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (А) и теста Манна-Уитни для попарных сравнений (Б-3). \* – p<0,05, \*\*\* – p<0,001.

Гистологическое исследование срезов легких мышей, иммунизированных вариантами интегразы, и контрольных мышей, выявило наличие единичных метастазов, состоящих из опухолевых и воспалительных клеток, аналогичных описанным ранее для наивных мышей (Рисунок 17). Для всех групп было характерно низкое число метастазов, группы не различались по их числу на мышь  $(1\pm0,5)$  и по общему выявленному количеству в группе  $(3\pm0,8)$  (p>0,05). Это позволило провести анализ объединенной группы мышей, иммунизированных различными вариантами IN, и имплантированных IN\_а 1.2 и IN\_a\_r2\_1.5 субклонами, в сравнении с контрольными мышами, иммунизированными PBS и имплантированными IN\_a 1.2 и IN a r2 1.5. Анализ объединенных выборок показал, что размер метастазов У иммунизированных мышей был статистически меньше, чем у мышей из контрольных групп (р<0,05, Рисунок 28).



Рисунок 28 – Сравнение размера метастазов в легких мышей сформированных опухолевыми клетками субклонов 4T1luc2 продуцирующих варианты IN на фоне иммунизации

ДНК-вакцинными конструктами, кодирующими аналогичный антиген. Точки представляют собой индивидуальный метастаз, линии – среднее значение в группе. Анализ с использованием теста Манна-Уитни. \*– p<0,05.

Спленоциты мышей, иммунизированных вариантами IN и контрольных мышей, были проанализированны на способность секретировать ИФН-ү/ИЛ-2 в ответ на стимуляцию пептидами из состава IN. IN-специфичного иммунного ответа в контрольных мышах обнаруженно не было, что говорит о том, что имплантация клеток, экспрессирующих интегразу, сама по себе не способна вызвать иммунный ответ, нацеленный на данный вирусный антиген. Во всех мышах, иммунизированных вариантами интегразы, как защищенных, так и не защищенных от формирования опухолей, был детектирован IN-специфичный иммунный ответ. Во всех иммунизирвоанных IN группах детектировани продукцию ИФН-ү, ИЛ-2 и двойную продукцию ИФН-ү/ИЛ-2 в ответ на пептиды иммуннодоминантых эпитопов для CD8+ (MIN219), и CD4+ клеток (MIN79 + MIN79r1 соответствующий варианту IN с мутацией ЛУ). Уровни продукции ИФН-ү, ИЛ-2 и ИФН-ү/ИЛ-2 в ответ на ДНК-иммунизацию вариантом IN\_in\_r1 и вариантом IN\_in\_r2 совпадали (p>0,1, Рисунок 29), что говорило об их одинаковой иммуногенности.



Рисунок 29 – Иммунный ответ мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструктами, продуцирующими варианты IN на фоне челленджа опухолевыми клетками, продуцирующими аналогичный антиген. Анализ с использованием теста Манна-Уитни, статистически достоверных различий не выявлено.

Как и в случае RT, размер опухоли и биолюминесцентным сигналом в конце эксперимента обратно коррелировал с магнитудой иммунного ответа на пептиды из состава IN, особенно сильно эта проявлялось при корреляции биолюмиесцентного сигнала с ответом на пептид,

представляющий иммунодоминанатный эпитоп, располагающийся в участке а.о. 219–238 (R ≥ -0, 933; Таблица 12).

Таблица 12 – Обратная корреляция размеров IN-экспрессирующих опухолей, образующихся в мышах, ДНК-иммунизированных IN\_in\_r1 и IN\_in\_r2, с иммунным ответом на пептиды из состава IN (Таблица 3).

	ИФН-ү	ИЛ-2	ИЛ-2	ИФН-ү/ИЛ-2	ИФН-ү/ИЛ-2
	MIN219	MIN219	MIN79+	MIN219	MIN79+MIN79r
			MIN79r1		1
Объем опухоли,	R= -0.749*	He	He	R= -0.67 *	Не значимо
MM <sup>3</sup>	p<0,05	значимо	значимо	p<0,05	
Биолюминесцен	R= -0.933 **	R= -	R= -	R= -0.95 **	R= -0.667*
тный сигнал на	p<0,01	0.933 **	0.748 *	p<0,01	p<0,05
день 19,		p<0,01	p<0,05		
фотонов/сек					

Таким образом, ДНК-вакцинные конструкты, кодирующие IN\_in\_r1 и IN\_in\_r2, обладая схожей иммуногенностью, имели разный протективный потенциал при опухолевом «челлендже». Интересно, что несмотря на несовпадение иммуногена при иммунизации IN\_in\_r1 с кодируемым опухолевыми клетками вариантом белка IN\_a, данная ДНК-иммунизация в большей степени препятствовала формированию опухолей и миграции опухолевых клеток *in vivo*. Данный эффект может быть связан как с *in vitro* характеристиками кодируемого белка, так и с профилем индуцируемого IN\_in\_r1 иммунного ответа.

# 3.9.4. Оценка методом «челленджа» эффективности ДНК-иммунизации конструктами, кодирующими варианты протеазы ВИЧ-1

Для оценки протективной способности конструктов, кодирующих варианты PR, после иммунизации мышам вводили клетки субклона PR20.2, продуцирующего вариант PR\_Ai3mut. ДНК-иммунизация вариантом протеазы PR\_Ai3mut, идентичным представляемому опухолевыми клетками, привела к замедлению роста опухолей (Рисунок 30А, В) и снижению процента приживаемости клеток (Рисунок 30Б). Увеличение биолюминесцентного сигнала наблюдали в 6 из 10 сайтов введения клеток, а формирование пальпируемой опухоли только в 1 из 10 сайтов, при этом ее размер был в 15 раз ниже, чем средний размер опухолей, образуемых в контрольной группе (13 мм<sup>3</sup> в сравнении с 279 мм<sup>3</sup>, Рисунок 30Г). Иммунизация конструктом PR\_Ai, кодирующем вариант PR наиболее отличающийся от представляемого опухолью, не повлияла на кинетику роста опухолей, что свидетельствовало об отсутствии у нее защитного эффекта

(Рисунок 30). Интересно, что при имплантации клеток PR20.2 мышам, ДНК-иммунизированным PR\_Ai2mut, отличающимся от представляемого опухолевыми клетками на всего один а.о. V82A, кинетика нарастания биолюминесцентного сигнала и его уровень на 8-й день наблюдения совпадали с таковым в контрольной группе (Рисунок 30A, B, p>0,1). Однако формируемые в конце эксперимента опухоли были статистически большего размера, чем опухоли в контрольной группе (Рисунок 30Г, p<0,05). Гистологически, опухоли, сформированные в группах, иммунизированых конструктами, кодирующими варианты PR, и в контрольной группе не отличались от таковых, сформированных клетками субклона PR20.2 в наивных мышах (Рисунок 15).



Рисунок 30 – Кинетика роста опухолей и миграции опухолевых клеток субклона PR20.2, представляющего вариант протеазы PR\_Ai3mut, на фоне иммунизации ДНК-вакцинными конструктами, кодирующими варианты PR: PR\_Ai, PR\_Ai2mut и PR\_Ai3mut. А – кинетика роста биолюминесцентного сигнала; Б – процент приживаемости клеток по нарастанию

биолюминесцентного сигнала и формированию пальпируемой опухоли; В – анализ прироста биолюминесцентного сигнала на 8-й день наблюдения; Г – пальпируемый объем опухоли в конце эксперимента; Д – миграция опухолевых клеток в дистальные органы по ex vivo биолюминесцентному сигналу; Е – биолюминесцентный сигнал от печени; Ж – биолюминесцентный сигнал от легких; 3 – биолюминесцентный сигнал от селезенки. Данные с использовнием двухфакторного дисперсионного проанализированы анализа лля повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения (А) и теста Манна-Уитни для попарных сравнений (Б-3). \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\*\* – p<0,0001. На панели А группы иммунизированные: PR\_Ai: aa – p<0,01; PR\_Ai2mut – бб – p<0,01; PR\_Ai3mut: c – p<0,05, сс – p<0,01 в сравнении с группой, иммунизированной PBS.

В ходе гистологического анализа срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, были выявлены метастазы, сформированные только опухолевыми клетками (Tu), опухолевыми клетками, окруженными нейтрофилами (смешанные метастазы, Mix) и инфильтраты нейтрофилов в отсутствие видимых опухолевых клеток (Neu) (Рисунок 31А). Для всех типов метастаз было оценено их количество и размер (Рисунок 31Б, В). Большинство метастазов представляли собой микрометастазы и относились к смешанному типу (Рисунок 31А1, А2). Метастазы были широко распределены по всей печени (Рисунок 31А3), встречались у кровеносных сосудов (Рисунок 31А4) и у желчных протоков (Рисунок 31А5). Метастазы, состоящие только из опухолевых клеток, по типу представленного на панели А6 (Рисунок 31А6), встречались редко. В группе, иммунизированной вариантом PR\_Ai3mut, метастазов в печени выявлено не было (Рисунок 31Б). В группе, иммунизированной вариантом PR\_Ai, метастазы не отличались от таковых в контрольной группе ни по числу (Рисунок 31Б), ни по размеру (Рисунок

31В). Иммунизация вариантом PR\_Ai2mut приводила к увеличению общего числа (за счет увеличения числа смешанных метастаз, Рисунок 31Б) и размера метастаз в печени (Рисунок 31В).





Рисунок 31 – Оценка процесса метастазирования в печень мышей субклона 4T1luc2 PR20.2, продуцирующего вариант PR\_Ai3mut, после их иммунизации конструктами, кодирующими варианты PR\_Ai, PR\_Ai2mut и PR\_Ai3mut. А – типичные фотографии срезов печени мышей, имплантированных PR20.2, после окрашивания гематоксилином и эозином. А1 – единичный большой метастаз с нейтрофилами; А2 – метастаз, окруженный множеством микрометастазов; А3 – множество микрометастазов; А4 – инвазия метастазов в кровеносный сосуд; А5 – инфильтрация метастаза в желчный проток; А6 – метастаз, состоящий только из опухолевых клеток. Увеличение от 200× до 400×. Б – количество метастазов; В – средний размер метастазов. Метастазы, сформированные: только опухолевыми клетками (Tu), опухолевыми клетками, окруженными нейтрофилами (Mix), инфильтраты нейтрофилов в отсутствие видимых опухолевых клеток (Neu), суммарное число метастазов (Total) определялась как сумма трех типов образований. Даны средние величины ± стандартное отклонение после оценки 2 срезов печени от каждой мыши в группе с выбором 5 случайных полей на каждом срезе. Данные использованием двухфакторного дисперсионного проанализированы с анализа для повторяющихся измерений с тестом Даннета для множественного сравнения. \* - p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* – p<0,001, \*\*\*\* – p<0,0001, ns – не значимо (not significant).

В конце эксперимента была оценена способность спленоцитов мышей из контрольной и иммунизированных групп продуцировать ИФН-ү/ИЛ-2 в ответ на стимуляцию пептидами из состава PR. Специфического иммунного ответа на PR в контрольных мышах детектировано не было, что свидетельствует о том, что имплантация клеток, продуцирующих PR, сопровождающаяся ростом опухоли, не способна вызвать PR-специфический иммунный ответ.

104

В группе, иммунизированной PR\_Ai3mut, был детектирован высокий уровень иммунного ответа в ответ на стимуляцию пептидами A1–15 и A76–90; в группах, иммунизированных PR\_Ai и PR\_Ai2mut, иммунный ответ на протеазу детектирован не был (Рисунок 32 A). Стоит отметить, что группа, иммунизированная PR\_Ai3mut, отличалась высокой реактивностью спленоцитов в ответ на стимуляцию неспецифическим митогеном конканавалином A (КонA) (Рисунок 32 Б), что говорит о сохранности жизнеспособности и функциональной активности T-клеток. В тоже время в других группах наличие растущих опухолей привело к нарушению функций T-клеток, выразившейся как в потере специфического распознавания пептидов из состава PR, наблюдаемого после иммунизации (видно из сравнения Рисунок 22Б и Рисунок 32A), так и в отсутствии неспецифического ответа на стимуляцию митогеном (Рисунок 32 Б). В подтверждении этого, число спленоцитов, секретирующих ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, and ИФН- $\gamma$ /ИЛ-2 в ответ на стимуляцию пептидами A1–15 и A76–90 в конце эксперимента, снижалось пропорционально возрастающему пальпируемому объему опухоли (Таблица 13).



Рисунок 32 – Иммунный ответ мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструктами, продуцирующими варианты PR на фоне челленджа опухолевыми клетками, продуцирующими аналогичный антиген. А – стимуляция пептидами из состава PR, Б – стимуляция КонА. 1 – секреция ИФН-ү; 2 – секркция ИЛ-2; 3 – секреция ИФН-ү и ИЛ-2. Данные проанализированны с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для

повторяющихся измерений с тестом Тьюки для множественного сравнения. \* – p<0,05, \*\*\* – p<0,001, \*\*\*\* – p<0,0001, ns – не значимо (not significant).

Таблица 13 – Обратная корреляция PR-специфического иммунного ответа на пептиды из состава PR (Таблица 3) с размером опухоли.

	Объем опухоли коррелирует с цитокиновым ответом на					
	A1–15			A76–90		
	ИФН-ү	ИЛ-2	ИФН- ү/ИЛ-2	ИФН-ү	ИЛ-2	ИФН-ү/ИЛ-2
Spearman r	-0,4202	-0,3659	-0,6293	-0,4147	-0,4229	-0,6121
р	0,0409	0,0787	0,0010	0,0439	0,0395	0,0015

Материалы разделов 3.8 и 3.9 опубликованы [235; 258].

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

За последние годы уже были показаны преимущества ДНК-вакцин, основанных на синтетических экспрессионно-оптимизированных генах, кодирующих консенсусные вирусные белки [262–265]. Дизайн таких консенсусных последовательностей в настоящей работе был облегчен низкой изменчивостью штамма FSU\_A [14; 266; 267]. В работе были созданы экспрессионно-оптимизированные консенсусные последовательности генов протеазы (PR) и ревертазы (RT) ВИЧ-1 субтипа А штамма FSU\_A, и на их основе получены варианты генов с мутациями лекарственной устойчивости (ЛУ). Данные гены, а также полученные ранее гены консенсусной интегразы (IN) с мутациями и без мутаций ЛУ были использованы как для создания ДНК-вакцинных конструктов, так и при получении представляющих эти белки опухолевых клеток с последующей оценкой эффективности ДНК-иммунизации путем имплантации этих клеток иммунизированным мышам («челленджа»).

Использованная в качестве основы для создания клеток, продуцирующих антигены ВИЧ-1, линия клеток аденокарционмы молочной железы мыши 4T1 [254] хорошо охарактеризована, а процесс опухолевой прогрессии и метастазирования при имплантации данных клеток схож с таковым при раке молочной железы человека, благодаря чему линию 4T1 часто используют в доклинических испытания противоопухолевых препаратов [190-194]. Производная от данной линии 4T1luc2 была получена путем ретровирусной трансдукции в геном клеток 4T1 около 500 копий гена luc2, кодирующего люциферазу светлячка [255]. Линия 4T1luc2 также широко используется в экспериментальной онкологии [268–270]. Наличие сильного биолюминесцетного сигнала от репортерного белка дает возможность детектировать *in vivo* единичные опухолевые клетки, что позволяет количественно оценивать кинетику роста опухолей на ранних этапах, а также оценивать инфильтрацию опухолевыми клетками тканей и органов с образованием метастазов. Клетки аденокарциномы легко дифференцировать от клеток внутренних органов мышей, что облегчает как гистологическую характеристику формируемых опухолей, так и идентификацию метастазов. Высокий туморогенный потенциал обеспечивает хорошую приживаемость клеток после имплантации, что позволяет варьировать количество подсаживаемых клеток в широком диапазоне от  $10^3$  до  $10^6$  клеток [227; 254].

Для дизайна гена PR, кодирующего консенсусную аминокислотную последовательность протеазы ВИЧ-1 субтипа A штамма FSU\_A было использовано два непересекающихся набора последовательностей, относящихся к 1997–2003 гг. и 2008–2015 гг. На их основе были независимо получены консенсусные последовательности, оказавшиеся идентичными, что еще раз подтверждает низкую изменчивость штамма FSU\_A. Ферментативная активность протеазы

токсична для клеток [271], поэтому в вакцинные конструкты были введены мутации, вызывающие аминокислотную замену в активном центре протеазы D25N, приводящую к потере ферментативной активности. Инактивирующая мутация D25N снижает протеолитическую активность протеазы [251; 272], но не позволяет заингибировать ее полностью [258]. Мутации ЛУ также приводят к снижению ферментативной активности протеазы [258; 272]. В силу высокой токсичности PR получить лентивирусные частицы, трансдукция которыми не вызывала массовой гибели клеток, удалось только для варианта PR\_Ai3mut, несущего мутацию инактивации и три мутации ЛУ.

