

На правах рукописи

МАРКОВ ОЛЕГ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ПОИСК ПУТЕЙ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.б.н. **Миронова Надежда Львовна**

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
заведующий лабораторией

Попова Нэлли Александровна, к.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики СО РАН, с.н.с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Научно-исследовательский институт фундаментальной и
клинической иммунологии

Защита состоится «___» ноября 2015 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090 Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время в терапии онкологических заболеваний выделяются методы, основанные на активации иммунной системы. Среди них особое место занимают подходы на основе дендритных клеток (ДК), способных запускать и поддерживать опухолеспецифический Т- и В-клеточный иммунные ответы. ДК являются профессиональными антиген-представляющими клетками (АПК), главная функция которых заключается в захвате чужеродных антигенов, их процессинге и презентации на клеточной поверхности в комплексах с молекулами МНС первого и второго типа наивным Т-клеткам. В результате такого взаимодействия происходит созревание и активация опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), способных проникать в места локализации опухоли, идентифицировать опухолевые клетки и уничтожать их. Помимо этого запускается Т-хелперный ответ первого и второго типа, стимулирующий Т- и В-клеточные звенья противоопухолевого иммунного ответа. Дополнительная стимуляция лимфоцитов цитокинами, секретируемыми ДК, способствует пролиферации клонов опухолеспецифических ЦТЛ. В настоящее время разработка вакцин на основе ДК, позволяющих эффективно лечить онкологические заболевания и преодолевать вызванный опухолью иммунодефицит, является крайне актуальной.

В экспериментах на мышинных опухолевых моделях *in vivo* было показано, что ДК, нагруженные опухолевыми антигенами (ОАГ) в виде белков, РНК, ДНК или вирусных конструкций, кодирующих ОАГ, способны вызывать активацию иммунной системы при их введении в организм-опухоленоситель. Были получены многообещающие результаты – уменьшение скорости роста опухоли, сокращение количества метастазов, увеличение выживаемости животных-опухоленосителей, запуск опухолеспецифического цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа. Однако на сегодняшний день результаты клинических испытаний ДК и противоопухолевых вакцин на их основе являются менее впечатляющими по своей эффективности по сравнению с данными экспериментов *in vivo*. На сегодняшний день остались такие нерешенные проблемы при подготовке ДК вакцин, как недостаточная эффективность доставки ОАГ в ДК, а также адаптация протоколов лечения с помощью ДК опухолей различного гистологического типа.

Целью настоящей работы являлся поиск путей увеличения эффективности противоопухолевых вакцин на основе модифицированных дендритных клеток. В ходе исследования решались следующие задачи:

1) Поиск липосомальных композиций, обеспечивающих высокоэффективную доставку ОАГ в костно-мозговые предшественники ДК и незрелые ДК мыши *ex vivo* и опосредующих высокий противоопухолевый потенциал ДК вакцин *in vivo*.

2) Поиск липосомальных композиций, адресованных к маннозным рецепторам на поверхности ДК, обеспечивающих эффективную избирательную доставку ОАГ в костно-мозговые предшественники ДК и незрелые ДК мыши *ex vivo* и *in vivo*, опосредующих способность ДК эффективно презентировать ОАГ и генерировать клоны противоопухолевых цитотоксических Т-лимфоцитов.

3) Выбор схем лечения с помощью вакцин на основе модифицированных ДК опухолей различных гистологических типов, обеспечивающих запуск высокоэффективного противоопухолевого иммунного ответа.

Научная новизна и практическая значимость работы. Разработаны противоопухолевые ДК вакцины на основе ДК, нагруженных суммарной опухолевой РНК в комплексах с катионными липосомами, состоящими из катионных липидов 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид) или 2D3 (1,26-бис(1,2-ди-О-тетрадецил-*rac*-глицерин)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид), содержащих в своей структуре два остатка холестерина или дитетрадецилглицерина, соединенных спермином, и липида-хелпера DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфэтаноламина), обладающих высоким противоопухолевым и антиметастатическим действием.

Разработаны противоопухолевые ДК вакцины на основе ДК, нагруженных суммарной опухолевой РНК в комплексе с «адресными» липосомами, направленными к маннозным рецепторам ДК. Липосомы состояли из катионного липида 2X3, липида-хелпера DOPE и маннозильированного липоконъюгата 3-[6-(α -D-маннопиранозилокси)гексил]амино-4-[6-*rac*-2,3-ди(тетрадецилокси)проп-1-илоксикарбамоил]гексил]аминоциклобут-3-ен-1,2-дион. Такие ДК вакцины обладали высоким антиметастатическим потенциалом и стимулировали запуск опухолеспецифического ЦТЛ ответа *in vivo*.

Впервые показано, что профилактические противоопухолевые вакцины на основе ДК, нагруженных суммарной опухолевой РНК в комплексах с катионными липосомами, более эффективны в отношении метастазирующих опухолей, тогда как терапевтические ДК вакцины эффективны в отношении неметастазирующих опухолей.

Основные положения, выносимые на защиту.

1) Созданы противоопухолевые вакцины на основе ДК, нагруженных с помощью «адресных» катионных липосом РНК, кодирующей ОАГ, и показана их высокая противоопухолевая и антиметастатическая активности.

2) Профилактические ДК вакцины эффективны в отношении метастазирующих опухолей, терапевтические ДК вакцины эффективны в отношении неметастазирующих опухолей.

3) Противоопухолевая эффективность ДК вакцины определяется ее способностью запускать и регулировать цитотоксический Т-клеточный и Th1/Th2/Th17 ответы, а также низким уровнем активации регуляторных Т-клеток.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 публикации в рецензируемых научных журналах. Результаты работы были представлены на конференциях: 11th Young Scientist Forum “Biochemistry for Tomorrow’s Medicine” (Турин, Италия 2011); 36th FEBS Congress “Biochemistry for Tomorrow’s Medicine” (Турин, Италия 2011); 31st European School of Medicinal Chemistry (Урбино, Италия 2011); 38th FEBS Congress “Mechanisms in Biology” (Санкт-Петербург, Россия 2013); Фундаментальные науки – медицине (Новосибирск, Россия 2013), “Science of the Future” (Санкт-Петербург, Россия 2014), Russian-British Seminar “Targeting the RNA World: The

Future of Nucleic Acid Therapeutics” (Санкт-Петербург, Россия 2015), 4th Meeting of the CNRS Laboratoire International Associe NUCPROT “Biogenesis, structure and reactivity of nucleic acids protein assembles important for health and disease” (Новосибирск, Россия 2015).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 36 рисунков и 4 таблицы. Библиография содержит 305 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

3.1. Приготовление ДК вакцины

В качестве модельных клеток использовали костно-мозговые предшественники ДК (преДК) и полученные из них незрелые ДК (imДК). ПреДК получали из клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6 с помощью центрифугирования на среде Histopaque-1083. ImДК получали культивированием преДК в присутствии ИЛ-4 и ГМ-КСФ в течение 6 дней. ДК вакцину получали нагрузкой imДК ОАГ в виде опухолевого лизата (пассивным методом) или суммарной опухолевой РНК (в комплексах с катионными липосомами). В исследовании трансфекционного потенциала катионных липосом в качестве источника АГ для нагрузки ДК использовали плазмидную ДНК pEGFP-C2 (далее pEGFP) и суммарную РНК клеток ВНК-IR780, эндогенно экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (далее РНК-EGFP).

3.2. Исследование трансфекционной активности поликатионных липосом

3.2.1. Поликатионные липиды и липосомы

Катионные липосомы состояли из поликатионных липидов на основе спермина и липида-хелпера DOPE (Рис. 1). Липиды были синтезированы и любезно предоставлены д.х.н. М. А. Масловым (МИТХТ им. М. В. Ломоносова, Москва).

Катионные липиды содержали один (липиды X2, S1, S2 и S3) или два (2X3) остатка холестерина или дитетрадецилглицерина (2D3), связанных со спермином. Катионные липосомы состояли из поликатионных липидов и липида-хелпера DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин) в мол. отношении 1:1. Липоплексы, т.е. комплексы, состоящие из липосом и НК (ДНК или РНК), были приготовлены при разных соотношениях N/P (отношение количества аминогрупп катионных липидов к количеству фосфатных групп нуклеиновых кислот).

