

ИММУНИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ PRAME ЗАМЕДЛЯЕТ РОСТ PRAME-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ У МЫШЕЙ

Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лыжко¹, Н.Н. Касаткина¹, Л.А. Кесаева¹, В.В. Тихонова¹,
В.А. Мисюрин¹, М.А. Барышникова¹, А.В. Мисюрин^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Юлия Павловна Финашутина j_finashutina@mail.ru

Введение. Белок PRAME, экспрессирующийся во многих опухолях и практически отсутствующий в нормальных тканях, может быть подходящей мишенью для иммунотерапии рака, так как способен вызывать иммунный ответ.

Цель исследования — изучение противоопухолевого эффекта профилактической иммунизации рекомбинантным человеческим белком PRAME на иммунокомпетентных мышах.

Материалы и методы. В работе были использованы культура клеток меланомы мыши B16F10, мыши линии C57BL/6, клонирование, трансфекция, полимеразная цепная реакция в реальном времени, анализ вестерн-блот, проточная цитофлуориметрия и иммуноферментный анализ.

Результаты. Были получены клетки меланомы мыши, трансфицированные плазмидой с вставкой гена PRAME человека и экспрессирующие соответствующий белок на высоком уровне. После нескольких предварительных иммунизаций композицией, содержащей рекомбинантный белок PRAME и адъювант, у мышей значительно замедлялся рост меланомы B16F10, экспрессирующей человеческий антиген PRAME (торможение роста опухоли — 98,41 %), и у животных данной группы детектировался высокий титр ($6,14 \times 10^5$) специфических антител в сыворотке.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что рекомбинантный белок PRAME можно рассматривать как перспективный антиген для противоопухолевой иммунотерапии.

Ключевые слова: рекомбинантный антиген, PRAME, иммунизация, трансфекция, меланома мыши B16F10

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-36-42

RECOMBINANT HUMAN PRAME IMMUNIZATION REDUCES PRAME-EXPRESSING TUMOR GROWTH IN MICE

Yu. P. Finashutina¹, N. A. Lyzhko¹, N. N. Kasatkina¹, L. A. Kesaeva¹, V. V. Tikhonova¹,
V. A. Misyurin¹, M. A. Baryshnikova¹, A. V. Misyurin^{1,2}

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²GeneTechnology LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia

Introduction. Human antigen PRAME is preferentially expressed in a number of different tumor types and may be a potent target for anti-tumor immunotherapy.

Purpose. To study anti-tumor action of immunogenic mix recombinant PRAME protein and adjuvant in mice with innate immunity.

Materials and methods. C57BL/6 female mice were used for immunization with purified human recombinant protein PRAME. Human PRAME gene coding sequence was cloned in mammalian expressing vector pCEP4 and resulting plasmid was introduced in mouse melanoma B16F10 cells by transfection followed by RQ-PCR, Western blot and flow-cytometry analysis. Then stably PRAME-transfected melanoma cells were injected in mice.

Results. The mouse melanoma B16F10 cells stably expressing human PRAME protein were obtained. We demonstrate the 10-fold decreased tumor volume in mice with melanoma B16F10 expressing human PRAME after preventive immunization series with recombinant PRAME protein. The tumor volume reducing was correlated with high titer (6.14×10^5) of anti-PRAME antibodies in mice sera.

Conclusion. These data indicate that recombinant protein PRAME is immunogenic and may be a potent antigen for immunotherapy studies.

Key words: recombinant antigen, PRAME, immunization, mouse B16F10 melanoma

Введение

В настоящее время традиционные методы лечения рака увеличивают выживаемость пациентов, но они часто ассоциированы с побочными эффектами и далеко не всегда позволяют достичь полной ремиссии. Кроме того, часть пациентов с опухолями оказываются резистентными к стандартной противоопухолевой терапии. Проблема ранних рецидивов также остается значимой. Ряд опухолей, такие как меланома и гепатоцеллюлярная карцинома, обладают незначительной чувствительностью к противоопухолевой терапии. Таким образом, существует необходимость в разработке новых методов лечения рака, более специфичных и менее токсичных.