Для интегразы были созданы варианты с двумя альтернативными комбинациями мутаций (ral) L74M/E92Q/V151I/N155H/G163R или устойчивости К ралтегравиру (IN a r1) E138K/G140S/Q148K (IN\_a\_r2), включающими первичные (N155H или Q148K) и вторичные (адаптивные) мутации (L74M/E92Q/V151I/G163R или E138K/G140S). Интеграза токсична для клеток за счет своей способности интегрировать чужеродную ДНК в геном клетки-хозяина. Первичные мутации лекарственной устойчивости снижают активность и, соответственно, токсичность, вторичные мутации компенсируют потерю активности, приводя к увеличению токсичночти белка для экспрессирующих клеток [247]. В нашем случае токсичность возрастала в ряду  $IN_a_r^2 < IN_a < IN_a_r^1$ . Это не позволило получить лентивирусные частицы, экспрессирующие вариант IN\_a\_r1, а трансдукция клеток 4T1luc2 лентивирусом, кодирующим IN\_а, оказалась возможной только при низкой множественности инфекции. С учетом генотоксичности интегразы в ДНК-вакцинные конструкты была дополнительно введена мутация D64V, ингибирующая активность интегразы [273].

Для обратной транскриптазы был создано два варианта с мутациями ЛУ к нуклеозидным ингибиторам (НИОТ) (К65R и M184V) и ненуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) (К103N и G190S) на основе консенсусной аминокислотной последовательности RT\_A. Ранее в работах группы, в том числе автора [236; 260; 274] было показано, что RT вызывает гиперпродукцию активных форм кислорода (АФК) в клетке. Однако ни при получении лентивирусных частиц, ни при последующей трансдукции клеток признаков токсичности выявлено не было ни для одного из активных вариантов белка. Это позволило получить общирную панель субклонов при различной множественности лентивирусной инфекции. Для ДНК-иммуногена было важно инактивировать потенциально опасную ферментативную активность. Мутации устойчивости к НИОТ снижают эффективность синтеза (-)оцДНК [275], а мутации устойчивости к ННИОТ снижают активность РНКазы Н и эффективность синтеза ДНК с тРНК Lys [276; 277], но это снижение не вызывает полной инактивации фермента. Для обеспечения безопасности ДНК вакцинного конструктов необходимо было создать
ферментативно неактивные варианты RT\_A. Ранее было показано, что мутации D185N, D186N и E478Q приводят к полной потере ферментативных активностей RT [278; 279]. Эти мутации были введены во все варианты RT, предназначенные для ДНК-иммунизации.

Известно, что продукция экзогенного белка может приводить к снижению туморогенного потенциала клеток [203; 227]. С учетом этого, все полученные субклоны 4T1luc2 были оценены на способность давать опухоли при имплантации сингенным мышам линии BALB/c. Рост опухолей детектировали как морфометрически по объему пальпируемой опухоли в конце эксперимента, так и по кинетике нарастания биолюминесцентного сигнала в сайте имплантации от момента введения клеток до окончания эксперимента. Для всех полученных субклонов 4T1luc2 наблюдали увеличение биолюминесцентного сигнала от сайта имплантации, однако для субклона IN\_a\_1.4 увеличение биолюминесцентного сигнала не приводило к образованию пальпируемых опухолей, опухоли не были детектированы ни в одном из сайтов введения в течение 21 дня мониторинга. Скорость нарастания биолюминесцентного сигнала для этого субклона была снижена относительно других субклонов, продуцирующих IN, а также относительно исходной линии. Возможно, пальпируемые опухоли были бы сформированны при более длительном наблюдении, но различия во временах наблюдений не позволило бы стандартизовать последующие эксперименты. В связи с этим субклон IN\_a\_1.4 был исключен из дальнейшей работы. В работах автора было показано, что продукция RT без мутаций ЛУ, приводит к увеличению туморогенного потенциала клеток, относительно исходной линии по механизму, опосредованному продукцией RT и индуцируемой при этом гиперпродукцией АФК [236]. Для субклонов, продуцирующих RT с мутациями ЛУ, изменеия туморогенного потенциала в сравнении с исходной линией выявлено не было. Продукция клетками интегразы также связана с продукцией АФК, но на более низком уровне [235]. В силу этого при введении клеток субклонов, продуцирующих варианты IN\_a (IN\_a\_1.2 и IN\_a\_r2), кинетика роста опухолей и их пальпируемый объем в конце эксперимента не отличались от такового в контрольной группе (4T1luc2). Таким образом, продукция IN и RT с мутациями ЛУ не вызывала усиление туморогенного потенциала клеток. Для протеазы удалось получить два субклона, продуцирующих вариант вирусного белка PR\_A3imut. При этом скорость роста опухолей, образуемых субклоном PR20.1, не отличалась от опухолей, образуемых исходной линией, в то время как опухоли от субклона PR20.2 росли быстрей и имели больший размер, чем опухоли, образуемые исходными 4T1luc2 клетками. Является ли это особенностями полученных субклонов или связано со свойствами протеазы предстоит выяснить в ходе дальнейшей работы.

Существенная часть «челленджа» – оценка процесса метастазирования. Она была разделена на два этапа – оценку миграционной активности опухолевых клеток и оценку

собственно процесса образования метастазов. Для оценки миграционной активности полученных субклонов нами был впервые использован метод детекции биолюминесцентного сигнала *ex vivo*. Для опухолевых клеток, экспрессирующих люциферазу была показана возможность детектировать до 3 опухолевых клеток *in vivo* [280; 281] и была продемонстрирована корреляция биолюминесцентного сигнала с числом метастазов, детектируемых при гистологическом исследовании [203; 236]. Такой подход позволяет быстро и с высокой чувствительностью оценивать поражение всех органов и тканей животного, что невозможно при гистохимическом скрининге.

Ранее было показано, что продукция репортерного белка – люциферазы – приводит к снижению метастатической активности клеток 4T1luc2 в сравнении с исходной клеточной линией 4T1 [227]. После определения основных органов мишеней миграционной активности опухолевых клеток проводили их гистологичесикй анализ. Для субклонов линии 4T1luc2, полученных в ходе этой работы, как и для исходных линий 4T1 и 4T1luc2 [227], основной мишенью для метастазирования являлись легкие. Гистологический анализ выявил отдельные состояшие опухолевых метастазы. ИЗ единичных клеток. окруженных тяжелыми воспалительными инфильтратами. Воспалительный паттерн имел мультифокальный, вид, сходный с острой интерстициальной пневмонией, поражающей альвеолярные перегородки [282]. Высокий уровень воспаления и большое количество воспалительных инфильтратов затрудняли гистологический анализ легких. Вторым органом по уровню биолюминесцентного сигнала и, соответственно, миграции опухолевых клеток, являлась печень. Легкость гистологического анализа в плане сравнительно низкого уровня воспаления и четкого различения клеток печени и клеток аденокарциномы молочной железы сделали печень предпочтительным органом для гистологического обследования. Оценка туморогенной, миграционной и метастатической активностей полученных субклонов не выявила их принципиальных отличий от исходной линии, то есть они были высоко туморогенны и метастатически активны (за исключением PR20.1) и в силу этого идеально подходили для экспериментов по челленджу.

Одной из задач исследования было определить оптимальную дозу имплантации опухолевых клеток и основные параметры мониторинга опухолевого роста. Было проанализированно 4 различных дозы  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  клеток на сайт имплантации. Введение  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  клеток/сайт приводило к быстрому выходу биолюминесцентного сигнала на плато, а введение  $5 \times 10^3$  снижало процент приживаемости клеток в 2 раза. Исходя из этого определили, что оптимальной дозой для имплантации субклонов 4T1luc2 является  $1 \times 10^4$  клеток на сайт иньекции. В первые дни после имплантации уровень биолюминесцентного сигнала от места введения клеток коррелирует с дозой клеток (Спирман; r=0,45, p<0,0001), в дальнейшем

эта зависимость пропадает (день 18: Спирман; r=0,16, p=0,06), но выявляется корреляция дозы имплантированных клеток с пальпируемым размером опухоли (Спирман; r=0,40, p<0,0001) и пальпируемого объема с уровнем биолюминесцентного сигнала (Спирман; r=0,50, p<0,0001). Таким образом оптимальными параметрами оценки роста опухоли являются мониторинг кинетики роста опухоли по уровню биолюминесцентного сигнала в начале (до дня 10) и пальпируемому размеру опухоли в конце эксперимента.

Следующим этапом работы было определение иммуногенности ДНК-вакцинных конструктов, кодирующих гены ВИЧ-1, эффективность которых планировалось оценивать в экспериментах с подсадкой опухолевых клеток («челлендже»).

Конструкты, кодирующие варианты RT, обладали схожей иммуногенностью, (вариант RT\_Annin был сравнительно менее иммуногенным, чем RT\_Anin, но разница была статистически незначима). Стоит отметить, что пептид RT-A 528-543, покрывающий описанный ранее для RT-В иммунодоминантный CD4+ T клеточный эпитоп [239], распознавался хуже, чем пептид RT-A 145–168, что говорит о смене иерархии эпитопов. Общий уровень индуцируемого T-клеточного ответа был сравнительно низок, что согласуется с ранее описанным иммунным ответом на RT [239; 259]. Ранее для экспрессионно-оптимизированных вариантов гена RT было показано, что множественные мутации лекарственной устойчивости не влияют на уровень индуцируемых антител и их подтип [239].

Для IN ранее было показано, что в районе а.о. 209–239 содержится эпитоп CD8+ Т-клеток, узнаваемый иммунной системой как мыши, так и человека [283–285]. Спленоциты мышей, иммунизированных ДНК-конструктами, кодирующими варианты интегразы, специфически узнавали пептиды MIN219 и IN209, покрывающие участок а.о. 209–239. Другие пептиды, представляющие известные Т-клеточные эпитопы интегразы, не распознавались, что говорит о строгой иерархии Т-клеточного ответа на IN с доминантным кластером, расположенным в области 209–239 а.о., и субдоминантыми эпитопами в области 79–98 и 169–196 а.о.

В данной работе мы сравнили иммуногенность вариантов IN с мутациями ЛУ. Варианты IN\_in\_r1 и IN\_in\_r2 не различались по уровню Т-клеточной иммуногенности. Стоит отметить, что в работах группы, в том числе автора, было показано, что введение инактивирующей мутации D64V приводит к снижению продукции цитокинов в ответ на стимуляцию пептидами из состава интегразы и сужает спектр распознаваемых пептидов. В тоже время мутации устойчивости к ралтегравиру восстанавливают уровень продукции цитокинов в ответ на стимуляцию пептидами, покрывающими а.о. 79–98 и 169–190 [235]. Иммунизация вариантами IN также была оценена по способности индуцировать В-клеточный иммунный ответ. Антитела, формируемые в результате

иммунизации вариантами IN, были способны перекрестно распознавать различные варианты интеграз, с мутациями и без мутаций ЛУ, а также их активные и ферментативно-неактивные формы [235].

При иммунизации конструктами, кодирующими варианты PR, из кластеров Т-клеточных эпитопов, распознаваемых человеком [103], представленных синтетическими пептидами, спленоциты иммунизированных мышей распознавали пептиды, покрывающие а.о. 1–15 и 71–90, но не пептиды, покрывающие а.о. 31-70. Мыши, иммунизированные вариантом PR\_Ai, распознавали пептиды с а.о. 82V, но не пептиды с мутацией ЛУ и а.о. 82A, что свидетельствует о роли а.о. 82 в распознавании PR Т-клетками. Конструкт, кодирующий вариант PR\_Ai2mut, был высокоиммуногененным и индуцировал более сильный иммунный ответ на иммунодоминантные эпитопы в а.о. 1-15 и 71-90 PR, чем варианты PR\_Ai и PR\_Ai3mut. Это может быть связано с повышенным уровнем протеасомной деградации данного варианта PR в сравнении с вариантами без мутаций и с 3 мутациями ЛУ [258]. Вариант протеазы PR\_Ai3mut обладал сравнительно низкой иммуногенностью, однако индуцируемый им иммунный ответ был специфически направлен на участок а.о.71–90, содержащих мутацию V82A. Чтобы дополнительно оценить иммунный ответ, специфичный к мутациям ЛУ, мы использовали пептиды, покрывающие а.о. 31-90 в вариантах с мутациями и без мутаций ЛУ. Наличие мутаций М46I и I54V не повлияло на специфичность индуцируемого вариантами PR иммунного ответа. Пептиды, покрывающие данный регион, не узнавались спленоцитами иммунизированных мышей. Напротив, мутация в а.о. 82 оказывала заметное влияние на специфичность иммунного ответа. Мыши, иммунизированные вариантами PR\_Ai и PR\_Ai2mut с а.о. 82V, слабо распознавали пептид A76-90dr, в то время как мыши, иммунизированные PR\_Ai3mut, распознавали как вариант пептида A76-90, так и вариант A76-90dr с а.о. 82A. В работе других сотрудников исследовательской группы было показано, что индуцируемый иммунный ответ опосредован CD8+ клетками [258]. После иммунизации всеми вариантами PR формирования PR-специфичных антител выявлено не было, что согласуется с данными по PR ВИЧ-1, опубликованными ранее [251]. Таким образом, полученные конструкты были иммуногенны и вызывали развитие Т-клеточного иммунного ответа, направленного на мутации ЛУ.

Суммируя, нами была получена панель ДНК-вакцинных конструктов с различными иммунологическими характеристиками:

i) Конструкты, кодирующие варианты IN, способные индуцировать как Т-клеточный иммунный ответ, так и формирование IN-специфичных антител, с индуцируемым иммунным ответом не специфичным к мутациям лекарственной устойчивости.

ii) Конструкты, кодирующие RT, индуцирующие слабый Т-клеточный ответ и высокий титр RT специфичных антител, с индуцируемым иммунным ответом, не специфичным к мутациям лекарственной устойчивости.

iii) Конструкты, кодирующие варианты PR, обладающие только Т-клеточной иммуногенностью, вызывающие иммунный ответ, специфически направленный на мутацию лекарственной устойчивости.

Полученная панель в совокупности с панелью субклонов, презентирующих соответствующие вирусные антигены, позволила нам провести оценку функциональной эффективности различных вариантов противовирусного иммунного ответа в разработанной нами модели опухолевого «челленджа».

Для оценки эффективности иммунного ответа, индуцированного вариантами RT, были использованы конструкты, кодирующие RT-Anin и RT-Annin, с последующей имплантацией субклонов 4T1luc2, продуцирующих идентичные варианты белка (без инактивирующих мутаций). При иммунизации вариантом RT-Annin мыши были защищены от формирования пальпируемых опухолей в 8 из 10 сайтов, однако в 8 из 10 сайтов имплантации было зарегистрировано увеличение биолюминесцентного сигнала, что говорит о том, что иммунизация данным вариантом была способна лишь замедлить формирование опухолей, но не предотвратить его полностью. При анализе миграции клеток в дистальные органы было показано, что иммунизация RT-Annin имела тенденцию ограничивать миграцию опухолевых клеток в легкие. При этом следует отметить, что конструкт, кодирующий RT-Annin был относительно менее имменогенным в сравнении с вариантом, кодирующим RT-Anin, а субклон RT-Ann-10.2 обладал сниженным метастатическим потенциалом по сравнению с родительскими клетками 4T1luc2. Иммунизация вариантом RT-Anin полностью предотвращала формирование пальпируемых опухолей субклоном RT-An-10.1, а биолюмиесцентный сигнал нарастал лишь в 4 из 10 сайтов имплантации клеток. Различий в миграции опухолевых клеток *in vivo* в иммунизированной и контрольной группе выявлено не было, что связано в первую очередь с низким миграционным потенциалом данного субклона. При гистологическом анализе срезов печени было подтверждено снижение на фоне иммунизации RT-Anin и RT-Annin числа формируемых метастазов (но не их размера).

