

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

на правах рукописи

Балдин Алексей Викторович

**Раково-сетчаточные антигены в контексте
диагностических и иммунотерапевтических
подходов в онкологии**

03.01.03 – Молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, доцент
Андрей Александрович Замятнин;
кандидат химических наук
Людмила Владимировна Савватеева

Москва – 2020

Оглавление

Введение	4
Обзор литературы	11
1. Иммунотерапевтические подходы в онкологии	11
1.1. Противоопухолевый иммунитет	11
1.1.1. Дендритные клетки – диспетчеры иммунной системы.....	13
1.1.2. Опухолевое микроокружение	15
1.2. Иммунотерапевтические подходы	17
1.2.1. Комбинированная иммунотерапия.....	21
1.2.2. Противоопухолевые вакцины	22
1.2.2.1. Лектиновые рецепторы С-типа	26
1.2.2.2. Мусорные рецепторы и их лиганды – белки теплового шока	29
2. Опухолеассоциированные антигены	39
2.1. Низкоспецифичные опухолевые антигены	40
2.2. Опухолеспецифичные антигены	41
2.3. Раково-сетчаточные и онконевральные антигены.....	43
3. Персонализированная медицина и диагностические подходы в онкологии	47
Материалы и методы.....	50
1. Дизайн скринингового исследования, демографическая и клиническая характеристика пациентов	50
2. Сбор и подготовка биообразцов.....	51
3. Используемые в работе материалы	52
4. Составы буферов и сред.....	55
5. Анализ экспрессии аррестина-1 в тканях.....	56
6. Анализ сыворотки крови пациентов на наличие аутоантител к аррестину-1	56
7. Бисульфитное секвенирование образцов ДНК.....	57
8. Конструирование и продукция рекомбинантных слитых белков и пептидов.....	58
9. Культивация иммунных клеток периферической крови.....	62
11. Мультиплексный анализ функциональной способности дендритных клеток	66
12. Анализ данных.....	67
Результаты работы	69
1. Аррестин-1 часто экспрессируется в первичной опухоли и метастазах при почечно-клеточной карциноме и почечной онкоцитоме	69
2. Аберрантная экспрессия аррестина-1 не регулируется гипометилированием промотора	

его гена	72
3. Аутоантитела к аррестину-1 часто обнаруживаются у пациентов с почечно-клеточной карциномой	73
4. Сконструированы рекомбинантные слитые белки на основе HSPA1B и эпитопов рековерина в качестве прототипа противоопухолевой вакцины.....	75
5. Слитый белок, состоящий из HSPA1B и эпитопов рековерина, индуцирует активацию и созревание дендритных клеток	77
6. Дендритные клетки, проинкубированные со слитым белком, секретируют про-воспалительные цитокины.....	84
Обсуждение результатов.....	86
Выводы.....	96
Список сокращений.....	97
Список литературы	99

Введение

Актуальность проблемы

Традиционные терапевтические подходы в онкологии, хирургическое вмешательство и химиотерапия, все еще являются «золотым стандартом». Такой их статус по отношению к появляющимся в последнее время современным, безопасным и эффективным подходам обусловлен в т. ч. отсутствием надлежащих методов ранней диагностики злокачественных процессов. Обнаруженные вследствие этого на поздней стадии онкологические заболевания уже не имеет смысла лечить современными таргетными методами, а последним рубежом является хирургическая операция с предшествующей (адьювантной) или последующей химиотерапией. Одним из наиболее эффективных современных терапевтических подходов в онкологии является иммунотерапия. Он объединяет несколько способов воздействия на иммунную систему пациента с целью эффективной реактивации противоопухолевого иммунного ответа, одним из которых являются противоопухолевые вакцины. Однако частота положительных клинических исходов при их применении остается довольно низкой, в т.ч. из-за поздней диагностики злокачественных образований и, следовательно, позднего начала применения.

Современной тенденцией в настоящее время является применение персонализированного и точного подхода в медицине. В рамках персонализированного подхода применяется специфическая таргетная терапия, основанная на специфических диагностических тестах. Ключевым здесь является именно последовательный подход, когда по результатам специфических диагностических тестов, несущих диагностическую ценность сами по себе, выявляются терапевтические мишени, на которые впоследствии может производиться специфическое воздействие в рамках терапии конкретной патологии. В контексте иммунотерапевтического подхода в онкологии, раннее выявление aberrантной экспрессии опухолеспецифичных антигенов и последующее применение этих антигенов в качестве компонентов противоопухолевых вакцин может быть применено в качестве диагностической и терапевтической стратегии, соответственно.

Степень разработанности темы

Наиболее исследованными антигенами, aberrантно экспрессирующимися в различных опухолях, являются низкоспецифичные опухолеассоциированные антигены, экспрессирующиеся в т.ч. в нормальных тканях. Однако для диагностики и иммунотерапии онкологических заболеваний требуются более специфичные мишени, так называемые опухолеспецифичные антигены. В настоящее время, лишь один тип опухолеспецифичных антигенов – раково-зародышевые антигены – успешно применяется в качестве компонентов

противоопухолевых вакцин [1]. Изучение опухолеспецифичных антигенов в контексте противоопухолевой терапии ускорилось за последнее десятилетие [2]. Все чаще применяются современные методы высокопроизводительного секвенирования и биоинформатические подходы для поиска и описания опухолеспецифичных антигенов [3]. Был охарактеризован новый тип опухолеспецифичных антигенов – опухолевые неоантигены – представляющие собой экспрессируемые эксклюзивно опухолевыми клетками белки, получающиеся в результате однонуклеотидной замены, сдвига рамки считывания, альтернативного сплайсинга, слияния генов и др. мутагенных процессов, часто происходящих в злокачественных клетках [2,4].

Соавторами данной работы впервые были описаны онкогематологические и раково-сетчаточные антигены, в норме экспрессирующиеся в иммунопривилегированных тканях и способные аберрантно экспрессироваться в клетках опухолей, делая их иммунологически отличными от клеток здоровой ткани [5,6]. В настоящее время в группу раково-сетчаточных антигенов относят белки рековерин, аррестин-1, родопсин, трансдуцин, сGMP-фосфодиэстеразу 6, гуанилилциклазу 1, родопсинкиназу, наиболее изученным среди которых является рековерин [7,8]. В ряде работ было показано наличие аберрантной экспрессии некоторых белков этой группы в образцах меланомы, карциномы легких, желудка, печени, опухолях мозга и др. [7,9,10]. Одними из первых упоминаний выявления аутоантител к раково-сетчаточным антигенам являются работы по их детекции в сыворотке крови пациентов с меланомо-ассоциированной ретинопатией [11]. Позднее, аутоантитела к рековерину были обнаружены в образцах сыворотки крови пациентов с раком легких (в 15% случаев), яичника (10%), шейки и тела матки (8% и 5 %, соответственно), молочной железы (5%) [12,13]. В одной из недавних работ коллективом соавторов данной работы было сообщено о наличии аберрантной экспрессии рековерина в опухолях почек пациентов с почечно-клеточной карциномой [14]. Было показано, что рековерин экспрессируется в опухоли почки в 68.4% случаев почечно-клеточной карциномы, тогда как аутоантитела к рековерину обнаруживались только у одного пациента (2.4%).

Различные известные на данный момент опухолеспецифичные антигены, в основном раково-зародышевые антигены, с тем или иным успехом уже применяются в качестве компонентов противоопухолевых вакцин. Ключевым механизмом действия противоопухолевой вакцины является доставка опухолеспецифичных антигенов в антиген-презентирующие клетки, в частности в дендритные клетки. В литературе описано некоторое количество стратегий конструирования противоопухолевых вакцин, которые можно разделить на две большие группы: вакцины, нацеленные на дендритные клетки *in vivo*, и нагрузка аутологичных дендритных клеток антигенами *in vitro*, с последующим их обратным введением пациенту. На наш взгляд, наиболее перспективным подходом является нацеливание на дендритные клетки *in vivo*, в частности HSP

(heat shock protein, белок теплового шока)-содержащие вакцины [15]. Одним из наиболее известных и исследованных методов производства HSP-содержащих вакцин является выделение аутологичных комплексов HSP-антиген из опухоли пациента, с последующим их введением обратно [16,17]. Следующей ступенью стало производство HSP-антиген комплексов *in vitro* [18]. В настоящее время наиболее перспективным методом считается производство так называемых слитых (fusion) белков, состоящих из белка теплового шока с присоединенными к его N- и C-концам HLA-специфичными эпитопами антигена. Эффективность таких конструкций была показана на мышиных моделях с использованием эпитопов овальбумина [19]. Помимо этого, было показано, что конъюгация HLA II-специфичных эпитопов к N-концу HSPA1B и HLA I-специфичных эпитопов через полигистидиновый линкер приводит к более эффективной презентации антигена с помощью HLA II и усиленному образованию цитотоксических лимфоцитов, соответственно [20,21].

Цель данной работы - проанализировать встречаемость aberrантной экспрессии одного из раково-сетчаточных антигенов – аррестина-1 – при почечно-клеточной карциноме, возможность и частоту возникновения гуморального иммунитета в ответ на экспрессию аррестина-1 клетками почечно-клеточной карциномы. Разработать прототип противоопухолевой вакцины на основе слитого белка, состоящего из HSPA1B и эпитопов раково-сетчаточного антигена рековерина и проанализировать возможность индукции иммунного ответа на входящие в состав вакцины эпитопы рековерина на человеческих иммунных клетках *in vitro*.

Задачи работы

1. Анализ наличия и встречаемости экспрессии аррестина-1 в образцах опухолевой ткани почек от пациентов с почечно-клеточной карциномой.
2. Анализ наличия и встречаемости аутоантител к аррестину-1 у пациентов с почечно-клеточной карциномой.
3. Выявление причины aberrантной экспрессии аррестина-1 в клетках почечно-клеточной карциномы.
4. Конструирование и наработка рекомбинантных слитых белков, состоящих из HSPA1B и эпитопов рековерина.
5. Оценка иммуногенности слитых белков с помощью нагрузки ими антиген-презентирующих клеток *in vitro*.

Научная новизна

Насколько известно, до сих пор экспрессия аррестина-1 в опухолевых клетках констатировалась лишь косвенно, по наличию аутоантител к аррестину-1 при опухолеассоциированной ретинопатии, кроме одного случая детекции единичных аррестин-1-экспрессирующих клеток в метастазах в лимфатический узел при меланоме [22-24]. В текущей работе впервые была зафиксирована экспрессия аррестина-1 в клетках почечно-клеточной карциномы, а также была выявлена возможность производства аутоантител в ответ на экспрессию аррестина-1 у пациентов с почечно-клеточной карциномой. Было сделано заключение о высоком потенциале использования аутоантител к аррестину-1 в качестве маркера ранней диагностики карциномы почки. Было установлено, что аберрантная экспрессия аррестина-1 в клетках почечно-клеточной карциномы не регулируется метилированием промотора гена аррестина-1.

В данной работе впервые был использован раково-сетчаточный антиген в качестве компонента противоопухолевой вакцины. Были сконструированы рекомбинантные слитые белки, состоящие из HSPA1B и HLA-специфичных эпитопов рековерина. В сравнительных экспериментах *in vitro* было показано, что полученные рекомбинантные слитые белки способны индуцировать активацию и созревание дендритных клеток, полученных из человеческих моноцитов периферической крови. В свою очередь, активированные слитым белком дендритные клетки функционально активны и способны к активации Т клеточного ответа против рековерин-экспрессирующих клеток.

Научная и практическая значимость

Полученные данные расширяют представление об аберрантной экспрессии раково-сетчаточных антигенов при различных онкологических заболеваниях. Данный задел можно использовать для обоснования дальнейшей разработки диагностических тестов на основе определения антигенов или антител к ним, а также для дальнейших фундаментальных исследований о выяснении механизма экспрессии и роли раково-сетчаточных антигенов в злокачественных клетках. Полученные данные об иммуногенности сконструированных слитых белков подтверждают их потенциал в качестве компонентов противоопухолевой вакцины и могут быть использованы в дальнейшей ее разработке.

Личный вклад автора

Диссертационная работа основана на собственных данных, полученных автором и соавторами в период с 2016 по 2020 гг. Соискатель самостоятельно проводил анализ имеющейся литературы, планировал и проводил описанные эксперименты, кроме иммуногистохимических

исследований и бисульфитного секвенирования полученных от пациентов образцов. Соискатель самостоятельно производил сбор, анализ, интерпретацию и статистическую обработку полученных данных. Соискатель самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и непосредственно осуществлял написание всех публикаций. Имена всех соавторов, а также их вклад, указаны в опубликованных работах.

Методология и методы исследования

В работе использовались молекулярно-биологические, биотехнологические, биохимические, микробиологические и цитологические методы исследования.

Оценка наличия и встречаемости aberrантной экспрессии аррестина-1 в опухоли почки, а также аутоантител к аррестину-1 у пациентов с почечно-клеточной карциномой производилась с помощью анализа собранных биологических образцов. Все эксперименты с полученными от пациентов образцами производились в соответствии с локальными и национальными этическими стандартами, а также в соответствии с Хельсинской декларацией от 1975 года, в редакции от 2013 года, и были одобрены Этическим Комитетом Сеченовского Университета (H04-12). У всех участвовавших в исследовании пациентов было получено информированное согласие на участие и на обезличенное использование их медицинских данных для публикации полученных результатов. Сбор образцов производился на базе Клиники урологии Сеченовского Университета в течение 2013 года. Собираемые образцы включали в себя внутриоперационно собранные образцы опухолевой ткани, а также сыворотка, выделенная из периферической крови, собранной незадолго до оперативного вмешательства.

Анализ наличия и встречаемости aberrантной экспрессии аррестина-1 проводился с помощью иммуногистохимического исследования образцов опухолевой ткани. Исследование статуса метилирования гена аррестина-1 как эпигенетического механизма его aberrантной экспрессии проводилось с помощью бисульфитного секвенирования ДНК из образцов опухолевой ткани. Анализ наличия аутоантител к аррестину-1 в сыворотке проводился с помощью вестерн-блоттинга. Оценка общей выживаемости рассчитывалась по методу Каплана-Майера с даты постановки диагноза почечно-клеточной карциномы, с использованием log-rank теста Мантела-Кокса. Наблюдение за пациентами составляло 65 месяцев.

Плазмидные конструкции, кодирующие рекомбинантные слитые белки, были получены с помощью генно-инженерных подходов. Подбор HLA I- и HLA II-специфичных эпитопов рековерина и аррестина-1 осуществлялся с помощью онлайн баз данных и инструментов по прогнозированию и анализу иммунных эпитопов (<http://tools.iedb.org>, <http://www.syfpeithi.de>). Нарботка кДНК, кодирующей эпитопы рековерина и аррестина-1, осуществлялась с помощью ПЦР со взаимно перекрывающимися прямыми и обратными праймерами. В ходе работы по

получению рекомбинантных слитых белков были проведены клонирование наработанных фрагментов кДНК в экспрессионные векторы, продукция рекомбинантных слитых белков в бактериальной системе *E. coli*, анализ экспрессии при помощи SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-page), выделение рекомбинантных слитых белков с помощью хроматографических методов. Наличие остаточных эндотоксинов (липополисахаридов (ЛПС)) в препаратах рекомбинантных слитых белков после выделения из лизатов *E. coli* анализировалось с помощью ЛАЛ (лизат амебоцитов *Limulus*)-теста.

Исследование иммуногенности рекомбинантных слитых белков осуществлялось с применением методов выделения и культивирования первичной культуры клеток крови человека, а также проточной цитометрии. Сбор периферической крови осуществлялся у нескольких здоровых (без новообразований, прогрессирующих заболеваний, или хронических заболеваний в острой фазе) лиц, согласных и готовых (с получением информированного согласия на использование биоматериала в исследовательских целях) предоставить свою кровь для HLA типирования и для дальнейшей сдачи крови в случае соответствия критериям отбора. HLA типирование предполагаемых доноров производилось с помощью секвенирования участков генома (SBT – sequence-based typing), кодирующих HLA классов A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1.

Положения, выносимые на доклад

1. Аррестин-1 часто экспрессируется в клетках почечно-клеточной карциномы и, как представитель раково-сетчаточных антигенов, является потенциальной мишенью для терапии почечно-клеточной карциномы.
2. Аутоантитела к аррестину-1 часто обнаруживаются у пациентов с почечно-клеточной карциномой и являются потенциальным маркером ранней диагностики почечно-клеточной карциномы.
3. Экспрессия аррестина-1 не регулируется метилированием промотора его гена.
4. HSPA1B обладает способностью доставлять антигены в дендритные клетки в виде слитого с антигенами или их эпитопами белка, а также неспецифически стимулировать активацию и созревание дендритных клеток.
5. Раково-сетчаточный антиген рековерин является иммуногеном, позволяющим в составе слитого белка с HSPA1B индуцировать активацию и созревание дендритных клеток

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность данных была подтверждена их воспроизводимостью при проведении нескольких (минимум трех) независимых экспериментов для каждого полученного образца, а также статистической обработкой полученных результатов.

