

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ НЕОАНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ПРОТИВОМЕЛАНОМНОЙ ВАКЦИНЫ

М.А. Барышникова, А.А. Рудакова, З.С. Соколова, О.С. Булова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_ba@mail.ru

Введение. Персонализированная вакциноterapia, направленная на усиление распознавания иммунной системой мутантных неоантигенов опухоли, является перспективным подходом к лечению некоторых видов злокачественных новообразований.

Цель исследования — оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов и адьюванта Poly(I:C) на модели мышинной меланомы B16F10.

Материалы и методы. Исследовали 43 мутантных неоантигенных синтетических пептида, ранее отобранных в качестве иммуногенных на основе результатов секвенирования меланомы B16F10 с помощью биоинформатического анализа. Исследование проводили на мышах C57Bl/6J с подкожно перевитой меланомой B16F10 после 2-кратной вакцинации группами пептидов с адьювантом Poly(I:C) и без него. Оценку иммуногенности пептидов проводили методом ELISpot по определению количества клеток, продуцирующих интерферон γ (ИФН- γ). Противоопухолевую активность оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей.

Результаты. Количество ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки мышей, ранее иммунизированных группами пептидов в сочетании с адьювантом, в ответ на *in vitro*-стимуляцию пептидами, входившими в состав модельной вакцины, увеличивалось. В группах мышей, иммунизированных пептидами без адьюванта, количество ИФН- γ -продуцирующих клеток *in vitro* не менялось по сравнению с группой контроля как при добавлении пептидов, входивших в состав вакцины, так и при добавлении пептидов из других групп. Двукратная вакцинация пептидами с адьювантом вызывала в ряде случаев выраженный противоопухолевый эффект: 3 из исследованных 8 групп пептидов с адьювантом вызывали значимое торможение роста опухоли и увеличение продолжительности жизни мышей.

Выводы. Таким образом, показано, что вакцинация мышей пептидами в сочетании с адьювантом Poly(I:C) вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа во всех исследованных группах, однако увеличение количества ИФН- γ -продуцирующих клеток не является показателем противоопухолевой эффективности.

Ключевые слова: неоантиген, меланома, синтетические пептиды, противоопухолевая вакцина

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81

EVALUATION OF THE ANTITUMOR EFFICACY OF SYNTHETIC NEOANTIGEN PEPTIDES FOR THE MELANOMA VACCINE MODEL

M.A. Baryshnikova, A.A. Rudakova, Z.A. Sokolova, O.S. Burova, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov
N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Personalized vaccine therapy that stimulates immune system to recognize mutant tumor neoantigens is one of the promising approaches of cancer treatment.

Objective. Evaluation of immunogenicity and antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides and Poly(I:C) adjuvant against murine melanoma B16F10.

Materials and methods. 43 synthetic mutant neoantigen peptides selected earlier according to the bioinformatics analysis of the results of melanoma B16F10 sequencing were investigated. The study was performed in mice C57Bl/6J with subcutaneously transplanted melanoma B16F10 after double vaccination by peptide groups with or without adjuvant poly(I:C). Immunogenicity of peptides was evaluated by ELISPOT that detected the number of interferon-gamma producing cells. Antitumor activity was evaluated on the base of tumor growth inhibition and the increase of the survival rate.

Results. The number of interferon-gamma producing cells increased after *in vitro* stimulation by the peptides of the model vaccine in the group of mice which had been vaccinated by these peptides with the adjuvant. The number of interferon-gamma producing cells *in vitro* did not change after addition of vaccine peptides or any other peptides in the groups of mice that had been vaccinated by the peptides without the adjuvant as compared to the control group. Double vaccination by the peptides with the adjuvant induced a potent antitumor effect in some

cases, three of the eight groups of the peptides with the adjuvant induced significant inhibition of tumor growth and the increase of survival rate in mice.

Conclusion. Thereby, it was shown that vaccination of mice by peptides in combination with adjuvant poly(I:C) stimulated the cell immunity response, however, the increase of the number of interferon-gamma producing cells is not an indicator of the antitumor efficacy of neoantigen peptides.