Для индукции иммунного ответа при иммунизации вариантами IN были использованы конструкты IN\_in\_r1 и IN\_in\_r2, кодирующие ферментативно неактивные варианты белка с мутациями лекарственной устойчивости. Для последующего челленджа использовали субклоны IN\_a\_1.2 и IN\_a\_r2\_1.5 соответственно. Субклон IN\_a\_r2\_1.5 продуцирует вариант IN\_a\_r2 (100% совпадение с иммуногеном за исключением мутации инактивации). Так как субклона,

несущего ген IN\_a\_r1, получить не удалось, для челленджа использовали субклон IN\_a\_1.2, продуцирующий вариант IN\_A, отличающийся от иммуногена в 6 а.о., в том числе E92Q, расположенном в Т-клеточном эпитопе в а.о. 79–98, распознаваемым в иммунизированных мышах. Среди мышей, иммунизированных вариантом IN\_in\_r1, пальпируемые опухоли сформировались в 2 из 10 сайтов имплантации и были в 15 раз меньше, чем в контрольной группе, однако в 9 из 10 сайтов к концу эксперимента зафиксировали нарастание биолюминесцентного сигнала. В группе, иммунизированной вариантом IN\_in\_r2, нарастание биолюминесцентного сигнала и пальпируемые опухоли детектировали в 7 из 10 сайтов имплантации клеток. У мышей, полностью или частично защищенных от формирования опухолей, выявили развитие INспецифичного Т-клеточного иммунного ответа в форме продукции ИНФ-у, ИЛ-2 и ИФН-у/ИЛ-2 при стимуляции спленоцитов пептидами, покрывающими Т-клеточные эпитопы, расположенные в a.o. 79–98 и 219–238. Число клеток, продуцирующих ИФН-у/ИЛ-2, обратно коррелировало с размером опухоли и биолюминесцентным сигналом от сайта имплантации клеток. В легких мышей, иммунизированных вариантами IN, были обнаружены единичные метастазы, как и в контрольных мышах, однако их размер был достоверно меньше, чем в контрольной группе. Таким образом, иммунизация вариантом IN in r1 была способна предотвратить или замедлить формирование опухолей, продуцирующий гомологичный вариант IN\_a, и уровень протекции зависел от Т-клеточного ответа на иммунные эпитопы IN. В то же время ДНК-иммунизация вариантом IN\_in\_r2 оказалась менее эффективной в защите от челленджа опухолевыми клетками, хотя они продуцировали вариант интегразы, идентичный представленному иммуногеномIN\_a\_r2. Объяснением этому феномену могут быть тонкие различия в иммуногенности. Вариант IN\_in\_r1, в частности, демонстрировал повышенную по сравнению с другими интегразами, протеасомную деградацию, что обуславливало его лучшее распознавание и более высокую иммуногенность для Т клеток [235].

Для оценки эффективности ДНК-иммунизации вариантами PR были использованы конструкты, кодирующие  $PR_Ai$ ,  $PR_Ai2mut$  и  $PR_Ai3mut$ , и субклон PR20.2, продуцирующий вариант PR\_Ai3mut. Иммунизация вариантом PR\_Ai не оказала влияние на кинетику роста и размер опухолей, а также на миграцию и метастазирование в дистальные органы. Иммунизация вариантом PR\_Ai3mut, совпадающим с вариантом PR, представляемым опухолевыми клетками, приводила к практически полной защите от формирования опухолей (нарастание биолюминесцентного сигнала в 6/10 сайтах имплантации клеток, но пальпируемую опухоль детектировали только в 1/10 сайтов). У мышей, иммунизированных вариантом PR\_Ai3mut, не было детектировано метастаз в дистальных органах ни при исследовании биолюминесцентного сигнала в систальных органах ни при исследовании биолюминесцентного сигнала в дистальных органах ни при исследовании биолюминесцентного сигнала ех vivo, ни при последующем гистологическом анализе срезов печени. При этом стоит

отметить восстановление функциональной активности спленоцитов в ответ на стимуляцию конканавалином А. В данной группе мышей был детектирован иммунный ответ на пептиды из состава протеазы A1–15 и A76–90. Уровень иммунного ответа коррелировал с протекцией от формирования опухолей. Иммунный ответ при ДНК-иммунизации вариантом PR\_Ai3mut в основном имел CD8+ T-клеточную природу [258] и был специфичен к эпитопу, расположенному в а.о.76–90, а также специфически распознавал мутацию V82A, что, по всей видимости, обеспечивало этой группе иммунизированных мышей защиту от опухолевого роста и метастазирования, несмотря на относительно низкую иммуногенность варианта PR\_Ai3mut.

Интересно, что иммунизация наиболее иммуногенным вариантом PR\_Ai2mut привела к формированию опухолей большего размера в сравнении с контрольной группой и повышенной миграции опухолевых клеток в дистальные органы. При гистологическом анализе срезов печени было выявлено множество единичных метастазов, окруженных иммунными клетками. Высокая иммуногенность варианта PR\_Ai2mut была оценена в тесте FluoroSpot, который не позволяет определить природу реактивных клеток. Однако нашей исследовательской группой было показано, что специфичная моно-продукция цитокинов ИФН-у и ИЛ-2 спленоцитами мышей, иммунизированных PR\_Ai2mut, в ответ на стимуляцию пептидами, покрывающими регион а.о.71-84 и 76-90, не связана с CD8+ Т-клетками (ответ CD4+ Т-клеток после заморозки/отморозки клеток померить не удалось) [258]. Это позволяет связать детектируемый в ответ на стимуляцию a.o.71-84 и 76-90 цитокиновый ответ с активированными CD4+ Tклетками. При таком допущении, опухоли, сформированные в группе, иммунизированной вариантом PR\_Ai2mut, не совпадающим с опухолевым из-за наличия у последнего мутации V82A, могли быть инфильтрированы CD4+ Т-клетками различных специфичностей, не способными распознать иммунодоминантный Т-клеточный эпитоп в участке мутации и убить представляющую этот эпитоп опухолевую клетку. Такая инфильтрация приводит к развитию локального воспаления и вызывает усиление роста опухоли, как было ранее описано для мышиных фибросарком [286].

Полученные данные демонстрируют, что мутации ЛУ не только приводят к уходу от ингибирования антиретровирусными препаратами, но и меняют антигенные свойства белка, что при ВИЧ-1 инфекции может привести к уходу от иммунного ответа. Этот феномен уже был продемонстрирован для мутаций I47A, G48V [103] и V82A [102] протеазы, а также E138G/A/K обратной транскриптазы [104]. Такие мутации дают двойное преимущество вирусу, что может привести к распространению ЛУ вариантов вируса в популяции. Своевременная выработка специфического к такой мутации иммунного ответа могла бы задержать/сдержать его появление и распространение. Проведенное исследование показывает, что ДНК-вакцины, кодирующие

115

варианты генов ВИЧ-1 с мутациями ЛУ, индуцируют иммунный ответ, способный распознать такие мутации в составе белков, экспрессируемых клетками, в данном случае, опухолевыми. Это дает основание предположить, что такая иммунизация смогла бы вызвать иммунный ответ, распознающий и убивающий клетки, инфицированные лекарственно устойчивыми вариантами вируса.

Важно отметить, что создание ДНК-вакцин против ЛУ ВИЧ-1 не требует включения всех возможных вариантов мутаций, так как многие из них неиммуногенны или мало иммуногенны, что было показано в настоящей работе. Принципиально важна выборка мутаций ЛУ, распознаваемых иммунной системой. Исследования иммунного ответа лиц, инфицированных ЛУ ВИЧ-1, постоянно выявляет мутации ЛУ, приводящие к возникновению новых эпитопов с временной потерей распознавания антигена иммунной системой, каковой, в частности, яляется мутация V82A в протеазе [102]. Первоочередной задачей на пути создания терапевтической вакцины против лекарственной устойчивости при ВИЧ-1 инфекции является выявление таких мутаций и систематическое включение в кандидатные вакцины на базе консенсусных ферментов ВИЧ-1, что влечет за собой объемные предклинические испытания. Сочетание классических методов детекции иммунного ответа и разработанной в ходе данной работы модели опухолевого «челленджа» позволяет не только охарактеризовать иммуногенность таких кандидатныхвакцин, но и оценить их протективный потенциал в предклинических испытаниях.

Обобщая, разработанная модель оценки эффективности иммунного ответа открывает возможность масштабного тестирования вакцинных препаратов, направленных на актуальные мутации ЛУ. В ходе данной работы было показано, что такая модель применима для оценки как иммунного ответа, опосредованного антителами, так и опосредованного CD8+ T-клетками, а также смешанного иммунного ответа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена созданию и характеристике опухолевых клеток, кодирующих ферменты ВИЧ-1 RT, IN, PR и их последующим применением для *in vivo* оценки эффективности ДНК-иммунизации этими белками. В связи с возрастающей частотой выявления ВИЧ-1 с мутациями лекарственной устойчивости (ЛУ) у пациентов, не получавших антиретровирусную терапию, особое внимание было уделено вариантам ферментов с мутациями ЛУ. На основе клеточной линияи 4T1luc2 была получена панель из 9 субклонов, кодирующих RT-A с мутациями ЛУ к НИОТ RT-An (2 субклона) и ННИОТ RT-Ann (2 субклона), IN\_A (2 субклона) и ее вариант с мутациями к ИПЦИ ралтегравиру IN\_a\_r2 (1 субклон), а также вариант PR\_A с мутациями ЛУ к различным ИП PR\_Ai3mut (2 субклона).

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

При имплантации опухолевых клеток сингенным мышам важным является выбор дозы подсаживаемых клеток. В ходе работы было проанализировано четыре варианта дозы и было показано, что для субклонов 4T1luc2, кодирующих варианты RT, IN и PR, оптимальной является доза в 1×10<sup>4</sup> клеток/сайт введения.

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

На основе синтетических экспрессионно оптимизированных генов ВИЧ-1, кодирующие ферментативно неактивные консенсусные варианты RT, IN и PR с мутациями и без мутаций ЛУ, были получены плазмиды для ДНК-иммунизации (ДНК-вакцинные конструкты). ДНК-иммунизация мышей этими плазмидами показала, что конструкты, кодирующие варианты IN,

способны индуцировать как Т-клеточный иммунный ответ, так и формирование IN-специфичных антител. Конструкты, кодирующие RT, способны индуцировать слабый Т-клеточный ответ и высокий титр RT-специфичных антител. Индуцируемый конструктами, кодирующими RT и IN, иммунный ответ не был специфичен к мутациям лекарственной устойчивости. Конструкты, кодирующие варианты PR, обладали только Т-клеточной иммуногенностью, при этом иммунизация конструктом, кодирующим вариант PR\_Ai3mut, индуцировала иммунный ответ, направленный на мутацию лекарственной устойчивости.

Полученная панель ДНК-вакцинных конструктов в совокупности с панелью субклонов, презентирующих соответствующие вирусные антигены, была использована для оценки функциональной эффективности различных вариантов противовирусного иммунного ответа в системе опухолевого «челленджа». Иммунизация вариантами RT с мутациями ЛУ была способна предотвратить формирование опухолей и метастазирование субклонов, экспрессирующих соответствующие варианты RT. Иммунизация вариантом IN\_in\_r1 предотвратила формирование опухолей, экспрессирующих гетерологичный вариант IN\_А. ДНК-иммунизация вариантом IN in r2 оказалась менее эффективной в защите от формирования опухолей при имплантации опухолевых клеток, хотя они продуцировали вариант интегразы, идентичный представленному иммуногеном IN a r2. Иммунизация вариантом PR\_Ai3mut, совпадающим с вариантом PR, представляемыми опухолевыми клетками, обеспечивала практически полную защиту от формирования опухолей и полную защиту от метастазирования. В то же время иммунизация PR Ai2mut, наиболее иммуногенным вариантом отличающимся от варианта PR. экспрессируемого опухолевыми клетками, на один аминокислотный остаток, приводила к формированию опухолей большего размера в сравнении с контрольной группой и повышенной миграции опухолевых клеток в дистальные органы. Иммунизация вариантом PR\_Ai, отличающимся от экспрессируемого опухолевыми клетками на 3 аминокислотных остатка, не оказывала влияния ни на кинетику роста, ни на размер опухолей, ни на миграцию и метастазирование в дистальные органы. Во всех группах, частично защищенных от формирования опухолей, размеры опухолей, обратно коррелировали с иммунным ответом на экспрессируемый ими фермент ВИЧ-1

Только для конструктов, кодирующих варианты PR, иммунный ответ был специфичен к мутации ЛУ. А именно, иммунный ответ, вызываемый ДНК-иммунизацией вариантом PR\_Ai3mut, специфически распознавал мутацию V82A, что и обеспечивало защиту от опухолевого роста и метастазирования в этой группе, несмотря на относительно низкую иммуногенность варианта PR\_Ai3mut. В остальных случаях, ЛУ варианты были иммуногенны и

обеспечивали кросс-реактивный иммунный ответ на варианты ферментов ВИЧ с мутациями и без мутаций ЛУ.

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

### выводы

- 1. Получено 9 субклонов линии 4T1luc2, кодирующих варианты обратной транскриптазы (RT) с мутациями лекарственной устойчивости к нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторам ингибиторам RT, интегразу (IN) и ее вариант с мутациями к ралтегравиру, а также вариант протеазы (PR) с мутациями лекарственной устойчивости к различным ингибиторам протеазы.
- 2. Экспрессия лекарственно-устойчивых вариантов ферментов ВИЧ-1 не изменяла туморогенный потенциал и гистологические характеристики формируемых опухолей. Все субклоны способны формировать опухоли в сингенных мышах, представляющие собой позднюю стадию (G3) слабодифферинцированной аденокарциномы с повышенной клеточной и ядерной атипией и частыми областями некроза и воспаления.
- 3. Экспрессия лекарственно-устойчивых вариантов ферментов ВИЧ-1 не изменяла органную специфичность и уровень миграции субклонов опухолевых клеток оцененые по биолюминесцентному сигналу от органов *ex vivo*. Опухолевые клетки мигрировали в легкие и печень. Для отдельных субклонов при гистологическом исследовании были выявлены различия в числе и размере метастаз в печени.
- 4. Подобраны оптимальные параметры имлпантации и мониторинга показателей роста опухоли, миграции и метастазирования. Для субклонов 4T1luc2, кодирующих варианты RT, IN и PR оптимальной являлась доза имплантации в 1×10<sup>4</sup> клеток/сайт введения с последующим мониторингом роста опухоли по кинетике билюминесценции от сайта имплантации с 1 по 10 день и морфометрически в конечной точке эксперимента. Миграция клеток в дистальные органы может быть оценена по биолюминесцентному сигналу от органов *ex vivo*.
- 5. Иммунный ответ на ДНК-иммунизацию конструктами, кодирующими варианты RT, опосредованный RT-специфичными антителами, частично защищал иммунизированных животных от формирования опухолей в рамках разработанной модели при имплантации субклонов 4T1luc2, экспрессирующих соответствующий вариант RT.
- 6. Смешанный иммунный ответ на ДНК-иммунизацию конструктами, кодирующими варианты IN, опосредованный как Т-клетками, так и IN-специфичными антителами, замедлял рост опухолей и подавлял метастазирование, но не обеспечивал защиты от формирования опухолей в рамках разработанной модели при имплантации субклонов 4T1luc2, экспрессирующих как соответствующий вакцинному вариант IN, так и вариант имеющий аминокислотные замены.

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

# ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Одним из направлений дальнейшей работы будет расширение описанного в работе подхода по созданию моделей для оценки эффективности ДНК-иммунизации против ВИЧ-1 на другие вирусные, а также опухолевые антигены. Кроме того, планируется использовать полученные в ходе работы производные клеточной линии 4T1luc2 для изучения патогенеза, связанного с конститутивной продукцией вирусных белков клетками при хронической вирусной инфекции.