По теме диссертационной работы было опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах и один патент на изобретение.

Результаты работы были представлены на четырех конференциях в виде устных и постерных докладов: “Vaccines and Vaccination” International Conference (Москва, Россия, 2017), Sechenov International Biomedical Summit (Москва, Россия, 2018), “Perspective Technologies in Vaccination and Immunotherapy” International Conference (Москва, Россия, 2018), Forschungstag 2019 (Мюнхен, Германия, 2020).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 страницах, содержит 14 таблиц и 25 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты работы, обсуждение результатов, выводы, список сокращений, список литературы.

Обзор литературы

1. Иммунотерапевтические подходы в онкологии

1.1. Противоопухолевый иммунитет

Существуют различные точки воздействия иммунной системы на опухолевые клетки. В рамках врожденного иммунитета, важнейшую роль в противодействии онкогенезу играют НК (natural killer, естественные киллеры) клетки. Но несмотря на то, что НК клетки хорошо контролируют инициацию малигнизации, в основном они малоэффективны при уже прогрессирующем онкологическом заболевании. Более того, множество фенотипов НК клеток, которые инфильтрируют прогрессирующую опухоль, начинают проявлять себя как про-ангиогенные и регуляторные клетки с низкой цитотоксичностью, что скорее свидетельствует об их вкладе в прогрессирование опухолей [25].

Злокачественная трансформация клеток различными типами мутаций приводит к тому, что опухолевые клетки становятся иммуногенными для аутологичной иммунной системы. Данный феномен происходит из-за экспрессии опухолевыми клетками атипичных для нормальной ткани или мутировавших белков. Такие аберрантные белки являются чужеродными для аутологичной иммунной системы. Таким образом, экспрессия чужеродных белков малигнизированными клетками это механизм, который позволяет адаптивной иммунной системе распознавать и элиминировать опухолевые клетки [26]. Один из основных исполнителей таких механизмов разрушения опухолевых клеток это цитотоксические Т лимфоциты, способные специфично распознавать антиген-экспрессирующие опухолевые клетки. Цитотоксические Т лимфоциты дифференцируются из их прекурсоров – наивных $CD8^+$ Т клеток. В отличие от НК клеток, $CD8^+$ Т клетки не являются универсальными «киллерами». Будучи наивными Т «киллерами», они не способны проявлять цитотоксичность пока не получают специфический сигнал к активации от дендритных клеток в процессе, известном как праймирование Т клеток. Этот процесс включает в себя активацию $CD8^+$ Т клеток путем презентации им антигена дендритными клетками через взаимодействие человеческих лейкоцитарных антигенов (human leukocyte antigen, HLA, человеческий аналог молекул главного комплекса гистосовместимости) I класса и Т-клеточного рецептора, сопровождающееся различными костимулирующими взаимодействиями молекул, таких как B7.1-CD28, CD70-CD27 и OX40L-OX40 [27]. Тем не менее, несмотря на отсутствие способности распознавать широкий спектр чужеродных антигенов и злокачественных клеток, активированные специфические цитотоксические Т лимфоциты могут развивать значительно более эффективный ответ против опухолевых клеток, экспрессирующих специфичный антиген. Вдобавок, существуют наивные $CD4^+$ Т клетки, которые активируются дендритными клетками в

схожей с $CD8^+$ Т клетками манере, но через взаимодействие HLA II класса с Т-клеточным рецептором [28]. Более того, $CD8^+$ Т клетки могут и сами рекрутировать наивные $CD4^+$ Т клетки путем непосредственного связывания с ними после приобретения фрагментов мембраны дендритных клеток и молекул HLA II класса посредством так называемого трогицитоза, с последующим образованием тройных комплексов, в которых $CD8^+$ и $CD4^+$ Т клетки взаимодействуют с дендритными клетками и друг с другом [29]. После дифференцировки наивных $CD4^+$ Т клеток в Т хелперы 1 типа (Th1), они способствуют усилению цитотоксического ответа за счет продукции цитокинов, необходимых для пролиферации и дифференцировки $CD8^+$ Т клеток, а так же увеличению способности дендритных клеток рекрутировать $CD8^+$ Т клетки [30].

Для того, чтобы противоопухолевый иммунный ответ привел к эффективному уничтожению злокачественных клеток, необходимо инициировать серию пошаговых событий, которые должны итеративно усиливаться. Такой процесс был описан как опухоли-иммунный цикл [27]. На первом этапе этого цикла опухолевые антигены, экспрессируемые в процессе онкогенеза, высвобождаются из разрушенных опухолевых клеток и захватываются незрелыми дендритными клетками для процессинга. Для достижения противоопухолевого Т клеточного ответа по результатам первого этапа, он должен сопровождаться различными сигналами, которые определяют иммунный ответ, чтобы не индуцировалась периферическая толерантность к опухолевым антигенам. Роль таких иммуногенных сигналов выполняют про-воспалительные цитокины и факторы, высвобождаемые умирающими опухолевыми клетками. В конечном счете незрелые дендритные клетки, поглотившие антиген и подвергнувшиеся воздействию про-воспалительных сигналов, становятся зрелыми. На следующем этапе зрелые дендритные клетки мигрируют в лимфатические узлы, где презентуют захваченные антигены Т клеткам с помощью молекул HLA I и HLA II, что приводит к праймированию и активации эффекторных Т клеток против опухолеспецифичных антигенов, распознаваемых как чужеродные, или против которых не была выработана центральная толерантность. Природа иммунного ответа определяется именно на этом этапе балансом, выражающимся в соотношении Т эффекторных клеток к Т регуляторным клеткам. Этот баланс является ключевым для финального исхода. Наконец, транспортировка активированных эффекторных Т клеток к опухоли и ее инфильтрация ими приводит к специфическому распознаванию и связыванию с клетками опухоли с помощью взаимодействия Т-клеточного рецептора с комплементарным ему эпитопом антигена, связанным с молекулой HLA I на опухолевой клетке, и уничтожению опухолевой клетки. Уничтожение опухолевой клетки приводит к высвобождению дополнительных опухолеспецифичных антигенов и запуску цикла заного, что увеличивает широту и глубину ответа в последующих

оборотах цикла. Тем не менее, опухоли-иммунный цикл у пациентов с онкологическими заболеваниями зачастую не работает в полной мере и прерывается на одном из этапов. Опухолевые антигены могут не детектироваться, дендритные и Т клетки могут распознавать антигены как собственные, а не чужеродные, тем самым индуцируя регуляторный ответ, а не цитотоксический, Т клетки могут быть заблокированы при проникновении в опухоль или факторы опухолевого микроокружения могут подавлять те эффекторные клетки, которые производятся [31]. Таким образом, существует отработанная система иммунного ответа на злокачественные образования, состоящая из нескольких звеньев, но как показывает клиническая практика, такая система зачастую дает сбой.

1.1.1. Дендритные клетки – диспетчеры иммунной системы

Дендритные клетки это «профессиональные» антиген-презентирующие клетки, которые обладают некоторыми функциями, отличающими их от остальных антиген-презентирующих клеток, таких как моноциты и макрофаги. Дендритные клетки значительно более эффективны в стимуляции Т клеток и отличаются способностью стимулировать в т.ч. иммунологически наивные Т клетки. Дендритные клетки могут распознавать и активировать антиген-специфические $CD8^+$ и $CD4^+$ Т клетки с помощью взаимодействия молекул HLA I и II класса с Т-клеточным рецептором [32]. Более того, дендритные клетки известны способностью экспрессировать исключительно высокий уровень молекул HLA II класса и ко-стимулирующих молекул, по сравнению с моноцитами. Такие особенности дендритных клеток позволяют им одновременно формировать множественные контакты с Т клетками и обеспечивать ко-стимуляторные сигналы, что в результате приводит к локальной пролиферации и экспансии большого количества Т клеток [33,34]. Вдобавок, дендритные клетки контролируют индукцию Т-клеточной толерантности [35]. Регуляторные Т клетки так же могут быть стимулированы к пролиферации дендритными клетками, что повышает их иммуносупрессивные способности [36,37]. Наконец, дендритные клетки обладают различными функциями врожденного иммунного ответа, такими как секреция IL-12 и интерферонов I типа, а так же мобилизация NK клеток, что делает дендритные клетки своего рода связующим звеном между врожденным и приобретенным (адаптивным) иммунитетом [38-40].

Активация и пролиферация антиген-специфических $CD8^+$ и $CD4^+$ Т клеток начинается с кросс-презентации антигенов дендритными клетками. В этом процессе дендритные клетки презентуют эпитопы антигенов наивным $CD8^+$ или $CD4^+$ Т клеткам с помощью комплекса эпитопа с молекулой HLA I или II класса на их поверхности. Перед презентацией наивным Т клеткам, антигены сначала захватываются, поглощаются и процессируются дендритными клетками. Процессинг антигенов дендритными клетками один из важных этапов кросс-

презентации антигена. Процессинг критически зависит от того, в какой компартмент дендритной клетки будет доставлен поглощенный антиген. Для достижения достаточной кросс-презентации, экзогенные антигены сначала должны быть направлены в эндосомы или фагосомы [41]. Таким образом, важной является способность рецептора дендритной клетки, осуществляющего распознавание, захват и поглощение антигена, направлять интернализацию антигена по эндоцитарному пути. Эндоцитарный путь дендритной клетки, в свою очередь, обладает сниженной протеолитической активностью, по сравнению с макрофагами и нейтрофилами [42]. Было показано, что пониженная деградация антигена в дендритных клетках коррелирует с эффективностью его кросс-презентации [42,43]. Такая особенность дендритных клеток способствует усилению эффективности кросс-презентации, что делает их более эффективными антиген-презентирующими клетками по сравнению с остальными. Более того, было продемонстрировано, что антигены могут быть кросс-презентированы эффективнее если направлены в так называемые ранние эндосомы, являющиеся менее деградационными, чем в более деградационные поздние эндосомы [44,45]. Тем не менее, антигены процессированные поздними эндосомами более эффективно кросс-презентируются через молекулы HLA II класса [44]. Существует и другой – цитозольный – путь процессинга экзогенных антигенов дендритными клетками. Тем не менее, начало цитозольного пути деградации включает направление антигена в эндоцитарный компартмент с последующим экспортом в цитозоль, где антигены подвергаются протеосомальной деградации [41]. Такой экспорт антигена в цитозоль происходит эффективнее в дендритных клетках, чем в макрофагах, а небольшие молекулы экспортируются гораздо более эффективно, чем более крупные [46]. Таким образом, некоторая степень пре-деградации способствует более эффективной кросс-презентации. Недавнее исследование показало, что структура антигена может значительно влиять на кросс-презентацию. Было продемонстрировано, что крупные гликополимеры направляются в неэндосомальные компартменты после интернализации, где не происходит процессинг антигена [47]. Помимо направления антигена в нужный компартмент клетки и структуры антигена, процессинг так же зависит от ферментативных систем, которые отвечают за расщепление антигенов и различны для N- и C-концов белка [48]. Такая вариативность процессинга антигена влияет на эффективность кросс-презентации.

Перед встречей с антигеном дендритные клетки обладают так называемым незрелым фенотипом, который характеризуется высокой экспрессией рецепторов для поглощения антигенов и низкой экспрессией ко-стимуляторных молекул и хемокиновых рецепторов. Такие незрелые дендритные клетки могут быть описаны как биологически экипированные для поглощения и интернализации антигенов [49]. Для захвата и поглощения антигенов дендритные

клетки имеют широкий спектр рецепторов, которые позволяют интернализировать различные чужеродные субстанции, включая антигены. Таким образом, дендритные клетки, являются своего рода «мусорщиками», которые неспецифично поглощают аутологичные и чужеродные антигены и подвергают их процессингу, что приводит к кросс-презентации эпитопов процессированных белков в комплексе с молекулами HLA I и II классов на их поверхности. К таким рецепторам относятся CD205/DEC205, Clec9a, CD206/маннозный рецептор, CD207/лангерин, CD209/DC-SIGN, Clec4a/DCIR, Fc рецепторы и так называемые мусорные рецепторы, которые включают в себя Clec8a/LOX-1, FEEL-1 и SREC-1 [50-53]. Более подробно речь об антиген-распознающих рецепторах дендритных клеток пойдет ниже. Тем не менее, поглощение антигена само по себе недостаточно для начала процесса созревания дендритной клетки. Для инициации созревания дендритные клетки должны получить специфические сигналы через экспрессируемые на них сенсорные молекулы, так называемые паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptors, PRRs). Такие сенсоры распознают различные молекулы патоген-ассоциированного паттерна (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), и молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (damage-associated molecular pattern, DAMP). Было продемонстрировано, что дендритные клетки, подвергнутые воздействию сигналов к созреванию, на начальном этапе усиливают поглощение антигена, с последующим быстрым прекращением функции поглощения и началом перехода к зрелому фенотипу [54-56]. Этот процесс включает в себя усиление экспрессии хемокиновых рецепторов, поверхностных молекул HLA I и HLA II, ко-стимуляторных молекул и усиление секреции цитокинов для регуляции типа Т-клеточного ответа и приводит к миграции дендритных клеток в лимфатические узлы и праймированию Т лимфоцитов [49]. И наоборот, поглощение антигенов дендритными клетками в «стерильных» условиях в отсутствии патоген-ассоциированного паттерна или молекул, ассоциированных с повреждениями, но в присутствии противовоспалительных цитокинов приводит к развитию иммунотолерантного фенотипа дендритных клеток, которые в свою очередь начинают проявлять локальные регуляторные функции.

1.1.2. Опухолевое микроокружение

В соответствии с описанной выше моделью цитотоксические Т лимфоциты и Th1 клетки являются результирующими эффекторными клетками при адаптивном противоопухолевом иммунном ответе. Их неактивные прекурсоры находятся в постоянном поиске подходящего комплекса молекулы HLA с эпитопом антигена на поверхности дендритной клетки для формирования сильной связи с Т-клеточным рецептором. Таким образом, дендритные клетки являются своего рода диспетчерами иммунного надзора, у которых остальные клетки иммунной

системы могут получить сигнал к активации. Однако, помимо способности стимулировать цитотоксичность Т клеток, дендритные клетки могут генерировать сигналы для пролиферации иммунотолерантных Т клеток, что зависит от подтипа дендритной клетки, ее текущего статуса созревания, микроокружения и тканевой локализации. При интернализации аутологичных белков в микроокружении в присутствии противовоспалительных цитокинов, но в отсутствии адьювантов, молекул патоген-ассоциированного паттерна, таких как лиганды Toll-подобных или CD40 рецепторов, дендритные клетки поддерживают иммунный гомеостаз способствуя периферической толерантности Т клеток [57,58]. Было показано, что Т-клеточная толерантность осуществляется путем взаимодействия рецепторов PD1 и CTLA4, экспрессируемых на Т клетках, с их лигандами, экспрессируемыми на дендритных клетках [59,60]. Более того, было показано, что взаимодействие PD1 рецептора с его лигандом необходимо для индукции регуляторных Т клеток [61]. Охарактеризованные рецепторы PD1 и CTLA4 и их лиганды были обозначены как иммунные чекпоинты. Суммируя, иммунные чекпоинты это механизм иммунной системы, который предотвращает бесконтрольную манифестацию цитотоксичности. Они предоставляют Т клеткам ингибирующие сигналы, которые предотвращают аутоиммунные реакции.