3.2.2. Доставка плазмидной ДНК pEGFP-C2 в преДК и imДК с помощью катионных липосом

Две липосомальные композиции из шести исследованных – 2X3-DOPE и 2D3-DOPE – обладали высокой эффективностью трансфекции преДК как с точки зрения числа трансфицированных клеток (TE), так и интенсивности флуоресценции (MFI): TE / MFI для 2X3-DOPE и 2D3-DOPE составили 33% / 2RFU и 30% / 2.4 RFU при N/P 10/1, соответственно (Рис. 2А,Б). Липосомы X2-DOPE и S2-DOPE показали заметную эффективность доставки: 43% / 0.7 RFU

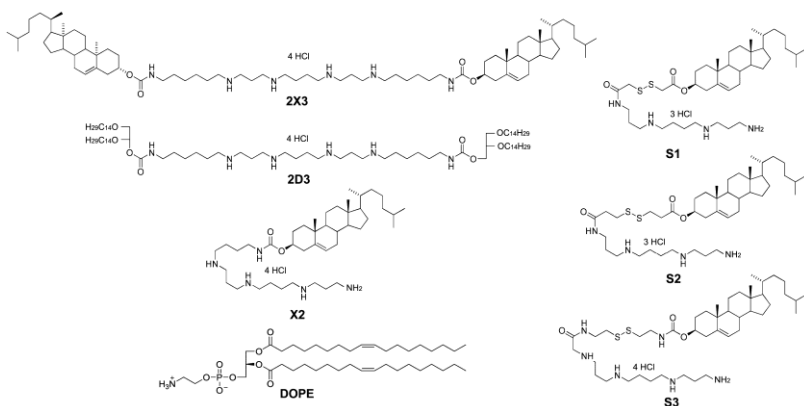


Рис. 1. Структуры компонентов поликатионных липосом

и 27% / 2 RFU при N/P 10/1, соответственно. Липосомы S1-DOPE и S2-DOPE были малоэффективны: 10% / 0.7 RFU, однако даже их ТЕ в 2-3 раза превышала уровни трансфекции, наблюдаемые при доставке рEGFP с помощью коммерческого препарата Lipofectamine 2000 (LF) (5% / 0.5 RFU) (Рис. 2А,Б). Показано, что с увеличением соотношения N/P наблюдался рост ТЕ для липосом 2X3-DOPE, 2D3-DOPE, X2-DOPE и S2-DOPE, тогда как липосомы S1-DOPE и S3-DOPE во всем интервале концентраций трансфицировали менее 10% преДК и обеспечивали уровень MFI схожий с уровнем LF.

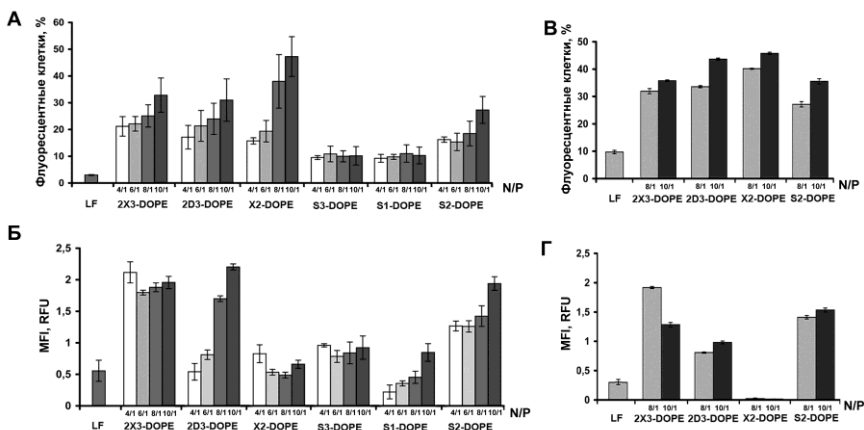


Рис. 2. Доставка рEGFP-C2 с помощью катионных липосом в преДК (А, Б) и имДК (В, Г). Количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции оценивали через 48 ч после трансфекции с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как MEAN±S.E.M..

Наиболее эффективные липосомы 2X3-DOPE, 2D3-DOPE, X2-DOPE и S2-DOPE были выбраны для исследования эффективности трансфекции рEGFP в имДК (Рис. 2В,Г). ТЕ / MFI для липосом 2X3-DOPE составило 36% / 1.8 RFU;

2D3-DOPE – 32-45% / 1 RFU; S2-DOPE – 27-35% / 1.4 RFU (Рис. 2В,Г). Трансфекция *im*ДК X2-DOPE/pEGFP обеспечила довольно высокий процент EGFP⁺ *im*ДК (до 44%, N/P 10/1), но MFI оказалось минимальной (0.02 RFU), что, возможно, связано с недостаточным высвобождением pEGFP из эндосом или липopleксов. Все исследованные липосомы доставляли pEGFP в преДК и *im*ДК со значительно большей эффективностью по сравнению с LF.

3.2.3. Доставка РНК-EGFP в преДК и *im*ДК с помощью катионных липосом

Как и в случае с ДНК, липосомы 2X3-DOPE, 2D3-DOPE, S2-DOPE и S3-DOPE эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК: ТЕ / MFI для 2X3-DOPE, S3-DOPE и S2-DOPE составило 30% / 3RFU; 32% / 3 RFU и 30% / 3.1 RFU, соответственно, а для 2D3-DOPE – 33% / 5.9 RFU (Рис. 3А,Б). Липосомы S1-DOPE были наименее эффективными. Для X2-DOPE ТЕ составила около 60%, однако MFI была крайне низкой 1 RFU. При увеличении N/P с 1/1 до 2/1 ТЕ значительно усиливалась для всех липосом, за исключением S1-DOPE.

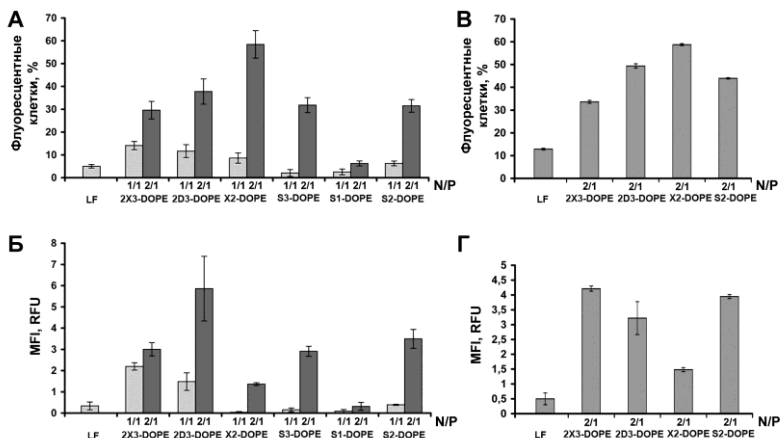


Рис. 3. Доставка РНК-EGFP с помощью катионных липосом в преДК (А, Б) и *im*ДК (В, Г). Количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции оценивали через 48 ч после трансфекции с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как MEAN±S.E.M.

Липосомы 2X3-DOPE, 2D3-DOPE, X2-DOPE и S2-DOPE использовали для доставки РНК-EGFP в *im*ДК при N/P 2/1 (Рис. 3В,Г). ТЕ / MFI для липосом 2D3-DOPE и S2-DOPE – 43-47% / 3.1-3.5 RFU; липосомы 2X3-DOPE, в отличие от X2-DOPE, трансфицировали меньшее количество клеток с более высоким уровнем экспрессии трансгена (ТЕ / MFI – 35% / 3 RFU), тогда как X2-DOPE доставлял РНК-EGFP в 57% клеток с MFI 1.2 RFU. Все исследуемые катионные липосомы значительно более эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК и *im*ДК по сравнению с LF (10% / 0.5 RFU).