Важной задачей дальнейших исследований также является изучение детальных аспектов иммунного ответа, связанного с предотвращением опухолевого роста субклонов 4T1luc2, экспрессирующих антигены ВИЧ-1.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- А.о. аминокислотный остаток
- АРТ антиретровирусная терапия
- АФК активные формы кислорода
- БСА бычий сывороточный альбумин
- ВААРТ высокоактивная антиретровирусная терапия
- ВГВ вирус гепатита В
- ВГС вирус гепатита С
- ВИЧ вирус иммунидефицита человека
- ВОЗ всемирная организация здравоохранения
- ВПЧ вирус папилломы человека
- ВПЧ ВКР вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска
- ВЭБ вирус Эпштейна-Барр
- ГЦК гепатоцеллюлярная карцинома
- ИЛ интерлейкин
- ИФА иммуноферментный анализ
- ИФН интерферон
- КонА конканавалин А
- кДа килодальтон
- ЛУ лекарственная устойивость, лекарственно устойчивый
- Т.Е. трансфорирующая единица
- ЦТЛ цитотоксические лимфоциты
- BLI bioluminescent imaging (мониторинг биолюминесценции)

ССR5 – С-С chemokine receptor type 5 (С-С-рецептор хемокина 5)

E. coli – Escherichia coli

EMT – epithelial to mesenchymal transition (эпителиально-мезенхимальный переход)

FDA – food and drug administration (управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств)

FFPE – formalin fixed paraffin embedded (фиксированные в формалине и залитые в парафиновые блоки)

GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)

HLA – human leukocyte antigens (человеческие лейкоцитарные антигены)

hpf – high power field (поля зрения при высоком увеличении)

HRP – horse radish peroxidase (пероксидаза хрена)

IN – integrase (интеграза)

INSTI – integrase strand transfer inhibitor (ингибитор переноса цепи интегразой)

IVIS – in vivo imaging system (система in vivo визуализации)

MVA – Modified Vaccinia Ankara (модифицированный вирус осповакцины Анкара)

NNRTI – non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы)

NRTI – nucleosede reverse transcriptase inhibitors (нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы)

NYVAC – nonreplicating attenuated poxvirus vector (нереплицирующийся ослабленный поксвирусный вектор)

OD – optical density (оптическая плотность)

PBMC – periferal blood mononuclear cells (периферические мононуклеарные клетки крови)

PBS – phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер)

PI – protease inhibitor (ингибитор протеазы)

PR – protease, протеаза

RT – reverse transcriptase; обратная транскриптаза

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информационный бюллетень ВОЗ по ВИЧ инфекции. – Режим доступа: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids (дата обращения: 12.02.2023). – [Электронный ресурс].

2. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2021 г. – Режим доступа: http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf (дата обращения: 12.02.2023). – [Электронный ресурс].

3. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. – Режим доступа: https://covid19.who.int/ (дата обращения: 12.02.2023). – [Электронный ресурс].

4. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2018 г. – Режим доступа: http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2019/05/VICH-infektsiya-v-Rossijskoj-Federatsii-za-2018-g..pdf (дата обращения: 12.02.2023). – [Электронный ресурс].

5. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2019 г. – Режим доступа: http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2020/02/VICH-infektsiya-v-Rossijskoj-Federatsii-na-31.12.2019.pdf (дата обращения: 12.02.2023). – [Электронный ресурс].

6. Sukhanova, A.L. [Protease and reverse transcriptase genetic polymorphism in HIV type 1 subtype A variants predominating in cis countries] / A.L. Sukhanova, E.V. Bogoslovskaia, A.I. Kruglova  $[\mu \text{ др.}]$  // Molekuliarnaia Biologiia. – 2005. – T. 39. – Nº 6. – C. 1063-1071.

7. Российская база данных, ЛУ ВИЧ у наивных пациентов. – Режим доступа: https://hivresist.ru/dokuments/ (дата обращения: 27.02.2023). – [Электронный ресурс].

8. Fanales-Belasio, E. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview / E. Fanales-Belasio, M. Raimondo, B. Suligoi, S. Buttò // Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita. – 2010. – T. 46. – HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection. –  $N_{2}$  1. – C. 5-14. DOI: 10.4415/ANN\_10\_01\_02.

9. Shchemelev, A.N. Detection of Patient HIV-1 Drug Resistance Mutations in Russia's Northwestern Federal District in Patients with Treatment Failure / A.N. Shchemelev, Y.V. Ostankova, E.B. Zueva  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Diagnostics. – 2022. – Vol. 12. – No 8. – P. 1821. DOI: 10.3390/diagnostics12081821.

10. Freed, E.O. Human immunodeficiency viruses: replication / E.O. Freed, M.A. Martin // Fields virology. – 2013. – T. 6. – C. 1502-1560.

11. Kazennova, E. HIV-1 Genetic Variants in the Russian Far East / E. Kazennova, V. Laga, I. Lapovok [и др.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2014. – Vol. 30. – № 8. – Р. 742-752. DOI: 10.1089/aid.2013.0194.

12. Baryshev, P.B. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia / P.B. Baryshev, V.V. Bogachev, N.M. Gashnikova // Archives of Virology. – 2012. – Vol. 157. – № 12. – P. 2335-2341. DOI: 10.1007/s00705-012-1442-4.

13. Kirichenko, A.A. PREVALENCE AND STRUCTURE OF HIV-1 DRUG RESISTANCE AMONG TREATMENT NAÏVE PATIENTS SINCE THE INTRODUCTION OF ANTIRETROVIRAL THERAPY IN THE RUSSIAN FEDERATION / A.A. Kirichenko, D.E. Kireev, A.E. Lopatukhin [и др.] // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. – 2019. – Т. 11. – № 2. – С. 75-83. DOI: 10.22328/2077-9828-2019-11-2-75-83.

14. Bobkova, M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR / M. Bobkova // AIDS reviews.  $-2013. - T. 15. - N_{2} 4. - C. 204-212.$ 

15. Levy, J.A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection / J.A. Levy // Microbiological Reviews. – 1993. – Vol. 57. – № 1. – P. 183-289. DOI: 10.1128/mr.57.1.183-289.1993.

16. Schröder, A.R.W. HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots / A.R.W. Schröder, P. Shinn, H. Chen  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Cell. – 2002. – Vol. 110. – No 4. – P. 521-529. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00864-4.

17. Joag, S.V. Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells, and AIDS / S.V. Joag, I. Adany, Z. Li  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Journal of Virology. – 1997. – Vol. 71. – Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease. – No 5. – P. 4016-4023. DOI: 10.1128/jvi.71.5.4016-4023.1997.

18. Bosch, M.L. Infection of Macaca nemestrina neonates with HIV-1 via different routes of inoculation: / M.L. Bosch, A. Schmidt, M.B. Agy  $[\mu \ \text{дp.}]$  // AIDS. – 1997. – Vol. 11. – Infection of Macaca nemestrina neonates with HIV-1 via different routes of inoculation. – No 13. – P. 1555-1563. DOI: 10.1097/00002030-199713000-00003.

19. Carias, A.M. Defining the Interaction of HIV-1 with the Mucosal Barriers of the Female Reproductive Tract / A.M. Carias, S. McCoombe, M. McRaven [и др.] // Journal of Virology. – 2013. – Vol. 87. – № 21. – Р. 11388-11400. DOI: 10.1128/JVI.01377-13.

20. Dinh, T.-H. Impact of Maternal HIV Seroconversion during Pregnancy on Early Mother to Child Transmission of HIV (MTCT) Measured at 4-8 Weeks Postpartum in South Africa 2011-2012: A National Population-Based Evaluation / T.-H. Dinh, K.P. Delaney, A. Goga [ $\mu$  др.] // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – Impact of Maternal HIV Seroconversion during Pregnancy on Early Mother to Child Transmission of HIV (MTCT) Measured at 4-8 Weeks Postpartum in South Africa 2011-2012. –  $N_{\rm P}$  5. – P. e0125525. DOI: 10.1371/journal.pone.0125525.

21. Girard, M. Genital Infection of Female Chimpanzees with Human Immunodeficiency Virus Type 1 / M. Girard, J. Mahoney, Q. Wei  $[\mu \ \text{дp.}]$  // AIDS Research and Human Retroviruses. – 1998. – Vol. 14. – No 15. – P. 1357-1367. DOI: 10.1089/aid.1998.14.1357.

22. Brune, K.A. HIV Impairs Lung Epithelial Integrity and Enters the Epithelium to Promote Chronic Lung Inflammation / K.A. Brune, F. Ferreira, P. Mandke [ $\mu$  др.] // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – No 3. – P. e0149679. DOI: 10.1371/journal.pone.0149679.

23. Liu, R. HIV Infection in Gastric Epithelial Cells / R. Liu, L. Huang, J. Li [и др.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 208. – № 8. – Р. 1221-1230. DOI: 10.1093/infdis/jit314.

24. Asin, S.N. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Human Uterine Epithelial Cells: Viral Shedding and Cell Contact–Mediated Infectivity / S.N. Asin, D. Wildt-Perinic, S.I. Mason [ $\mu \ \mu$ p.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 187. – Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Human Uterine Epithelial Cells. – Nº 10. – P. 1522-1533. DOI: 10.1086/374782.

25. Aiken, C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the

requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A / C. Aiken // Journal of Virology.  $-1997. - Vol. 71. - N_{\odot} 8. - P. 5871-5877. DOI: 10.1128/jvi.71.8.5871-5877.1997.$ 

26. King, B. Pseudotypes: your flexible friends / B. King, J. Daly // Future Microbiology. – 2014. – Vol. 9. – Pseudotypes. – № 2. – P. 135-137. DOI: 10.2217/fmb.13.156.

27. Tang, Y. Infection of Female Primary Lower Genital Tract Epithelial Cells after Natural Pseudotyping of HIV-1: Possible Implications for Sexual Transmission of HIV-1 / Y. Tang, A. George, F. Nouvet  $[\mu \text{ др.}]$  // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – Infection of Female Primary Lower Genital Tract Epithelial Cells after Natural Pseudotyping of HIV-1. –  $N \ge 7$ . – P. e101367. DOI: 10.1371/journal.pone.0101367.

28. Tang, Y. Endogenous Retroviral Envelope Syncytin Induces HIV-1 Spreading and Establishes HIV Reservoirs in Placenta / Y. Tang, B.O. Woodward, L. Pastor [и др.] // Cell Reports. – 2020. – Vol.  $30. - N_{\text{0}}$  13. – P. 4528-4539.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.03.016.

29. Devadoss, D. Lung Bronchial Epithelial Cells are HIV Targets for Proviral Genomic Integration / D. Devadoss, S.P. Singh, A. Acharya, [и др.]. – Physiology, 2020. – Mode of access: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.06.01.126821 (date of access: 10.03.2023). – [Electronic resource].

30. Ganor, Y. Within 1 h, HIV-1 uses viral synapses to enter efficiently the inner, but not outer, foreskin mucosa and engages Langerhans–T cell conjugates / Y. Ganor, Z. Zhou, D. Tudor  $[\mu \ \text{дp.}] //$  Mucosal Immunology. – 2010. – Vol. 3. – Nº 5. – P. 506-522. DOI: 10.1038/mi.2010.32.

31. Hladik, F. Initial Events in Establishing Vaginal Entry and Infection by Human Immunodeficiency Virus Type-1 / F. Hladik, P. Sakchalathorn, L. Ballweber [ $\mu \ \text{дp.}$ ] // Immunity. – 2007. – Vol. 26. – No 2. – P. 257-270. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.01.007.

32. Maher, D. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue / D. Maher, X. Wu, T. Schacker [ $\mu \ \mu p$ .] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 102. – No 32. – P. 11504-11509. DOI: 10.1073/pnas.0500848102.

33. Zhou, Z. HIV-1 Efficient Entry in Inner Foreskin Is Mediated by Elevated CCL5/RANTES that Recruits T Cells and Fuels Conjugate Formation with Langerhans Cells / Z. Zhou, N. Barry de Longchamps, A. Schmitt [ $\mu$  др.] // PLoS Pathogens. – 2011. – Vol. 7. – Nº 6. – P. e1002100. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002100.

34. Stoddard, E. gp340 Promotes Transcytosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Genital Tract-Derived Cell Lines and Primary Endocervical Tissue / E. Stoddard, H. Ni, G. Cannon [и др.] // Journal of Virology. – 2009. – Vol. 83. – № 17. – P. 8596-8603. DOI: 10.1128/JVI.00744-09.

35. Kohlstaedt, L.A. Crystal Structure at 3.5 Å Resolution of HIV-1 Reverse Transcriptase Complexed with an Inhibitor / L.A. Kohlstaedt, J. Wang, J.M. Friedman [и др.] // Science. – 1992. – Vol. 256. – № 5065. – Р. 1783-1790. DOI: 10.1126/science.1377403.

36. Jacobo-Molina, A. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 A resolution shows bent DNA. / A. Jacobo-Molina, J. Ding, R.G. Nanni [ $\mu$  др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1993. – Vol. 90. – No 13. – P. 6320-6324. DOI: 10.1073/pnas.90.13.6320.

37. Mansky, L.M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase / L.M. Mansky, H.M. Temin // Journal of Virology.  $-1995. - Vol. 69. - N_{2} 8. - P. 5087-5094.$  DOI: 10.1128/jvi.69.8.5087-5094.1995.

38. Abram, M.E. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication / M.E. Abram, A.L. Ferris, W. Shao  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Journal of Virology. – 2010. – Vol. 84. – Nº 19. – P. 9864-9878. DOI: 10.1128/JVI.00915-10.

39. Engelman, A. Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro / A. Engelman, R. Craigie // Journal of Virology. – 1992. – Vol. 66. – № 11. – P. 6361-6369. DOI: 10.1128/jvi.66.11.6361-6369.1992.

40. Craigie, R. Nucleoprotein Intermediates in HIV-1 DNA Integration: Structure and Function of HIV-1 Intasomes / R. Craigie. – [Электронный ресурс] // Virus Protein and Nucleoprotein Complexes : Subcellular Biochemistry / J.R. Harris, D. Bhella ред. . – Singapore : Springer Singapore, 2018. – T. 88. – Nucleoprotein Intermediates in HIV-1 DNA Integration. – С. 189-210. – Режим доступа: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8456-0\_9 (дата обращения: 10.03.2023).

41. Passos, D.O. Cryo-EM structures and atomic model of the HIV-1 strand transfer complex intasome / D.O. Passos, M. Li, R. Yang [ $\mu \ \text{дp.}$ ] // Science. – 2017. – Vol. 355. – No 6320. – P. 89-92. DOI: 10.1126/science.aah5163.

42. Brik, A. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery / A. Brik, C.-H. Wong // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2003. – T. 1. – HIV-1 protease. – № 1. – C. 5-14. DOI: 10.1039/b208248a.

43. Wlodawer, A. Conserved Folding in Retroviral Proteases: Crystal Structure of Synthetic HIV-1 Protease / A. Wlodawer, M. Miller, M. Jaskólski [и др.] // Science. – 1989. – Vol. 245. – Conserved Folding in Retroviral Proteases. – № 4918. – P. 616-621. DOI: 10.1126/science.2548279.

44. Lapatto, R. X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes / R. Lapatto, T. Blundell, A. Hemmings [ $\mu$  др.] // Nature. – 1989. – Vol. 342. – № 6247. – P. 299-302. DOI: 10.1038/342299a0.

45. Ghosh, A.K. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS / A.K. Ghosh, H.L. Osswald, G. Prato // Journal of Medicinal Chemistry. -2016. - Vol. 59. - No 11. - P. 5172-5208. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01697.

46. Fischl, M.A. The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex / M.A. Fischl, D.D. Richman, M.H. Grieco [ $\mu \ \mu p$ .] // New England Journal of Medicine. – 1987. – Vol. 317. – Nº 4. – P. 185-191. DOI: 10.1056/NEJM198707233170401.

47. Mitsuya, H. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. / H. Mitsuya, K.J. Weinhold, P.A. Furman [ $\mu \ \text{дp.}$ ] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1985. – Vol. 82. – 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U). – Nº 20. – P. 7096-7100. DOI: 10.1073/pnas.82.20.7096.

48. Урываев, Л. ВИЧ-инфекция вызов человечеству. Есть ли шансы победить заболевание? / Л. Урываев, М. Бобкова, И. Лаповок // Вопросы вирусологии. – 2012. – № S1. – C. 104-126.

49. Pau, A.K. Antiretroviral Therapy / A.K. Pau, J.M. George // Infectious Disease Clinics of North America. – 2014. – Vol. 28. – № 3. – P. 371-402. DOI: 10.1016/j.idc.2014.06.001.

50. Johnson, V.A. Two-Drug Combinations of Zidovudine, Didanosine, and Recombinant Interferon- A Inhibit Replication of Zidovudine-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Synergistically In Vitro / V.A. Johnson, D.P. Merrill, J.A. Videler [ $\mu \ \mu p$ .] // Journal of Infectious Diseases. – 1991. – Vol. 164. – Nº 4. – P. 646-655. DOI: 10.1093/infdis/164.4.646.

51. Hicks, C. Raltegravir: The First HIV Type 1 Integrase Inhibitor / C. Hicks, R.M. Gulick // Clinical Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 48. – Raltegravir. – № 7. – P. 931-939. DOI: 10.1086/597290.

52. Lederman, M.M. Immunologic Responses Associated with 12 Weeks of Combination Antiretroviral Therapy Consisting of Zidovudine, Lamivudine, and Ritonavir: Results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315 / M.M. Lederman, E. Connick, A. Landay [ $\mu$  др.] // Journal of Infectious Diseases. – 1998. – Vol. 178. – Immunologic Responses Associated with 12 Weeks of Combination Antiretroviral Therapy Consisting of Zidovudine, Lamivudine, and Ritonavir. – N 1. – P. 70-79. DOI: 10.1086/515591.