Опухолевые клетки, в свою очередь, переняли описанный механизм для ухода из-под иммунного надзора. Было установлено, что опухолевые клетки могут сверхэкспрессировать лиганд PD1 рецептора, мимикрируя под дендритные клетки [62]. Экспрессия иммунных чекпоинтов опухолевыми клетками это один из механизмов, с помощью которого опухолевые клетки избегают иммунного надзора. В настоящее время известно, что крупные опухоли могут эффективно уходить от иммунного надзора за счет формирования так называемого опухолевого микроокружения. Такая область, формирующаяся вокруг опухоли, является иммуносупрессорной. Инфильтрирующие опухоль или проникнувшие в опухолевое микроокружение иммунные клетки, в свою очередь, становятся анергичными или толерантными. В какой-то степени, опухолевое микроокружение воссоздает иммуно-привилегированную ткань, которая функционально аналогична некоторым нормальным тканям организма, таким как нервная ткань, сетчатка глаза, половые железы, плацента и др. [63]. В настоящее время считается, что злокачественная опухоль это не просто масса злокачественных трансформированных клеток, но скорее новый орган, состоящий помимо злокачественных из различных незлокачественных клеток, составляющих большую пропорцию опухолевой массы, которые стали независимыми и потеряли способность поддерживать архитектуру и гомеостаз нормальной ткани [64]. Входящие в состав опухолевого микроокружения клетки включают в себя фибробласты, адипоциты, перициты, эндотелиальные клетки сосудов и, главных игроков, иммунные клетки [65]. Опухолевые и стромальные клетки коэволюционируют схожим при органогенезе образом и

взаимодействие между различными компонентами микроокружения опухоли приводит к продолжающейся фенотипической и функциональной пластичности. Динамическая связь между клетками и микроокружением осуществляется через клеточные соединения, рецепторы и множество сигналов, производимых множеством типов клеток, заключенных в межклеточный матрикс опухолевого микроокружения. Сюда входят гликопротеины, протеогликаны, цитокины и факторы роста, а так же ферменты, ремоделирующие структуру межклеточного матрикса [66]. Все это обеспечивает структурную поддержку опухолевого микроокружения и обмен сигналами между входящими в него клетками. Нарушение тканевого гомеостаза приводит к изменениям клеточного метаболизма и функции как стромальных, так и иммунных клеток [67]. Причины формирования иммуносупрессорной среды в опухолевом микроокружении до конца не выяснены. Считается, что за это ответственны иммуносупрессорные клетки, такие как регуляторные Т клетки, миелоидные супрессорные клетки и макрофаги [68]. Вклад упомянутых супрессорных клеток сопровождается препятствием инфильтрации и транспорта лимфоцитов, которое формируется за счет продукции стромальными клетками факторов роста эндотелия сосудов и последующей aberrантной неоваскуляризации, а так же снижением секреции адгезионных сигналов и хемоаттрактантов опухолевым эндотелием [69,70]. Исключение Т клеток из опухолевого микроокружения так же может регулироваться продукцией CXCL12 хемокина опухолеассоциированными фибробластами [71]. Формирующееся таким образом иммуносупрессивное микроокружение и отсутствие в нем эндогенного противоопухолевого ответа описывается как «иммуннопустынный» фенотип [72]. При этом инфильтрирующие опухоль дендритные клетки теряют способность созревать и проявляют иммуносупрессивный фенотип, Т лимфоциты становятся анергичными, а экспансия и пролиферация новых Т клеток ингибируется.

1.2. Иммунотерапевтические подходы

С развитием онкологии и иммунологии стала понятна роль иммунной системы в онкогенезе. Злокачественные клетки, будучи трансформированными различными типами мутаций или за счет эпигенетических изменений в процессе их прогрессии, становятся иммуногенными для аутологичного организма. Тем не менее, опухолевые клетки в процессе своего развития зачастую уходят от иммунологического надзора с помощью различных механизмов, мимикрируя под иммуносупрессорные клетки, создавая иммуносупрессивное микроокружение и др. [62,73]. Понимание взаимоотношения клеток иммунной системы со злокачественными клетками дало толчок к развитию нового направления в борьбе с онкологическими заболеваниями — иммунотерапии. Иммунотерапевтический подход в онкологии заключается в активирующем противоопухолевый иммунный ответ или

блокирующем иммуносупрессию воздействию. Примером одного из недавно разработанных и применяемых методов иммунотерапии является использование блокаторов иммунных чекпоинтов [74]. Метод заключается в ингибировании чекпоинтов иммунной системы, которые позволяют контролировать иммунные реакции и препятствовать Т клеткам проявлять цитотоксичность. Блокаторы чекпоинтов «отпускают тормоза» иммунной системы, Т клетки теряют возможность получать супрессорный сигнал от толерантных антиген-презентирующих или мимикрирующих опухолевых клеток, что приводит к их продолжительной и беспрепятственной цитотоксичности. Возможен и обратный подход, ингибирование белково-лигандов иммунных чекпоинтов, экспрессируемых иммунотолерантными антиген-презентирующими или мимикрирующими опухолевыми клетками, являющихся сигналами к Т клеточной анергии. Учитывая, что иммуносупрессивное опухолевое микроокружение способствует пролиферации именно иммунотолерантных антиген-презентирующих клеток, такой подход оказался довольно эффективным. По результатам клинических исследований блокаторов иммунных чекпоинтов у их участников – пациентов с онкологическими заболеваниями – отмечалось длительное клиническое улучшение и значительное увеличение выживаемости [75,76]. Применение блокаторов иммунных чекпоинтов было одобрено FDA (U.S. Food and Drug Administration) для лечения меланомы и рака легких, что навсегда изменило расклад в выборе методов противоопухолевой терапии [77]. Но несмотря на доминирующее положение блокаторов иммунных чекпоинтов в иммунотерапии рака, клинические исследования и практика из раза в раз показывают, что лишь довольно умеренная часть пациентов получает клиническую пользу от такой терапии [78]. Более того, некоторые виды рака, как например глиома или глиобластома, оказались особо устойчивыми к лечению блокаторами иммунных чекпоинтов [79]. Таким образом, нужно понимать, что данный вид терапии не панацея и необходимы новые и улучшенные подходы в иммунотерапии онкологических заболеваний.

Открытие дендритных клеток Ральфом Штайнманом и его коллегами, развитие методов молекулярной биологии и возможность подробно изучать взаимодействие опухолевых клеток с иммунной системой привело к возникновению другого иммунотерапевтического подхода – противоопухолевой вакцинации. Технологически стало возможно воспроизвести антиген-специфический противоопухолевый иммунный ответ с помощью доставки опухолеспецифичных антигенов в антиген-презентирующие клетки, особенно дендритные клетки, с последующим праймированием Т клеток. В целом, все стратегии противоопухолевой вакцинации базируются на факте наличия на поверхности дендритных клеток различных рецепторов, участвующих в интернализации и включении в процесс кросс-презентации антигенов, являющихся потенциальными мишенями противоопухолевых вакцин. Множество клинических исследований

подтвердили высокую эффективность у ответивших на лечение пациентов и безопасность дендритноклеточных вакцин. Но несмотря на определенное количество случаев в каждом клиническом исследовании, когда пациенты полностью отвечали на противоопухолевую вакцинацию, на текущий момент показатель частоты объективного ответа на терапию противоопухолевыми вакцинами у онкологических пациентов в среднем не превышает 15% [80]. Это объясняется в т.ч. иммуносупрессией опухолевого микроокружения. Дендритные и Т клетки, уже инфильтрирующие опухоль или которые заного попадают в опухолевое микроокружение становятся толерогенными, даже когда дендритноклеточная вакцина успешно вызывает пролиферацию и активацию периферических опухолеспецифичных цитотоксических лимфоцитов [81].

Большие надежды связывают с технологией адаптивного переноса клеток. Данная технология основана на выделении аутологичных лимфоцитов инфильтрирующих уже существующую опухоль у пациента, с последующей культивацией лимфоцитов *ex vivo* в присутствии активирующих цитокинов и тестировании полученных субпопуляций *in vitro* против опухолевых клеток пациента [82]. Таким образом удастся увеличить количество активных в отношении опухоли аутологичных Т клеток для последующего их обратного введения пациенту с целью усиления цитотоксического ответа. Такая терапия показала себя эффективной у пациентов с метастатическими формами онкологических заболеваний [83,84]. Тем не менее, эффективность подтверждалась лишь при нескольких типах злокачественных образований, включая меланому, что связывают с ее высокой иммуногенностью. Учитывая это, интерес в области адаптивного клеточного переноса сместился в сторону разработки стратегий, направленных на генетическую модификацию Т клеточных рецепторов [85]. В добавок к выделению аутологичных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, было предложено генетически модифицировать Т-клеточные рецепторы выделенных клеток, полученные из опухоли-реактивных клонов Т клеток, таким образом создавая большое количество опухоли-реактивных популяций [86]. Работы по конструированию высокоаффинных рекомбинантных Т-клеточных рецепторов привели к созданию Т-клеточных субпопуляций более эффективных, чем эндогенные опухоли-реактивные Т клетки [87]. Список текущих клинических исследований адаптивного переноса Т клеток с рекомбинантным Т-клеточным рецептором постоянно расширяется, тем не менее антигены, используемые в качестве мишеней пока остаются теми же хорошо охарактеризованными gp100 и тирозиназой для меланомы, WT1 для острого миелоидного лейкоза, NSCLC и HPV-6 для ВПЧ-ассоциированных онкологических заболеваний и др. [87,88]. Несмотря на бурное развитие этой области все еще существуют значительные ограничения в отношении эффективности адаптивного переноса лимфоцитов при лечении

пациентов. Терапевтическую эффективность данного подхода ограничивают использование эпитопов, специфичных молекулам HLA I класса, экспрессия которых часто снижена в злокачественных клетках, и конкуренция между трансгенным и эндогенным Т-клеточными рецепторами за взаимодействие с доступными компонентами CD3 комплекса [88,89]. Вдобавок, наличие эндогенного Т-клеточного рецептора может приводить к неправильному связыванию эндогенных и привнесенных α и β цепей Т-клеточного рецептора, что приводит к сниженной экспрессии рецептора и часто к серьезным побочным эффектам, вызываемым непредсказуемым образованием ауто-реактивных Т-клеточных рецепторов [90,91].

Другая стратегия в рамках описанного иммунотерапевтического подхода - адаптивный перенос лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами (chimeric antigen receptors, CARs). В отличие от рекомбинантных Т-клеточных рецепторов, химерные антигенные рецепторы являются синтетическими и не существуют в природе [92]. Химерные антигенные рецепторы первого поколения состоят из внеклеточного домена, являющегося варибельным одноцепочечным фрагментом антигенспецифичного антитела, внутриклеточного CD3- ζ сигнального домена, и соединяющего их трансмембранного домена, полученного из CD8 или IgG4 [93]. Варибельный фрагмент антигенспецифичного антитела в данной конструкции нацелен на поверхностные антигены опухолевых клеток, таким образом, использование такой конструкции убирает необходимость в презентации антигена с помощью HLA [94]. Неудовлетворительные результаты клинических испытаний адаптивной терапии лимфоцитами с химерными антигенными рецепторами первого поколения показали, что внутриклеточного сигнала CD3- ζ домена недостаточно, чтобы вызвать Т-клеточный ответ *in vivo* [95-97]. Последующие поколения химерных антигенных рецепторов конструировались с добавлением дополнительных ко-стимуляторных доменов. В зависимости от количества включенных во внутриклеточную структуру ко-стимуляторных доменов химерные антигенные рецепторы классифицируются на три поколения [87]. Рецепторы второго поколения, помимо внутриклеточного CD3- ζ сигнального домена, включают в себя ко-стимуляторные домены от CD28 или CD137 (4-1BB), тогда как рецепторы третьего поколения состоят из дополнительно двух и более ко-стимуляторных доменов. Воодушевляющие ранние результаты клинических исследований Т лимфоцитов с химерным антигенным рецептором второго поколения, специфичным В-клеточному антигену CD19, наблюдались у пациентов с В-клеточными лимфомами [98,99]. Тем не менее, высокая аффинность к клеткам-мишеням, обеспечиваемая внеклеточным доменом, в сочетании с усиленной нефизиологической передачей сигналов Т-клетками в конструкциях второго и третьего поколения были связаны с серьезными побочными эффектами [100]. Как результат, у пациентов наблюдалась CD19-специфичная цитотоксичность

и, следовательно, В-клеточная аплазия, которая сохранялась более года после лечения адаптивным переносом лимфоцитов с химерным CD19-специфичным рецептором, в зависимости от доступного времени наблюдения [101]. Наиболее значительный побочный эффект связан с токсичностью при синдроме высвобождения цитокинов, или так называемом «цитокиновом шторме» [102]. Эффект заключается в повышении высвобождения цитокинов, особенно IFN- γ и TNF- α , активированными Т клетками при взаимодействии химерного рецептора с антигеном-мишенью. Эти цитокины являются сигналами для моноцитов и макрофагов к высвобождению других про-воспалительных цитокинов IL-1 и IL-6. «Цитокиновый шторм» приводит к таким клиническим проявлениям, как лихорадка, утомляемость, миалгия, тошнота, а в тяжелых случаях к полиорганной дисфункции с гипертензией и гипоксией [103]. В одном из недавних исследований сообщалось, что терапия Т клетками с химерным CD19-специфичным рецептором вызывала повреждение глиальных клеток примерно у 40% пациентов в следствие синдрома высвобождения цитокинов [104]. Ассоциированная с иммунными клетками нейротоксичность является вторым по частоте токсическим эффектом при лечении Т клетками с химерным антигенным рецептором и характеризуется такими симптомами как спутанность сознания, бредом, а в редких случаях отеком мозга [105]. Важной целью текущих исследований в этой области является снижение цитотоксичности Т клеток с химерным рецептором на мишень при сохранении противоопухолевой эффективности [106].

1.2.1. Комбинированная иммунотерапия

Чтобы обойти ограничения в частоте положительных клинических исходов у пациентов, проходящих лечение одним из методов иммунотерапии, например блокаторами иммунных чекпойнтов, был предложен комбинированный иммунотерапевтический подход [78]. Такой подход заключается в применении рациональной комбинации комплементарных иммуномодулирующих агентов. В пилотных доклинических исследованиях было показано, что применение комбинации сразу нескольких иммунотерапевтических подходов используемых ранее и малоэффективных по отдельности – про-воспалительных цитокинов, антител к опухолиассоциированным антигенам, блокаторов иммунных чекпойнтов и противоопухолевых вакцин – приводило к полному стойкому противоопухолевому ответу у мышей в условиях крупных иммуносупрессивных новообразований [107]. Важным наблюдением было то, что, когда комбинируемые иммунотерапевтические агенты тестировались отдельно, каждый из них показывал лишь среднюю эффективность, тогда как комбинация всех четырех компонентов показывала наибольший эффект [107]. Стало понятно, чтобы реализовать весь потенциал иммунотерапевтического подхода в онкологии, требуется использовать комбинированный подход, позволяющий воздействовать на опухоль и ее микроокружение комплексно.

Использование взаимодополняющих компонентов активирует множественные иммунные эффекторы, такие как Т и НК клетки, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, которые привлекаются к опухоли богатой хемоаттрактантами средой, так же создаваемой при помощи цитокинов и адъювантов в рамках данного подхода. Таким образом, комбинированный подход приводит к ремоделированию опухолевого микроокружения, куда интегрируются множественные ветви противоопухолевого иммунного ответа. В настоящее время уже проводятся клинические исследования комбинированного иммунотерапевтического подхода в онкологии [68]. В том числе тестируются комбинации блокаторов иммунных чекпоинтов с противоопухолевыми вакцинами или с адаптивным переносом лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами. Несмотря на то, что сам по себе комбинированный иммунотерапевтический подход оказался довольно эффективным по результатам доклинических исследований, подбор отдельных компонентов для такой терапии является довольно сложной задачей. Если блокаторы иммунных чекпоинтов переживают свой «золотой век», то сказать о том, какая, например, противоопухолевая вакцина является наиболее эффективной сегодня, затруднительно.

1.2.2. Противоопухолевые вакцины

Ключевым моментом противоопухолевой вакцинации как иммунотерапевтической стратегии является доставка антигена или вектора, кодирующего антиген, в антиген-презентирующую клетку, а точнее в дендритную клетку, как наиболее эффективную среди них. Попадая в дендритную клетку, антиген процессируется и кросс-презентируется Т клеткам, что является одним из сигналов к активации и пролиферации Т клеток, с их последующей специфической цитотоксичностью против антиген-экспрессирующих опухолевых клеток. По способу доставки антигена в рамках подхода выделяют две стратегии: нагрузка дендритных клеток антигеном *in vitro* и таргетинг дендритных клеток *in vivo* с помощью различных векторных молекул [80,108]. После введения нагруженных антигеном зрелых дендритных клеток обратно пациенту, или же после таргетинга дендритных клеток с последующим поглощением антигена и их созреванием вне опухолевого микроокружения, происходит их миграция во вторичные лимфоидные органы, где и происходит кросс-презентация антигена Т клеткам с их последующей активацией и пролиферацией. Противоопухолевые дендритноклеточные вакцины являются своеобразной альтернативой поиска и сбора антигенов дендритной клеткой в опухолевом микроокружении. Таким образом, использование противоопухолевых вакцин позволяет активировать адаптивный противоопухолевый иммунитет в обход иммуносупрессорного микроокружения опухоли.

Таргетинг дендритных клеток для доставки опухолевых антигенов *in vivo* основан на

использовании поверхностных молекул дендритных клеток и их рецепторной машинерии. Данный подход подразумевает использование лигандов рецепторов дендритных клеток, адъювантов, рецептор-специфичных антител и других субстанций, которые могут специфично связаться с их мишенью на дендритных клетках, с последующим их поглощением и/или изменением фенотипа дендритных клеток. Таким образом, специально приготовленные вакцины, состоящие из опухолеспецифичных антигенов в комплексе или слитые с нацеленными на дендритные клетки субстанциями, могут быть направлены в дендритные клетки после их введения в ткани пациента (Рисунок 1).