Key words: neoantigens, melanoma, synthetic peptides, antitumor vaccine

Введение

Одним из новых эффективных экспериментальных подходов к иммунотерапии опухолей является персонализированная вакциноterapia, направленная на усиление распознавания иммунной системой мутантных неоантигенов опухоли [1]. Персонализированные противоопухолевые вакцины создаются из химически синтезированных опухолевых неоантигенных пептидов, отобранных в результате биоинформатического прогнозирования иммуногенности, и адьюванта [2, 3].

В нашей предыдущей работе с помощью разработанного биоинформатического подхода для анализа данных секвенирования нового поколения были предсказаны пептиды, способные вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10 [4].

Цель настоящего исследования — оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов и адьюванта Poly(I:C) на модели мышинной меланомы B16F10.

Материалы и методы

По результатам биоинформатического анализа были синтезированы 43 пептида длиной от 22 до 30 аминокислот (табл. 1) [4]. Пептиды были охарактеризованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрически, степень чистоты каждого пептида после очистки с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии составила не менее 85 %.

Для оценки противоопухолевого эффекта пептиды разделили на группы, каждая из которых включала 5 или 6 пептидов (табл. 2). Пептиды растворяли в физиологическом растворе (ПанЭко) или диметилсульфоксиде (ДМСО) (ПанЭко) до концентрации 10 мг/мл, мышам вводили по 100 мкг каждого пептида из группы, — таким образом, суммарно 1 доза включала в себя 500 или 600 мкг пептидов в физиологическом растворе или 10 % растворе ДМСО.

Исследовали эффективность пептидов, введенных с адьювантом (Poly(I:C) (Sigma) — 50 мкг на мышь в 200 мкл физраствора) и без адьюванта, а также адьюванта без пептидов. В контрольной группе мышь не получали никакого воздействия.

Иммунизировали мышей линии C57Bl/6J массой 20–22 г, полученных из отделения лабораторных

животных Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. В каждой группе было 8 мышей. Исследуемые модели вакцин вводили подкожно (в складку кожи на левом боку мыши по направлению к передней лапке). В группах «пептиды с адьювантом» poly(I:C) вводили подкожно за 5 мин до введения пептидов в то же самое место (складку кожи на левом боку). Иммунизация проводилась в 0-й и 7-й дни.

На 12-й день после 1-й инъекции 3 мышей из каждой группы забивали, извлекали сыворотку и спленоциты для иммунологических тестов. Оставшимся 5 мышам из каждой группы на 12-й день в правый бок перевивали по 75 тыс. клеток меланомы мышьи линии B16F10 в 500 мкл среды 199.

Иммуногенность пептидов с адьювантом, пептидов без адьюванта и адьюванта оценивали по определению количества клеток, продуцирующих интерферон γ (ИФН- γ), методом ELISpot согласно инструкции к набору для определения мышинового INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech). Клетки селезенки мышей инкубировали 48 ч с группами пептидов, которыми до этого иммунизировали. В качестве положительного контроля использовали адьювант Poly(I:C), он неспецифически увеличивал число клеток, продуцирующих ИФН- γ . Для подтверждения специфичности клеточного иммунного ответа в одну лунку с клетками селезенки мышей, иммунизированных одной группой пептидов, добавляли пептиды этой группы, а в другую лунку — пептиды другой группы, которую не использовали для иммунизации этой мышьи.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили торможение роста опухоли (ТРО) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) подопытных мышей по сравнению с животными контрольной группы. Путем измерений длины, ширины и высоты опухолевого узла вычисляли объем (V) опухоли у каждого животного, а затем — средний объем опухоли в группе. Объем опухолей измеряли 2–3 раза в неделю. Торможение роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = ((V_k - V_0) : V_k) \times 100,$$

где V_k — средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3), V_0 — средний объем опухолей в подопытной группе (мм^3).