53. Воронин, Е. Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у взрослых» / Е. Воронин, И. Латышева, В. Розенберг, [и др.]. – 2020.

54. Cígler, P. From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: Metallacarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease / P. Cígler, M. Kožíšek, P. Řezáčová [ $\mu \ \mu p$ .] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 102. – From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors. – No 43. – P. 15394-15399. DOI: 10.1073/pnas.0507577102.

55. Engelman, A.N. Multifaceted HIV integrase functionalities and therapeutic strategies for their inhibition / A.N. Engelman // Journal of Biological Chemistry. – 2019. – Vol. 294. – № 41. – P. 15137-15157. DOI: 10.1074/jbc.REV119.006901.

56. Zyl, G. van. HIV evolution and diversity in ART-treated patients / G. van Zyl, M.J. Bale, M.F. Kearney // Retrovirology. -2018. - Vol. 15. - No 1. - P. 14. DOI: 10.1186/s12977-018-0395-4.

57. Kuznetsova, A. The efficacy of first-line ART regimens based on RPV in HIV-infected patients with pre-existing E138A mutation in reverse transcriptase / A. Kuznetsova, A. Lebedev, K. Gromov, [и др.]. – In Review, 2021. – Режим доступа: https://www.researchsquare.com/article/rs-402978/v1 (дата обращения: 24.05.2023). – [Электронный ресурс].

58. Kirichenko, A. HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia: Analysis of the National Database, 2006–2022 / A. Kirichenko, D. Kireev, I. Lapovok [и др.] // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – HIV-1 Drug Resistance among Treatment-Naïve Patients in Russia. – № 4. – P. 991. DOI: 10.3390/v15040991.

59. Lebedeva, N.N. HIV DRUG RESISTANCE EARLY WARNING INDICATORS AND THEIR ASSESSMENT IN SOME REGIONS OF RUSSIA / N.N. Lebedeva, S.Ya. Zverev, V.V. Kulagin [ $\mu$  др.] // HIV Infection and Immunosuppressive Disorders. – 2019. – T. 10. –  $N_{2}$  4. – C. 67-75. DOI: 10.22328/2077-9828-2018-10-4-67-75.

60. Klundert, M.A.A. van de. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Eastern Europe and Russia / M.A.A. van de Klundert, A. Antonova, G. Di Teodoro  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Viruses. – 2022. – Vol. 14. –  $N_{2}$  10. – P. 2099. DOI: 10.3390/v14102099.

61. Kolomeets, A.N. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses / A.N. Kolomeets, V. Varghese, P. Lemey [и др.] // AIDS. – 2014. – Vol. 28. – № 17. – P. F1-F8. DOI: 10.1097/QAD.0000000000485.

62. Schlösser, M. HIV-1 Sub-Subtype A6: Settings for Normalised Identification and Molecular Epidemiology in the Southern Federal District, Russia / M. Schlösser, V.V. Kartashev, V.H. Mikkola [ $\mu$  др.] // Viruses. – 2020. – Vol. 12. – HIV-1 Sub-Subtype A6. – Nº 4. – P. 475. DOI: 10.3390/v12040475.

63. Turner, D. The influence of protease inhibitor resistance profiles on selection of HIV therapy in treatment-naive patients / D. Turner, J.M. Schapiro, B.G. Brenner, M.A. Wainberg // Antiviral Therapy.  $-2004. - T. 9. - N_{\odot} 3. - C. 301-314.$ 

64. Todd, M.J. Thermodynamic Basis of Resistance to HIV-1 Protease Inhibition: Calorimetric Analysis of the V82F/I84V Active Site Resistant Mutant / M.J. Todd, I. Luque, A. Velázquez-Campoy, E. Freire // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – Thermodynamic Basis of Resistance to HIV-1 Protease Inhibition. – N 39. – P. 11876-11883. DOI: 10.1021/bi001013s.

65. Goldfarb, N.E. Defective Hydrophobic Sliding Mechanism and Active Site Expansion in HIV-1 Protease Drug Resistant Variant Gly48Thr/Leu89Met: Mechanisms for the Loss of Saquinavir Binding Potency / N.E. Goldfarb, M. Ohanessian, S. Biswas  $[\mu \ дp.]$  // Biochemistry. – 2015. – Vol. 54. – Defective Hydrophobic Sliding Mechanism and Active Site Expansion in HIV-1 Protease Drug Resistant Variant Gly48Thr/Leu89Met. – No 2. – P. 422-433. DOI: 10.1021/bi501088e.

66. Tzou, P.L. Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)-resistance mutations for the surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance / P.L. Tzou, S.-Y. Rhee, D. Descamps [и др.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2020. – Vol. 75. – N 1. – P. 170-182. DOI: 10.1093/jac/dkz417.

67. Yu, F. Drug Resistance to HIV-1 Integrase Inhibitors Among Treatment-Naive Patients in Beijing, China / F. Yu, Q. Li, L. Wang [идр.] // Pharmacogenomics and Personalized Medicine. – 2022. – Vol. Volume 15. – P. 195-203. DOI: 10.2147/PGPM.S345797.

68. Kirichenko, A. Genetic Features of HIV-1 Integrase Sub-Subtype A6 Predominant in Russia and Predicted Susceptibility to INSTIs / A. Kirichenko, I. Lapovok, P. Baryshev [и др.] // Viruses. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – Р. 838. DOI: 10.3390/v12080838.

69. Shtrek, S. Prevalence and Spectrum of HIV-1 Resistance Mutations in the Siberian Federal District / S. Shtrek, L. Levakhina, A. Blokh [и др.] // Viruses. – 2022. – Vol. 14. – № 10. – Р. 2117. DOI: 10.3390/v14102117.

70. Quinn, T.C. HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences / T.C. 2008. Vol. 22. № Suppl P. S7-S12. Quinn // AIDS. \_ \_ \_ 3. DOI: \_ 10.1097/01.aids.0000327510.68503.e8.

71. Houser, K.V. Safety and immunogenicity of an HIV-1 prefusion-stabilized envelope trimer (Trimer 4571) vaccine in healthy adults: A first-in-human open-label, randomized, dose-escalation, phase 1 clinical trial / K.V. Houser, M.R. Gaudinski, M. Happe  $[\mu \ дp.]$  // eClinicalMedicine. – 2022. – Vol. 48. – Safety and immunogenicity of an HIV-1 prefusion-stabilized envelope trimer (Trimer 4571) vaccine in healthy adults. – P. 101477. DOI: 10.1016/j.eclinm.2022.101477.

72. Rerks-Ngarm, S. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand / S. Rerks-Ngarm, P. Pitisuttithum, S. Nitayaphan [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 361. – № 23. – P. 2209-2220. DOI: 10.1056/NEJMoa0908492.

 73.
 Clinical
 trials
 NCT01931358.
 –
 Режим
 доступа:

 https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01931358
 (дата обращения:
 23.01.2023).
 –
 [Электронный ресурс].

74. Clinical trials NCT04066881. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04066881 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

75. Clinical trials NCT04120415. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04120415 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

76. Jackson, L.A. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report / L.A. Jackson, E.J. Anderson, N.G. Rouphael [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 383. – № 20. – Р. 1920-1931. DOI: 10.1056/NEJMoa2022483.

77. Clinical trials NCT03699241. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03699241 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

78. Clinical trials NCT04224701. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04224701 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

79. Clinical trials NCT04985760. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04985760 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

80. Clinical trials NCT03878121. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03878121 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

81. Chu, L. A preliminary report of a randomized controlled phase 2 trial of the safety and immunogenicity of mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine / L. Chu, R. McPhee, W. Huang [и др.] // Vaccine. – 2021. – Vol. 39. – № 20. – Р. 2791-2799. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.02.007.

82. Zhu, F.-C. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial / F.-C. Zhu, X.-H. Guan, Y.-H. Li  $[\mu \ дp.]$  // The Lancet. – 2020. – Vol. 396. – Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older. – Nº 10249. – P. 479-488. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31605-6.

83. Emary, K.R.W. Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial / K.R.W. Emary, T. Golubchik, P.K. Aley [ $\mu$  др.] // The Lancet. – 2021. – Vol. 397. – Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7). – Nº 10282. – P. 1351-1362. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00628-0.

84. Logunov, D.Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D.Y. Logunov, I.V. Dolzhikova, D.V. Shcheblyakov [ $\mu$  др.] // The Lancet. – 2021. – Vol. 397. – Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine. – Nº 10275. – P. 671-681. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.

85. Clinical trials NCT05217641. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05217641 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

86. Clinical trials NCT05001373. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05001373 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

87. Clinical trials NCT05414786. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05414786 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

88. Clinical trials NCT04927585. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04927585 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

89. Clinical trials NCT04826094. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04826094 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

90. Clinical trials NCT02935686. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02935686 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

91. Clinical trials NCT04553016. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04553016 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

92. Clinical trials NCT04725877. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04725877 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

93. Pant Pai, N. Structured treatment interruptions (STI) in chronic unsuppressed HIV infection in adults / N. Pant Pai, J. Lawrence, A.L. Reingold, J.P. Tulsky. – [Electronic resource] // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2006. – Mode of access: https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006148 (date of access: 10.03.2023).

94. Haidari, G. The Safety and Immunogenicity of GTU®MultiHIV DNA Vaccine Delivered by Transcutaneous and Intramuscular Injection With or Without Electroporation in HIV-1 Positive Subjects on Suppressive ART / G. Haidari, S. Day, M. Wood [и др.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – T. 10. – C. 2911. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02911.

95. Casazza, J.P. Therapeutic Vaccination Expands and Improves the Function of the HIV-Specific Memory T-Cell Repertoire / J.P. Casazza, K.A. Bowman, S. Adzaku [и др.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 207. – № 12. – Р. 1829-1840. DOI: 10.1093/infdis/jit098.

96. Rosenberg, E.S. Safety and Immunogenicity of Therapeutic DNA Vaccination in Individuals Treated with Antiretroviral Therapy during Acute/Early HIV-1 Infection / E.S. Rosenberg, B.S. Graham, E.S. Chan  $[\mu \ \text{дp.}]$  // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. –  $N_{\text{D}}$  5. – P. e10555. DOI: 10.1371/journal.pone.0010555.

97. Macgregor, R. Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results in enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral ?blips? / R. Macgregor, J. Boyer, K. Ugen [ $\mu$  др.] // Vaccine. – 2005. – Vol. 23. – Plasmid vaccination of stable HIV-positive subjects on antiviral treatment results in enhanced CD8 T-cell immunity and increased control of viral ?– No 17-18. – P. 2066-2073. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.010.

98. Clinical trials NCT05208125. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05208125 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

99. Clinical trials NCT05604209. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05604209 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

100. Clinical trials NCT04983030. – Режим доступа: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04983030 (дата обращения: 23.01.2023). – [Электронный ресурс].

101. Boberg, A. Vaccination against drug resistance in HIV infection / A. Boberg, M. Isaguliants // Expert Review of Vaccines. -2008. -Vol. 7.  $-N_{2} 1$ . -P. 131-145. DOI: 10.1586/14760584.7.1.131.

102. Karlsson, A.C. Dual Pressure from Antiretroviral Therapy and Cell-Mediated Immune Response on the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Gene / A.C. Karlsson, S.G. Deeks, J.D. Barbour [идр.] // Journal of Virology. – 2003. – Vol. 77. – № 12. – Р. 6743-6752. DOI: 10.1128/JVI.77.12.6743-6752.2003.

103. Mueller, S.M. Influence of Major HIV-1 Protease Inhibitor Resistance Mutations on CTL Recognition / S.M. Mueller, B.M. Spriewald, S. Bergmann [и др.] // JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2011. – Vol. 56. – № 2. – Р. 109-117. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181fe946e.

104. Gatanaga, H. Naturally Selected Rilpivirine-Resistant HIV-1 Variants by Host Cellular Immunity / H. Gatanaga, H. Murakoshi, A. Hachiya [и др.] // Clinical Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 57. – № 7. – Р. 1051-1055. DOI: 10.1093/cid/cit430.

105. Frese, K.K. Maximizing mouse cancer models / K.K. Frese, D.A. Tuveson // Nature Reviews Cancer.  $-2007. - Vol. 7. - N_{2} 9. - P. 654-658$ . DOI: 10.1038/nrc2192.

106. Wei, T. An Infection-Based Murine Model for Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer / T. Wei, D. Buehler, E. Ward-Shaw, P.F. Lambert // mBio. – 2020. – Vol. 11. – № 3. – P. e00908-20. DOI: 10.1128/mBio.00908-20.

107. Spurgeon, M.E. Sexual transmission of murine papillomavirus (MmuPV1) in Mus musculus / M.E. Spurgeon, P.F. Lambert // eLife. – 2019. – Vol. 8. – P. e50056. DOI: 10.7554/eLife.50056.

108. Yu, L. Mouse papillomavirus type 1 (MmuPV1) DNA is frequently integrated in benign tumors by microhomology-mediated end-joining / L. Yu, V. Majerciak, X.-Y. Xue [ $\mu$  др.] // PLOS Pathogens. – 2021. – Vol. 17. – No 8. – P. e1009812. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009812.

109. Liang, X. Murine Gamma-herpesvirus Immortalization of Fetal Liver-Derived B Cells Requires both the Viral Cyclin D Homolog and Latency-Associated Nuclear Antigen / X. Liang, C.R. Paden, F.M. Morales [и др.] // PLoS Pathogens. – 2011. – Vol. 7. – № 9. – P. e1002220. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002220.

110. Ahmed, E.H. Murine Models of Epstein-Barr Virus–Associated Lymphomagenesis / E.H. Ahmed, R.A. Baiocchi // ILAR Journal. – 2016. – Vol. 57. – № 1. – P. 55-62. DOI: 10.1093/ilar/ilv074.

111. Boberg, A. Murine models for HIV vaccination and challenge / A. Boberg, A. Bråve, S. Johansson [и др.] // Expert Review of Vaccines. – 2008. – Vol. 7. – № 1. – Р. 117-130. DOI: 10.1586/14760584.7.1.117.

112. Tukhvatulin, A.I. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-human primates / A.I. Tukhvatulin, I.V. Gordeychuk, I.V. Dolzhikova [ $\mu \ дp$ .] // Emerging Microbes & Infections. – 2022. – Vol. 11. – Nº 1. – P. 2229-2247. DOI: 10.1080/22221751.2022.2119169.

113. Winkler, E.S. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function / E.S. Winkler, A.L. Bailey, N.M. Kafai [ $\mu$  др.] // Nature Immunology. – 2020. – Vol. 21. – Nº 11. – P. 1327-1335. DOI: 10.1038/s41590-020-0778-2.

114. Li, H. HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP / H. Li, Q. Zhuang, Y. Wang  $[\mu \text{ др.}]$  // Cellular & Molecular Immunology. – 2014. – Vol. 11. – No 2. – P. 175-183. DOI: 10.1038/cmi.2013.66.

115. Dorner, M. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection / M. Dorner, J.A. Horwitz, J.B. Robbins  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Nature. – 2011. – Vol. 474. – No 7350. – P. 208-211. DOI: 10.1038/nature10168.

116. Burm, R. Animal Models to Study Hepatitis C Virus Infection / R. Burm, L. Collignon, A.A. Mesalam, P. Meuleman // Frontiers in Immunology. – 2018. – T. 9. – C. 1032. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01032.

117. Masemann, D. Advances in Transgenic Mouse Models to Study Infections by Human Pathogenic Viruses / D. Masemann, S. Ludwig, Y. Boergeling // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 23. – P. 9289. DOI: 10.3390/ijms21239289.

118. Inuzuka, T. Mouse Models of Hepatitis B Virus Infection Comprising Host-Virus Immunologic Interactions / T. Inuzuka, K. Takahashi, T. Chiba, H. Marusawa // Pathogens. – 2014. – Vol. 3. – № 2. – P. 377-389. DOI: 10.3390/pathogens3020377.

119. Li, Y.-T. Molecular Mechanisms and Animal Models of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma: With Emphasis on Metastatic Tumor Antigen 1 / Y.-T. Li, H.-L. Wu, C.-J. Liu // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – Molecular Mechanisms and Animal Models of HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. – № 17. – P. 9380. DOI: 10.3390/ijms22179380.

120. Liu, Y. Animal Models of Hepatitis B Virus Infection–Success, Challenges, and Future Directions / Y. Liu, S. Maya, A. Ploss // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – № 5. – P. 777. DOI: 10.3390/v13050777.

121. Leonard, J.M. Development of Disease and Virus Recovery in Transgenic Mice Containing HIV Proviral DNA / J.M. Leonard, J.W. Abramczuk, D.S. Pezen [и др.] // Science. – 1988. – Vol. 242. – № 4886. – Р. 1665-1670. DOI: 10.1126/science.3201255.