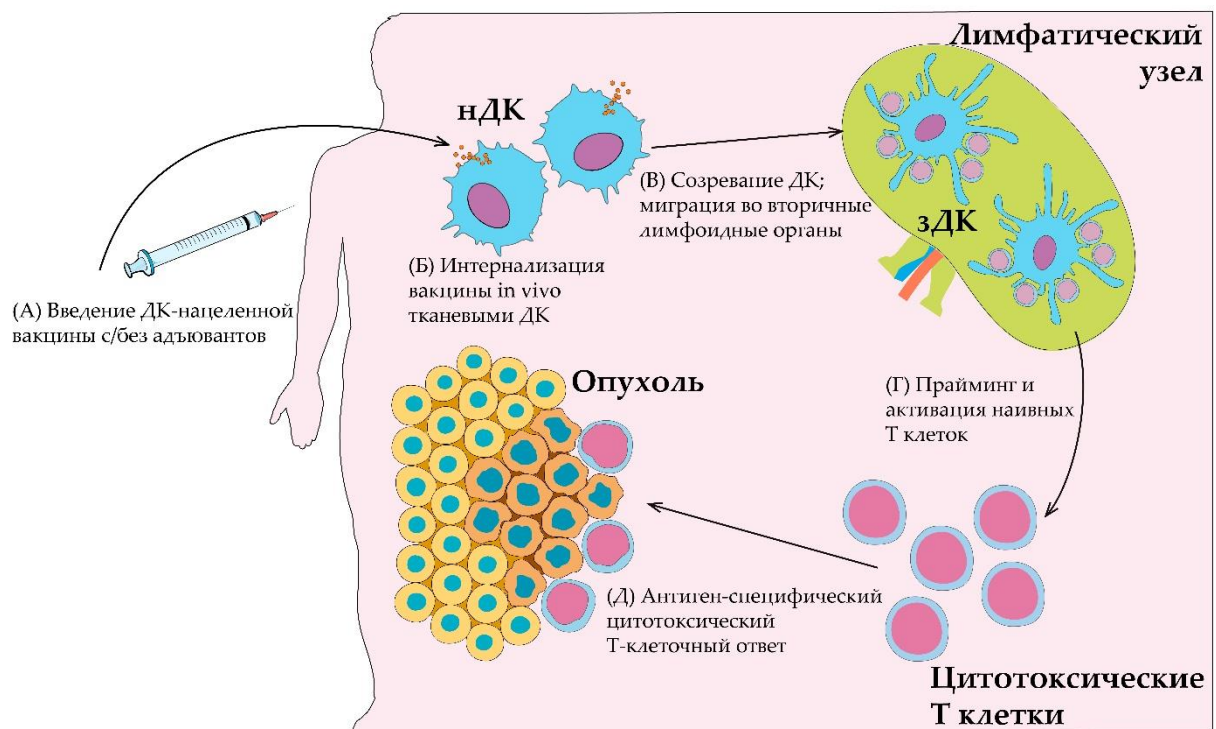


Рисунок 1. Схема стратегии таргетинга дендритных клеток *in vivo*. **(А)** Введение химически-модифицированных опухолевых белков или пептидов, белков или пептидов слитых, или в комплексе с антителами или другими векторами, специфичными дендритным клеткам. В зависимости от цели и требуемой субпопуляции дендритных клеток, могут использоваться различные пути введения вакцины: подкожный, внутрикожный, интралимфатический или внутривенный. **(Б)** После введения в богатую дендритными клетками область организма, антиген-содержащая вакцина распознается незрелыми дендритными клетками (нДК), с последующей ее интернализацией. **(В)** Далее, незрелые дендритные клетки претерпевают процесс созревания, который включает в себя уменьшение антиген-распознающей активности, миграцию в лимфатические узлы и усиление экспрессии HLA и ко-стимуляторных молекул. **(Г)** Зрелые дендритные клетки (зДК) способны к антиген-презентации для наивных Т клеток. **(Д)** В итоге, активированные антиген-специфичные цитотоксические Т лимфоциты становятся способными распознавать и уничтожать опухолевые клетки.

Будучи своеобразными «мусорщиками» от иммунной системы, дендритные клетки имеют широкий спектр рецепторов для распознавания и поглощения различных типов антигенов. К таким рецепторам относятся CD205/DEC205, Clec9a, CD206/маннозный рецептор, CD207/лангерин, CD209/DC-SIGN, Clec4a/DCIR, Fc рецепторы и так называемые мусорные рецепторы, которые включают в себя Clec8a/LOX-1, FEEL-1 и SREC-1 [50-53]. Некоторые перечисленные рецепторы экспрессируются специфически только на отдельных субпопуляциях

дендритных клеток, локализующихся в различных тканях. Таким образом, возможно доставлять опухолевые антигены в специфическую субпопуляцию дендритных клеток, т.к. стало понятно, что таргетинг определенного типа дендритных клеток позволяет контролировать тип иммунного ответа, который желается достичь [109].

Среди всех поверхностных молекул дендритных клеток могут быть выделены несколько групп, ответственные за распознавание чужеродных или аутологичных субстанций и/или за поглощение антигена. Дендритные клетки являются важной частью иммунной системы из-за их способности распознавать различные сигналы среды, ассоциированные с патологическими процессами, или так называемые молекулы патоген-ассоциированного паттерна (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), и молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (damage-associated molecular pattern, DAMP). Для этих целей на дендритных клетках существуют различные сенсорные молекулы – рецепторы распознавания паттернов (pattern recognition receptors, PRRs), например Toll-подобные рецепторы, NOD-подобные рецепторы, рецепторы лектина С-типа, RIG-I, MDA-5 и др. [110,111]. Активированные паттерн-распознающие рецепторы побуждают дендритные клетки к созреванию и секреции провоспалительных цитокинов, если они связываются со своими лигандами, например бактериальными липополисахаридами (ЛПС), эндотоксинами, аутологичной ДНК, РНК и/или АТФ, белками из поврежденных или находящихся в стрессе аутологичных клеток, включая раковые клетки [112,113]. Таким образом, чувствительность дендритных клеток к сигналам окружающей их среды может быть использована для усиления регулируемого ими иммунного ответа. Для этой цели лиганды паттерн-распознающих рецепторов могут служить в качестве адъювантов в составе противоопухолевых вакцин.

Наличие описанных рецепторов дендритных клеток дает им возможность интернализировать антигены с помощью механизмов рецептор-опосредованного эндоцитоза и фагоцитоза. Таким образом возможна доставка антигенов в дендритные клетки *in vivo*. Требуется лишь введение рационально сконструированной специфичной дендритным клеткам вакцины в ткань, богатую дендритными клетками, чего будет достаточно для достижения выраженного противоопухолевого ответа. После введения вакцины дендритные клетки естественным образом поглощают вакцину с содержащимися в ней антигенами и взаимодействуют с адъювантами, которые являются сигналом к созреванию, миграции в лимфатические узлы и инициации Т-клеточного ответа [114,115]. Клинические исследования эффективности таргетинга дендритных клеток *in vivo* при онкологических заболеваниях начались относительно недавно и только некоторые из них были завершены к настоящему времени с опубликованными результатами (Таблица 1).

Таблица 1. Клинические исследования таргетинга антиген-презентирующих клеток *in vivo* при онкологических заболеваниях.

Мишень на антиген-презентирующей клетке	Состояние включенных в исследование пациентов	Фаза	Номер исследования	Ссылки
Маннозный рецептор	Различные прогрессирующие онкологические заболевания	I	NCT00709462; NCT00648102	[116]
DC-SIGN рецептор	Различные опухоли, экспрессирующие NY-ESO-1	I	NCT02122861	[117]
DC-SIGN рецептор	Меланома	I	N/A	[118]
DEC-205 рецептор	Различные прогрессирующие онкологические заболевания	I	NCT00948961	[119]
Мусорные рецепторы	Панкреатическая аденокарцинома	I	N/A	[120]
Мусорные рецепторы	Глиобластома	I	NCT02122822; ChiCTR-ONC-13003309	[121]
Мусорные рецепторы	Глиобластома	II	NCT00905060	[122]
Мусорные рецепторы	Глиобластома	II	NCT00293423	[123]
Мусорные рецепторы	Интраэпителиальная неоплазия шейки матки	II	NCT00075569	[124,125]
Мусорные рецепторы	Меланома	II	N/A	[126]
SLOs DCs targeting	Меланома	II	N/A	[127]

Классическими рецепторами для поглощения антигенов являются Fc рецепторы. Эти рецепторы ответственны за опосредованную иммуноглобулинами кросс-презентацию антигенов дендритными клетками. Существуют различные Fc рецепторы, специфичные различным классам иммуноглобулинов: Fcα для IgA, Fcε для IgE, Fcγ для IgG и Fcα/μ для обоих, IgA и IgM [108]. Опухолевые антигены могут быть доставлены в дендритные клетки через Fc рецепторы будучи в комплексе с антителами. В пионерных исследованиях было продемонстрировано, что биспецифичные антитела, распознающие Fc рецепторы и антиген, индуцировали гуморальный ответ у мышей [128]. Было так же показано, что комплексы антиген-антитело распознаваемые Fc рецепторами способны активировать цитотоксический иммунитет. У мышей было показано десятикратное усиление эффективности CD8⁺ Т-клеточного ответа при введении комплекса овальбумина с антителом к нему, по сравнению со введением только овальбумина в качестве антигена [129]. Fc рецепторы экспрессируются неспецифично на дендритных клетках различных субпопуляций, что в какой то степени ограничивает возможное применение нацеленных на Fc рецепторы вакцин для индукции иммунного ответа специфичной популяцией дендритных клеток. Тем не менее, в одном из исследований были предоставлены интересные данные, свидетельствующие о большей предпочтительности таргетинга Fc рецепторов, чем таргетинга маннозного рецептора, о котором пойдет речь ниже, по крайней мере для некоторых опухолевых антигенов. Было продемонстрировано, что использование комплекса PSA с антителом к нему ассоциировалось с индукцией CD4⁺ и CD8⁺ Т клеток, тогда как использование манозилированного PSA приводило лишь к индукции CD4⁺ Т клеток [130]. Таким образом, несмотря на неспецифичную экспрессию Fc рецепторов на дендритных клетках, но учитывая их

способность индуцировать широкий спектр иммунных реакций, Fc рецепторы являются рациональными мишенями для доставки опухолевых антигенов в дендритные клетки *in vivo*.

1.2.2.1. Лектиновые рецепторы С-типа

Большинство рецепторов, используемых в стратегии нацеливания на дендритные клетки *in vivo*, относятся к семейству лектиновых рецепторов С-типа. Они представляют собой распознающие углеводороды рецепторы, экспрессирующиеся на дендритных клетках различных субпопуляций (Таблица 2) [109]. Данное семейство рецепторов подробно изучается в качестве мишеней для доставки дендритноклеточных вакцин *in vivo* из-за их вовлеченности в интернализацию и процессинг антигенов для кросс-презентации. Различные лектиновые рецепторы С типа были предложены в качестве мишеней для противоопухолевых вакцин, среди которых наиболее описаны маннозный, DC-SIGN и DEC205 рецепторы. Большинство из этих рецепторов специфично экспрессируются в различных человеческих субпопуляциях дендритных клеток (Таблица 2). Разработанные изначально стратегии таргетинга лектиновых рецепторов С типа заключались в гликозилировании антигенов [109]. Тем не менее, с помощью гликозилирования сложно нацелиться на конкретную субпопуляцию дендритных клеток из-за неспецифического распознавания сахаров сразу несколькими типами лектиновых рецепторов. Чтобы усовершенствовать доставку антигенов в дендритные клетки специфической субпопуля-

Таблица 2. Экспрессия различных лектиновых рецепторов С-типа в субпопуляциях человеческих дендритных клеток.

Субпопуляция DC	DEC205/CD205	MR/CD206	Лангерин/CD207	DC-SIGN/CD209	BDCA2/CD303	Clec4A/DCIR	Clec9A/DNGR1	Clec12A
moDC ¹	+	+	-	+	-	+	-	+
Дендритные клетки крови								
cDC1	+	-	-	-	-	+	+	+
cDC2	+	-	-	-	-	+	-	+
CD16 ⁺ DC ²	+	-	-	-	-	+	-	?
pDC	+	-	-	-	+	+	-	+
Тканевые дендритные клетки								
cDC1	?	-	-	-	-	+	+	?
cDC2	-	? ³	± ⁴	-	-	?	-	?
LC ⁵	+	-	+	-	-	?	?	?
IDEC	?	+ ⁶	-	+ ⁶	?	?	?	?

¹ moDC (monocyte-derived dendritic cells) представляют собой полученные *ex vivo* из моноцитов дендритные клетки и приведены для сравнения. DC (dendritic cells) – дендритные клетки; cDC – конвенциональные (conventional) дендритные клетки; pDC – плазматцитоидные (plasmacytoid) дендритные клетки; LCs – клетки Лангерганса (Langerhans); IDEC – воспалительные эпидермальные дендритные клетки; ? – статус неизвестен.

² Данная субпопуляция клеток в недавних исследованиях отнесена скорее к неклассическим CD16⁺ моноцитам [131,132]. Однако необходимы дальнейшие исследования для выявления фенотипических и функциональных нюансов этого подтипа. ³ В то время как существуют исследования, показывающие экспрессию маннозного рецептора (MR) на cDC2 кожи, другие исследования сообщают, что этими клетками среди дендритно-подобных являются макрофаги, а не дендритные клетки кожи [133,134]. ⁴ Были описаны лангерин⁺ и лангерин⁻ популяции cDC2 [135]. ⁵ Ведутся серьезные дебаты о том, следует ли классифицировать клетки Лангерганса как дендритные, или как макрофаги. ⁶ Было показано, что IDEC экспрессируют MR [136]. Тем не менее, IDEC все еще плохо описаны как субпопуляция дендритных клеток, поэтому экспрессия MR и DC-SIGN на дендритных клетках все еще обсуждается.

ции, нацеливаясь на лектиновые рецепторы С типа, было предложено использовать антигены в комплексе или слитые со специфичными этим рецепторам антителами. В настоящее время такой подход *in vivo* таргетинга лектиновых рецепторов С типа является предпочтительным. Первые клинические исследования эффективности и безопасности таргетинга лектиновых рецепторов С типа *in vivo* для лечения онкологических заболеваний начались десятилетие назад и лишь некоторые из них были завершены с опубликованными результатами.

DEC205 является одним из наиболее подходящих лектиновых рецепторов в качестве мишени для доставки антигенов в дендритные клетки. DEC205 интернализируется через поздние эндосомальные и лизосомальные компартменты, что свидетельствует о его вовлечении в кросс-презентацию антигенов и пригодность в качестве мишени для таргетинга вакцин *in vivo* [137]. В отличие от маннозного рецептора и DC-SIGN, экспрессия DEC205 была обнаружена на различных типах человеческих дендритных клеток, включая «типичные» (конвенциональные) (Таблица 2) [109,138,139]. Вдобавок, экспрессия DEC205 была обнаружена в В, NK и Т клетках [139]. Предполагается, что основной функцией DEC205 является связывание апоптотических и некротических клеток для дальнейшего их поглощения и перекрестной презентации связанных с клеточным дебрисом антигенов дендритными клетками [140]. Доказательства концепции использования анти-DEC209 антител для доставки антигенов в дендритные клетки были получены в многочисленных исследованиях на мышинных моделях [141-143]. Однако, и это не было сюрпризом, для достижения иммунного ответа, но не иммунной толерантности, требовалось дополнительное применение адъювантов [144]. Более того, эксперименты с химерным антителом к DEC205, слитым с гликопротеином миелиновых олигодендроцитов, показали потенциальную терапевтическую пользу в контексте экспериментальной модели аутоиммунного энцефаломиелита – мышинной модели рассеянного склероза, поскольку введение таких антител блокировало аутоиммунные реакции [145]. Так же сообщалось, что таргетинг антигенов с помощью анти-DEC205 антител без применения какого-либо адъюванта можно использовать даже для индукции антиген-специфичной иммунной толерантности для уменьшения тяжести аутоиммунных заболеваний в моделях диабета, воспалительных заболеваний кишечника и артрита [146]. Использование же антигенов, конъюгированных с анти-DEC205 антителами, одновременно с адъювантами CpG, poly I:C, или лигандом CD40 приводило к обратной ситуации – индукции антиген-специфичных CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеточных ответов, включая продукцию про-воспалительных цитокинов, что свидетельствует об обязательном применении адъювантов в комплексе с такими вакцинами [147,148].