Исследования последних десятилетий в области иммунологии, а также понимание клеточных и молекулярных путей при канцерогенезе привели к разработке различных иммунотерапевтических подходов для лечения опухолей [1].

В связи с открытием различных опухолевых антигенов, способных вызывать специфический иммунный ответ, иммунотерапевтические методы лечения включают также противоопухолевую вакцинацию [2]. Потенциальными преимуществами иммунотерапии являются специфичность против опухолевых клеток, сниженный риск повреждения нормальных тканей и вероятный пролонгированный эффект. Ограничением такого вида терапии может быть слабый иммунный ответ против антигенов опухоли. Соответственно, для усиления противоопухолевого иммунного ответа необходимо применять также иммуностимулирующие вещества и тщательно подойти к выбору мишени для иммунотерапии.

Антиген *PRAME* может быть перспективной мишенью для иммунотерапии, так как экспрессируется в различных опухолях, например, при меланоме, немелкоклеточном раке легкого и гемобластозах [3, 4] и практически не экспрессируется в нормальных тканях. Белки с такими характеристиками относят к группе раково-тестикулярных антигенов [5]. Ряд исследований подтверждает его иммуногенность и способность индуцировать цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ [6–8].

Таким образом, разработка новых подходов для оценки иммунотерапевтического потенциала белка *PRAME* является перспективной. Исследование противоопухолевых вакцин на животных моделях опухолей, экспрессирующих человеческие опухолевые антигены, часто используется в рамках предварительных доклинических исследований [9, 10]. Кроме того, используются модели опухолей с иммунизацией собственными мышинными опухолевыми антигенами [11].

В данной работе оценивается эффект иммунизации рекомбинантным белком *PRAME* на модели *PRAME*-экспрессирующей опухоли у мышей.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и клеточные линии

Использовались штаммы *E. coli* DH-5 α , линия эритромиелоидного лейкоза K562, линия меланомы мыши B16F10.

Получение рекомбинантного белка *PRAME*

Рекомбинантный человеческий белок *PRAME* очищали хроматографически из клеток штамма-продуцента *E. coli* [12] и стерилизовали фильтрацией. Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд. Очищенный белок сорбировали на суспензии гидроксида алюминия (Brenntag Biosector) в течение 24 ч перед инъекцией.

Получение экспрессионного вектора

Кодирующую последовательность гена *PRAME* получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами prmF и prmR (табл. 1) с комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), выделенной из линии клеток K562. ПЦР-фрагмент был клонирован в промежуточную плазмиду pGEM-T Easy, а затем переклонирован в плазмиду pCER4 (Invitrogen) по сайтам рестрикции NotI. Плазмидную ДНК для последующей трансфекции выделяли набором Wizard® MagneSil (Promega).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в данной работе

Название	5'–3' - последовательность
prmF	ATGGAACGAAGGCGTTTGTGG
prmR	GCACCCAGCTAGTTAGGCATGAAA
mactF (β -актин)	AAGTGTGACGTTGACATCCGTAA
mactR (β -актин)	TGCCTGGGTACATGGTGGTA
prmFb	GACTCTTTATTTTTTCCTTAGA
prmRb	CGAAAGCCGGCAGTTAGTTATT

Трансфекция клеток меланомы

Клетки меланомы мыши B16F10 выращивали в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ глутамина, 10 мМ HEPES, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки при 5 % CO₂. Трансфекцию проводили с помощью набора TransFast (Promega) по инструкции производителя; для 5 \times 10⁴ клеток брали 500 нг очищенной от эндотоксинов плазмидной ДНК pCER4-*PRAME*. Методом лимитирующих разведений на селективной среде при концентрации гигромицина 50 мкг/мл отбирались клетки с максимальной и стабильной экспрессией гена *PRAME*.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Экспрессию гена *PRAME* определяли методом ПЦР в реальном времени. Комплементарную ДНК

гена *PRAME* и референсного гена (*бета-актин*) амплифицировали при помощи специфических праймеров *primFb* и *primRb* (см. табл. 1) в присутствии красителя SYBR Green. Реакция проводилась на оборудовании Roche LightCycler® 96 System. Для оценки уровня экспрессии вычисляли соотношение относительных количеств копий комплементарной ДНК гена и референсного гена, данные значения определяли при помощи построения стандартных кривых.