3.2.4. Исследование противоопухолевого потенциала ДК, трансфицированных опухолевой РНК с помощью катионных липосом *ex vivo*, на метастатической модели меланомы В16 мыши

Для нагрузки *in vitro* ДК использовали суммарную РНК клеток меланомы В16 (РНК-В16). Метастатическую модель меланомы индуцировали введением клеток меланомы В16 (100 тыс. кл.) в хвостовую вену мышей С57В1/6. На 4-й день после трансплантации мышей делили на пять групп и *in vivo* вводили: (1), контроль - физиологический раствор, (2) – ДК, нагруженные липоплексами LF/РНК-В16, (3) – 2Х3-DOPE/РНК-В16, (4) – 2D3-DOPE/РНК-В16 или (5) Х2-DOPE/РНК-В16.

Оказалось, что ДК вакцины, нагруженные 2Х3-DOPE/РНК-В16 и 2D3-

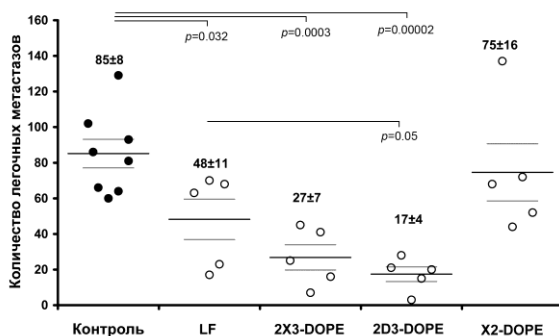


Рис. 4. Антиметастатический эффект ДК, нагруженных РНК-В16 в комплексах с катионными липосомами. Для определения уровня достоверности использовали t-тест критерия Стьюдента, различия при $p \leq 0.05$ считали статистически достоверными

DOPE/РНК-В16, вызывают значительное снижение количества легочных метастазов - в 3-5 раз по сравнению с контрольной группой ($p=0.0003$ и $p=0.00002$) и в 1.9-2.8 раза по сравнению с группой животных, получавшей ДК, нагруженные LF/РНК-В16 ($p=0.05$, Рис. 4). Мыши, получавшие ДК, нагруженные Х2-DOPE/РНК-В16, имели большое количество легочных метастазов, близкое к показателям контрольной группы.

Таким образом, показано, что подавление уровня развития метастазов коррелирует с числом трансфицированных *in vitro* ДК и эффективностью экспрессии трансгена, что указывает на прямую зависимость между эффективностью трансфекции ДК, уровнями презентации антигена и интенсивностью иммунного противоопухолевого ответа.

3.2.5. Влияние липоплексов катионных липосом с РНК-В16 на иммуномодулирующие свойства ДК

Продукция ДК провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 α и ИЛ-6) и интерферонов (ИФН- α и ИФН- γ) была оценена через 48 ч после нагрузки ДК РНК-В16 в комплексах с катионными липосомами *in vitro*. Показано, что все исследованные липосомы приводили к увеличению продукции ДК цитокинов – маркеров созревания: ИЛ-6 в 6-8 раз, ИФН- γ в 1.6-2.3 раза и ФНО- α в 1.5-1.8 раза по сравнению с ДК без стимуляции. Кроме того, наблюдалось незначительное

повышение уровня ИЛ-1 α (до 1.6 раз) и ИФН- α (до 2-3 раза) по сравнению с ДК без стимуляции.

Уровни тех же цитокинов были определены в сыворотке крови животных с меланомой В16 после лечения ДК, нагруженными липоплексами. Введение ДК, нагруженных РНК-В16 в комплексах с 2X3-DOPE, 2D3-DOPE и X2-DOPE, приводило к увеличению уровня ИЛ-1 α в 1.7, 2.3 и 3 раза, соответственно, по сравнению с контрольной группой ($p=0.023$, $p=0.018$ и $p=0.05$), который в организме играет роль сигнала, способствующего миграции ДК из периферических тканей в лимфатические узлы. Статистически достоверное увеличение продукции про-воспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α относительно контроля наблюдалось только в случае ДК, нагруженных X2-DOPE/РНК-В16, что коррелировало с отсутствием антимиастатического эффекта в данной группе животных. Введение ДК, нагруженных липоплексами, не влияло на уровень интерферонов.

Таким образом, было показано, что как *in vitro*, так и *in vivo* наиболее эффективными оказались катионные липосомы 2X3-DOPE и 2D3-DOPE, содержащие катионные липиды на основе спермина и двух остатков холестерина или диглицерида, соответственно. Данные липосомы были выбраны для разработки на их основе систем селективной доставки в ДК.

3.3. Исследование маннозилированных катионных липосом, адресованных к маннозным рецепторам ДК

3.3.1. Состав маннозилированных липосом

В качестве основы для разработки таргетных маннозилированных липосом (МЛ), направленных на маннозные рецепторы ДК, были выбраны липосомы 2X3-DOPE. Структуры компонентов МЛ представлены на Рис. 5.

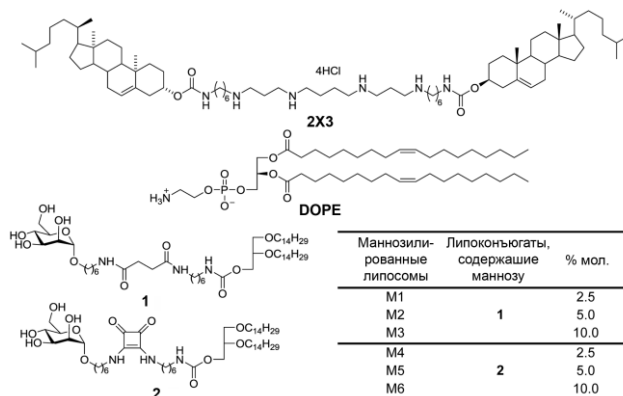


Рис. 5. Структуры компонентов маннозилированных липосом (МЛ).

Липосомы 2X3-DOPE (далее контрольные липосомы), состояли из катионного липида 2X3 (1,26-Бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетразагексакозан тетрагидрохлорид) и цвиттер-ионного липида-

хелпера DOPE (1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фософэтаноламин), взятых в мол. отношении 1:2. Таргетные МЛ состояли из липидов 2X3 и DOPE (1:2 мол. отношение) с добавлением 2,5, 5 или 10% мол. маннозилированных липоконъюгатов **1** (липосомы M1, M2, M3, соответственно) или **2** (липосомы M4, M5, M6, соответственно).

Маннозилированные липоконъюгаты содержали остаток D-маннозы, соединенный с диалкилглицерином через сукцинильный (липоконъюгат **1**) или скваратный (липоконъюгат **2**) линкеры, значительно отличающиеся друг от друга гибкостью и пространственной структурой.

3.3.2. Физико-химические характеристики МЛ и липоплексов

Были оценены гидродинамический диаметр (Рис. 6) и поверхностный заряд МЛ и липоплексов МЛ с плазмидной ДНК рEGFP-C2. Средний диаметр контрольных липосом 2X3-DOPE составлял 40 нм (Рис. 6, N/P=1/-). Липосомы M1 – M6 обладали большим размером по сравнению с 2X3-DOPE: самым большим размером (около 120 нм) обладали липосомы M1 – M3, содержащие липоконъюгат **1**, причем количество липоконъюгата не влияло на размер липосом. Размер липосом M4 – M6 постепенно уменьшался со 100 нм до 54 нм с увеличением содержания липоконъюгата **2** в липосомах и был близок к диаметру 2X3-DOPE (Рис. 6, N/P=1/-).