Трансляционные исследования таргетинга DEC205 производились на трансгенной мышинной модели с гуманизированным DEC205, чтобы продемонстрировать возможность его таргетинга человеческими анти-DEC205 антителами [149]. В этой работе использовался антиген HIV Gag p24, слитый с анти-DEC205 антителом, и было показано, что такая конструкция успешно доставлялась в дендритные клетки и кросс-презентировалась Т клеткам. В последующей I фазе клинического исследования таргетинг DEC205 оценивался с использованием конструкции CDX-1401, которая представляет собой полноразмерный опухолевый антиген NY-ESO-1, слитый с человеческим моноклональным анти-DEC205 антителом [119]. В исследовании участвовало 45 пациентов с различными злокачественными NY-ESO-1-экспрессирующими новообразованиями, которые получали одновременно CDX-1401 и адъюванты poly I:C и/или резиквимод (resiquimod). У пациентов наблюдалась индукция гуморального, CD8⁺ и CD4⁺ NY-ESO-1-специфичных ответов без признаков токсичности. Тринадцать пациентов достигли стабилизации заболевания, тогда как у двоих пациентов наблюдалось уменьшение опухолей. В целом, полученные результаты малочисленных клинических исследований показывают эффективность таргетинга DEC205 и выглядят многообещающими.

Генетическое профилирование субпопуляций мышинных дендритных клеток позволило идентифицировать лектиновый рецептор Clec9A и его ортолог у человека, известный так же как DNGR1 [150]. Clec9A был описан как рецептор, специфически экспрессирующийся мышинными CD8 α ⁺ дендритными клетками. У людей аналогом мышинных CD8 α ⁺ дендритных клеток являются BDCA3⁺ (конвенциональные) дендритные клетки; человеческий Clec9A так же специфически экспрессируется на них (Таблица 2) [151,152]. Этот недавно описанный рецептор со все еще плохо описанными лигандами и функциями было предложено использовать в целях таргетинга дендритных клеток из-за его специфической экспрессии, т.к. известно, что Clec9A⁺ BDCA3⁺ дендритные клетки обладают более эффективной кросс-презентативной функцией по сравнению с другими субпопуляциями дендритных клеток [153,154]. In vitro исследования с первичными культурами человеческих иммунных клеток показали значительную эффективность прайминга антигена CD8⁺ и CD4⁺ Т клеткам после его таргетинга с помощью анти-Clec9A антител [155]. Тем не менее, как и в случае с DEC205, для развития надлежащих созревания дендритных клеток и продукции про-воспалительных цитокинов требовалось дополнительное применение лигандов Toll-подобных рецепторов в качестве адъювантов [155,156] Несмотря на это, исследования на гуманизированной мышинной модели показали, что таргетинг Clec9A приводил к более эффективной кросс-презентации, по сравнению с таргетингом DEC205 [157]. Объяснением такой низкоэффективной кросс-презентации в случае таргетинга DEC205 может

быть его неспецифическая экспрессия и возможность анти-DEC205 антител связываться с большим количеством субпопуляций дендритных клеток. Тем не менее, в отдельных случаях это может быть преимуществом. Суммируя, Clec9A представляет собой еще один лектиновый рецептор С-типа, который, наряду с DEC205, перспективно использовать при таргетинге дендритных клеток. Таким образом, в ближайшем будущем ожидается трансляция стратегии таргетинга Clec9A в клинические испытания.

1.2.2.2. Мусорные рецепторы и их лиганды – белки теплового шока

Мусорные рецепторы были изначально описаны как рецепторы распознающие модифицированные или окисленные формы липопротеинов [158]. Последующие исследования расширили диапазон известных лигандов мусорных рецепторов до таких как липополисахариды, фукоидан, полианионные лиганды, конечные продукты гликирования, нуклеиновые кислоты и белки теплового шока (heat shock proteins, HSPs) [53,158]. Семейство мусорных рецепторов состоит из восьми классов, от А до Н, большинство членов которых экспрессируются на поверхности антиген-презентирующих клеток, включая дендритные клетки. Помимо так называемой функции неспецифичных «сборщиков» (“scavenging” function), мусорные рецепторы обеспечивают эндоцитоз захваченных антигенов и их участие в кросс-презентации через HLA I и II классов [159,160]. Более того, существуют данные демонстрирующие опосредование передачи сигналов мусорными рецепторами Toll-подобным рецепторам, экспрессируемым в антиген-презентирующих клетках. Многие лиганды мусорных рецепторов распознаются и запускают передачу сигналов в т.ч. через Toll-подобные рецепторы. Было продемонстрировано, что мусорные рецепторы интернализируют такие лиганды, чтобы сделать их доступными для Toll-подобных рецепторов 3, 7/8 и 9, локализованных в цитозоле [161,162]. Учитывая обнаруженные функции мусорных рецепторов было предложено использовать их как потенциальные мишени для доставки противоопухолевых вакцин в дендритные клетки *in vivo*. Большинство стратегий таргетинга мусорных рецепторов не отличаются от описанных выше по отношению к другим рецепторам дендритных клеток. Рецепт заключается в конъюгации, слиянии или конструированию комплекса лиганда мусорного рецептора или специфичного к нему антитела с рационально подобранными опухолеспецифичными антигенами. Например, для создания вакцин, нацеленных на мусорные рецепторы, используется малеилизация антигенов. Было продемонстрировано, что малеилированный овальбумин способен связываться с мусорными рецепторами, что усиливает его кросс-презентацию и праймирование цитотоксических лимфоцитов [159]. Более того, малеилированные антигены оказались более иммуногенными, чем немалеилированные [163]. Использование антител к мусорным рецепторам так же было показано эффективным для нацеливания на них антигенов. С помощью моноклеарных клеток

периферической крови *in vitro* было продемонстрировано, что нуклеопротеины вируса гриппа слитые с антителами к LOX-1 или Dectin-1 рецепторам способны вызывать специфичный CD8⁺ и более преобладающий CD4⁺ Т-клеточный ответ [164]. Подход, использующий наночастицы, был так же применен для нацеливания антигенов на мусорные рецепторы дендритных клеток. Были разработаны наноструктуры, имитирующие под липопротеины высокой плотности, для таргетинга В1 класса мусорных рецепторов [165]. Такие наноструктуры, функционализированные слитым пептидом, состоящим из OVA₃₂₃₋₃₃₉, OVA₂₅₇₋₂₆₄ и hgp100₂₅₋₃₃, позволяют доставлять пептид в дендритные клетки лимфатических узлов мышей с помощью интернализации через мусорные рецепторы В1 класса [166]. Структуры, подобные липопротеинам высокой плотности, функционализированные пептидами, показали высокую эффективность активации цитотоксического Т-клеточного ответа и предотвращения опухолевого роста у мышей, даже без адъювантов. Более того, дальнейшая функционализация наночастиц олигонуклеотидами, состоящими из цитозинов и гуанинов, в качестве адъюванта, значительно увеличивала противоопухолевую эффективность [166].

Одной из наиболее представляющих интерес стратегий таргетинга дендритных клеток и мусорных рецепторов, в частности, является использование белков теплового шока в качестве молекул-доставщиков. Белки теплового шока это распространенные повсеместно консервативные белки «домашнего хозяйства», которые выполняют шаперонные функции фолдинга и поддержания правильной конформации внутриклеточных белков, а так же репарации и элиминации неправильно свернутых или денатурированных белков [167]. Обнаружение белков теплового шока во внеклеточном окружении и последующие их исследования продемонстрировали, что они обладают не только функциями обслуживания внутриклеточных белков, но и различными внеклеточными функциями, в том числе иммуномодуляторными (Таблица 3). Иммуномодуляторные функции белков теплового шока были продемонстрированы Прамодом Сриваставой и коллегами, которые доложили о способности HSP70 человека в комплексе с пептидами усиливать противоопухолевый иммунный ответ и показали, что HSP70 человека может служить переносчиком антигенов [168]. Позднее было показано, что усиление иммунного ответа комплексами HSP70 человека с пептидами происходило за счет кросс-презентации доставленных антигенов [169].

Как шапероны, белки теплового шока взаимодействуют с другими белками стехиометрически и, таким образом, огромные количества белков теплового шока синтезируются во время клеточного стресса, чтобы поддерживать внутриклеточный белковый гомеостаз. Клетки, пораженные вирусами, бактериями или злокачественные клетки, находятся в состоянии стресса, который в конечном итоге может привести к некрозу, сопровождающемуся высвобожде-

Таблица 3. Иммунные функции внеклеточных белков теплового шока

Название	Иммуностимуляторные функции	Иммуносупрессивные функции	Ссылки
HSP27		Индукция дифференцировки моноцитов в иммунотолерогенные макрофаги; усиление секреции IL-10 макрофагами	[170-173]
HSP60	Индукция секреции IFN γ Т клетками, опосредованная HSP60-активированными В клетками; индукция продукции TNF α макрофагами	Индукция и активация регуляторных Т клеток; индукция продукции IL-6 и IL-10 В клетками	[174-177]
HSP70	Транспортировка антигенов в антиген-презентирующие клетки с последующим вовлечением в кросс-презентацию; индукция миграции и цитолитической активности NK клеток; стимуляция продукции TNF α макрофагами	Снижение продукции про-воспалительных цитокинов; снижение Т-клеточного ответа и созревания дендритных клеток	[168,178-183]
HSP90	Транспортировка антигенов в антиген-презентирующие клетки с последующим вовлечением в кросс-презентацию		[184]
HSP110	Транспортировка антигенов в антиген-презентирующие клетки с последующим вовлечением в кросс-презентацию		[185]

нием комплексов белков теплового шока с другими клеточными белками во внеклеточное пространство. Более того, злокачественная трансформация усиливает клеточный стресс. Таким образом, уровень экспрессии белков теплового шока в злокачественных клетках выше, чем в нормальных клетках [170,186]. Такая ситуация происходит из-за увеличенной экспрессии мутантных или неправильно свернутых опухолеспецифичных белков, оксидативного стресса и недостатка питательных веществ. Высокий уровень экспрессии мутантных белков, которые нарушают процессы пролиферации, передачи сигналов роста и гибели клеток так же запускают усиленную экспрессию белков теплового шока. В этом случае, внутриклеточные белки теплового шока поддерживают процесс малигнизации, стабилизируя измененную конформацию мутантных белков, которые управляют канцерогенезом [170,187]. Принимая во внимание высокострессовое опухолевое микроокружение, это приводит к некротической дезинтеграции опухолевых клеток и высвобождению в микроокружение большого количества белков теплового шока. Находящиеся в микроокружении иммунные клетки, в т.ч. дендритные клетки, поглощают высвобожденные в микроокружение комплексы белков теплового шока с опухолевыми антигенами (Рисунок 2) [53]. Этот процесс обеспечивается и т.ч. мусорными рецепторами, экспрессируемыми на дендритных клетках. Было установлено, что LOX-1 и FEEL-1 рецепторы могут связываться с HSP70 млекопитающих, а так же с рекомбинантным HSP70, в то время как SREC-1 рецептор хорошо связывается с HSP70 млекопитающих, но не с рекомбинантным [188].

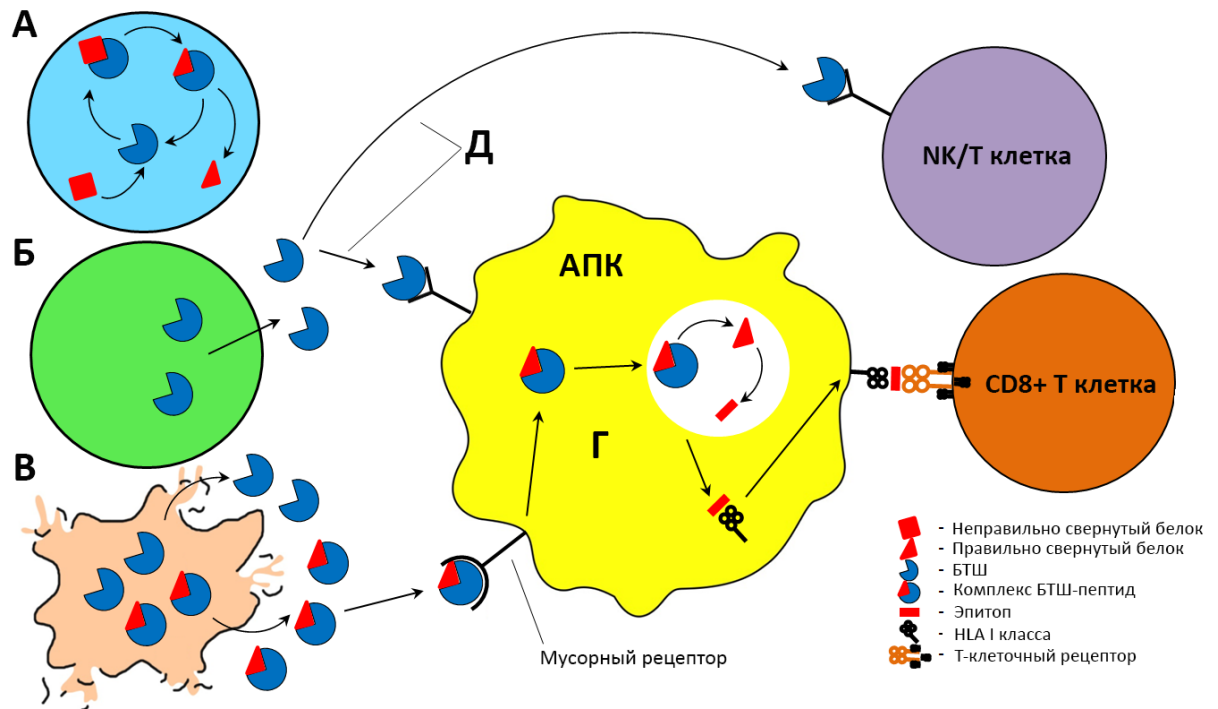


Рисунок 2. Взаимодействие внеклеточных белков теплового шока с иммунными клетками. (А) Шаперонная функция внутриклеточных белков теплового шока (БТШ). БТШ взаимодействуют с неправильно свернутыми белками с помощью пептид-связывающего домена, производя удерживание и корректный фолдинг. (Б) Высвобождение БТШ из неповрежденной клетки. БТШ могут высвобождаться в трех различных формах из неповрежденных клеток: в свободной форме, ассоциированные с мембраной или в экзосомах. (В) Высвобождение БТШ из некротизированной клетки. Будучи разрушенными, клетки являются источником большого количества БТШ, которые высвобождаются как в свободной форме, так и в комплексе с клеточными белками. (Г) Кросс-презентация белка, доставленного БТШ в антиген-презентирующую клетку (АПК). Комплекс БТШ-белок интернализируется АПК после связывания с мусорными рецепторами. После интернализации, комплекс включается в процессинг и кросс-презентацию, что приводит к активации эпитоп-специфических CD8+ Т клеток. (Д) Свободные БТШ опосредуют иммуномодуляторные эффекты различных эффекторных иммунных клеток.

После связывания с HSP70 эти рецепторы опосредуют интернализацию комплекса HSP70 с антигеном дендритной клеткой по эндоцитарному пути.

В одной из первых работ в этой области было показано, что белок теплового шока gr96 является транспортером опухолевых антигенов. Будучи изначально описанным как опухолеспецифичный антиген сам по себе, впоследствии было показано что gr96 является транспортером опухолевых антигенов, в т.ч. из-за его консервативной структуры [189,190]. Было обнаружено, что ассоциированный с опухолевыми антигенами gr96 может вызывать специфический иммунный ответ против опухолей, из которых он был выделен. Позднее, эта же способность усиливать противоопухолевый иммунитет была обнаружена у HSP70 и HSP90 ассоциированных с опухолевыми пептидами [168,191]. Механизмом, отвечающим за активацию специфического иммунитета при доставке антигенов в антиген-презентирующие клетки белками теплового шока, является кросс-презентация [169]. Таким образом, белки теплового шока должны были быть ассоциированы с эпитопами антигенов, специфичными HLA I класса, чтобы активировать цитотоксические лимфоциты после кросс-презентации. И действительно,

выделение и анализ пептидов ассоциированных с HSP70, HSP90 и gp96, показал, что эти пептиды являются HLA I-специфичными эпитопами опухолевых антигенов [192]. Позднее было показано, что не только CD8⁺ Т клетки могут быть активированы с помощью такого механизма, но и CD4⁺ Т клетки. Белки теплового шока могут так же быть ассоциированы с прекурсорами HLA II-специфичных эпитопов опухолевых антигенов [193]. Таким образом, захваченные антигены включаются в процессинг и кросс-презентацию с последующим представлением их эпитопов Т клеткам [193]. Все эти открытия были приняты научным сообществом и эти знания направлены на адаптацию белков теплового шока для лечения онкологических заболеваний.