122. Goudreau, G. Vacuolar myelopathy in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins under the regulation of the myelin basic protein gene promoter / G. Goudreau, S. Carpenter, N. Beaulieu, P. Jolicoeur // Nature Medicine. – 1996. – Vol. 2. – N $_{2}$  6. – P. 655-661. DOI: 10.1038/nm0696-655.

123. Vogel, J. The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice / J. Vogel, S.H. Hinrichs, R.K. Reynolds [и др.] // Nature. – 1988. – Vol. 335. – № 6191. – Р. 606-611. DOI: 10.1038/335606a0.

124. Brady, H.J. Altered cytokine expression in T lymphocytes from human immunodeficiency virus Tat transgenic mice / H.J. Brady, D.J. Abraham, D.J. Pennington [и др.] // Journal of Virology. – 1995. – Vol. 69. – № 12. – Р. 7622-7629. DOI: 10.1128/jvi.69.12.7622-7629.1995.

125. Murakami, M. Tumorigenesis of Epstein–Barr Virus-Positive Epithelial Cell Lines Derived from Gastric Tissues in the SCID Mouse / M. Murakami, Y. Hoshikawa, Y. Satoh [и др.] // Virology. – 2000. – Vol. 277. – № 1. – Р. 20-26. DOI: 10.1006/viro.2000.0602.

126. Dubich, T. An endothelial cell line infected by Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV) allows the investigation of Kaposi's sarcoma and the validation of novel viral inhibitors in vitro and in vivo / T. Dubich, A. Lieske, S. Santag [ $\mu \ \mu p$ .] // Journal of Molecular Medicine. – 2019. – Vol. 97. – No 3. – P. 311-324. DOI: 10.1007/s00109-018-01733-1.

127. Fujii, E. Characterization of EBV-related Lymphoproliferative Lesions Arising in Donor Lymphocytes of Transplanted Human Tumor Tissues in the NOG Mouse / E. Fujii, A. Kato, Y.J. Chen  $[\mu \text{ др.}]$  // Experimental Animals. – 2014. – Vol. 63. – No 3. – P. 289-296. DOI: 10.1538/expanim.63.289.

128. Bondarenko, G. Patient-Derived Tumor Xenografts Are Susceptible to Formation of Human Lymphocytic Tumors / G. Bondarenko, A. Ugolkov, S. Rohan [и др.] // Neoplasia. – 2015. – Vol. 17. – N 9. – P. 735-741. DOI: 10.1016/j.neo.2015.09.004.

129. Tanaka, T. Patient-Derived Xenograft Models in Cervical Cancer: A Systematic Review / T. Tanaka, R. Nishie, S. Ueda  $[\mu \ \text{gp.}]$  // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – Patient-Derived Xenograft Models in Cervical Cancer. – No 17. – P. 9369. DOI: 10.3390/ijms22179369.

130. Liu, J. Pathological Pattern of Intrahepatic HBV in HCC is Phenocopied by PDX-Derived Mice: a Novel Model for Antiviral Treatment / J. Liu, S. Chen, Z. Zou  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Translational Oncology. – 2019. – Vol. 12. – Pathological Pattern of Intrahepatic HBV in HCC is Phenocopied by PDX-Derived Mice. – No 9. – P. 1138-1146. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.05.006.

131. Nazzal, M. Establishment of a Patient-Derived Xenograft Tumor From Hepatitis C–Associated Liver Cancer and Evaluation of Imatinib Treatment Efficacy / M. Nazzal, S. Sur, R. Steele [и др.] // Hepatology. – 2020. – Vol. 72. – № 2. – Р. 379-388. DOI: 10.1002/hep.31298.

132. Ilan, E. The hepatitis B virus-trimera mouse: A model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents / E. Ilan, T. Burakova, S. Dagan  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Hepatology. – 1999. – Vol. 29. – The hepatitis B virus-trimera mouse. –  $\mathbb{N}$  2. – P. 553-562. DOI: 10.1002/hep.510290228.

133. Malaney, P. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy / P. Malaney, S.V. Nicosia, V. Davé // Cancer Letters. -2014. - Vol. 344. - One mouse, one patient paradigm.  $-N_{\rm P}$  1. - P. 1-12. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.10.010.

134. Hazari, S. Hepatocellular carcinoma xenograft supports HCV replication: A mouse model for evaluating antivirals / S. Hazari // World Journal of Gastroenterology. – 2011. – Vol. 17. – Hepatocellular carcinoma xenograft supports HCV replication. –  $N_{\rm D}$  3. – P. 300. DOI: 10.3748/wjg.v17.i3.300.

135. Meuleman, P. The human liver-uPA-SCID mouse: A model for the evaluation of antiviral compounds against HBV and HCV / P. Meuleman, G. Lerouxroels // Antiviral Research. – 2008. – Vol. 80. – The human liver-uPA-SCID mouse. –  $N_{2}$  3. – P. 231-238. DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.07.006.

136. Ito, M. NOD/SCID/ $\gamma$ cnull mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells / M. Ito, H. Hiramatsu, K. Kobayashi [ $\mu$  др.] // Blood. – 2002. – Vol. 100. – NOD/SCID/ $\gamma$ cnull mouse. – No 9. – P. 3175-3182. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0207.

137. Walsh, N.C. Humanized Mouse Models of Clinical Disease / N.C. Walsh, L.L. Kenney, S. Jangalwe  $[\mu \ дp.]$  // Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. – 2017. – Vol. 12. – No 1. – P. 187-215. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100332.

138. Hatziioannou, T. Animal models for HIV/AIDS research / T. Hatziioannou, D.T. Evans // Nature Reviews Microbiology. – 2012. – Vol. 10. – № 12. – P. 852-867. DOI: 10.1038/nrmicro2911.

139. Brehm, M.A. Humanized mouse models to study human diseases / M.A. Brehm, L.D. Shultz, D.L. Greiner // Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity. – 2010. – Vol. 17. – № 2. – P. 120-125. DOI: 10.1097/MED.0b013e328337282f.

140. Wang, L.-X. Humanized-BLT mouse model of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection / L.-X. Wang, G. Kang, P. Kumar  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Vol. 111. – No 8. – P. 3146-3151. DOI: 10.1073/pnas.1318175111.

141. Ma, S.-D. LMP1-deficient Epstein-Barr virus mutant requires T cells for lymphomagenesis / S.-D. Ma, X. Xu, J. Plowshay [и др.] // Journal of Clinical Investigation. – 2015. – Vol. 125. –  $N_{2}$  1. – P. 304-315. DOI: 10.1172/JCI76357.

142. Gauduin, M.-C. Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1 / M.-C. Gauduin, P.W.H.I. Parren, R. Weir [и др.] // Nature Medicine. – 1997. – Vol. 3. – № 12. – Р. 1389-1393. DOI: 10.1038/nm1297-1389.

143. Parren, P.W.H.I. Protection against HIV-1 infection in hu-PBL-SCID mice by passive immunization with a neutralizing human monoclonal antibody against the gp120 CD4-binding site: / P.W.H.I. Parren, H.J. Ditzel, R.J. Gulizia [ $\mu \ \text{дp.}$ ] // AIDS. – 1995. – Vol. 9. – Protection against HIV-1 infection in hu-PBL-SCID mice by passive immunization with a neutralizing human monoclonal antibody against the gp120 CD4-binding site. – Nº 6. – P. 1-538. DOI: 10.1097/00002030-199506000-00001.

144. Xu, L. Immunization for Ebola virus infection / L. Xu, A. Sanchez, Z.-Y. Yang [и др.] // Nature Medicine. – 1998. – Vol. 4. – № 1. – Р. 37-42. DOI: 10.1038/nm0198-037.

145. Zitvogel, L. Mouse models in oncoimmunology / L. Zitvogel, J.M. Pitt, R. Daillère [и др.] // Nature Reviews Cancer. – 2016. – Vol. 16. – № 12. – Р. 759-773. DOI: 10.1038/nrc.2016.91.

146. 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 [и др.] // Mucosal Immunology. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – Р. 393-404. DOI: 10.1038/mi.2012.83.

147. 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 [ $\mu \ \text{дp.}$ ] // Cell & Bioscience. – 2014. – Vol. 4. – No 1. – P. 11. DOI: 10.1186/2045-3701-4-11.

148. 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. Perez-Trujillo, E. Martinez-Jaramillo [ $\mu$  др.] // Cancers. – 2019. – Vol. 11. – N 1. – P. 96. DOI: 10.3390/cancers11010096.

149. Daemen, T. Superior Therapeutic Efficacy of Alphavirus-Mediated Immunization against Human Papilloma Virus Type 16 Antigens in a Murine Tumour Model: Effects of the Route of Immunization / T. Daemen, A. Riezebos-Brilman, J. Regts [идр.] // Antiviral Therapy. – 2004. – Vol. 9. - Superior Therapeutic Efficacy of Alphavirus-Mediated Immunization against Human Papilloma Virus Murine Tumour Model. Type 16 Antigens in а \_ № 5. \_ P. 733-742. DOI: 10.1177/135965350400900515.

150. Peng, S. Development of DNA Vaccine Targeting E6 and E7 Proteins of Human Papillomavirus 16 (HPV16) and HPV18 for Immunotherapy in Combination with Recombinant Vaccinia Boost and PD-1 Antibody / S. Peng, L. Ferrall, S. Gaillard [и др.] // mBio. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. e03224-20. DOI: 10.1128/mBio.03224-20.

151. 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 [ $\mu$  др.] // Cancer Immunity. – 2007. – T. 7. – C. 2.

152. Smalley Rumfield, C. Immunomodulation to enhance the efficacy of an HPV therapeutic vaccine / C. Smalley Rumfield, S.T. Pellom, Y.M. Morillon Ii  $[\mu \ дp.]$  // Journal for Immunotherapy of Cancer. – 2020. – T. 8. – No 1. – C. e000612. DOI: 10.1136/jitc-2020-000612.

153. 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 [и др.] // International Journal of Cancer. – 1998. – Т. 78. – № 1. – С. 41-45. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19980925)78:1<41::aid-ijc8>3.0.co;2-x.

154. 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 [и др.] // Molecular Cancer Therapeutics. -2015. -Vol. 14.  $-N_{2}$  6. -P. 1336-1345. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1015.

155. Che, Y. Intratumoral Injection of a Human Papillomavirus Therapeutic Vaccine-Induced Strong Anti-TC-1-Grafted Tumor Activity in Mice / Y. Che, Y. Yang, J. Suo [и др.] // Cancer Management and Research. – 2021. – Т. 13. – С. 7339-7354. DOI: 10.2147/CMAR.S329471.

156. Feltkamp, M.C.W. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells / M.C.W. Feltkamp, H.L. Smits, M.P.M. Vierboom [и др.] // European Journal of Immunology. – 1993. – Vol. 23. – № 9. – P. 2242-2249. DOI: 10.1002/eji.1830230929.

157. 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 [и др.] // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – N 2. – P. e0149748. DOI: 10.1371/journal.pone.0149748.

158. 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. – Immunotherapy of HPV-associated cancer. – № 10. – P. 1329-1338. DOI: 10.1007/s00262-015-1734-0.

159. Hoover, A.C. The Role of Human Papillomavirus 16 E6 in Anchorage-Independent and Invasive Growth of Mouse Tonsil Epithelium / A.C. Hoover, W.C. Spanos, G.F. Harris  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery. – 2007. – Vol. 133. – No 5. – P. 495. DOI: 10.1001/archotol.133.5.495.

160. Mermod, M. Mouse model of postsurgical primary tumor recurrence and regional lymph node metastasis progression in HPV-related head and neck cancer: Surgical model of HPV-related head and neck cancer / M. Mermod, A. Hiou-Feige, E. Bovay  $[\mu \text{ др.}]$  // International Journal of Cancer. – 2018. – Vol. 142. – Mouse model of postsurgical primary tumor recurrence and regional lymph node metastasis progression in HPV-related head and neck cancer. – No 12. – P. 2518-2528. DOI: 10.1002/ijc.31240.

161. Vermeer, D.W. Metastatic model of HPV+ oropharyngeal squamous cell carcinoma demonstrates heterogeneity in tumor metastasis / D.W. Vermeer, J.D. Coppock, E. Zeng [ $\mu$  др.] // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – Nº 17. – P. 24194-24207. DOI: 10.18632/oncotarget.8254.

162. Paolini, F. Immunotherapy in new pre-clinical models of HPV-associated oral cancers / F. Paolini, S. Massa, I. Manni  $[\mu \ p.]$  // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2013. – Vol. 9. – No 3. – P. 534-543. DOI: 10.4161/hv.23232.

163. 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 [и др.] // Cancer Prevention Research. – 2023. – P. CAPR-22-0413. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-22-0413.

164. Sun, L. Constructing TC-1-GLUC-LMP2 Model Tumor Cells to Evaluate the Anti-Tumor Effects of LMP2-Related Vaccines / L. Sun, Y. Hao, Z. Wang, Y. Zeng // Viruses. -2018. -Vol. 10.  $-N_{2} 4$ . -P. 145. DOI: 10.3390/v10040145.

165. Hsieh, Y. Electroporation-mediated and EBV LMP1-regulated gene therapy in a syngenic mouse tumor model / Y. Hsieh, C. Wu, K. Chow  $[\mu \ дp.]$  // Cancer Gene Therapy. – 2003. – Vol. 10. – No 8. – P. 626-636. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700609.

166. Zhu, X. DNA immunotherapy targeting BARF1 induces potent anti-tumor responses against Epstein-Barr-virus-associated carcinomas / X. Zhu, A. Perales-Puchalt, K. Wojtak [и др.] // Molecular Therapy - Oncolytics. – 2022. – Vol. 24. – P. 218-229. DOI: 10.1016/j.omto.2021.12.017.

167. Trivedi, P. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus (EBV) encoded growth transformation-associated antigens in a murine model system / P. Trivedi, G. Winberg, G. Klein // European Journal of Cancer. – 1997. – Vol. 33. –  $N_{0.6.}$  – P. 912-917. DOI: 10.1016/S0959-8049(96)00514-X.

168. Gehring, S. Type 1 interferon augments DNA-based vaccination against hepatitis C virus core protein / S. Gehring, S.H. Gregory, N. Kuzushita, J.R. Wands // Journal of Medical Virology. -2005. - Vol. 75.  $- N_{2} 2. - P. 249-257$ . DOI: 10.1002/jmv.20264.

169. Tokushige, K. Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-based vaccine constructs / K. Tokushige, T. Wakita, C. Pachuk [идр.] // Hepatology. – 1996. – Vol. 24. – № 1. – Р. 14-20. DOI: 10.1002/hep.510240104.

170. Encke, J. Genetic immunization generates cellular and humoral immune responses against the nonstructural proteins of the hepatitis C virus in a murine model / J. Encke, J. zu Putlitz, M. Geissler, J.R. Wands // Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950).  $-1998. - T. 161. - N_{2} 9. - C. 4917-4923.$ 

171. Frelin, L. Low dose and gene gun immunization with a hepatitis C virus nonstructural (NS) 3 DNA-based vaccine containing NS4A inhibit NS3/4A-expressing tumors in vivo / L. Frelin, M. Alheim, A. Chen  $[\mu \text{ дp.}]$  // Gene Therapy. – 2003. – Vol. 10. – No 8. – P. 686-699. DOI: 10.1038/sj.gt.3301933.

172. Frelin, L. Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A gene / L. Frelin, G. Ahlén, M. Alheim [ $\mu$  др.] // Gene Therapy. – 2004. – Vol. 11. – Nº 6. – P. 522-533. DOI: 10.1038/sj.gt.3302184.

173. Encke, J. Genetic vaccination with Flt3-L and GM-CSF as adjuvants: Enhancement of cellular and humoral immune responses that results in protective immunity in a murine model of hepatitis C virus infection / J. Encke // World Journal of Gastroenterology. -2006. - Vol. 12. - Genetic vaccination with Flt3-L and GM-CSF as adjuvants.  $-N_{2}$  44. -P. 7118. DOI: 10.3748/wjg.v12.i44.7118.

174. Young, K.G. Development of a recombinant murine tumour model using hepatoma cells expressing hepatitis C virus nonstructural antigens / K.G. Young, K. Haq, S. MacLean [ $\mu \ p$ .] // Journal of Viral Hepatitis. – 2018. – Vol. 25. – Nº 6. – P. 649-660. DOI: 10.1111/jvh.12856.

175. Wei. T lymphocyte responses against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma induced by adenovirus vaccine encoding HBx / Wei. – [Электронный ресурс] // International Journal of Molecular Medicine. – 2010. – Т. 26. – № 6. – Режим доступа: http://www.spandidos-publications.com/ijmm/26/6/869 (дата обращения: 11.03.2023).