Таблица 1. Перечень исследуемых синтетических пептидов

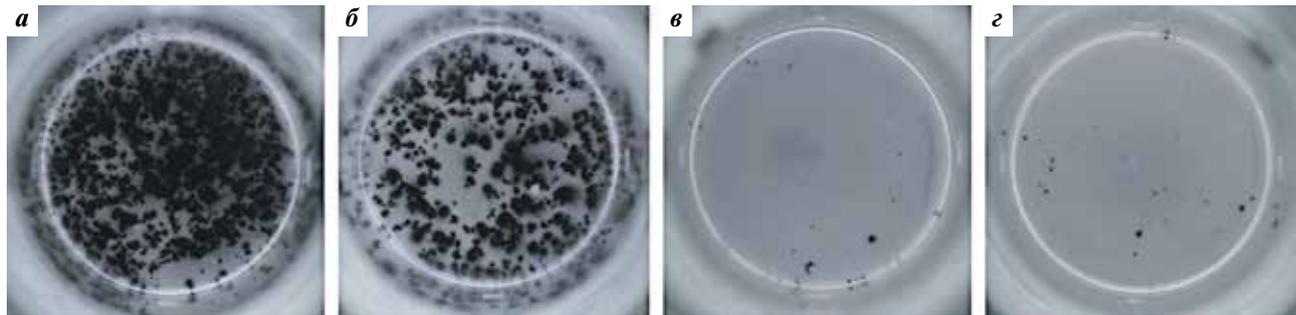
Table 1. List of investigated synthetic peptides

№	Название Name	Последовательность Sequence
1	g. 6393021C>G	SSGHVGFIFKSGKMTSIVKDSSAARNG
2	g. 109894747T>G	PITAHMYEAVAIKDH TLVNSLIRVLQ
3	g. 60246193G>T	FMFSLPNITYSVIEKKRNFLRWKTWLE
4	g. 56226589G>T	GGLAGPDGTKSVFGQMFAKMSSFSPDS
5	g. 54847269G>T	PEAKYDAFLVTNMVQMYPAFKRVWTYF
6	g. 145123749C>T	WAPNENKFAVGS GFRVISICYFEQEND
7	g. 64957410G>C	GTVFISQD TVESLLAAANLLQIKLVLK
8	g. 108075690C>A	LSENISHGLLLRKAPVLHYLYYLAQIG
9	g. 155991934C>A	LVHYLRSLSEYLR AWHSE DVSLGTWLA
10	g. 69027878G>A	SGGGSKVMRGRMGSSVINEISVEEVNK
11	g. 77174891A>C	DALQEYSHNSFALQCLLNSFP GDLEFK
12	g. 66708664A>C	MRMLQNSDTLLSHMAAKCLASLLYFQL
13	g. 110327865C>T	TLHNMMKKFFLQLIAEFKRLGSSVVYA
14	g. 106886296T>A	TVYTMYPFCMSQEFRHLLCEILPLLK
15	g. 5098048A>C	VHMAARIATLA AWGKELMEGSDLNYY
16	g. 69615465A>T	AWHTNLSRKILRMSPLLAKFHQFLVSE
17	g. 65813948T>A	GSPFPAAVILRDALHMARGLKY LHQEK
18	g. 108814677G>C	MQTD TQDHQNL CYSALV LAMVFSMGEA
19	g. 116820833G>C	AGYRGSFLAGFRPLPCTPGPGWVSHVD
20	g. 45553003G>T	ALLYFTGSANFNRS MRALAKTKGMSLS
21	g. 58476516A>C	RVDQKTLHNLLRKVVPSFSAEIERLNQ
22	g. 35197173T>G	VQGLLKDATGSFVLPFRHVMYAPYPTT
23	g. 105559136C>T	ASLSEAVQAAYMLRYQKCLDARSQTST
24	g. 126439132G>T	FNITADPYERVDLSSMYPGIVKKLLRR
25	g. 101573665C>G	GRISGIGSAFGSRSLYNLGGTRRVSIG
26	g. 140328678C>G	TFLCPADVTDPTTFQKILELLPSRRAD
27	g. 121734550T>C	YTETPEKIRLHLYHLNETVTITASLVS
28	g. 190937554G>A	RNV DSTCEDREDKFNFSVMSYNILSQD
29	g. 153509426A>T	LLLAMRLVNEATFPLLLNCFGQPKTKW
30	g. 142664440A>G	PSQVTEMFNQGRAFAAVRLPFCGHKNI
31	g. 81419559T>A	KITTIPFTTEVFAPVTETVTVSAIP
32	g. 24108965G>C	NEEGIEELVVALTCVGGWQAPLNQNWV
33	PSKPSFQE	PSKPSFQEFVDWENVSPELNSTDQPFL
34	REGVELCPG	REGVELCPGNKYEMRRHGTT HSLVIHD
35	g. 28894578A>C	SGLVTFQAFIDVMSRETTD TDTADQVI
36	g. 29565843C>G	VDRNPQFLDPVLA YLMKGLCEKPLASA
37	g. 65813948T>A	GSPFPAAVILRDALHMARGLKY LHQEK
38	g. 41232378A>G	PAMVCGTAFFINFIAIYHHASRAIPFG
39	g. 4007844T>G	WIPSGTTILNCFHDVLSGKLSGGSPGV
40	g. 123421534G>C	FRRKAFLHWYTGEAMDEMEFTEAESNM
41	g. 107599034A>C	LRRLVLHVVSAAQAERLARAEEAAPA
42	g. 93352588T>C	RNIEGIDKLTQLKKPFLVNNKINKIEN
43	GFSQPLRRL	GFSQPLRRLVLHVVSAAQAERLARAEE