Изначальная идея заключалась в использовании в качестве противоопухолевых вакцин комплексов белков теплового шока с пептидами, выделенными из аутологичных опухолей. Было показано, что аутологичные препараты выделенных из опухоли комплексов белков теплового шока с пептидами были эффективны в ограничивании опухолевого роста и метастазирования у мышей [16]. Позднее было показано, что комплексы HSP70 с пептидами, выделенные из меланомы, могут быть кросс-презентированы человеческими дендритными клетками, что в свою очередь стимулирует пептид-специфический Т-клеточный ответ [194]. Вдобавок, CD8⁺ Т клеткам не требуется дополнительных сигналов от дендритных клеток для стимуляции, кроме кросс-презентации пептидов в комплексе с HLA I класса [194]. Следует так же отметить, что препараты, выделенные из аллогенной, но не аутологичной опухоли, не показали значительной эффективности. Это объясняется тем фактом, что каждое злокачественное образование обладает своим уникальным протеомом. Такие препараты комплексов белков теплового шока с пептидами, выделенные из опухоли, являются поливалентной вакциной, которая предоставляет кросс-презентацию целой палитры антигенов той опухоли, из которой эти комплексы были выделены. Таким образом, аутологичные вакцины на основе белков теплового шока должны использоваться для отдельного пациента и его злокачественного образования с его уникальным протеомом.

Благодаря обнаруженным особенностям, комплексы белков теплового шока с пептидами, выделенные из опухоли, стали использоваться в качестве многообещающих индивидуальных противоопухолевых вакцин. Несколько клинических исследований продемонстрировали некоторую эффективность аутологичных вакцин на основе белков теплового шока при лечении меланомы, колоректальной карциномы и почечно-клеточной карциномы [17,195,196]. Было доказано, что аутологичные вакцины на основе белков теплового шока, выделенные из опухолей, безопасны и эффективны, обеспечивая индивидуальную терапию пациентов при некоторых видах онкологических заболеваний [195]. Тем не менее, такая стратегия имеет свои недостатки и ограничения. Одним из существенных ограничений является малый объем опухолевой ткани

пациентов. Для того, чтобы выделить достаточное количество комплексов белков теплового шока с пептидами требуется большой объем опухолевой ткани. Примерно половина пациентов, исключенных из клинических исследований, имели недостаточное количество опухолевой ткани для приготовления вакцины [17,195]. Более того, большой объем злокачественного образования обычно коррелирует с поздней стадией заболевания, когда такие иммунотерапевтические методы уже малоэффективны. Противоопухолевая вакцина на основе выделенных из аутологичных опухолей комплексов gp96 с пептидами, которая получила коммерческое название Oncophage® (витеспен), показала значительный эффект в клинических исследованиях лишь при лечении ранних стадий почечно-клеточной карциномы [17]. Препарат витеспен не смог продемонстрировать более широкую активность в рандомизированных клинических исследованиях при лечении запущенных стадий таких заболеваний, как глиобластома, колоректальная карцинома, неходжкинская лимфома, карцинома поджелудочной железы, немелкоклеточная карцинома легких и карцинома желудка [197]. Тем не менее, было описано и несколько обезнадлежающих результатов у нескольких пациентов. В соответствии с этими случаями стало понятно, что лучшей стратегией применения противоопухолевых вакцин на основе белков теплового шока является превентивная вакцинация, или вакцинация на ранних стадиях онкологического заболевания. Другой стратегией может быть использование таких вакцин в качестве профилактики рецидива после резекции опухоли. Еще одним недостатком такой вакцины является тот факт, что выделение комплексов белков теплового шока с пептидами из опухолевого материала ограничивается гетерогенностью опухоли, т.к. опухоли состоят из соединительной и сосудистой тканей, больших областей некроза и инфильтрированы иммунными клетками. Более того, транскриптом и протеом клеток первичной опухоли и метастазов может отличаться [198,199].

Альтернативной стратегией является использование комплексов белков теплового шока с опухолеассоциированными антигенами, сконструированными *in vitro*. Возможность такого комплексообразования *in vitro* была показана на примере шаперонов HSC70 и HSPA5 [200]. Опухолеассоциированные пептиды не стали исключением и была так же показана возможность из связывания *in vitro* с HSP70 и gp96 [18,169]. Такие *in vitro* реконструированные комплексы оказались способными вызывать противоопухолевый иммунный ответ, в т.ч. CD8⁺ Т-клеточный ответ, в той же манере, что и аутологичные препараты [169]. Стратегия использования *in vitro* реконструированных комплексов имеет несколько преимуществ по сравнению с аутологичными вакцинами, например, отсутствие ограничения в количестве опухолевой ткани от пациента. По этой причине отпадает вопрос о недостаточном количестве препарата. Другие преимущества — это возможность образовать комплекс белка теплового шока с любым требуемым антигеном или

пептидом и решение проблемы персонализированности вакцин на основе белков теплового шока. Тем не менее, возможность реконструировать вакцины на основе белков теплового шока *in vitro* поднимает другую проблему. В этом случае невозможно синтезировать все антигены экспрессируемые отдельной опухолью. Единственный способ достичь это – выделение антигенов из аутологичной опухоли пациента, но эта процедура мало отличается от выделения комплексов антигенов с белками теплового шока и сталкивается с теми же проблемами. Таким образом, необходимо изучение опухолевого протеома, чтобы выявлять ассоциированные с опухолями антигены, эпитопы которых будут обеспечивать строго специфичный и эффективный противоопухолевый ответ. Достаточно будет использовать один или несколько антигенных эпитопов в качестве вакцины против одного типа злокачественного образования, чем использовать целый опухолевый протеом, как при аутологичных вакцинах. Необходим поиск антигенов и их эпитопов, которые являются более иммуногенными и специфичными для злокачественных клеток, чтобы реализовать потенциал противоопухолевых вакцин, в частности вакцин на основе белков теплового шока, что будет обсуждено далее.

Учитывая тот факт, что лишь одного или нескольких опухолеспецифичных антигенов достаточно для активации специфического противоопухолевого иммунного ответа с помощью вакцины, в качестве компонентов *in vitro* реконструированных вакцин на основе белков теплового шока стали использоваться рекомбинантные белки. Было проведено множество исследований с похожими результатами, которые показывают эффективность реконструированных *in vitro* комплексов белка теплового шока с одним пептидом опухолевого белка или белка из микроорганизма [201,202]. Не все белки способны образовывать прочный комплекс с белком теплового шока. Чтобы решить эту проблему были сконструированы гибридные пептиды. Такие пептиды состоят из известного HLA I-специфичного эпитопа антигена, который присоединен к пептиду, известному как высоко-аффинный лиганд HSP70, через глицин-серин-глицин линкер [203]. Было продемонстрировано, что комплексы рекомбинантного HSP70 с гибридными пептидами обладают более высокой эффективностью, чем комплексы HSP70 с пептидами без лиганда для шаперонов. Очередное исследование с использованием лиганда HSP70 с еще большим сродством и с расщепляемым линкером подтвердило утверждение о том, что высокое сродство белка теплового шока к его лиганду имеет решающее значение для способности комплексов вызывать иммунный ответ [204]. Было показано, что чем выше аффинность пептида к шаперону, тем выше иммуногенность [204]. Это наблюдение позволяет сделать вывод о том, что возможно использовать меньшую дозу препарата комплексов белка теплового шока с пептидом высокой аффинности к белку теплового шока, чтобы добиться такого же по силе иммунного ответа, но с пептидом меньшей аффинности [204].

Вдобавок, были созданы комплексы белков теплового шока с мультипептидными конструкциями, которые позволяют доставлять большее количество иммуногенов за одну иммунизацию, что дает возможность создавать поливалентные вакцины на основе белков теплового шока [204]. В целом, реконструированные *in vitro* комплексы белков теплового шока с опухолевыми антигенными пептидами показали себя эффективными индукторами пептид-специфического цитотоксического ответа. Тем не менее, до сих пор существует дискуссия о том, какой тип вакцины на основе белков теплового шока более эффективен – аутологичные комплексы выделенные из опухоли или реконструированные из рекомбинантных белков *in vitro* [205]. Преимуществом аутологичных вакцин на основе белков теплового шока является их поливалентность, что позволяет предоставлять иммунным клеткам для кросс-презентации целую палитру опухолевых антигенов. Эта гипотеза подтверждается несколькими исследованиями мультипептидных вакцин, в которых было показано их превосходство в эффективности против инфекционных и онкологических заболеваний над однопептидными вакцинами [206,207]. С другой стороны, существует множество обратных примеров, когда однокомпонентная вакцина показывала большую эффективность, по сравнению с мультиантигенными коктейлями [208].

Развивая идею реконструированных *in vitro* комплексов опухолевых пептидов с рекомбинантными белками теплового шока и использование их в качестве противоопухолевых вакцин, появились работы по синтезу слитых рекомбинантных белков, состоящих из этих же компонентов. *Suzie* и коллеги впервые описали и создали концепт такой конструкции [209]. Рекомбинантный слитый белок, состоящий из HSP70 *M. tuberculosis* и 115-аминокислотного пептида овальбумина, присоединенного к N-концу шаперона, был синтезирован и выделен из *E. coli*. Было показано, что HSP70-овальбумин слитый белок стимулирует пролиферацию CD8⁺ Т клеток, распознающих экспрессирующие овальбумин клетки меланомы [209]. Позднее, *Moré*, и коллеги сообщили, что слитый белок, состоящий из gp96 и эпитопа, но присоединенного к C-концу gp96 без линкеров, не продемонстрировал какой-либо значительной активации эпитоп-специфичных Т клеток [210]. Тем не менее, было мало понятно, почему произошел провал gp96 по сравнению с микобактериальным HSP70. Среди возможных объяснений была гипотеза, что конформационные изменения из-за ковалентного связывания пептида с gp96 имеют решающее значение для интернализации слитого белка антиген-презентирующей клеткой или для доставки пептида в HLA I путь кросс-презентации антигена. Позднее, *Udono* и коллеги сообщили о похожем эксперименте, но с использованием HSC70 [211]. В этом эксперименте авторы работы синтезировали оба варианта слитых белков, с несколькими пептидами, присоединенными к HSC70 с N- или C-конца без линкеров. Было продемонстрировано, что оба варианта слитых белков были способны активировать пептид-специфичный цитотоксический ответ, что также

указывает на несущественность наличия С- или N-концевых линкеров для этого процесса. В другом исследовании было показано, что не только HLA I-специфичные пептиды, но и HLA II-специфичные антигенные пептиды могут быть функциональными, если слиты с белком теплового шока [19]. Было показано, что HLA II-специфичные пептиды кросс-презентируются дендритными клетками, будучи доставленными в составе слитого белка с HSC70 [19]. Таким образом, слитые белки, состоящие из HSC70 с HLA II-специфичными пептидами, активируют CD4⁺ Т-клеточный ответ, что приводит к усилению цитотоксического ответа. В исследовании наблюдалась увеличенная и гораздо более эффективная популяция CD8⁺ Т клеток после кросс-презентации дендритными клетками слитого белка, состоящего из HSC70 с эпитопами обоими HLA I- и HLA II-специфичными эпитопами [19]. Эти данные согласуются с данными из другого исследования, в котором использовался слитый белок, состоящий из HSP70 с HLA I- и HLA II-специфичными эпитопами овальбумина [21]. Было показано, что HSP70 слитый с двумя пептидами сразу эффективнее индуцирует цитотоксический ответ, по сравнению со смесью двух слитых белков, в одном из которых HSP70 слит с HLA I пептидом, а в другом с HLA II пептидом. Более того, более эффективная кросс-презентация пептидов наблюдалась если HLA II-специфичный эпитоп присоединен к N-концу HSP70, а не к С-концу [21]. Этот результат объясняется тем, что процессинг интернализированных пептидов, слитых с белком теплового шока, и других белков регулируется различными протеолитическими процессами, ответственными за N- или С-концевое расщепление, и что такое расщепление происходит с разной эффективностью в отношении N- и С-концов белка [48]. Помимо усиления эффективности процессинга и кросс-презентации слитых белков на основе белков теплового шока, в другом исследовании сообщалось о более эффективном направлении интернализованного слитого белка в цитозольный путь деградации если слитый белок был конъюгирован с полигистидиновой аминокислотной последовательностью [20]. HSP70 слитый с HLA I-специфичным эпитопом овальбумина со стороны С-конца и с 25 гистидинами с N-конца более эффективно включался в цитозольный путь деградации из эндосомального *in vitro* и *in vivo*, по сравнению со слитым белком без полигистидиновой конъюгации [20].

Несмотря на то, что вакцины на основе белков теплового шока показали себя отличными активаторами антиген-специфичного цитотоксического ответа в лабораторных исследованиях, они не смогли продемонстрировать широкий спектр активности в клинических испытаниях аутологичных вакцин (Таблица 4). Что касается вакцин на основе реконструированных комплексов с белком теплового шока или слитых белков, клинические исследования этих типов вакцин практически не проводились. Так же не проводились исследования, в которых бы сравни-

Таблица 4. Обобщенные данные клинических испытаний противоопухолевых вакцин на основе белков теплового шока по данным <http://clinicaltrials.gov/>.

Название исследования	Номер исследования	Тип вакцины	Белок теплового шока	Состояние	Статус
Аутологичные препараты, выделенные из опухоли					
GP96 Heat Shock Protein-Peptide Complex Vaccine in Treating Patients with Recurrent or Progressive Glioma	NCT00293423	gp96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Опухоли мозга и центральной нервной системы	Завершено
Vaccine Therapy in Treating Patients with Stage I or Stage II Pancreatic Cancer	NCT00003025	Витеспен (gp96-пептид комплексы)	HSPC4/gp96	Панкреатическая карцинома	Завершено
Study of Heat Shock Protein-Peptide Complex (HSPPC-96) Versus IL-2/DTIC for Stage IV Melanoma	NCT00039000	Oncophage® (HSPPC96-пептид комплексы)	HSPC4/gp96	Меланома	Завершено
Vaccine Therapy in Treating Patients with Recurrent Soft Tissue Sarcoma	NCT00005628	Витеспен (HSPPC96-пептид комплексы)	HSPC4/gp96	Саркома	Завершено
Research for Immunotherapy of Glioblastoma with Autologous Heat Shock Protein gp96	NCT02122822	gp96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Глиома	Завершено
A Safety and Effectiveness Study of Vaccine Therapy in Patients with Indolent Lymphoma	NCT00081809	HSPPC96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Лимфома	Завершено
Study of the Feasibility to Derive Vaccine from Tumor Tissue in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer	NCT00098085	HSPPC96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Карцинома легких	Завершено
Study Using Vaccination with Heat Shock Protein 70 (HSP70) for the Treatment of CML in Chronic Phase	NCT00027144	HSP70-пептид комплексы	HSPA1B/HSP70	Лейкемия	Завершено
A Large-scale Research for Immunotherapy of Glioblastoma with Autologous Heat Shock Protein gp96	NCT03650257	gp96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Глиома	Набор пациентов
GP96 Heat Shock Protein-Peptide Complex Vaccine in Treating Patients with Liver Cancer	NCT04206254	gp96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Карцинома печени	Набор пациентов
Vaccine Therapy with Bevacizumab Versus Bevacizumab Alone in Treating Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme That Can Be Removed by Surgery	NCT01814813	HSPPC96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Глиобластома, глиосаркома	Активно
Clinical Trial Studying a Personalized Cancer Vaccine in Patients with Non-metastatic Kidney Cancer	NCT00126178	Oncophage® (HSPPC96-пептид комплексы)	HSPC4/gp96	Почечно-клеточная карцинома	Отменено
Trial of Heat Shock Protein Peptide Complex-96 (HSPPC-96) Vaccine	NCT02722512	HSPPC96-пептид комплексы	HSPC4/gp96	Глиобластома, астроцитомы, эпендимомы	Отменено

Vaccination Against High Risk Breast Cancer Using Tumor Derived Heat Shock Protein 70	NCT00027131	HSP70-пептид комплексы	HSPA1B/HSP70	Карцинома молочной железы	Отменено
Рекомбинантные препараты					
Vaccine Therapy in Treating Patients with Stage III or Stage IV Melanoma	NCT00005633	Пептиды тирозиназы и gp100:209-217, слитые с BiP пептидом овальбумина и HSP70	HSPA1B/HSP70	Меланома	Завершено
Vaccine Therapy in Treating Patients with Advanced Stage III-IV Melanoma	NCT01744171	HSP110-gp100 комплексы	HSPH2/HSP110	Меланома	Отменено

валась эффективность различных подходов, основанных на белках теплового шока. Таким образом, нельзя однозначно утверждать какой из типов вакцин, основанных на белках теплового шока, наиболее предпочтителен, каждый из них обладает своими преимуществами и недостатками.