Иммуноблоттинг

Экспрессию белка определяли в лизатах клеток B16F10, трансфицированных плазмидой с геном *PRAME*. Лизаты приготавливали при помощи RIPA-буфера с ингибиторами протеаз (Thermo Scientific Pierce, США). Электрофорез в 10 % полиакриламидном геле проводили по стандартной методике Laemmli [13], на 1 дорожку наносили 50 мкг тотального белка. После электрофореза перенос белков из геля на Amersham Hybond-P PVDF мембрану (GE Healthcare, Великобритания) осуществляли методом полусухого электроблоттинга. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к белку *PRAME*, полученные нами ранее [12]; вторичных — антитела козы против антител мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Dako Research, США). Для визуализации белка, связавшегося с антителами, использовали двухкомпонентную систему Clarity Western ECL (Bio-Rad).

Проточная цитометрия

Эффективность трансфекции клеток B16F10 оценивали на проточном цитометре ACEA NovoCyte (ACEA Biosciences, США). Перед окрашиванием белка *PRAME* проводилась пермеабилзация клеток реактивами Fixation Buffer и Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (SONY biotechnology, Япония) согласно протоколу, предложенному производителем. Для окрашивания клеток использовались моноклональные антитела к белку *PRAME* [12] и вторичные FITC-меченные антимишьяные антитела (Becton Dickinson, США). В качестве контроля использовались B16F10, трансфицированные пустым вектором.

Иммунизация животных рекомбинантным белком

Для трансплантации опухолевых клеток использовали иммунокомпетентных мышей-самок линии C57BL/6J массой тела не менее 18 г из питомника ООО «Столбовая, питомник лабораторных животных». Группы по 5 мышей были четырежды иммунизированы внутрибрюшинно с двухнедельными интервалами рекомбинантным белком *PRAME* в дозе 50 мкг на мышь с 300 мкг гидроксида алюминия в качестве адъюванта. Титр антител в сыворотке кро-

ви оценивался методом твердофазного иммуноферментного анализа перед введением животным клеток опухоли, а также на 14-й и 21-й день после трансплантации опухолевых клеток.

Измерение опухолей

Клетки опухоли B16F10-*PRAME* были подкожно трансплантированы в дозе 2×10^5 клеток на мышь через 14 дней после последней иммунизации. Размеры опухолей измерялись на 14, 18 и 21-й дни после введения клеток. Пальпируемые узлы измеряли и рассчитывали объем по формуле $V = 0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$, торможение роста опухоли (ТРО) — по формуле $\text{ТРО} = (V_{\text{к}} - V_0) / V_{\text{к}} \times 100 \%$ [14], где $V_{\text{к}}$ — средний объем опухоли у животных контрольной группы, получавших инъекции адъюванта; V_0 — средний объем опухоли у животных контрольной группы, получавших инъекции рекомбинантного белка с адъювантом либо без адъюванта. При статистической обработке применяли метод Манна—Уитни.

Иммуноферментный анализ

В лунку планшета наносили рекомбинантный белок *PRAME* в концентрации 2 мкг/мл. Затем после отмывания вносили образцы сывороток крови мышей в двукратных разведениях. В качестве вторичных антител использовали конъюгат антител козы с пероксидазой хрена против IgG мыши (Dako Research, США). Проявляли реакцию раствором тетраметилбензидина и после остановки реакции измеряли оптическую плотность (ОП) при 450 нм. Титром сыворотки считали ее разведение, при котором значения ОП вдвое превышали контрольные значения.