Таблица 2. Группы пептидов, сформированные для введения животным

Table 2. Peptide groups formed for administration to animals

Группы пептидов Peptide groups							
1	2	3	4	5	6	7	8
g. 116820833	g. 110327865	g. 123421534	g. 107599034	g. 65813948	g. 10559136	g. 101573665	g. 155991934
g. 140328678	g. 126439132	g. 130452479	g. 108075690	g. 69615465	g. 106886296	g. 190937554	g. 41232378
g. 142664440	g. 4007844	g. 28894578	g. 109894747	g. 69027878	g. 108814677	g. 60246193	g. 54847269
g. 145123749	g. 6393021	g. 4553003	g. 29565843	g. 93352588	g. 121734550	g. 7163330	g. 58476516
g. 35197173	g. 64957410	g. 5098048	g. 56226589	REGVELCPG	g. 153509426	g. 77174891	g. 66708664
				GFSQPLRRL		PSKPSFQE	g. 81419559
Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	ДМСО DMSO	ДМСО DMSO	ДМСО DMSO



Количество продуцирующих интерферон γ клеток селезенки мышей, ранее иммунизированных пептидами с адьювантом, после стимуляции пептидами *in vitro*: а, б – стимуляция пептидами, входившими в состав вакцины, вызывает увеличение числа клеток, продуцирующих интерферон γ ; в, г – стимуляция пептидами, не входившими в состав вакцины, не вызывает увеличения числа клеток, продуцирующих интерферон γ

The number of interferon- γ -producing spleen cells of mice, which were immunized by the peptides with the adjuvant, after *in vitro* stimulation by the peptides: а, б – increase in the number of interferon γ producing cells after *in vitro* stimulation by the peptides, which were part of the vaccine; в, г – no increase in the number of interferon γ producing cells after *in vitro* stimulation by the peptides, which were not part of the vaccine

Увеличение продолжительности жизни вычисляли после гибели всех животных в ходе опыта по формуле:

$$\text{УПЖ (\%)} = ((\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_k) : \text{СПЖ}_k) \times 100,$$

где СПЖ_к – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ₀ – средняя продолжительность жизни животных в подопытной группе (дни).

Минимальные критерии противоопухолевой активности: ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 50 %.

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью программы Statistica 2.0 с использованием критерия Манна–Уитни. Параметры увеличения продолжительности жизни анализировали с помощью логрангового критерия. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Количество ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки мышей, ранее иммунизированных группами пептидов в сочетании с адьювантом, в ответ на *in vitro*-стимуляцию пептидами, входившими в состав модельной вакцины, увеличивалось. Тогда как при добавлении в лунки с клетками этих мышей пептидов из других групп, не входивших в состав модельной вакцины, количество ИФН- γ -продуцирующих клеток оставалось таким же, как в группе контроля (см. рисунок).