176. Moore, P.S. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology / P.S. Moore, Y. Chang // Nature Reviews Cancer. -2010. - Vol. 10. - Why do viruses cause cancer?  $- N_{2} 12$ . - P. 878-889. DOI: 10.1038/nrc2961.

177. Bhatia, S. Immunobiology of Merkel Cell Carcinoma: Implications for Immunotherapy of a Polyomavirus-Associated Cancer / S. Bhatia, O. Afanasiev, P. Nghiem // Current Oncology Reports. – 2011. – Vol. 13. – Immunobiology of Merkel Cell Carcinoma. –  $N_{0.6.}$  – P. 488-497. DOI: 10.1007/s11912-011-0197-5.

178. Gomez, B. Creation of a Merkel cell polyomavirus small T antigen-expressing murine tumor model and a DNA vaccine targeting small T antigen / B. Gomez, L. He, Y.C. Tsai [и др.] // Cell & Bioscience. – 2013. – Vol.  $3. - N_{2} 1. - P. 29$ . DOI: 10.1186/2045-3701-3-29.

179. Peng, J. Non-cytolytic antigen clearance in DNA-vaccinated mice with electroporation / J. Peng, Y. Zhao, J. Mai [и др.] // Acta Pharmacologica Sinica. – 2007. – Vol. 28. – № 7. – Р. 1024-1030. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2007.00591.x.

180. Huang, Y.-H. A murine model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma generated by adeno-associated virus-mediated gene delivery / Y.-H. Huang, C.-C. Fang, K. Tsuneyama [и др.]. – [Электронный ресурс] // International Journal of Oncology. – 2011. – Режим доступа: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2011.1145 (дата обращения: 11.03.2023).

181. Yang, D. A mouse model for HBV immunotolerance and immunotherapy / D. Yang, L. Liu, D. Zhu  $[\mu \ дp.]$  // Cellular & Molecular Immunology. – 2014. – Vol. 11. – No 1. – P. 71-78. DOI: 10.1038/cmi.2013.43.

182. Lang Kuhs, K.A. Peripheral immunization induces functional intrahepatic Hepatitis C specific immunity following selective retention of vaccine-specific CD8 T cells by the liver: Immunization induced intrahepatic HCV-specific immunity / K.A. Lang Kuhs, R. Toporovski, A.A. Ginsberg [и др.] // Human Vaccines. – 2011. – Vol. 7. – Peripheral immunization induces functional intrahepatic Hepatitis C specific immunity following selective retention of vaccine-specific CD8 T cells by the liver. – Nº 12. – P. 1326-1335. DOI: 10.4161/hv.7.12.18279.

183. Lang Kuhs, K.A. Induction of Intrahepatic HCV NS4B, NS5A and NS5B-Specific Cellular Immune Responses following Peripheral Immunization / K.A. Lang Kuhs, R. Toporovski, A.A.

Ginsberg [и др.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e52165. DOI: 10.1371/journal.pone.0052165.

184. Latimer, B. Strong HCV NS3/4a, NS4b, NS5a, NS5b-specific cellular immune responses induced in Rhesus macaques by a novel HCV genotype 1a/1b consensus DNA vaccine / B. Latimer, R. Toporovski, J. Yan [и др.] // Human Vaccines & Immunotherapeutics. -2014. - Vol. 10. - № 8. - P. 2357-2365. DOI: 10.4161/hv.29590.

185. Jacobson, J.M. Phase I Trial of a Therapeutic DNA Vaccine for Preventing Hepatocellular Carcinoma from Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection / J.M. Jacobson, D. Zahrieh, C.A. Strand [и др.] // Cancer Prevention Research. – 2023. – Vol. 16. –  $N_{2}$  3. – P. 163-173. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-22-0217.

186. Potez, M. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice / M. Potez, V. Trappetti, A. Bouchet  $[\mu \ \text{дp.}]$  // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. –  $N_{\text{P}}$  11. – P. e0206693. DOI: 10.1371/journal.pone.0206693.

187. McCray, A.N. Complete Regression of Established Subcutaneous B16 Murine Melanoma Tumors after Delivery of an HIV-1 Vpr-Expressing Plasmid by in Vivo Electroporation / A.N. McCray, K.E. Ugen, K. Muthumani [и др.] // Molecular Therapy. – 2006. – Vol. 14. – № 5. – P. 647-655. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.06.010.

188. Lucas, M.L. IL-12 Plasmid Delivery by in Vivo Electroporation for the Successful Treatment of Established Subcutaneous B16.F10 Melanoma / M.L. Lucas, L. Heller, D. Coppola, R. Heller // Molecular Therapy. -2002. - Vol. 5. - N = 6. - P. 668-675. DOI: 10.1006/mthe.2002.0601.

189. Prévost-Blondel, A. Differential requirement of perforin and IFN-γ in CD8 T cell-mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen / A. Prévost-Blondel, M. Neuenhahn, M. Rawiel, H. Pircher // European Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 30. – № 9. – P. 2507-2515. DOI: 10.1002/1521-4141(20009)30:9<2507::AID-IMMU2507>3.0.CO;2-V.

190. Tao, K. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer / K. Tao, M. Fang, J. Alroy, G.G. Sahagian // BMC Cancer. -2008. - Vol. 8. - N $_{2}$  1. - P. 228. DOI: 10.1186/1471-2407-8-228.

191. Rashid, O.M. Is tail vein injection a relevant breast cancer lung metastasis model? / O.M. Rashid, M. Nagahashi, S. Ramachandran [ $\mu \ \mu p$ .] // Journal of Thoracic Disease. – 2013. – T. 5. – Nº 4. – C. 385-392. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.17.

192. Kaur, P. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease / P. Kaur, G.M. Nagaraja, H. Zheng [ $\mu$  др.] // BMC Cancer. – 2012. – Vol. 12. – № 1. – P. 120. DOI: 10.1186/1471-2407-12-120.

193. Gao, Z.-G. Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles / Z.-G. Gao, L. Tian, J. Hu [ $\mu$  др.] // Journal of Controlled Release. – 2011. – Vol. 152. – No 1. – P. 84-89. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.021.

194. Feng, X. Recombinant virus-like particles presenting IL-33 successfully modify the tumor microenvironment and facilitate antitumor immunity in a model of breast cancer / X. Feng, H. Liu, X. Chu [и др.] // Acta Biomaterialia. – 2019. – Vol. 100. – P. 316-325. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.09.024.

195. Warner, J.F. Induction of HIV-Specific CTL and Antibody Responses in Mice Using Retroviral Vector-Transduced Cells / J.F. Warner, C.-G. Anderson, L. Laube [и др.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 1991. – Vol. 7. – № 8. – Р. 645-655. DOI: 10.1089/aid.1991.7.645.

196. Oguey, D. Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell line and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249 / D. Oguey, L.L. Dumenco, R.H. Pierce, N. Fausto // Hepatology. – 1996. – Vol. 24. –  $\mathbb{N}_{2}$  5. – P. 1024-1033. DOI: 10.1002/hep.510240508.

197. Kaul, R. Epstein-Barr Virus Latent Nuclear Antigens Can Induce Metastasis in a Nude Mouse Model / R. Kaul, M. Murakami, T. Choudhuri, E.S. Robertson // Journal of Virology. -2007. - Vol. 81.  $- N_{2}$  19. - P. 10352-10361. DOI: 10.1128/JVI.00886-07.

198. Zhang, B. Immune Surveillance and Therapy of Lymphomas Driven by Epstein-Barr Virus Protein LMP1 in a Mouse Model / B. Zhang, S. Kracker, T. Yasuda [и др.] // Cell. – 2012. – Vol. 148. –  $N_{2}$  4. – P. 739-751. DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.031.

199. Dittmer, D.P. Animal models of tumorigenic herpesviruses — an update / D.P. Dittmer, B. Damania, S.-H. Sin // Current Opinion in Virology. – 2015. – Vol. 14. – P. 145-150. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.09.006.

200. Chang, P.-Y. Spontaneous metastases in immunocompetent mice harboring a primary tumor driven by oncogene latent membrane protein 1 from Epstein–Barr virus / P.-Y. Chang, Y. Huang, T.-Y. Hung  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Biomedical Journal. – 2016. – Vol. 39. –  $N_{\text{P}}4$ . – P. 261-271. DOI: 10.1016/j.bj.2015.12.003.

201. Lyngaa, R. Cell transformation mediated by the Epstein–Barr virus G protein-coupled receptor BILF1 is dependent on constitutive signaling / R. Lyngaa, K. Nørregaard, M. Kristensen [ $\mu \ \mu p$ .] // Oncogene. – 2010. – Vol. 29. – Nº 31. – P. 4388-4398. DOI: 10.1038/onc.2010.173.

202. Smirnova, I.S. Hepatitis C Virus Core Protein Transforms Murine Fibroblasts by Promoting Genomic Instability / I.S. Smirnova, N.D. Aksenov, E.V. Kashuba [и др.] // Analytical Cellular Pathology. – 2006. – Vol. 28. – № 4. – Р. 177-190. DOI: 10.1155/2006/864648.

203. 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 [ $\mu$  др.] // Vaccines. – 2020. – Vol. 8. – No 2. – P. 318. DOI: 10.3390/vaccines8020318.

204. Mangeney, M. Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection *in vivo* / M. Mangeney, T. Heidmann // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95. – № 25. – P. 14920-14925. DOI: 10.1073/pnas.95.25.14920.

205. Iuliano, M. Virus-Induced Tumorigenesis and IFN System / M. Iuliano, G. Mangino, M.V. Chiantore [и др.] // Biology.  $-2021. - Vol. 10. - N_{\text{0}} 10. - P. 994.$  DOI: 10.3390/biology10100994.

206. Salmon, P. Reversible Immortalization of Human Primary Cells by Lentivector-Mediated Transfer of Specific Genes / P. Salmon, J. Oberholzer, T. Occhiodoro [ $\mu$  др.] // Molecular Therapy. – 2000. – Vol. 2. – Nº 4. – P. 404-414. DOI: 10.1006/mthe.2000.0141.

207. Matlashewski, G. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. / G. Matlashewski, J. Schneider, L. Banks [ $\mu \ p$ .] // The EMBO Journal. – 1987. – Vol. 6. – Nº 6. – P. 1741-1746. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02426.x.

208. Zerfass, K. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation / K. Zerfass, A. Schulze, D.

Spitkovsky [и др.] // Journal of Virology. – 1995. – Vol. 69. – № 10. – Р. 6389-6399. DOI: 10.1128/jvi.69.10.6389-6399.1995.

209. Wei, W. Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras / W. Wei, W. Huang, Y. Pan [ $\mu \ p$ .] // Cancer Letters. – 2006. – T. 244. – No 1. – C. 119-128. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.12.008.

210. Seifer, M. In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein / M. Seifer, M. Höhne, S. Schaefer, W.H. Gerlich // Journal of Hepatology. – 1991. – T. 13 Suppl 4. – C. S61-65. DOI: 10.1016/0168-8278(91)90026-8.

211. Tarn, C. Differential immediate early gene expression in conditional hepatitis B virus pXtransforming versus nontransforming hepatocyte cell lines / C. Tarn, M.L. Bilodeau, R.L. Hullinger, O.M. Andrisani // The Journal of Biological Chemistry. – 1999. – T. 274. – № 4. – C. 2327-2336. DOI: 10.1074/jbc.274.4.2327.

212. Gottlob, K. Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation / K. Gottlob, S. Pagano, M. Levrero, A. Graessmann // Cancer Research. -1998. - T. 58. - N 16. - C. 3566-3570.

213. Goldie, H. Pattern of tumor cell spread in tissues and organs as a lethal factor in tumor-bearing animals / H. Goldie, M. Walker, B.R. Jeffries, R. Guy // Cancer Research. – 1955. – T. 15. –  $\mathbb{N}_{2}$  4. – C. 263-267.

214. Brown, Z.J. Mouse models of hepatocellular carcinoma: an overview and highlights for immunotherapy research / Z.J. Brown, B. Heinrich, T.F. Greten // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2018. – Vol. 15. – Mouse models of hepatocellular carcinoma. –  $N_{2}$  9. – P. 536-554. DOI: 10.1038/s41575-018-0033-6.

215. Guo, J. Establishment of two ovarian cancer orthotopic xenograft mouse models for in vivo imaging: A comparative study / J. Guo, J. Cai, Y. Zhang  $[\mu \ Дp.]$  // International Journal of Oncology. – 2017. – Vol. 51. – Establishment of two ovarian cancer orthotopic xenograft mouse models for in vivo imaging. – No 4. – P. 1199-1208. DOI: 10.3892/ijo.2017.4115.

216. Zhang, Y. Establishment of a murine breast tumor model by subcutaneous or orthotopic implantation / Y. Zhang, G. Zhang, X. Sun [и др.]. – [Электронный ресурс] // Oncology Letters. – 2018. – Режим доступа: http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8113 (дата обращения: 11.03.2023).

217. Rashid, O.M. An improved syngeneic orthotopic murine model of human breast cancer progression / O.M. Rashid, M. Nagahashi, S. Ramachandran [ $\mu$  др.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2014. – Vol. 147. – No 3. – P. 501-512. DOI: 10.1007/s10549-014-3118-0.

218. Decrausaz, L. A novel mucosal orthotopic murine model of human papillomavirus-associated genital cancers / L. Decrausaz, A.-R. Gonçalves, S. Domingos-Pereira [ $\mu \ \text{дp.}$ ] // International Journal of Cancer. – 2011. – Vol. 128. – No 9. – P. 2105-2113. DOI: 10.1002/ijc.25561.

219. 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. – T. 11. – Inducing Immunity Where It Matters. – C. 1750. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01750.

220. Greer, L.F. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review / L.F. Greer, A.A. Szalay // Luminescence. – 2002. – Vol. 17. – Imaging of light

emission from the expression of luciferases in living cells and organisms. –  $N_{2} 1. - P. 43-74$ . DOI: 10.1002/bio.676.

221. Juratli, M.A. Real-time monitoring of circulating tumor cell release during tumor manipulation using in vivo photoacoustic and fluorescent flow cytometry: Circulating Tumor Cell Release During Medical Intervention / M.A. Juratli, M. Sarimollaoglu, E.R. Siegel [ $\mu \ \mu p$ .] // Head & Neck. – 2014. – Vol. 36. – Real-time monitoring of circulating tumor cell release during tumor manipulation using in vivo photoacoustic and fluorescent flow cytometry. – Nº 8. – P. 1207-1215. DOI: 10.1002/hed.23439.

222. Cabral, H. Systemic Targeting of Lymph Node Metastasis through the Blood Vascular System by Using Size-Controlled Nanocarriers / H. Cabral, J. Makino, Y. Matsumoto [ $\mu$  др.] // ACS Nano. – 2015. – Vol. 9. – № 5. – P. 4957-4967. DOI: 10.1021/nn5070259.

223. Chen, J. Receptor and Microenvironment Dual-Recognizable Nanogel for Targeted Chemotherapy of Highly Metastatic Malignancy / J. Chen, J. Ding, W. Xu [и др.] // Nano Letters. – 2017. – Vol. 17. – № 7. – Р. 4526-4533. DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b02129.

224. Shirai, T. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice / T. Shirai, O. Inoue, S. Tamura [ $\mu$  др.] // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2017. – Vol. 15. – No 3. – P. 513-525. DOI: 10.1111/jth.13604.

225. Zhang, Y. Surgically-Induced Multi-organ Metastasis in an Orthotopic Syngeneic Imageable Model of 4T1 Murine Breast Cancer / Y. Zhang, N. Zhang, R.M. Hoffman, M. Zhao // Anticancer Research. -2015. - T. 35. - N 9. - C. 4641-4646.

226. Baklaushev, V.P. Modeling and Integral X-Ray, Optical, and MRI Visualization of Multiorgan Metastases of Orthotopic 4T1 Breast Carcinoma in BALB/c Mice / V.P. Baklaushev, N.F. Grinenko, G.M. Yusubalieva [μ др.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2015. – Vol. 158. – № 4. – P. 581-588. DOI: 10.1007/s10517-015-2810-3.

227. 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 [и др.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – Р. 7715. DOI: 10.1038/s41598-017-07851-z.

228. Sujobert, P. Conflicting Signals for Cancer Treatment / P. Sujobert, A. Trautmann // Cancer Research. – 2016. – Vol. 76. – № 23. – P. 6768-6773. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1393.

229. Weiss, J.M. The STING agonist DMXAA triggers a cooperation between T lymphocytes and myeloid cells that leads to tumor regression / J.M. Weiss, M.V. Guérin, F. Regnier [ $\mu$  др.] // OncoImmunology. – 2017. – Vol. 6. – Nº 10. – P. e1346765. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1346765.