Результаты и обсуждение

Получение клеток мышинной меланомы, экспрессирующих белок *PRAME* человека

Полноразмерный ген *PRAME* (NM_006115.4) был клонирован в вектор pCER4 для экспрессии в эукариотических клетках под контролем CMV-промотора. Методом прямого секвенирования подтверждено, что все составные части плазмиды и последовательность, кодирующая белок *PRAME*, полностью соответствуют оригинальной схеме конструирования. После трансфекции плазмидой pCER4-*PRAME* линии мышинной меланомы B16F10 были получены клетки, стабильно экспрессирующие человеческий белок *PRAME*, и определена прививочная доза 2×10^5 клеток на мышь, обеспечивающая 100 % прививаемость для этих клеток. В полученной трансфицированной линии клеток мышинной меланомы B16F10 по данным ПЦР в реальном времени уровень экспрессии человеческого гена *PRAME* составлял $27,4 \pm 1,6 \%$ относительно референс-гена (β -актин) по результатам 3 измерений в течение 1 мес культивирования.



Рис. 1. Анализ экспрессии белка PRAME в культуре клеток методом иммуноблоттинга: 1 – K562 клетки хронического миелолейкоза (человек); 2 – меланома мыши B16F10; 3 – клетки B16F10, трансфицированные контрольной плазмидой; 4 – клетки B16F10, трансфицированные плазмидой с геном PRAME

Экспрессия человеческого белка PRAME в данной трансфицированной линии подтверждена методом иммуноблоттинга (рис. 1) и методом проточной цитометрии (рис. 2).

Развитие гуморального ответа

На момент трансплантации клеток опухоли, экспрессирующих белок PRAME, мыши были проиммунизированы 4 раза с двухнедельными интервалами рекомбинантным человеческим белком PRAME в растворе 0,9 % NaCl либо тем же белком в смеси с адьювантом. Схема эксперимента представлена на рис. 3. Мыши контрольной группы получали в том же режиме инъекции адьюванта или раствора 0,9 % NaCl. Таким образом, через 42 дня после первой иммунизации и перед прививанием опухоли в сыворотке мышей обнаруживался высокий титр специфических антител: $1,76 \times 10^5$ у мышей, иммунизированных белком, и $2,89 \times 10^5$ у мышей, иммунизированных смесью белка с адьювантом (рис. 4). У животных контрольных групп детектировался очень низкий уровень антител, сравнимый с фоновым сигналом, так как

они не получили инъекций антигена. По мере роста опухоли титр антител повысился до $6,14 \times 10^5$ у животных, иммунизированных рекомбинантным белком с адьювантом, и $3,07 \times 10^5$ у животных, иммунизированных только рекомбинантным белком; разница между этими величинами была статистически незначимой ($p = 0,108$). При этом у неиммунизированных животных контрольных групп детектировалось лишь небольшое увеличение титра антител, до 840, что значительно ниже, чем в опытных группах ($p = 0,025$). Появление антител к белку в сыворотке неиммунизированных животных на момент завершения эксперимента объясняется слабым эффектом иммунизации белком, присутствующим в привитой опухоли.

Рост PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10 после профилактической иммунизации рекомбинантным белком PRAME

Мышам, иммунизированным антигеном PRAME с адьювантом или изотоническим раствором NaCl, подкожно были трансплантированы клетки PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10. На рис. 5 и табл. 2 показано, что опухоль растет быстрее у животных контрольных групп, иммунизированных адьювантом или раствором 0,9 % NaCl.