В группах мышей, иммунизированных пептидами без адьюванта, количество ИФН- γ -продуцирующих клеток *in vitro* не менялось по сравнению с группой контроля как при добавлении пептидов, входивших в состав вакцины, так и при добавлении пептидов из других групп.

Таким образом, показано, что вакцинация мышей пептидами в сочетании с адьювантом Poly(I:C)

Таблица 3. Противоопухолевый эффект моделей пептидной вакцины

Table 3. Antitumor efficacy of peptide vaccine models

Группы пептидов Peptide groups	Торможение роста опухоли, % Tumor growth inhibition, %				Увеличение продолжительности жизни, % Increase of survival rate, %
	Сутки Day				
	18	23	27	32	
Poly (I:C)	67	7	0	0	27
1	0	0	0	0	7
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	16	0	0	0	3
5	82	34	0	0	18
6	100	91	71	26	19
7	88	68	35	25	58
8	37	20	0	0	14
1 + Poly (I: C)	64	0	0	0	10
2 + Poly (I: C)	0	0	0	0	3
3 + Poly (I: C)	0	0	00	0	0
4 + Poly (I: C)	100*	100*	98*	71*	60*
5 + Poly (I: C)	95	76*	69*	34	40
6 + Poly (I: C)	95*	40*	44	0	35
7 + Poly (I: C)	100*	100*	97*	92*	67* 2 из 5 мышей живы >90 дней
8 + Poly (I: C)	97	69	62	52	67*

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.* $p < 0,05$ in relation to control.

вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа.

Результаты оценки противоопухолевого эффекта исследуемых моделей вакцины после 2-кратной вакцинации представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что пептиды групп 1–3 не обладали противоопухолевым эффектом, возможно, это связано с недостаточной растворимостью их в физрастворе и, как следствие, сниженной биодоступностью.

Эффект пептидов значительно усиливался при использовании адьюванта Poly(I:C), самого по себе обладающего противоопухолевой активностью, но менее выраженной, чем при комбинации с пептидами.

Модель вакцины 7 + Poly(I:C) обладает выраженным противоопухолевым эффектом. «Пептиды 7» без адьюванта, в отличие от других групп пептидов без

адьювантов, у которых эффект незначительный или отсутствует, увеличивали продолжительность жизни мышей примерно на 58 %.

Заключение

Вакцинация мышей синтетическими неоантигенными пептидами в сочетании с адьювантом Poly (I:C) вызывает стимуляцию клеточного иммунного ответа, выражающуюся в увеличении количества ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки. Однако не во всех случаях наблюдаемая стимуляция клеточного иммунитета приводила к развитию противоопухолевого ответа. Пептиды, проявившие выраженную противоопухолевую эффективность, будут использованы как модель для более углубленного изучения персонализированной пептидной неоантигенной вакцины против меланомы B16F10.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):6–14. (In Russ.)].
2. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 2012;72(5):1081–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722.
3. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991.
4. Косоруков В.С., Барышникова М.А., Кособокова Е.Н. и др. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(3):23–30. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30. [Kosorukov V.S., Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N. et al. Identification of immunogenic mutant neoantigens in the genome of murine melanoma Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(3):23–30. (In Russ.)].

Вклад авторов

М.А. Барышникова: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;

А.А. Рудакова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

З.А. Соколова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

О.С. Бурова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

Е.Н. Кособокова: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

В.С. Косоруков: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Author's contributions:

M.A. Baryshnikova: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;

A.A. Rudakova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

Z.A. Sokolova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

O.S. Burova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

E.N. Kosobokova: data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

V.S. Kosorukov: concept and design, data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article, approval of the final version.

ORCID авторов/ORCID of authors

М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

А.А. Рудакова/A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

З.А. Соколова/Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

О.С. Бурова/O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>

В.С. Косоруков/V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Е.Н. Кособокова/E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках экспериментальной научной разработки № АААА-А18-118032290146-5.

Financing. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the experimental scientific development No АААА-А18-118032290146-5.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 03.09.2019. Принята в печать: 15.10.2019.

Article submitted: 03.09.2019. Accepted for publication: 15.10.2019.