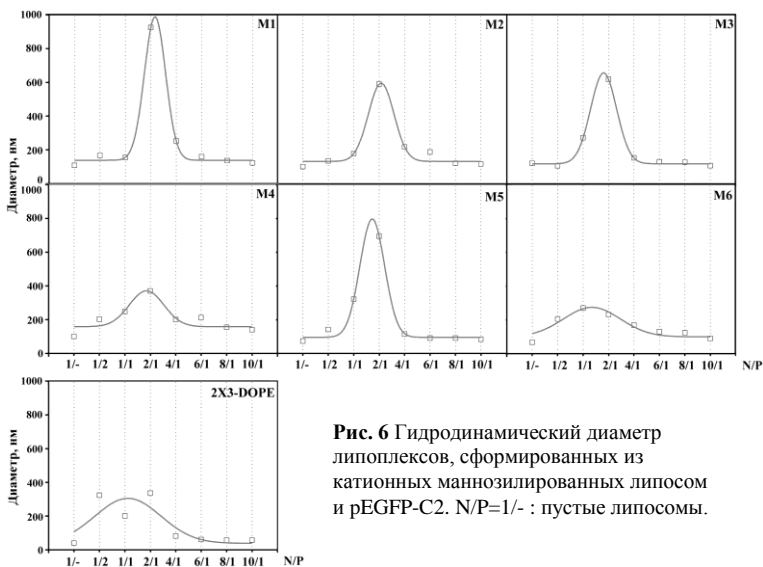


Рис. 6 Гидродинамический диаметр липоплексов, сформированных из катионных маннозилированных липосом и рEGFP-C2. N/P=1/- : пустые липосомы.

Средний размер липоплексов 2X3-DOPE/рEGFP постепенно уменьшался с увеличением соотношения N/P (до 57 нм при N/P 10/1, Рис. 6). Похожая тенденция наблюдалась для липоплексов M1–M6/рEGFP. Однако при N/P 2/1 наблюдалось отчетливое увеличение размера липоплексов (до 8-9 раз). При N/P 2/1 МЛ формировали с рEGFP-C2 огромные липоплексы, чей размер снижился с

~925 нм до ~600 нм (для М1 – М3) и с ~370 до ~219 нм (для М4 – М6) при увеличении содержания маннозилированных липоконъюгатов в МЛ (Рис. 6). Начиная с N/P 4/1 размеры и индексы полидисперсности липоплексов уменьшались, что указывает на образование более мелких и упорядоченных по размеру частиц. По-видимому, при N/P 2/1 липоконъюгат **1** (гораздо в большей степени, чем **2**) существенно нарушает структуру сформированных липоплексов и не обеспечивает эффективную компактизацию ДНК. С увеличением содержания липоконъюгатов **1** и **2** в липосомах это нарушение исчезает, и образуются мелкие компактные частицы.

Липоплексы, сформированные при низких N/P 1/2 и 1/1, имели отрицательный поверхностный заряд, который становился положительным при увеличении N/P до 2/1. При высоких N/P (8/1 и 10/1) формировались очень компактные липоплексы с наиболее высокими положительными зарядами.

3.3.3. Исследование специфичности взаимодействия МЛ с конканавалином А

Конканавалин А (КонА) является растительным аналогом маннозного рецептора, имеющим четыре сайта связывания с D-маннозой. Агглютинация МЛ с КонА позволяет исследовать доступность остатков D-маннозы в составе МЛ для маннозных рецепторов ДК (Рис. 7).

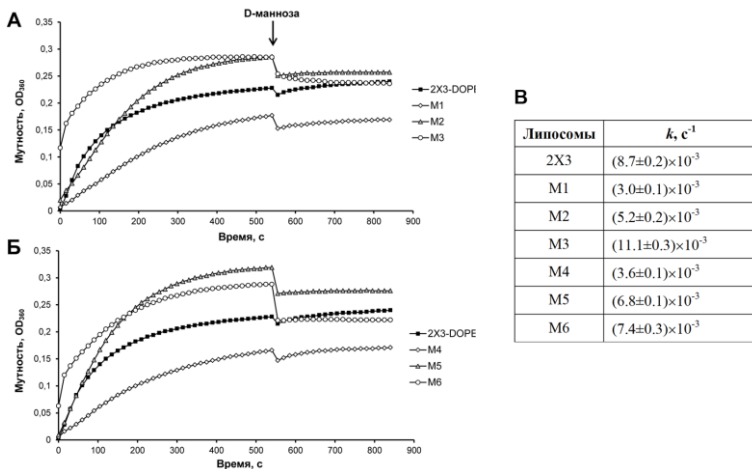


Рис. 7. А, Б. Кинетика формирования комплексов МЛ с КонА. **В.** Эффективные константы скорости формирования комплексов КонА-МЛ (k). Для расчета k использовали формулу: $T(t) = a + be^{-kt}$, где k – эффективная константа скорости образования комплексов, t – время.

Все МЛ, а также контрольные липосомы, эффективно связывались с КонА (Рис. 7). С увеличением количества маннозилированных липоконъюгатов **1** или **2** в составе МЛ с 2.5% мол. до 10% мол. эффективная константа скорости k увеличивалась с 3.0×10^{-3} до $11.1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ для М1–М3 (сукцинилный линкер) и с 3.6×10^{-3} до $7.4 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ для М4–М6 (сквартный линкер) (Рис. 7В). Контрольные липосомы 2X3-DOPE обладали значительной аффинностью к КонА ($k = 8.7 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$), несмотря на отсутствие остатков маннозы в их составе. Это объясняется тем,

что Кона является кислым белком (изоэлектрическая точка Кона рН 4.5–5.5) и содержит большое количество отрицательно заряженных аминокислот, способных электростатически взаимодействовать с катионными липосомами.

Добавление избытка D-маннозы к комплексам 2X3-DOPE/Кона практически не влияло на связывание липосом с белком, что указывает на неспецифические взаимодействия между 2X3-DOPE и Кона (Рис. 7А,Б). МЛ связывались с Кона более специфично: добавление избытка D-маннозы к МЛ/Кона приводило к резкому падению мутности раствора. Величина падения мутности коррелировала с содержанием маннозилированных липоконъюгатов в составе МЛ (Рис. 7А,Б).

Таким образом, все исследуемые МЛ были способны специфично связываться с аналогом маннозного рецептора и могли быть использованы для рецептор-опосредуемой доставки НК в ДК.

3.3.4. Характеристика ДК

Показано, что экспрессия маннозных рецепторов (CD206) наблюдалась у 4% преДК, тогда как в процессе их созревания в имДК количество клеток увеличивалось до 45%. Обработка имДК как пустыми липосомами 2X3-DOPE и М6, так и их липоплексами с РНК приводила к увеличению содержания маркеров созревания CD80, CD83, CD86 и МНС II на поверхности ДК, что является важной характеристикой их активации.

3.3.5. Доставка плазмидной ДНК рEGFP-C2 в преДК и имДК с помощью МЛ

Все МЛ обладали значительно большей эффективностью трансфекции рEGFP в преДК и имДК по сравнению с LF (ТЕ/МFI = 5% / 0.1 RFU) (Рис. 8).

При N/P 1/1 заряды липоплексов являются отрицательными (от –22 мВ для М3 до –10 мВ для М2), при N/P 2/1 становятся близки к нейтральным (–2.5 мВ) или умеренно положительным (от +37 мВ для М5 до +44 мВ для М3). При таких зарядах предположительно будет превалировать таргетная рецептор-опосредованная доставка. Действительно, МFI при доставке рEGFP в преДК с помощью М1, М2, М3 и М6 при N/P 1/1 и 2/1 в два раза выше по сравнению с контрольными липосомами 2X3-DOPE (Рис. 8Б). Однако наблюдаемая при этом МFI и, что более важно, количество EGFP⁺ клеток слишком малы (0.7 RFU и 12%) для достижения необходимого уровня трансфекции ДК *in vitro*.

Липоплексы, сформированные при высоких N/P (от 4/1 до 10/1), имеют большой положительный заряд (до +66.3 мВ для М6), поэтому доставка рEGFP в клетки происходит за счет электростатических взаимодействий с незначительным вкладом рецептор-опосредованного эндоцитоза. Действительно, при данных N/P разница в ТЕ между 2X3-DOPE и МЛ не превышала 10% (Рис. 8А). При увеличении N/P наблюдалось увеличение ТЕ и МFI. Три МЛ из шести исследованных – липосомы М4, М5 и М6 – в 1.2–1.4 раза более эффективно доставляли рEGFP в преДК при высоких N/P по сравнению с 2X3-DOPE и липосомами М1 – М3 (Рис. 8Б), однако МFI не отличалась.