По окончании эксперимента (на 21-й день) в контрольных группах средний размер опухоли достигал 700 мм³. Как следует из данных, представленных на рис. 6, на 21-й день размеры опухолей были значительно меньше у мышей, иммунизированных рекомбинантным белком PRAME ($p = 0,1113$) или рекомбинантным белком PRAME с адьювантом ($p = 0,0864$) по сравнению с группой, получившей только адьювант. При этом присутствие адьюванта при иммунизации

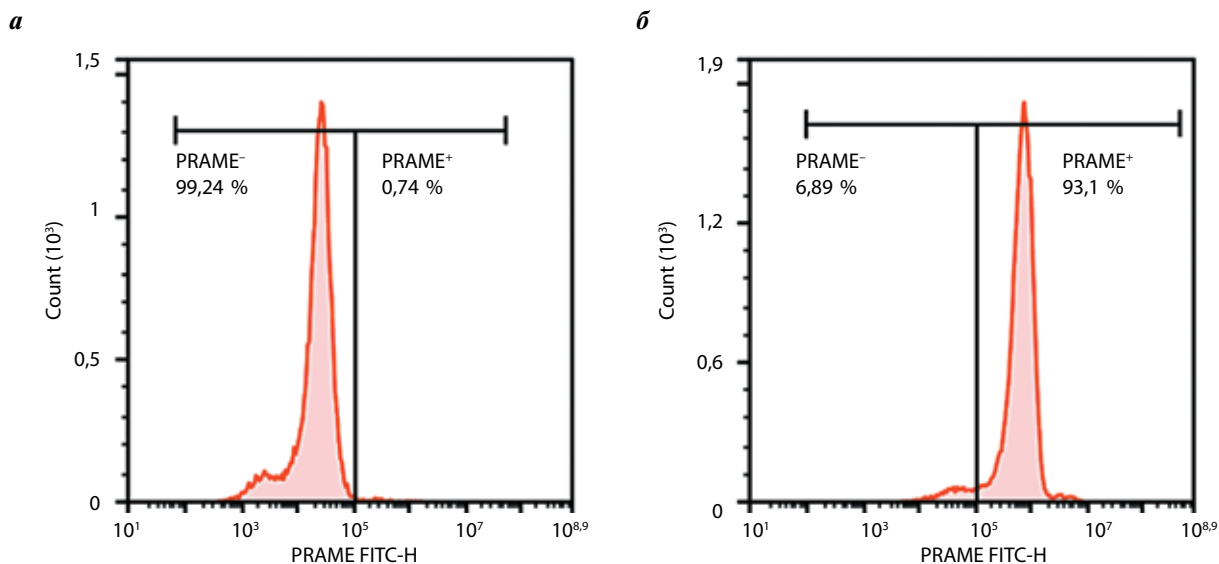


Рис. 2. Определение уровня экспрессии белка PRAME методом проточной цитометрии: а – клетки B16F10, трансфицированные контрольной плазмидой, б – клетки B16F10, трансфицированные плазмидой с геном PRAME

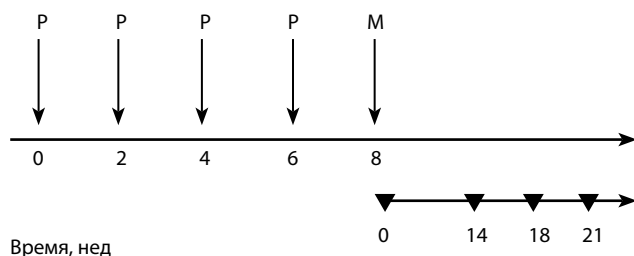


Рис. 3. Схема профилактической иммунизации рекомбинантным белком PRAME. P – иммунизация антигеном либо контрольным раствором; M – введение PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10. Треугольники обозначают временные точки получения результатов измерений