230. Guerin, M.V. Preclinical murine tumor models: A structural and functional perspective / M.V. Guerin, V. Finisguerra, B.J. Van den Eynde [и др.] // eLife. – 2020. – Vol. 9. – Preclinical murine tumor models. – P. e50740. DOI: 10.7554/eLife.50740.

231. Bucala, R. Circulating Fibrocytes Define a New Leukocyte Subpopulation That Mediates Tissue Repair / R. Bucala, L.A. Spiegel, J. Chesney [и др.] // Molecular Medicine. – 1994. – Vol. 1. – № 1. – Р. 71-81. DOI: 10.1007/BF03403533.

232. Kraman, M. Suppression of Antitumor Immunity by Stromal Cells Expressing Fibroblast Activation Protein– $\alpha$  / M. Kraman, P.J. Bambrough, J.N. Arnold [ $\mu$  др.] // Science. – 2010. – Vol. 330. – Nº 6005. – P. 827-830. DOI: 10.1126/science.1195300.

233. Wood, S. Pathogenesis of metastasis formation observed in vivo in the rabbit ear chamber / S. Wood // A.M.A. Archives of Pathology. -1958. -T. 66. -N 4. -C. 550-568.

234. Spiotto, M.T. Imaging the Unfolded Protein Response in Primary Tumors Reveals Microenvironments with Metabolic Variations that Predict Tumor Growth / M.T. Spiotto, A. Banh, I. Papandreou [и др.] // Cancer Research. – 2010. – Vol. 70. – N 1. – P. 78-88. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2747.

235. 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  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – Nº 6. – P. 1219. DOI: 10.3390/microorganisms9061219.

236. Bayurova, E. HIV-1 Reverse Transcriptase Promotes Tumor Growth and Metastasis Formation via ROS-Dependent Upregulation of Twist / E. Bayurova, J. Jansons, D. Skrastina [и др.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2019. – T. 2019. – C. 6016278. DOI: 10.1155/2019/6016278.

237. Inoue, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // Gene. – 1990. – T. 96. –  $\mathbb{N}$  1. – C. 23-28. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.

238. Roos, A.-K. Optimization of Skin Electroporation in Mice to Increase Tolerability of DNA Vaccine Delivery to Patients / A.-K. Roos, F. Eriksson, D.C. Walters  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Molecular Therapy. – 2009. – Vol. 17. – Nº 9. – P. 1637-1642. DOI: 10.1038/mt.2009.120.

239. Latanova, A.A. Codon optimization and improved delivery/immunization regimen enhance the immune response against wild-type and drug-resistant HIV-1 reverse transcriptase, preserving its Th2-polarity / A.A. Latanova, S. Petkov, A. Kilpelainen [и др.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 8078. DOI: 10.1038/s41598-018-26281-z.

240. Tomayko, M.M. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice / M.M. Tomayko, C.P. Reynolds // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. -1989. - Vol. 24. - No 3. - P. 148-154. DOI: 10.1007/BF00300234.

241. Elston, C.W. pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up / C.W. Elston, I.O. Ellis // Histopathology. – 1991. – Vol. 19. – pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer. –  $N_{2}$  5. – P. 403-410. DOI: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.

242. Li, G. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective / G. Li, S. Piampongsant, N.R. Faria  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Retrovirology. – 2015. – Vol. 12. – No 1. – P. 18. DOI: 10.1186/s12977-015-0148-6.

243. Krotova, O. Consensus HIV-1 FSU-A Integrase Gene Variants Electroporated into Mice Induce Polyfunctional Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells / O. Krotova, E. Starodubova, S. Petkov [ $\mu$  др.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – Nº 5. – P. e62720. DOI: 10.1371/journal.pone.0062720.

244. Vázquez de Parga, E. Analysis of drug resistance-associated mutations in treatment-naïve individuals infected with different genetic forms of HIV-1 circulating in countries of the former Soviet Union / E. Vázquez de Parga, A. Rakhmanova, L. Pérez-Álvarez [и др.] // Journal of Medical Virology. – 2005. – Vol. 77. – № 3. – P. 337-344. DOI: 10.1002/jmv.20461.
245. Rumyantseva, O.A. Epidemiological Networks and Drug Resistance of HIV Type 1 in Krasnoyarsk Region, Russia / O.A. Rumyantseva, I.A. Olkhovskiy, M.A. Malysheva [ $\mu$  др.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2009. – Vol. 25. – № 9. – P. 931-936. DOI: 10.1089/aid.2009.0075.

246. HIV drug resistance data base. – Режим доступа: https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/ (дата обращения: 18.05.2018). – [Электронный ресурс].

247. Shadrina, O. Consensus HIV-1 subtype A integrase and its raltegravir-resistant variants: Design and characterization of the enzymatic properties / O. Shadrina, O. Krotova, J. Agapkina  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Biochimie. – 2014. – Vol. 102. – Consensus HIV-1 subtype A integrase and its raltegravir-resistant variants. – P. 92-101. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.02.013.

248. Blanco, J.-L. HIV-1 Integrase Inhibitor Resistance and Its Clinical Implications / J.-L. Blanco, V. Varghese, S.-Y. Rhee [и др.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 203. – № 9. – Р. 1204-1214. DOI: 10.1093/infdis/jir025.

249. Cane, P.A. New developments in HIV drug resistance / P.A. Cane // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – Vol. 64. – № Supplement 1. – P. i37-i40. DOI: 10.1093/jac/dkp258.

250. Shafer, R.W. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART / R.W. Shafer, J.M. Schapiro // AIDS reviews. -2008. - T. 10. - HIV-1 drug resistance mutations.  $-N_{2} 2. - C. 67-84.$ 

251. Hallengärd, D. Increased expression and immunogenicity of HIV-1 protease following inactivation of the enzymatic activity / D. Hallengärd, B.K. Haller, S. Petersson [ $\mu$  др.] // Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – № 4. – P. 839-848. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.10.083.

252. Kozak, M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. / M. Kozak // Journal of Cell Biology. – 1991. – Vol. 115. – An analysis of vertebrate mRNA sequences. – N 4. – P. 887-903. DOI: 10.1083/jcb.115.4.887.

253. Kohl, N.E. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. / N.E. Kohl, E.A. Emini, W.A. Schleif [ $\mu \ p$ .] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – Vol. 85. – Nº 13. – P. 4686-4690. DOI: 10.1073/pnas.85.13.4686.

254. Pulaski, B.A. Mouse 4T1 Breast Tumor Model / B.A. Pulaski, S. Ostrand-Rosenberg. – [Electronic resource] // Current Protocols in Immunology. – 2000. – Vol. 39. – № 1. – Mode of access: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im2002s39 (date of access: 11.03.2023).

255. 4T1luc2 cell line. – Режим доступа: http://www.caliperls.com/assets/014/7158.pdf (дата обращения: 20.02.2015). – [Электронный ресурс].

256. DNA vaccines: methods and protocols : Methods in molecular biology. DNA vaccines / Â.M.A. de Sousa ред. – New York, NY, U.S.A : Humana Press, 2021. – Вып. 2197. – 335 с.

257. Abakumov, M. Evaluation of cyclic luciferin as a substrate for luminescence measurements in in vitro and in vivo applications / M. Abakumov, A. Kilpeläinen, S. Petkov  $[\mu \ дp.]$  // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2019. – Vol. 513. – No 3. – P. 535-539. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.006.

258. 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 [и др.] // Cancers. – 2022. – Vol. 15. – HIV-

1 Protease as DNA Immunogen against Drug Resistance in HIV-1 Infection. – № 1. – P. 238. DOI: 10.3390/cancers15010238.

259. Petkov, S. DNA immunization site determines the level of gene expression and the magnitude, but not the type of the induced immune response / S. Petkov, E. Starodubova, A. Latanova  $[\mu \ \text{дp.}] //$  PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – Nº 6. – P. e0197902. DOI: 10.1371/journal.pone.0197902.

260. 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 [и др.] // Journal of Immunology Research. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-16. DOI: 10.1155/2017/7407136.

261. Starodubova, E.S. HIV-1 reverse transcriptase artificially targeted for proteasomal degradation induces a mixed Th1/Th2-type immune response / E.S. Starodubova, A. Boberg, M. Litvina  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Vaccine. – 2008. – Vol. 26. – Nº 40. – P. 5170-5176. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.070.

262. Santra, S. A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys / S. Santra, B.T. Korber, M. Muldoon  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105. – Nº 30. – P. 10489-10494. DOI: 10.1073/pnas.0803352105.

263. Yan, J. Immunogenicity of a novel engineered HIV-1 clade C synthetic consensus-based envelope DNA vaccine / J. Yan, N. Corbitt, P. Pankhong  $[\mu \text{ др.}]$  // Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – No 41. – P. 7173-7181. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.076.

264. Harro, C.D. Safety and Immunogenicity of Adenovirus-Vectored Near-Consensus HIV Type 1 Clade B *gag* Vaccines in Healthy Adults / C.D. Harro, M.N. Robertson, M.A. Lally  $[\mu \ \text{дp.}]$  // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2009. – Vol. 25. – No 1. – P. 103-114. DOI: 10.1089/aid.2008.0212.

265. Barouch, D.H. HIV-1 Vaccine Development After STEP / D.H. Barouch, B. Korber // Annual Review of Medicine. – 2010. – Vol. 61. – N 1. – P. 153-167. DOI: 10.1146/annurev.med.042508.093728.

266. Díez-Fuertes, F. Bayesian phylogeographic analyses clarify the origin of the HIV-1 subtype A variant circulating in former Soviet Union's countries / F. Díez-Fuertes, M. Cabello, M.M. Thomson // Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – Vol. 33. – P. 197-205. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.003.

267. Bobkov, A. An HIV Type 1 Epidemic among Injecting Drug Users in the Former Soviet Union Caused by a Homogeneous Subtype A Strain / A. Bobkov, R. Cheingsong-Popov, L. Selimova [и др.] // AIDS Research and Human Retroviruses. – 1997. – Vol. 13. – № 14. – P. 1195-1201. DOI: 10.1089/aid.1997.13.1195.

268. Beebe, S. Nanopulse Stimulation (NPS) Induces Tumor Ablation and Immunity in Orthotopic 4T1 Mouse Breast Cancer: A Review / S. Beebe, B. Lassiter, S. Guo // Cancers. – 2018. – Vol. 10. – Nanopulse Stimulation (NPS) Induces Tumor Ablation and Immunity in Orthotopic 4T1 Mouse Breast Cancer. –  $N_{2}$  4. – P. 97. DOI: 10.3390/cancers10040097.

269. Yoneda, T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma / T. Yoneda, T. Michigami, B. Yi [и др.] // Cancer. – 2000. – Vol. 88. – № S12. – P. 2979-2988. DOI: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12+<2979::AID-CNCR13>3.0.CO;2-U.

270. Mundy, G. Preclinical studies with zoledronic acid and other bisphosphonates: Impact on the bone microenvironment / G. Mundy // Seminars in Oncology. – 2001. – Vol. 28. – Preclinical studies with zoledronic acid and other bisphosphonates. – P. 35-44. DOI: 10.1016/S0093-7754(01)90263-5.

271. Blanco, R. Cell Killing by HIV-1 Protease / R. Blanco, L. Carrasco, I. Ventoso // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 2. – P. 1086-1093. DOI: 10.1074/jbc.M205636200.

272. Nijhuis, M. Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy: / M. Nijhuis, R. Schuurman, D. de Jong [ $\mu$  др.] // AIDS. – 1999. – Vol. 13. – Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. – Nº 17. – P. 2349-2359. DOI: 10.1097/00002030-199912030-00006.

273. Ellison, V. An Essential Interaction between Distinct Domains of HIV-1 Integrase Mediates Assembly of the Active Multimer / V. Ellison, J. Gerton, K.A. Vincent, P.O. Brown // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270. – № 7. – P. 3320-3326. DOI: 10.1074/jbc.270.7.3320.

274. Isaguliants, M. Oxidative stress induced by HIV-1 reverse transcriptase modulates the enzyme's performance in gene immunization / M. Isaguliants, O. Smirnova, A.V. Ivanov  $[\mu \ дp.]$  // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2013. – Vol. 9. – Nº 10. – P. 2111-2119. DOI: 10.4161/hv.25813.

275. Xu, H.-T. Effects of the K65R and K65R/M184V reverse transcriptase mutations in subtype C HIV on enzyme function and drug resistance / H.-T. Xu, J.L. Martinez-Cajas, M.L. Ntemgwa  $[\mu \text{ др.}] //$  Retrovirology. – 2009. – Vol. 6. – No 1. – P. 14. DOI: 10.1186/1742-4690-6-14.

276. Wang, J. The HIV-1 reverse transcriptase mutants G190S and G190A, which confer resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, demonstrate reductions in RNase H activity and DNA synthesis from tRNALys, 3 that correlate with reductions in replication efficiency / J. Wang, C. Dykes, R.A. Domaoal  $[\mu \ \text{gp.}]$  // Virology. – 2006. – Vol. 348. – No 2. – P. 462-474. DOI: 10.1016/j.virol.2006.01.014.

277. Gerondelis, P. The P236L Delavirdine-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mutant Is Replication Defective and Demonstrates Alterations in both RNA 5'-End- and DNA 3'-End-Directed RNase H Activities / P. Gerondelis, R.H. Archer, C. Palaniappan [и др.] // Journal of Virology. – 1999. – Vol. 73. – № 7. – P. 5803-5813. DOI: 10.1128/JVI.73.7.5803-5813.1999.

278. Wakefield, J.K. In vitro enzymatic activity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants in the highly conserved YMDD amino acid motif correlates with the infectious potential of the proviral genome / J.K. Wakefield, S.A. Jablonski, C.D. Morrow // Journal of Virology. – 1992. – Vol. 66. –  $N_{2}$  11. – P. 6806-6812. DOI: 10.1128/jvi.66.11.6806-6812.1992.

279. Beilhartz, G.L. HIV-1 Ribonuclease H: Structure, Catalytic Mechanism and Inhibitors / G.L. Beilhartz, M. Götte // Viruses. – 2010. – Vol. 2. – HIV-1 Ribonuclease H. –  $N_{2}$  4. – P. 900-926. DOI: 10.3390/v2040900.

280. Kim, J.-B. Non-Invasive Detection of a Small Number of Bioluminescent Cancer Cells In Vivo / J.-B. Kim, K. Urban, E. Cochran [и др.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – № 2. – P. e9364. DOI: 10.1371/journal.pone.0009364.

281. Rabinovich, B.A. Visualizing fewer than 10 mouse T cells with an enhanced firefly luciferase in immunocompetent mouse models of cancer / B.A. Rabinovich, Y. Ye, T. Etto  $[\mu \ \text{дp.}]$  // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105. –  $N_{2}$  38. – P. 14342-14346. DOI: 10.1073/pnas.0804105105.

282. Lungpathology.–Режимдоступа:http://www.pathologyoutlines.com/topic/lungnontumoracuteinterstitialp.html(дата обращения:30.05.2017). – [Электронный ресурс].

283. Casimiro, D.R. Vaccine-Induced Immune Responses in Rodents and Nonhuman Primates by Use of a Humanized Human Immunodeficiency Virus Type 1 *pol* Gene / D.R. Casimiro, A. Tang, H.C. Perry [и др.] // Journal of Virology. – 2002. – Vol. 76. –  $\mathbb{N}$  1. – P. 185-194. DOI: 10.1128/JVI.76.1.185-194.2002.

284. Rodriguez, W.R. CD8+ T lymphocyte responses target functionally important regions of Protease and Integrase in HIV-1 infected subjects / W.R. Rodriguez, M.M. Addo, A. Rathod  $[\mu \text{ др.}] //$  Journal of Translational Medicine.  $-2004. - T. 2. - N_{\rm 2} 1. - C. 15$ . DOI: 10.1186/1479-5876-2-15.

285. Wilson, C.C. Identification and Antigenicity of Broadly Cross-Reactive and Conserved Human Immunodeficiency Virus Type 1-Derived Helper T-Lymphocyte Epitopes / C.C. Wilson, B. Palmer, S. Southwood [ $\mu$  др.] // Journal of Virology. – 2001. – Vol. 75. – № 9. – P. 4195-4207. DOI: 10.1128/JVI.75.9.4195-4207.2001.

286. Yu, P. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors / P. Yu, Y. Lee, W. Liu [ $\mu \ \mu p$ .] // Journal of Experimental Medicine. – 2005. – Vol. 201. – No 5. – P. 779-791. DOI: 10.1084/jem.20041684.