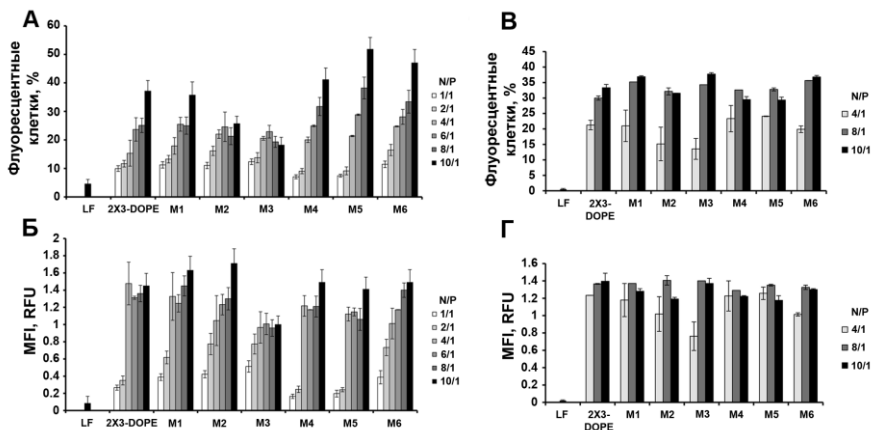


Рис. 8. Доставка pEGFP-C2 в преДК (А, Б) и имДК (В, Г) с помощью МЛ. Количество флуоресцентных клеток и интенсивность флуоресценции оценивали через 48 ч после трансфекции с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как MEAN±S.E.M.

При доставке pEGFP с помощью МЛ в имДК с большим содержанием маннозных рецепторов было показано, что при N/P 4/1 МЛ обладали одинаковыми или более низкими (для М2 и М3) уровнями трансфекции по сравнению с 2X3-DOPE: 23% / 1.2 RFU (Рис. 8В,Г). При увеличении N/P наблюдалось усиление ТЕ для всех МЛ: 30-36% / 1.2-1.4 RFU, однако, результаты не отличались от 2X3-DOPE.

3.3.6. Доставка РНК-EGFP в преДК и имДК с помощью МЛ

Доставку РНК-EGFP в комплексах с МЛ осуществляли при низких N/P 1/1 и 2/1. При данных N/P главным возможным механизмом трансфекции РНК является рецептор-опосредованный эндоцитоз. При N/P 1/1 М3 наиболее эффективно доставляли РНК-EGFP в преДК по сравнению с другими МЛ и 2X3-DOPE: ТЕ / MFI 33% / 3.5 RFU (Рис. 9А,Б). Другие липоплексы МЛ/РНК-EGFP при N/P 1/1 не отличались по ТЕ от 2X3-DOPE: 20% / 1.6 RFU. Увеличение N/P привело к повышению ТЕ для всех исследованных МЛ, однако их ТЕ не превышала значения для контрольных липосом 2X3-DOPE (Рис. 9А,Б).

Доставка РНК-EGFP в имДК с помощью МЛ при N/P 2/1 показала, что липосомы М1, М4–М6 обладали высоким уровнем ТЕ (40-45%), сравнимым с 2X3-DOPE (Рис. 9В,Г). Однако уровень MFI для клеток, трансфицированных 2X3-DOPE, был в 1.4 раза ниже. Липосомы М3, содержащие 10% мол. липоконъюгата **1** с сукцинилным линкером, оказались наименее эффективными для доставки РНК в имДК.

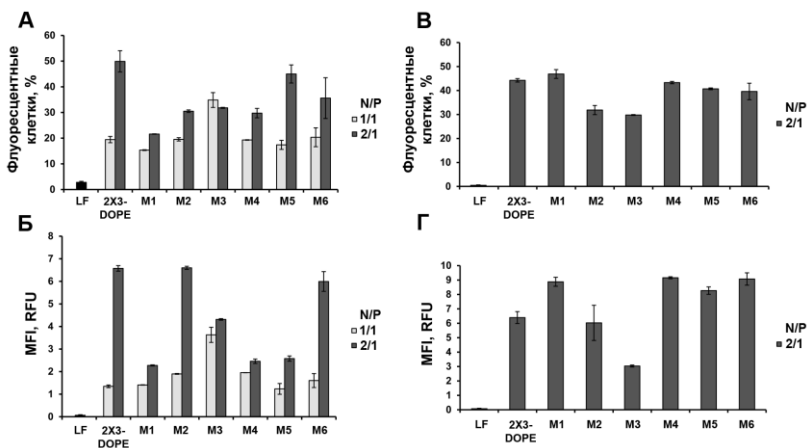


Рис. 9. Доставка РНК-EGFP в преДК (А, Б) и имДК (В, Г) с помощью МЛ. Данные представлены как MEAN±S.E.M.

3.3.7. Подавление роста метастазов на модели метастатической меланомы B16 мыши с помощью ДК, нагруженных липopleксами МЛ/РНК-B16 *ex vivo*

Клетки меланомы B16 (100 тыс кл.) трансплантировали мышам C57Bl/6 в/в. На 4 день после трансплантации мышей делили на семь групп, которые получали однократные в/в инъекции: группа 1 (контроль, w/t) – PBS; группы 2-7 – ДК, нагруженные РНК-B16 в комплексах с липосомами 2X3-DOPE, M1, M2, M4, M5 и M6, соответственно. Липосомы M3 не исследовали в эксперименте *in vivo* вследствие низкой ТЕ *in vitro*.

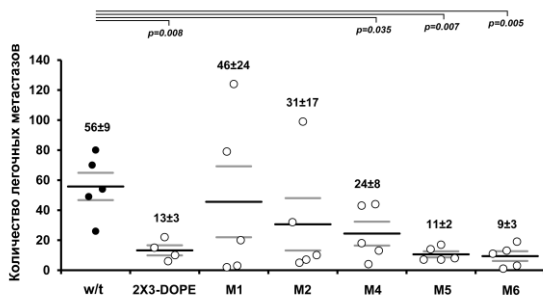


Рис. 10. Антиметастатический эффект ДК, нагруженных РНК-B16 в комплексах с МЛ, на модели меланомы B16. Для определения уровня достоверности использовали однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD).

Иммунизация мышей ДК, нагруженными липopleксами 2X3-DOPE/РНК-B16, M5/РНК-B16 и M6/РНК-B16, приводила к значительному снижению количества легочных метастазов - в 4.3, 5 и 6.3 раза по сравнению с контролем, соответственно ($p=0.008$, $p=0.007$ и $p=0.005$, Рис. 10). Количество метастазов у мышей, получавших инъекции ДК, нагруженных M4/РНК-B16, было в 2.3 раза ниже по сравнению с контролем ($p=0.035$, Рис. 10). В группе мышей, получавших ДК, нагруженные M1/РНК-B16 или M2/РНК-B16, количество метастазов было высоким и приближалось к значению контрольной группы.

Такие ДК-вакцины не вызывали у животных изменения уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ГМ-КСФ и ФНО- α), а также цитокинов, специфичных как для Th1 (ИЛ-12, ИЛ-2, ИФН- γ), так и для Th2 (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-5) ответов.

3.3.8. Аллостимуляторная активность ДК, нагруженных липоплексами

ДК, нагруженные 2X3-DOPE/РНК-В16 или М6/РНК-В16, ссаживали с аллогенными спленоцитами и через 24 ч оценивали пролиферацию спленоцитов. Данные ДК обладали высокой стимуляторной активностью и усиливали пролиферацию спленоцитов в 1.9-2 раза по сравнению с нестимулированными ДК ($p=0.014$ и $p=0.02$, Рис. 11) и с ЛПС ($p=0.038$ и $p=0.05$, Рис. 11). ДК, обработанные пустыми липосомами 2X3-DOPE или М6, также эффективно стимулировали пролиферацию спленоцитов, однако отличия были статистически недостоверными по сравнению с нестимулированными ДК и ДК, обработанными ЛПС. Таким образом, катионные липосомы имеют существенное значение для стимуляторной активности ДК. Добавление 10% мол. маннозилированных липоконъюгатов в состав 2X3-DOPE (М6 липосомы) не влияло на стимуляторную активность ДК по сравнению с 2X3-DOPE.