В настоящее время белки теплового шока хорошо изучены как адъюванты и транспортировщики антигенов, тогда как фокус исследований в области иммунотерапевтических подходов в онкологии сместился в сторону поиска антигенов и их эпитопов, являющихся эффективными активаторами антиген-специфического иммунного ответа. В нескольких исследованиях докладывается о потенциальной эффективности некоторых опухолеспецифичных антигенов слитых или в комплексе с белками теплового шока в качестве противоопухолевых вакцин. Подавляющее большинство из этих опухолеспецифичных антигенов являются раково-зародышевыми антигенами из-за того, что они наиболее изучены к настоящему времени. Тем не менее, больше антигенов, потенциально являющихся компонентами противоопухолевых вакцин, еще только предстоит описать.

2. Опухолеассоциированные антигены

Злокачественная трансформация нормальных клеток сопровождается значительными перестройками в структуре и функции молекулярных механизмов их существования. В частности, значительно изменяется паттерн экспрессии различных белков из-за усиления или подавления экспрессии на уровне транскрипции или трансляции. Более того, при злокачественной трансформации клетки зачастую начинают эктопически экспрессировать неспецифичные для того или иного типа ткани белки [212]. Такие белки, специфично экспрессирующиеся в опухолях, называются опухолеассоциированными антигенами. В зависимости от их происхождения, опухолеассоциированные антигены разделяются на две категории: опухолеспецифичные и низкоспецифичные для опухоли [26]. В свою очередь, каждая

из этих категорий включает несколько групп антигенов (Таблица 5). Увеличение количества aberrantly экспрессируемых антигенов приводит к тому, что опухолевая ткань становится иммунологически отличной от нормальной ткани, из которой она произошла. Накопление опухолеассоциированных антигенов в опухолевых клетках при их избыточной или эктопической экспрессии приводит к тому, что опухолевые клетки становятся иммуногенными для аутологичной иммунной системы.

Таблица 5. Опухолеассоциированные антигены

	Группы
Низкоспецифичные опухолевые антигены	Тканеспецифичные (дифференцирующие) антигены: • меланоцит-специфичные антигены • простат-специфичные антигены • антигены, специфичные для молочной железы • антигены, специфичные для яичников
	Сверхэкспрессирующиеся антигены
Опухолеспецифичные антигены	Неоантигены
	Антигены онкогенных вирусов
	Иммунопривилегированные антигены: • раково-зародышевые антигены • онкогемральные антигены • раково-сетчаточные антигены

2.1. Низкоспецифичные опухолевые антигены

Низкоспецифичные опухолевые антигены включают в себя белки, которые экспрессируются не только в опухолевых клетках, но также в нормальных клетках первичной ткани. Существуют две группы антигенов, входящие в эту категорию: тканеспецифичные или дифференцирующие антигены и сверхэкспрессированные антигены. Дифференцирующие антигены экспрессируются тканеспецифично, а также в опухолях, происходящих из соответствующей ткани. К настоящему времени несколько антигенов экспрессирующихся в нормальных тканях отнесены к группе дифференцирующих антигенов. Например, NY-BR-1 антиген был описан как белок специфично экспрессирующийся в нормальной ткани молочной железы, а также в клетках опухоли при раке молочной железы [213,214]. Ни в одной другой нормальной ткани или опухоли, кроме семенников, экспрессия NY-BR-1 не обнаружена. Примерами других дифференцирующих антигенов являются тастин и бистин, в норме экспрессирующиеся в плаценте и семенниках, а также в клетках опухоли при эпителиальной карциноме яичника [215]. MNDA (myeloid cell nuclear differentiation antigen), в норме экспрессирующийся в миеломоноцитарных и В клетках, а также при В-клеточной лимфоме, также может быть отнесен к группе дифференцирующих антигенов [216]. Наиболее изученными дифференцирующими антигенами являются меланоцит-специфичные антигены. Они включают в себя тирозиназу [217], gp100 [218] и Melan-A/MART-1 [219], которые экспрессируются в нормальных меланоцитах, а также в клетках меланомы. Оказалось, что несмотря на экспрессию

дифференцирующих антигенов в нормальных тканях, толерантность аутологичной иммунной системы к ним не является абсолютной. Т-клеточный иммунный ответ против этих белков спонтанно возникает у пациентов с онкологическими заболеваниями [217,220]. Таким образом, вопрос об использовании дифференцирующих антигенов или их пептидов в качестве компонентов противоопухолевых вакцин является спорным из-за их низкой опухолевой специфичности и потенциальной возможности возникновения аутоиммунного ответа на нормальные клетки, также экспрессирующие эти белки.

Другая группа белков, входящая в категорию низкоспецифичных для опухоли антигенов это сверхэкспрессирующиеся антигены. Некоторые белки экспрессируемые тканью в норме, будучи сверхэкспрессированными в опухоли, могут стать иммуногенными для специфического Т-клеточного ответа. Обычно Т клетки не распознают аутологичные клетки из-за низкой специфичности Т-клеточного рецептора к комплексу HLA-пептид, в котором пептид является частью одного из экспрессируемых в норме белков. Клоны Т клеток с высокой специфичностью к пептидам экспрессируемых в норме белков в комплексе с HLA элиминируются в процессе дифференцировки в тимусе. В случае сверхэкспрессии какого-либо белка выше определенного порога, количество комплексов пептида данного белка с HLA на поверхности клетки увеличивается. Высокая плотность HLA-пептид комплексов, в свою очередь, компенсирует низкую специфичность Т-клеточного рецептора к ним и делает специфическое распознавание Т клетками возможным [221]. Таким образом, сверхэкспрессирующиеся антигены являются потенциальными компонентами противоопухолевых вакцин. Наиболее изученный антиген этой группы это HER2, так же известный как ERBB2 и NEU. HER2 интенсивно изучался в контексте карциномы молочной железы и яичников, где его сверхэкспрессия по сравнению с соответствующей нормальной тканью встречается в 30-40% случаев при обоих заболеваниях [222]. Было так же обнаружено, что HER2 сверхэкспрессируется при карциноме желудка и колоректальной карциноме [223,224]. Несколько пептидов HER2 уже идентифицированы как потенциальные компоненты вакцин [221,225]. Тем не менее, применение таких анти-HER2 вакцин проблематично из-за иммунологической толерантности к HER2 из-за наличия его экспрессии в нормальных клетках организма и отсутствия высокоспецифичных к нему клонов Т клеток [226]. Таким образом, эта проблема ограничивает применение HER2 и других сверхэкспрессирующихся в опухоли антигенов как компонентов противоопухолевых вакцин в будущем.

2.2. Опухолеспецифичные антигены

Вторая большая категория опухолеассоциированных антигенов – это антигены высокой опухолевой специфичности, в состав которой входят антигены экспрессирующиеся в опухолях в

результате мутаций или перестройки генома, антигены онкогенных вирусов и иммунопривилегированные антигены, являющиеся результатом aberrантной экспрессии неспецифических тканевых генов. Будучи высокоспецифичными для опухолей, вакцины с такими антигенами в составе могут вызывать специфический противоопухолевый иммунный ответ, что является ключевым моментом в противоопухолевой иммунотерапии.

Мутации генов, в зависимости от их типа, приводят к изменениям нормальной аминокислотной последовательности белка. Такая ситуация приводит к образованию новых антигенных эпитопов, вместо эпитопов соответствующих оригинальной аминокислотной последовательности. В этом случае, опухолевыми клетками эксклюзивно экспрессируется модифицированный белок, который будет распознаваться иммунными клетками как чужеродный с последующим развитием специфического Т-клеточного ответа [2]. Получаемые в результате мутагенного процесса в опухолях антигены были описаны как неоантигены [4]. Примерами таких мутирующих при малигнизации антигенов входящих в данную группу опухолеассоциированных антигенов являются: CDK-4 [227], β -catenin [228], mutated p53 [229] and MUM-1 [230]. Стоит отметить, что опухолеассоциированные антигены этой группы, как правило, являются факторами онкогенеза в процессе малигнизации клеток. Разнообразие возможных мутаций или перестроек генома, приводящих к изменению аминокислотной последовательности огромно. Таким образом, пептиды, образующиеся в результате таких мутаций малоперспективны в качестве компонентов противоопухолевых вакцин для массового применения. Тем не менее, с развитием современных технологий высокопроизводительного секвенирования и биоинформатических подходов анализа больших данных появляются инструменты для разработки персонализированных иммунотерапевтических подходов на основе неоантигенов [3].

Онкогенные вирусы известны своим вкладом в развитие опухолей при некоторых онкологических заболеваниях. Описано несколько вирусов, ассоциированных с развитием онкологии: вирус папилломы человека (ВПЧ) (карцинома шейки матки), вирус Эпштейна-Барра (болезнь Ходжкина, карцинома носоглотки, лимфома Беркитта) и вирусы гепатита В и С (гепатоцеллюлярная карцинома) [212]. В случае трансформации клеток ретровирусами, их гены (онкогены) интегрируются в клеточный геном, что приводит к экспрессии вирусного антигена (онкобелка). В случае трансформации клеток ДНК-содержащими вирусами, их ДНК также может быть интегрирована в клеточный геном с последующей экспрессией вирусных антигенов. Обе ситуации приводят к синтезу вирусных антигенов, которые являются чужеродными для иммунной системы, и к активации специфического Т-клеточного ответа против опухолевых клеток, трансформированных онкогенными вирусами. Таким образом, вирусные антигены являются подходящими кандидатами в компоненты противоопухолевых вакцин. Благодаря их

очень ранней экспрессии задолго до начала злокачественной трансформации клетки, такие вакцины, содержащие вирусные онкогены, могут быть более перспективными для профилактических, чем для терапевтических целей [231]. Например, клинические исследования противоопухолевой вакцины содержащей антиген ВПЧ показали ее высокую эффективность в профилактике ВПЧ-ассоциированной карциномы шейки матки и собственно ВПЧ инфекции [232].

Иммунопривилегированные антигены, в сравнении с остальными группами опухолеассоциированных антигенов, являются одними из самых подходящих антигенов для противоопухолевых вакцин. Белки, входящие в группу иммунопривилегированных антигенов в норме экспрессируются в клетках, у которых отсутствуют молекулы HLA, или в клетках, находящихся в иммунопривилегированных тканях. Такие белки являются чужеродными и иммуногенными для аутологичной иммунной системы. Таким образом, aberrантная экспрессия этих белков клетками опухоли приводит к возникновению специфического Т-клеточного ответа против опухолевых клеток их экспрессирующих. Раково-зародышевые антигены (старое название раково-тестикулярные) были впервые описаны как опухолеспецифичные антигены. Впервые их aberrантная экспрессия была обнаружена в клетках меланомы и они были обозначены как семейство меланома-ассоциированных антигенов (MAGE, melanoma-associated antigen family) [233]. В настоящее время семейство меланома-ассоциированных антигенов включает в себя 25 антигенов, экспрессируемых в широком спектре опухолей, а не только в меланоме. В свою очередь вся группа раково-зародышевых антигенов включает в себя более 60 антигенов [26]. Экспрессия раково-зародышевых антигенов не была обнаружена ни в одной нормальной ткани, за исключением половых клеток и клеток трофобласта. Анергия иммунной системы к этим клеткам объясняется отсутствием у них молекул HLA класса I, соответственно, зародышевые клетки не могут вызвать Т-клеточный ответ [234]. Тканевые барьеры, в частности гемато-тестикулярный барьер также вносит свой вклад, делая эти ткани иммунопривилегированными [235]. В свою очередь, большое количество опухолей различного типа могут aberrантно экспрессировать раково-зародышевые антигены [236]. Таким образом, экспрессируясь в опухолях и будучи чужеродными для аутологичной иммунной системы, раково-зародышевые антигены делают опухолевые клетки, в которых они экспрессируются специфическими мишенями для Т-клеточного ответа.

2.3. Раково-сетчаточные и онконевральные антигены

Онконевральные антигены и недавно описанная группа раково-сетчаточных антигенов так же как и раково-зародышевые антигены входят в группу иммунопривилегированных антигенов [5]. Онконевральные и раково-сетчаточные антигены в норме экспрессируются только в нервной

ткани и сетчатке, соответственно, которые являются иммунопривилегированными тканями из-за наличия гематоэнцефалического и гематоретинального барьеров. Во время процесса малигнизации эти антигены, так же, как и раково-зародышевые антигены, могут начать аберрантно экспрессироваться в раковых клетках. Наличие тканевых барьеров делает онкогематологические и раково-сетчаточные антигены чужеродными для аутологичной иммунной системы и, таким образом, будучи экспрессированными в опухоли они могут быть кросс-презентированы Т клеткам с последующим специфическим Т-клеточным ответом.

Гематоэнцефалический и гематоретинальный барьеры известны как специальные тканевые структуры, которые контролируют проникновение лекарственных средств, микроорганизмов, антител и лимфоцитов в ткани, которые они отделяют [237]. Тем не менее, в некоторых случаях эти барьеры могут быть проницаемы, в частности для антител и лимфоцитов [238]. В таких случаях могут возникать аутоиммунные реакции против клеток нервной системы и сетчатки. Это подтверждается клиническими случаями так называемого паранеопластического синдрома. Паранеопластические синдромы возникают как следствие онкологического заболевания, но они не связаны с опухолевой тканью как таковой напрямую. Они характеризуются как манифестация внеопухолевых симптомов вызванных аберрантной продукцией опухолью различных субстанций. Патомеханизм паранеопластических синдромов был подробно изучен на примере паранеопластической или опухолеассоциированной ретинопатии, симптомами которой являются ухудшение зрения, жалобы на необъяснимые вспышки света, потеря периферического зрения, цветовая и ночная слепота [239]. Описанные симптомы возникают вследствие аутоиммунного ответа против клеток сетчатки после распознавания иммунными клетками аберрантно экспрессируемых раково-сетчаточных антигенов в опухолевых клетках. В этом случае аутоиммунные реакции регулируются гуморальным, Т- и В-клеточными ответами [240,241]. Тем не менее, в подавляющем количестве случаев активация иммунного ответа против раково-сетчаточных антигенов не манифестирует [12]. По одной из нескольких гипотез объясняющих данный феномен, титр антител против раково-сетчаточных антигенов должен превысить определенный уровень, чтобы они могли проникнуть через гематоретинальный или гематоэнцефалический барьер [6]. Эта гипотеза поддерживается наблюдениями, что лишь у пациентов с очень высокими титрами антител против белков Нс и рековерина проявляются паранеопластические синдромы [242]. Тем не менее стоит отметить, что антитела к раково-сетчаточным антигенам могут быть обнаружены задолго до того, как становится возможным обнаружить онкологическое заболевание с помощью обычных диагностических методик, используемых в клинической практике [8]. Это может означать, что процесс малигнизации уже

где-то происходит и этот феномен может быть использован в диагностических целях, что будет обсуждено далее

К настоящему времени несколько белков известны как «классические» онкогематологические антигены, а именно: наиболее интенсивно изученный - HuD, Yo, CRMP5, амфифизин, Ri и Ma2 [243]. Экспрессия антигена HuD обнаруживается в подавляющем большинстве случаев мелкоклеточной карциномы легких и нейробластомы [244]. Что касается остальных онкогематологических антигенов, их экспрессия наиболее распространена в клетках карцином легких, молочной железы и яичников [243,245,246].

Первым белком, распознанным как раково-сетчаточный антиген был рековерин [247]. В дальнейшем было показано, что и другие специфичные сетчатке белки, такие как родопсин, трансдуцин, фосфодиэстераза 6, родопсин киназа и аррестин-1, могут абберрантно экспрессироваться в клетках опухолей [7,10,243]. Интересно, что при карциноме желудка рековерин экспрессируется в основном на ранних стадиях заболевания [248]. Механизмом, регулирующим абберрантную экспрессию рековерина, как и раково-зародышевых антигенов, является деметилирование промотора гена [249,250]. Промоторы генов раково-зародышевых антигенов и рековерина в норме метилированы, за исключением промоторов этих генов в зародышевых клетках и клетках сетчатки, соответственно, что приводит к их сайленсингу. Изменения эпигенетического аппарата клетки в процессе малигнизации приводит к изменению паттерна метилирования различных генов и, следовательно, их экспрессии.

Учитывая описанные особенности раково-сетчаточных антигенов, такие как абберрантная опухолеспецифичная экспрессия и ее начало задолго до манифестации онкологического заболевания, они являются подходящими кандидатами в компоненты противоопухолевых вакцин как для превентивных, так и для лечебных целей. Тем не менее стоит рассматривать такую возможность с предосторожностью, т.к., в отличие от зародышевых клеток, на клетках экспрессирующих онкогематологические и раково-сетчаточные антигены в норме присутствуют молекулы HLA. Следовательно, несмотря на иммунопривилегированный статус этих тканей и наличие тканевых барьеров, при их повреждении существует вероятность развития аутоиммунных реакций.