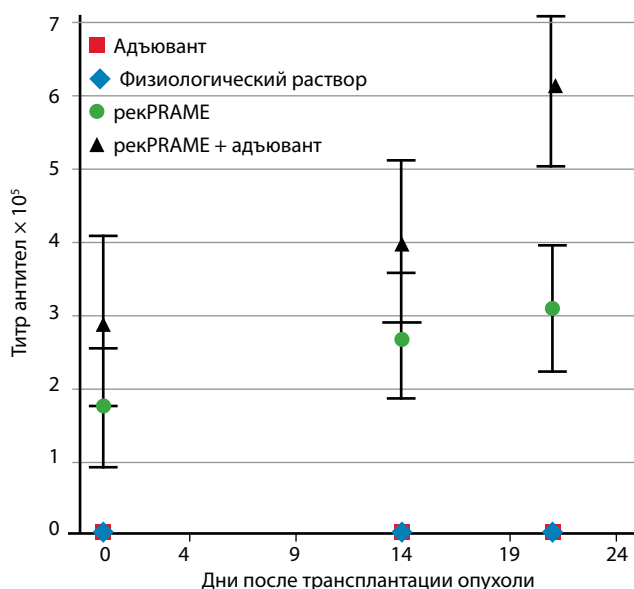


Рис. 4. Титр специфических антител к рекомбинантному белку PRAME в сыворотке мышей с меланомой B16F10-PRAME

рекомбинантным белком PRAME не влияло на размер опухолей в опытных группах ($p = 1$). Также заметно не различались контрольные группы, получившие адьювант и раствор 0,9 % NaCl ($p = 0,8852$). Торможение роста опухоли рассчитывалось на момент окончания эксперимента относительно контрольной группы, получавшей только адьювант, и состав-

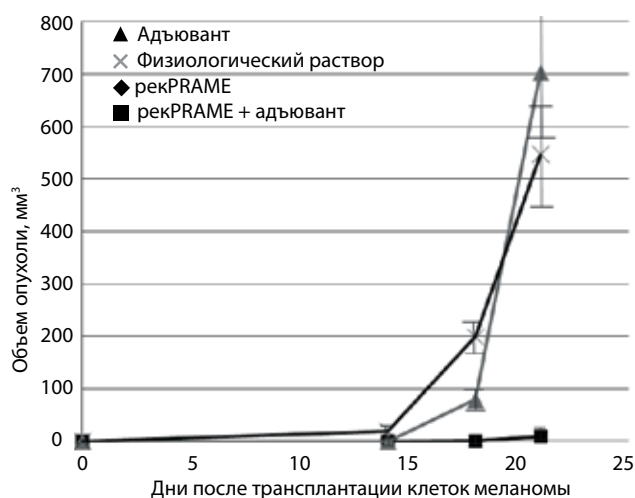


Рис. 5. Влияние профилактической иммунизации рекомбинантным белком PRAME на рост PRAME-экспрессирующей меланомы B16F10

ляло 98,41 и 98,64 % для групп, иммунизированных белком с адьювантом и чистым белком соответственно.

Таким образом, предварительная иммунизация мышей рекомбинантным человеческим белком PRAME значительно замедляет развитие меланомы B16F10, экспрессирующей человеческий антиген PRAME.

Поскольку уровень антител у предварительно иммунизированных белком мышей относительно значимо повысился за 21 день роста PRAME-экспрессирующей опухоли ($p = 0,745$), вероятно, контакт иммунной системы с опухолью, несущей антиген, усиливает специфический гуморальный ответ. Известно, что клетки мышинной меланомы B16 способны вызывать преимущественно гуморальный и антителозависимый клеточный иммунный ответ [15], так как на их поверхности снижена экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости [16]. Гуморальный ответ на антиген PRAME является важным показателем, отражающим общую активацию иммунной системы, притом что в данном исследовании наибольшие титры антител наблюдались в группе животных с самой низкой скоростью развития опухоли, несущей специфический антиген. Определяет ли такой

Таблица 2. Размеры меланомы B16F10-PRAME в контрольных и опытных группах мышей

Иммуноген	Срок измерения, сут.			День	
	14	18	21	18-й	21-й
	Объем опухоли, мм ³			ТРО, %	
Адьювант+рекPRAME	0	0,02 \pm 0,003	11,2 \pm 2,5	99,97	98,41
рекPRAME	0	1,0 \pm 0,4	9,6 \pm 2,1	98,74	98,64
Адьювант	0	79,5 \pm 20,5	703,9 \pm 123,8	—	—
0,9 % NaCl	19,25 \pm 7,3	199,7 \pm 31,2	547,1 \pm 110,2	—	—