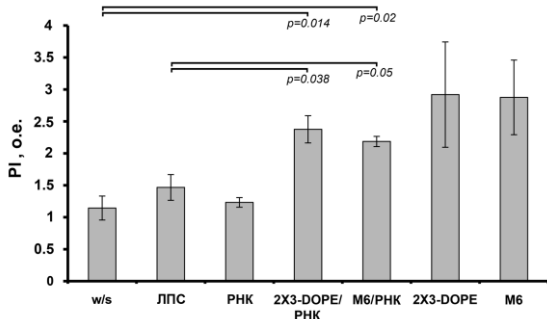


Рис. 11. Индекс пролиферации (PI) спленоцитов после стимуляции ДК, нагруженными липоплексами. Уровень пролиферации (PI) спленоцитов в отсутствие стимуляторных ДК взят за 1 относительную единицу (о.е.). Уровень достоверности определяли с помощью t-теста Стьюдента.

3.3.9. Активация опухоль-специфических ЦТЛ *in vivo* под действием липоплексов МЛ/РНК-В16

Липоплексы 2X3-DOPE/РНК-В16, М5/РНК-В16 и М6/РНК-В16 вводили в/в здоровым мышам С57В1/6. На 7 день после введения получали спленоциты, проводили их рестимуляцию с помощью лизата клеток меланомы В16 в присутствии ИЛ-2 в течение 4 дней и оценивали цитотоксичность против клеток меланомы В16 (Рис. 12).

Липоплексы М6/РНК-В16, содержащие 10% мол. маннозилированного липоконъюгата **2**, индуцировали клон ЦТЛ с эффективностью специфического лизиса клеток меланомы В16, который был в 2.2 и 1.7 раз выше по сравнению с нестимулированными спленоцитами и 2X3-DOPE, соответственно (соотношение эффекторные клетки / таргетные клетки = 20 / 1). Интенсивность ЦТЛ ответа в случае 2X3-DOPE и М5, содержащих 5% мол. маннозилированного липоконъюгата **2**, значительно не отличалась от контрольного уровня.

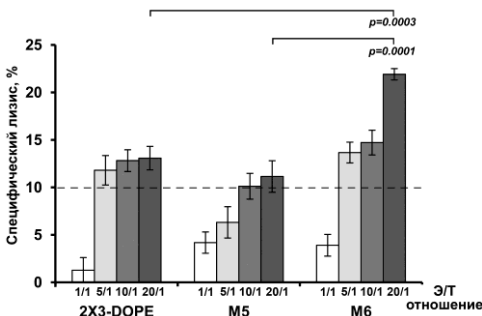


Рис. 12. Лизис клеток меланомы В16 специфически активированными спленоцитами. Базовая линия (пунктирная): неспецифический лизис клеток В16 спленоцитами, выделенными из контрольных животных, получавших инъекции Орті-МЕМ (контроль), уровень базовой линии не превышал 7-10%. Э/Т отношение – соотношение эффекторные клетки (спленоциты) / таргетные клетки (клетки В16).

3.4. Исследование эффективности профилактических и терапевтических ДК вакцин в лечении опухолей

3.4.1. Экспериментальные модели и схемы лечения опухолей с помощью ДК

Использовали три опухолевые модели: аденокарциному Кребс-2 (Кребс-2, неметастазирующая опухоль с первичным узлом), меланому В16 (опухоль без первичного опухолевого узла с метастазами в легких) и карциному легких Льюис (LLC, опухоль с первичным опухолевым узлом и метастазами в легких).

ДК вакцины получали из костно-мозговых преДК культивированием в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 с последующей нагрузкой имДК ОАГ. Для нагрузки ДК использовали источники множества ОАГ, а именно лизат опухолевых клеток и суммарную опухолевую РНК. В качестве трансфектантов для доставки РНК в ДК использовали коммерческий препарат LF или катионные липосомы 2D3-DOPE (Рис. 1). Степень активации ДК после обработки липоплексами LF/РНК или 2D3-DOPE/РНК оценивали по увеличению экспрессии маркеров созревания CD80, CD83 и CD86.

В режиме профилактической вакцинации в моделях опухолей Кребс-2 и LLC мыши были однократно в/в иммунизированы ДК вакцинами за 7 дней до трансплантации опухоли. В модели меланомы В16 использовали одну или две ДК вакцинации с недельным интервалом между ними – первую вакцину вводили за 14 дней до трансплантации опухоли, ревакцинацию осуществляли за 7 дней до трансплантации опухоли.

В режиме терапевтической вакцинации животные-опухоленосители получали в/в инъекции ДК вакцин на 4 день после трансплантации опухоли, ревакцинацию мышей в модели меланомы В16 проводили на 11 день развития опухоли, через неделю после первой ДК вакцинации.

3.4.2. Сравнение противоопухолевой активности профилактической и терапевтической схем лечения ДК на различных опухолевых моделях

Эффективность противоопухолевого ответа при профилактической и терапевтической ДК вакцинации представлена на Рис. 13. Тип вакцины для моделей Кребс-2 и LLC приведен как С/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая)/трансфектант/источник антигена, для модели меланомы В16 тип вакцины приведен как С-И/Т/А – схема (1 - профилактическая, 2 – терапевти-

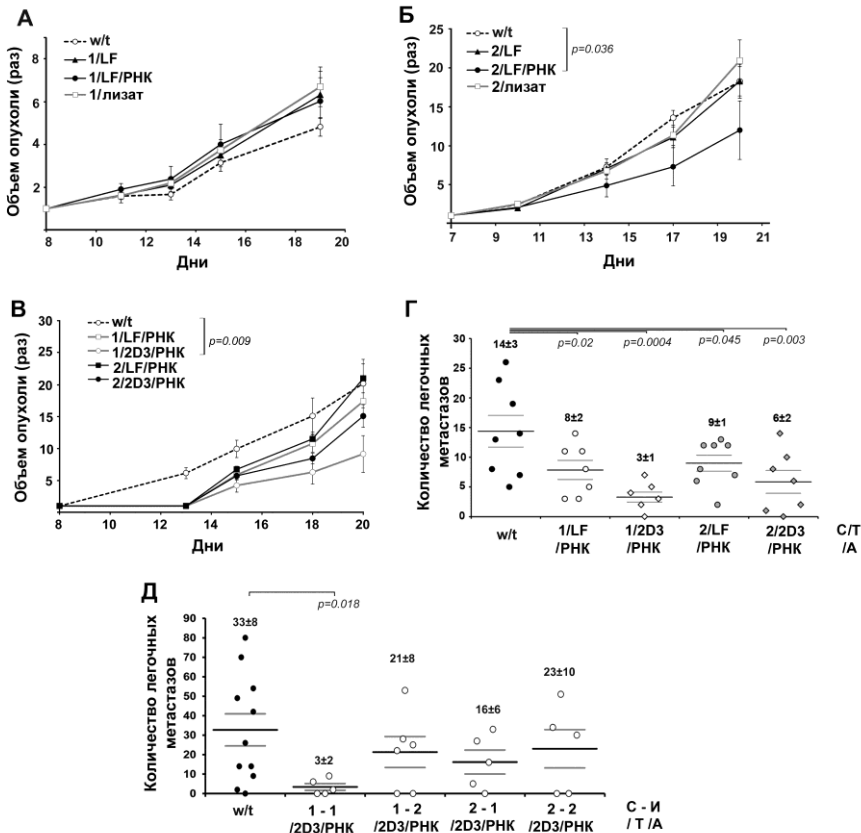


Рис. 13. Эффективность ДК вакцин. **А и Б.** Подавление скорости роста Кребс-2 под действием профилактических и терапевтических ДК вакцин, соответственно. w/t – контроль, животные с Кребс-2, получавшие инъекции PBS. **В и Г.** Подавление скорости роста и метастазирования LLC под действием ДК вакцин. w/t – контроль, животные с LLC, получавшие инъекции PBS. Тип ДК вакцины для А-Г представлен в виде С/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая)/трансфектант/источник антигена. **Д.** Ингибирование метастазирования меланомы В16 под действием ДК вакцин. Тип ДК вакцины представлен в виде С-И/Т/А – схема (1 – профилактическая, 2 – терапевтическая) – количество иммунизаций/трансфектант/источник антигена. w/t – контроль, животные с меланомой В16, получавшие инъекции PBS.

ческая) – количество иммунизаций/трансфектант/источник антигена.

В модели Кребс-2 профилактические вакцины на основе как РНК, так и лизата были неэффективны и не влияли на рост опухоли (Рис. 13А). Введение терапевтической ДК вакцины на основе РНК (2/LF/РНК) мышам с Кребс-2 приводило к заметному подавлению роста опухоли в 1.9 раз по сравнению с контрольной группой без лечения (w/t) ($p=0.036$), тогда как терапевтическая вакцина на основе лизата (2/лизат) была слабо иммуногенной (Рис. 13Б).

В модели LLC использовали ДК вакцины на основе РНК. В качестве трансфектантов использовали LF и катионные липосомы 2D3-DOPE. В группе животных, получавших профилактическую ДК вакцину 1/2D3/РНК, наблюдалось двукратное снижение скорости роста опухоли по сравнению с контролем ($p=0.009$, Рис. 13В). В этой же группе животных наблюдался наиболее эффективный антиметастатический ответ – снижение количества легочных метастазов в 4.7 раз относительно контроля ($p=0.0004$, Рис. 13Г). Терапевтическая вакцинация мышей-опухоленосителей такой же вакциной (2/2D3/РНК) приводила к 2.3-кратному снижению количества метастазов по сравнению с контролем ($p=0.003$, Рис. 13Г), однако не вызывала подавления роста первичной опухоли (Рис. 13В). Лечение животных как профилактической, так и терапевтической ДК вакциной с использованием LF в качестве трансфектанта не приводило к достоверному снижению скорости роста опухоли, однако наблюдалось 1.5-кратное снижение количества метастазов по сравнению с контролем ($p=0.02$ и $p=0.045$ для 1/LF/РНК и 2/LF/РНК, соответственно, Рис.13Г).

В модели меланомы В16 ДК вакцины состояли из ДК, трансфицированных липоплексами 2D3-DOPE/РНК-В16. Однократная профилактическая вакцинация 1-1/2D3/РНК оказалась наиболее эффективной и приводила к снижению количества легочных метастазов в 10 раз по сравнению с контролем ($p=0.018$, Рис. 13Д). Двукратная профилактическая вакцина 1-2/2D3/РНК, обладала меньшим антиметастатическим потенциалом: наблюдалось ингибирование метастазирования в 1.5–2 раза (данные статистически не достоверны, Рис. 13Д). Следует отметить, что как в профилактической, так и в терапевтической схемах лечения двукратная иммунизация ДК была менее эффективной по сравнению с однократной ДК вакциной.

3.4.3. Иммунологические характеристики организма-опухоленосителя после лечения профилактическими и терапевтическими ДК вакцинами.

Было исследовано соотношение $CD4^+/CD8^+$ клеток в селезенках животных с Кребс-2, получавших профилактические и терапевтические ДК вакцины, отражающее баланс между Т-хелперным и ЦТЛ ответами (Рис. 14). Количество $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток в точках – 7 день (Рис. 14А-Г) и 0 день (Рис. 14Д-3) измеряли до введения ДК вакцин и трансплантации опухоли (здоровые животные), которое составило 18% и 19%, соответственно.

Количество $CD4^+$ клеток в контрольной группе профилактической схемы (животные с Кребс-2, получавшие инъекции PBS, 19 день развития опухоли) слабо изменялось в ходе развития опухоли (Рис. 14А). Все профилактические вакцины 1/LF, 1/LF/РНК, 1/лизат вызывали двукратное увеличение содержания $CD4^+$ клеток на 7-ой день после введения ДК вакцин (день трансплантации опухоли) вне зависимости от источника антигена (Рис. 14Б,В,Г). К окончанию эксперимента (день 19) количество $CD4^+$ клеток снижалось до 18-22% (Рис. 14Б-Г). Количество $CD8^+$ клеток слабо снижалось с 19% (базовый уровень) до 13-17% на 19 день развития опухоли во всех экспериментальных группах, включая контроль (Рис. 14А-Г).

Количество $CD4^+$ клеток в контрольной группе терапевтической схемы (жи-

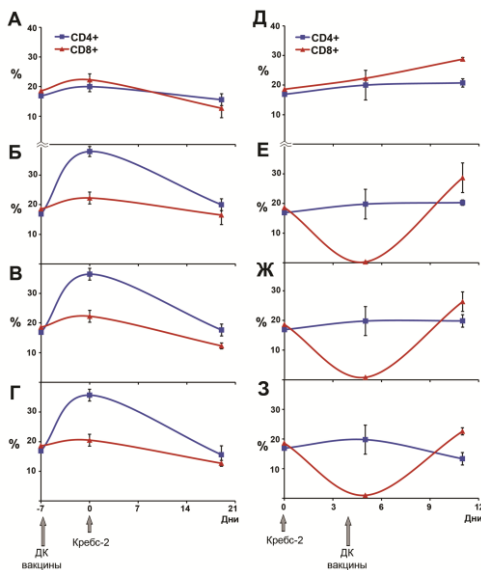


Рис. 14. Количество $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток в селезенках животных с Кребс-2, получавших лечение профилактическими и терапевтическими ДК вакцинами.

А. w/t, контроль, мыши с Кребс-2, получавшие инъекции PBS, 19 день развития опухоли.

Б, В и Г. Мыши, получавшие профилактические ДК вакцины 1/LF, 1/LF/ПНК и 1/лизат, соответственно.

Д. w/t, контроль, мыши с Кребс-2, получавшие инъекции PBS, 11 день развития опухоли.

Е, Ж и З. Мыши, получавшие терапевтические ДК вакцины 2/LF, 2/LF/ПНК и 2/лизат, соответственно.

Количество $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток в точке -7 день отражает содержание клеток в селезенках здоровых мышей

вотные с Кребс-2, получавшие инъекции PBS, 11 день развития опухоли) слабо увеличивалось с 17% (базовый уровень) до 21% в ходе развития опухоли (Рис. 14Д). ДК вакцины 2/LF и 2/LF/ПНК не влияли на содержание $CD4^+$ клеток (Рис. 14Е,Ж). ДК вакцина 2/лизат снижала количество $CD4^+$ клеток до 13% к концу эксперимента (Рис. 14З). Количество $CD8^+$ клеток в контрольной группе терапевтической схемы значительно росло с 19% (базовый уровень) до 29% к 11-ому дню (Рис. 14Д). Все терапевтические ДК вакцины 2/LF, 2/LF/ПНК и 2/лизат вызывали практически полное исчезновение $CD8^+$ клеток в первый день после введения ДК вакцин (5 день после трансплантации опухоли) (Рис. 14Е-З). Тем не менее, на 7 день после введения ДК (11 день после трансплантации опухоли) количество $CD8^+$ клеток возвратилось к контрольному уровню (22-29%).

Оценка Т-хелперных и провоспалительного ответов показала, что профилактическая ДК вакцина не приводит к статистически значимым изменениям уровня Th1-цитокинов. В случае терапевтической схемы лечения наблюдалось увеличение уровней ИЛ-2 и ИЛ-12 ($p < 0.05$) в группах 2-1/2D3/ПНК и 2-2/2D3/ПНК, соответственно.