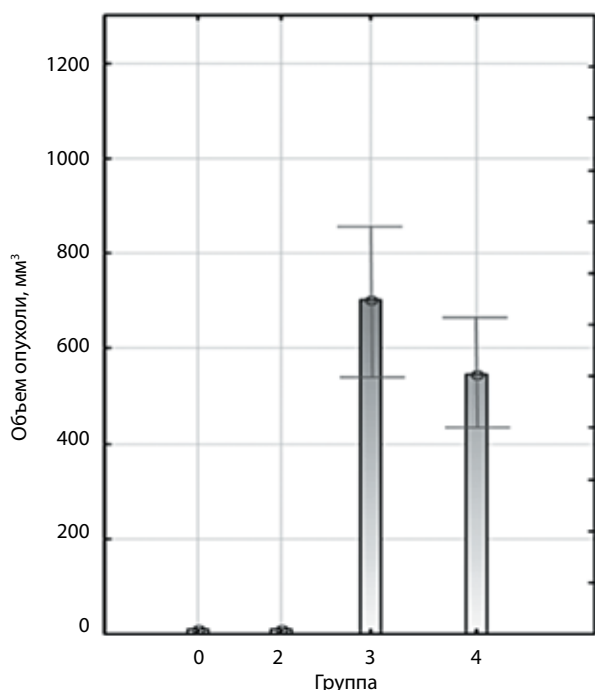


Рис. 6. Размеры меланомы B16F10-PRAME у мышей на 21-й день: 1 – рекPRAME + адъювант; 2 – рекPRAME; 3 – адъювант; 4 – физиологический раствор

иммунный ответ противоопухолевый эффект, можно будет узнать, проведя дополнительные эксперименты *in vitro* по изучению механизма действия специфических антител в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих антиген PRAME.

Похожие данные были получены на модели клеток карциномы кишечника CT26, стабильно транс-

фицированной PRAME-экспрессирующей плазмидой [17], где также использовалась схема четырехразовой иммунизации животных рекомбинантным белком PRAME внутримышечно перед введением опухолевых клеток. При этом был достигнут значительный противоопухолевый эффект иммунизации при тех же порядках титров антител в сыворотке животных, что и в представленной работе. В другом исследовании [9] подобные результаты, но в отношении раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1, были достигнуты и при двукратной подкожной иммунизации животных. Очевидно, схему иммунизации, дозу антигена и способ введения требуется подбирать экспериментально для каждого белка.

Раково-тестикулярный человеческий антиген PRAME интенсивно исследуется в качестве компонента противоопухолевых вакцин как в виде рекомбинантного белка [18, 19], где у пациентов после иммунизации был получен стойкий специфический гуморальный ответ, так и в виде синтетических пептидов, распознаваемых иммунной системой человека [20].

Заключение

Представленные результаты свидетельствуют о возможном противоопухолевом потенциале полученного рекомбинантного белка PRAME как антигена для иммунизации. В дальнейшем предстоит продолжить детальное изучение иммунного ответа, в том числе Т-клеточного, на рекомбинантный белок PRAME на различных моделях опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей. Вестник Московского онкологического общества 2008;1:6–10. [Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V., Kadagidze Z.G. et al. Current problems of anti-cancer biotherapy. Vestnik Moskovskogo onkologicheskogo obshchestva = Bulletin of the Moscow Cancer Society 2008;1:6–10 (In Russ.)].
2. Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S. et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res 2009;15(17):5323–37. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0737. PMID: 19723653.
3. Ikeda H., Lethé B., Lehmann F. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. Immunity 1997;6:199–208. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80426-4. PMID: 9047241
4. Абраменко И.В., Белоус Н.И., Крячок И.А. и др. Экспрессия гена PRAME при множественной миеломе. Терапевтический архив 2004;74(7):77–81. [Abramenko I.V., Belous N.I., Kryachok I.A. et al. Expression of PRAME gene in multiple myeloma. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive 2004;74(7):77–81 (In Russ.)].
5. Мисюрин В.А., Мисюрин А.В., Лукина А.Е. и др. Профили экспрессии раково-тестикулярных генов в клеточных линиях меланомы. Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии 2014;31(2):104–109. DOI: 10.7868/S0233475514020054. [Misyurin V.A., Misyurin A.V., Lukina A.E. et al. Cancer-testis Gene Expression Profile in Human Melanoma Cell Lines. Biologicheskie membrany = Biological membranes 2014;31(2):104–9 (In Russ.)].
6. Quintarelli C., Dotti G., Hasan S.T. et al. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells. Blood 2011;117:3353–62. DOI: 10.1182/blood-2010-08-300376. PMID: 21278353.
7. Rezvani K., Yong A.S., Tawab A. et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and

- acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;113:2245–55. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144071. PMID: 18988867.
8. Luetkens T., Schafhausen P., Uhlich F. et al. Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2010;34(12):1647–55. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.03.039. PMID: 20409582.
 9. Maraskovsky E., Sjölander S., Drane D. et al. NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ t-cell-mediated immunity and protection against NY-ESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res* 2004;10(8):2879–90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0245. PMID: 15102697.
 10. Hance K., Zeytin H., Greiner J. Mouse models expressing human carcinoembryonic antigen (CEA) as a transgene: evaluation of CEA-based cancer vaccines. *Mutat Res* 2005; 576(1–2):132–54. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.10.014. PMID: 15888344.
 11. Chiriva-Internati M., Yu Y., Mirandola L. et al. Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One* 2010;5(5):e10471. DOI: 10.1371/journal.pone.0010471. PMID: 20485677.
 12. Финашутина Ю.П., Мисюрин А.В., Ахлынина Т.В. и др. Получение рекомбинантного раково-тестикулярного белка PRAME и моноклональ-ных антител к нему. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(3):29–36. [Finashutina Yu. P., Misyurin A. V., Akhlynina T. V. et al. Production of recombinant PRAME cancer testis antigen and its specific monoclonal antibodies. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(3):29–36. (In Russ)].
 13. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;224: 680–5. DOI: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.
 14. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1.* Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян и др. М.: Гриф и К, 2012:642–57. [Treshchalina E. M., Zhukova O. S., Gerasimova G. K. et al. Guidance on pre-clinical study of antitumor activity of drugs. In: *Guide to conduct preclinical studies of drugs. Part 1.* Eds. A. N. Mironov, N. D. Bunyatyan et al. Moscow: Grif i K, 2012:642–57 (In Russ.)].
 15. Eisenthal A., Lafreniere R., Letor A. et al. Effect of anti-B₁₆ melanoma monoclonal antibody on established murine B16 melanoma liver metastases. *Cancer Res* 1987;47:7140–5. PMID: 3494504.
 16. Seliger B., Wollscheid U., Momburg F. et al. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61(3):1095–9. PMID: 11221838.
 17. Gérard C., Baudson N., Ory T. et al. A comprehensive preclinical model evaluating the recombinant PRAME antigen combined with the AS15 immunostimulant to fight against PRAME-expressing tumors. *J Immunother* 2015;38(8):311–20. DOI: 10.1097/CJI.000000000000095. PMID: 26325375.
 18. Pujol J., De Pas T., Rittmeyer A. et al. Safety and Immunogenicity of the PRAME Cancer Immunotherapy in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase I Dose Escalation Study. *J Thorac Oncol* 2016;11(12):2208–17. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.08.120. PMID: 27544054.
 19. Gutzmer R., Rivoltini L., Levchenko E. et al. Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapy in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study. *ESMO Open* 2016;1(4):e000068. DOI:10.1136/esmoopen-2016-000068. PMID: 27843625.
 20. Weber J.S., Vogelzang N.J., Ernstoff M.S. et al. A phase I study of a vaccine targeting preferentially expressed antigen in melanoma and prostate-specific membrane antigen in patients with advanced solid tumors. *J Immunother* 2011;34(7):556–67. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182280db1. PMID: 21760528.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.