Однако профилактическая ДК вакцина приводила к падению уровня Th2-цитокинов: наблюдалось полное исчезновение ИЛ-4, значительное падение уровня ИЛ-10 и 1.6-кратное снижение концентрации ИЛ-5 в группе 1-1/2D3/ПНК (отличия от контроля статистически недостоверны), а также полное исчезновение ИЛ-5 в группе 1-2/2D3/ПНК ($p = 0.009$). Иммунизация животных терапевтическими ДК вакцинами 2-1/2D3/ПНК и 2-2/2D3/ПНК не приводила к изменениям уровня Th2-цитокинов. Анализ провоспалительного ответа показал 1.3-кратное повышение уровня ИЛ-1 β в группе 2-1/2D3/ПНК и трехкратное повышение уровня ФНО- α в группе 1-1/2D3/ПНК.

3.4.4. Оценка экспрессии транскрипционных факторов *Tbet*, *RORγ*, *GATA3* и *Foxp3*

Экспрессию транскрипционных факторов *Tbet* (специфичен для Th1 ответа), *GATA3* (Th2 ответ), *RORγ* (Th17 ответ) и *Foxp3* (Т регуляторные клетки) оценивали в спленocyтaх мышей с метастатической меланомой В16, получавших ДК вакцины, с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Рис. 15).

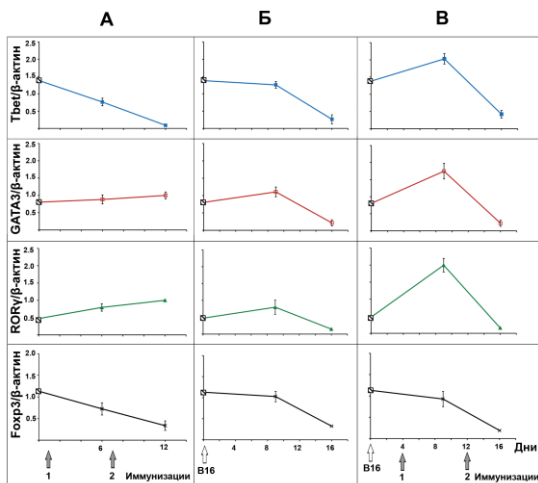


Рис. 15. Уровни экспрессии *Tbet*, *GATA3*, *RORγ* и *Foxp3* в спленocyтaх мышей после ДК вакцинации.

А. Профилактическая схема лечения: здоровые мыши получали ДК вакцины 1-1/2D3/PHK и 1-2/2D3/PHK (однократная и двукратная иммунизация, соответственно).

Б. Мыши с метастатической меланомой получавшие инъекции PBS (контроль).

В. Терапевтическая схема лечения: мыши с метастатической меланомой получали ДК вакцины 2-1/2D3/PHK и 2-2/2D3/PHK (однократная и двукратная иммунизация, соответственно). Перечеркнутый квадрат на оси Y отражает уровень экспрессии генов в здоровых интактных мышах (базовая линия).

Показано, что как однократная, так и двукратная профилактические ДК вакцины не оказывали эффекта на уровень *GATA3* (Рис. 15А). Увеличение количества профилактических ДК иммунизаций привело к исчезновению *Tbet* ($p=0.0018$) и двукратному увеличению уровня *RORγ* ($p=0.04$), с чем может быть связано отсутствие эффективности двукратной профилактической ДК вакцины, т.к. поляризация Th17-ответа свидетельствует о развитии аутоиммунных и про-воспалительных реакций в организме. Уровня *Foxp3* снижался в 3 раза по сравнению с базовой линией (здоровые животные) (отличия статистически недостоверны) (Рис. 15А).

Однократная терапевтическая иммунизация мышей-опухоленосителей ДК вакциной приводила к увеличению уровня экспрессии *Tbet*, *GATA3* и *RORγ* по сравнению с базовой линией и группой w/t (Рис. 15В,Б). Уровни *Tbet* и *GATA3* увеличивались в 1.3 и 2 раза относительно группы w/t (данные статистически недостоверны). Уровень *RORγ* увеличивался в 5 раз ($p=0.019$) по сравнению с группой w/t. Таким образом, увеличение уровней экспрессии *RORγ* и *Tbet* вместе с увеличенным содержанием некоторых Th1 цитокинов в сыворотке крови мышей указывает на то, что одиночная терапевтическая вакцинация модифицированными ДК приводит к поляризации Th1/Th17 ответа. Уровни экспрессии *Tbet*, *GATA3* и *RORγ* после второй терапевтической ДК иммунизации не отличались от уровней в группе w/t (Рис. 15В,Б). Уровень экспрессии *Foxp3* снижался во всех группах животных (данные статистически недостоверны).

ВЫВОДЫ

1) Исследована трансфекционная активность шести поликатионных липосом, состоящих из катионных липидов на основе спермина и холестерина или диглицерида, и липида-хелпера DOPE, в отношении ДК и способность нагруженных таким образом ДК модулировать эффективный противоопухолевый иммунный ответ. Показано, что:

- Липосомы на основе липидов 2X3 (1,26-бис(холест-5-ен-3 β -илоксикарбониламино)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид) и 2D3 (1,26-бис(1,2-ди-О-тетрадецил-гас-глицерин)-7,11,16,20-тетраазагексакозан тетрагидрохлорид) наиболее эффективно доставляют ДНК и РНК в предшественники ДК и незрелые ДК мыши.

- Вакцины, полученные путем трансфекции ДК суммарной опухолевой РНК в комплексах с данными липосомами, опосредуют запуск эффективного противоопухолевого ответа у мышей с метастатической меланомой В16, что выражается в 5-кратном снижении количества метастазов и отсутствии активации про-воспалительного ответа.

2) Исследована доставка в ДК плазмидной ДНК и РНК, кодирующей опухолевые антигены, с помощью «адресных» поликатионных липосом на основе липосом 2X3-DOPE, направленных к маннозным рецепторам на поверхности дендритных клеток. Показано, что:

- Добавление в состав липосом 2X3-DOPE 10% маннозилированных липоконъюгатов с диэтилкватерным линкером (липосомы М6), приводит к повышению эффективности доставки РНК в незрелые ДК и усилению антиметастатического потенциала такой ДК вакцины на модели метастатической меланомы В16.

- При системном введении лабораторным животным комплексов суммарной опухолевой РНК клеток меланомы В16 с липосомами М6 наблюдалась в два раза более эффективная активация анти-В16 цитотоксических Т-лимфоцитов по сравнению с контрольными липосомами 2X3-DOPE.

3) Исследована противоопухолевая эффективность ДК вакцин, содержащих в качестве источника антигена опухолевый лизат или РНК, при лечении по профилактической и терапевтической схемам. Показано, что:

- Наиболее эффективные ДК вакцины получены с использованием в качестве источника антигена опухолевой РНК;

- Профилактическая схема лечения ДК вакцинами наиболее эффективна в отношении высокоагрессивных метастазирующих опухолей (карцинома легких Льюис, меланома В16), тогда как терапевтическая схема ДК вакцинации была эффективна в отношении неметастазирующей опухоли (Кребс-2).

- При лечении по профилактической или по терапевтической схемам происходит поляризация Th17 или Th1/Th17 иммунных ответов, соответственно. При этом не наблюдается активации регуляторных Т-клеток.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1) Markov, O.V., Mironova, N.L., Maslov, M.A., Petukhov, I.A., Morozova, N.G., Vlassov, V.V., Zenkova, M.A. Novel cationic liposomes provide highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets // *J. Control. Release.* – 2012. – V. 160. – P. 200-210.

2) Markov, O.V., Mironova, N.L., Shmendel, E.V., Serikov, R.N., Morozova, N.G., Maslov, M.A., Vlassov, V.V., Zenkova, M.A. Multicomponent mannose-containing liposomes efficiently deliver RNA in murine immature dendritic cells and provide productive anti-tumour response in murine melanoma model // *J. Control. Release.* – 2015. – V. 213. – P. 45-56.

3) Markov, O.V., Mironova, N.L., Sennikov, S.V., Vlassov, V.V., Zenkova, M.A. Prophylactic dendritic cell-based vaccines efficiently inhibit metastases in murine metastatic melanoma // *PLoS ONE.* – 2015. – V. 10. – P. e0136911. doi: 10.1371/journal.pone.0136911