В организме человека присутствуют различные гематотканевые барьеры: упомянутые выше гематоретинальный, гематоэнцефалический, гематотестикулярный барьеры, а также гематоплацентарный и гематосухжильный барьеры. Таким образом, клетки отделенных ими иммунопривилегированных тканей могут специфично экспрессировать много других белков, которые будут иммуногенны для аутологичной иммунной системы. В случае выявления абберрантной экспрессии таких белков в опухолевых клетках их можно рассматривать как

потенциальные опухоли-специфичные антигены для использования в качестве иммуногенов против опухолевых клеток.

В настоящее время стало очевидным, что не только адъюванты и системы доставки ответственны за эффективность вакцины, но и хорошо подобранные эпитопы высокоспецифичных опухолевых антигенов. Специфичность антигенных эпитопов к HLA молекулам пациента так же играет важную роль в результативной иммуногенности вакцины. Более того, было показано, что два различных эпитопа одного антигена после кросс-презентации могут приводить к различным по эффективности антиген-специфичным Т-клеточным ответам против опухолевых клеток, экспрессирующих этот антиген [251].

Интересный взгляд на данный вопрос и о механизмах действия противоопухолевых вакцин был высказан в обзорной статье *Coulie et al., 2014* [26]. До вакцинации большое количество активированных противоопухолевых антиген-специфичных Т клеток уже циркулирует в организме в случае развития онкологического заболевания [252]. Тем не менее, локальное иммуносупрессивное микроокружение, сформированное опухолью, приводит как к анергии Т клеток, которые уже присутствуют в нем, так и препятствует проникновению новых активированных Т клеток. Гипотеза, предложенная *Coulie et al.* основана на том, что после вакцинации частота анти-вакцинных Т клеток в регрессирующей опухоли большинства пациентов, ответивших на иммунотерапию, довольно низкая – порядка одной клетки на 10^6 опухолевых клеток [26]. С другой стороны, во время регрессии опухоли наблюдалось значительное увеличение количества уже присутствующих и новых Т клеток, специфических антигенам той же опухоли, и их частота может быть в 10000 раз выше, чем анти-вакцинных Т клеток. Исходя из этих наблюдений делается вывод о том, что маловероятно, что такое небольшое количество анти-вакцинных Т клеток может в большой степени повлиять на разрушение опухоли. Тем не менее, небольшое количество анти-вакцинных Т клеток, проникнув в опухолевое окружение и распознав специфичные им эпитопы на опухолевых клетках, начинают активно продуцировать про-воспалительные цитокины, которые очагово изменяют иммуносупрессивное микроокружение на иммуностимуляторное. Это, в свою очередь, приводит к реактивации анергичных Т клеток, уже присутствующих в опухолевом микроокружении, и стимулирует новые Т клетки. Таким образом, происходит нечто похожее на цепную реакцию, которая мобилизует все большее количество существовавших ранее противоопухолевых Т клеток, тогда как активированные вакциной Т клетки являются своего рода «вспышкой», которая запускает реакцию [26]. Это так же подтверждается работами по неоадъювантной терапии рака – применение химиотерапии до хирургической операции при онкологических заболеваниях. Известно, что химиотерапевтические препараты для борьбы с онкологическими заболеваниями

обладают сильными мутагенными свойствами. Было замечено, что микроокружение метастатических сайтов пациентов с колоректальной карциномой, получавших неоадьювантную терапию, инфильтрировано лимфоцитами в большей степени, по сравнению с пациентами неоадьювантную терапию не получавшими [253,254]. Такой феномен может объясняться тем, что химиопрепараты, вызывая ускоренный мутагенез опухолевых клеток, приводят к появлению неоантигенов, экспрессия которых не встречается в нормальных тканях, и которые обладают высокой иммуногенностью. Тем не менее, опухолевые антигены сами по себе, даже опухолеспецифичные антигены, могут быть неэффективно процессированы и кросс-презентированы, что приводит к слабому иммунному ответу. Было отмечено, что опухолеспецифичные антигены, слитые с белком теплового шока презентуются антиген-презентирующими клетками намного более эффективно, чем опухолеспецифичные антигены сами по себе [255]. Таким образом, опухолеспецифичные антигены, входящие в состав вакцины, например, в комплексе или слитые с белком теплового шока, обладают более высокими иммуногенными свойствами. Хорошо подобранные эпитопы опухолеспецифичных антигенов с высокой аффинностью к HLA молекулам пациента так же играют важную роль. Описанным образом можно добиться увеличения эффективности кросс-презентации и иммуногенности противоопухолевой вакцины, что, в свою очередь, приведет к увеличению количества Т клеток, способных проникнуть в опухолевое микроокружение и/или увеличить количество описанных выше «вспышек», способных изменить микроокружение опухоли.

3. Персонализированная медицина и диагностические подходы в онкологии

Персонализированная медицина является относительно новой областью, методология которой заключается в применении комплексных подходов - применение специфической таргетной терапии, основанной на специфических диагностических тестах [256]. Ключевым в персонализированной медицине является именно последовательный подход, когда по результатам специфических диагностических тестов, зачастую несущих диагностическую ценность сами по себе, выявляются терапевтические мишени, на которые впоследствии может производиться специфическое воздействие в рамках терапии. Персонализированная медицина приходит на смену традиционным терапии и диагностике существующим отдельно друг от друга, в рамках которых комплекс диагностических процедур позволяет получить некую общую абстрактную информацию о пациенте и на ее основе сформулировать требуемое лечение. В отличие от этого подходы персонализированной медицины предлагают конкретный диагностический тест или процедуру, которые проводятся для принятия решения о применении конкретного терапевтического вмешательства. Тем самым, относительно пациента задается вопрос не «какое терапевтическое вмешательство выбрать?», а «можем ли мы и как применить

это терапевтическое вмешательство у конкретного пациента?». Персонализированный подход, таким образом, отвечает современным трендам медицины, в т.ч. ее цифровизации. В частности, развитие методов высокопроизводительного секвенирования и биоинформатических подходов к анализу больших данных позволяет в кратчайшие сроки определять так называемый мутаном и выявлять неоантигены отдельной опухоли отдельного пациента [257,258]. Постоянное совершенствование этих методов делает персонализированную идентификацию неоантигенов все более осуществимой и экономически выгодной. Таким образом, уже сейчас возможно индивидуально определять неоантигены опухоли и, в соответствии с результатом, конструировать персонализированную противоопухолевую вакцину, состоящую из выявленных опухолевых антигенов. Результаты двух недавних клинических испытаний I фазы персонализированных неоантигенных вакцин показали их эффективность у пациентов с резецированной меланомой – у 66.7% и 61.5% пациентов не происходило рецидивов в течении всего периода наблюдения, 20-32 и 12-23 месяцев, соответственно [258,259]. Таким образом, они возвестили о зарождающейся эре персонализированных противоопухолевых вакцин [257]. Тем не менее, остается проблема раннего выявления злокачественного процесса. Определение мутаном и выявление неоантигенов является мощным инструментом для создания противоопухолевых вакцин, но материал для исследования собирался у пациентов с уже диагностированным злокачественным образованием, при чем на 3 и 4 стадии, тогда как зачастую, проблемой является именно позднее начало применения противоопухолевых вакцин. Так, их применение на 3 или 4 стадии онкологического заболевания в большинстве случаев бессмысленно из-за иммунокомпрометированного статуса таких пациентов. Отсутствие надлежащих и доступных в клинической практике методов ранней диагностики онкологических заболеваний лишь усугубляет проблему, тогда как известно, что ранняя диагностика злокачественного процесса коррелирует с потенциальной клинической пользой от предпринимаемого лечения. Резюмируя, существует проблема отсутствия комплексного подхода в онкологии, который будет способствовать раннему выявлению злокачественных новообразований, а также, в случае их обнаружения, скорейшему началу применения современных иммунотерапевтических подходов.

Выбирая предпочтительный подход для создания противоопухолевой вакцины следует отметить, что онкологические заболевания крайне гетерогенны. Зачастую, один и тот же иммунотерапевтический подход может приводить к разным клиническим исходам у пациентов с различными онкологическими заболеваниями, и даже внутри одной нозологической формы [260]. Таким образом, следующее поколение противоопухолевых вакцин должно быть оптимизировано для выборочного использования отдельными пациентами на основе биологии

их опухоли. Для выбора подходящей вакцины может быть применен описанный выше комплексный подход, который заключается в проведении специфических диагностических тестов, по результатам которых будет ставиться решение о применении той или иной вакцины. Одним из примеров такого подхода является выявление мутаномы опухоли с помощью высокопроизводительного секвенирования. В контексте противоопухолевых вакцин такие тесты должны определять паттерн экспрессии антигенов опухолью. Таким образом можно будет сказать, имеет ли смысл применять противоопухолевую вакцину, содержащую некий антиген, в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии этого антигена в опухоли. Для раннего выявления злокачественных процессов применяются методологически другие подходы. В настоящее время основным методом определения наличия экспрессии антигенов в опухолевых клетках является иммуногистохимия (ИГХ). Тем не менее, такой, хоть и прямой, метод определения антигена в опухоли обладает довольно низкой чувствительностью. Более того, применение этого метода может быть ограничено гетерогенностью опухоли и сложностью проведения биопсии на ранних стадиях заболевания. Современной тенденцией является разработка ультрачувствительных методов детекции остаточных количеств опухолевых антигенов в биологических жидкостях, так называемая жидкостная биопсия [261-263]. Однако, помимо проблемы устойчивости серологических онкомаркеров, которые подвергаются деградации за счет циркулирующих нуклеаз и протеаз, что снижает их сигнал [264,265], некоторые из них могут быть обнаружены в опухоли только прямым способом с помощью ИГХ.

Более подходящей альтернативой для специфических диагностических тестов по определению экспрессии антигенов опухолью может стать детекция антител против этих антигенов. Антитела обладают несколькими преимуществами по сравнению с другими биомаркерами [264]. Хотя триггером для продукции специфических антител против опухоле-специфичных антигенов является их аберрантная экспрессия, антитела начинают вырабатываться вскоре после начала экспрессии опухоле-специфичных антигенов и их концентрация быстро увеличивается. Более того, антитела более стабильны в кровотоке [264]. Таким образом, антитела к опухоле-специфичным антигенам могут указать на наличие злокачественного процесса, а также на экспрессию опухоле-специфичных антигенов опухолевыми клетками прежде, чем это будет заметно при стандартных клинических исследованиях. Возможность использования аутоантител к различным опухолеспецифичным антигенам для специфических тестов и диагностики в последнее время была показана для различных онкологических заболеваний, таких как карциномы яичников [266], простатической железы [267], пищевода [268], молочной железы [269] и др.

Материалы и методы

1. Дизайн скринингового исследования, демографическая и клиническая характеристика пациентов

В исследование было включено 65 пациентов (Таблица 6), среди которых у 52 была диагностирована почечно-клеточная карцинома (ПКК), у 13 была диагностирована почечная онкоцитома. Критериями включения в исследование пациентов с симптомами опухолей почек из рутинного потока были диагноз ПКК или почечная онкоцитома. Критериями исключения были невозможность собрать или проанализировать хотя бы один из собранных биообразцов, неполная картина клинических данных по тем или иным причинам, невозможность установить статус пациента на момент окончания наблюдения.

Таблица 6. Демографическая и клиническая характеристика пациентов, вовлеченных в исследование.

Характеристики		Почечно-клеточная карцинома		Почечная онкоцитома	
Общее количество пациентов		52		13	
Средний возраст (диапазон), г.		57.78 (36-86)		60.83 (25-75)	
		Количество пациентов	%	Количество пациентов	%
Пол	Мужской	22	42.3	8	61.5
	Женский	30	57.6	5	38.4
Стадия опухоли	1	9	17.3	6	46.1
	2	2	3.8	-	-
	3	40	76.9	7	53.9
	4	1	1.9	-	-

Почечно-клеточная карцинома или почечная онкоцитома практически во всех случаях диагностировалась во время рутинных клиничко-диагностических исследований. При наличии специфических симптомов или по поводу других причин проводилось ультразвуковое исследование. Компьютерная томография (КТ) с контрастным усилением проводилась для исключения наличия отдаленных метастазов («М» по классификации TNM). У пациентов с аллергическими реакциями на контрастное вещество в анамнезе вместо КТ проводилась магнитно-резонансная томография (МРТ) с контрастным усилением гадолинием. Для определения типа опухолевых клеток, стадии по шкале Фурмана, распространенности первичной опухолевой ткани («Т» по классификации TNM) и степени вовлеченности регионарных лимфатических узлов («N» по классификации TNM) после радикальной или частичной нефрэктомии проводился гистологический и цитологический анализ образцов опухоли почки, паранефральной жировой клетчатки и регионарных лимфатических узлов. Для постановки гистологического диагноза использовалась рутинная световая микроскопия в соответствии с установленными ранее критериями [14]. Диагноз подтверждался в соответствии с

рекомендациями Консенсуса по диагностике почечной неоплазии Международного общества урологической патологии в Ванкувере от 2012 года (International Society of Urological Pathology Vancouver 2012 Consensus Conference on Renal Neoplasia diagnosis) с помощью иммуногистохимического исследования опухолевой ткани с антителами к виментину, CK-7, CK-20, CD20, MUC1 и AMACR [270].

В группу пациентов с ПКК был отобран 31 пациент со светлоклеточной ПКК, 10 пациентов с хромофобной ПКК и 11 пациентов с пиллярной ПКК. У двух пациентов были обнаружены метастазы в регионарных лимфатических узлах (N2 по классификации TNM). У шести пациентов с ПКК развились отдаленные метастазы (M1). У группы из 39 пациентов, состоящей из 29 пациентов с ПКК и 10 пациентов с почечной онкоцитомой, было проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии аррестина-1 в образцах опухолевой ткани почек. Тридцать шесть пациентов, среди которых было 33 пациента с ПКК и 3 пациента с почечной онкоцитомой, были вовлечены в анализ наличия аутоантител против аррестина-1 в образцах сыворотки крови. У десяти пациентов с ПКК было возможно исследовать оба типа биообразцов (ткань опухоли и сыворотку крови). Образцы ткани опухоли почки 15 пациентов с ПКК использовались для исследования статуса метилирования промотора гена аррестина-1.

Наблюдение за пациентами продолжалось 65 месяцев (5.4 года) с момента постановки диагноза.

2. Сбор и подготовка биообразцов

Сбор образцов производился на базе и с использованием оборудования Клиники урологии Сеченовского Университета в течение 2013 года. Все эксперименты с полученными от пациентов образцами производились в соответствии с локальными и национальными этическими стандартами, а также в соответствии с Хельсинской декларацией от 1975 года, в редакции от 2013 года, и были одобрены Этическим Комитетом Сеченовского Университета (N04-12). У всех участвовавших в исследовании пациентов было получено информированное согласие на участие и на обезличенное использование их медицинских данных для публикации полученных результатов. Собираемые образцы включали в себя внутриоперационно собранные образцы ткани опухоли и отдаленных метастазов, а также сыворотку периферической крови, собранную незадолго до оперативного вмешательства. Образцы ткани опухоли и отдаленных метастазов были зафиксированы в 10% формалине и парафинизированы. Парафиновые блоки хранились при комнатной температуре. Сыворотка крови собиралась после центрифугирования свернувшейся крови и хранилась при -80°C.

3. Используемые в работе материалы

3.1. Соли, реактивы, наборы, среды.

Трис, глицин, метанол, NaCl, Tween 20, бычий сывороточный альбумин (БСА), додецилсульфат натрия (ДСН), глицерин, бромфеноловый синий, 2-меркаптоэтанол, акриламид, персульфат аммония, тетраметилэтилендиамин (ТМЭДА), пептон, дрожжевой экстракт, KCl, MgCl₂, ампициллин, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), ЭДТА, имидазол, Triton X-114, PIPES, KOH, CaCl₂, KCl, MnCl₂, HCl, NaOH, агар, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, борная кислота, этидий бромид, азид натрия, бисульфит натрия, гидрохинон, агароза были куплены у производителей Sigma, Thermo Scientific, Merck, Difco, Helicon, ДиаМ, Fluka, MP, ROTH, Serva, BIOMOL.

В работе использовались следующие реактивы, наборы и среды: Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit (Bio-Rad), Clarity™ Western ECL (Bio-Rad), Wizard DNA Clean-up System (Promega), Ni²⁺-активированная Сефароза (GE Healthcare), Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific), RPMI-1640 (Gibco), DPBS без кальция и магния, стерильный (Pan Biotech), разделительный раствор Biocoll (Merck), Bio-Plex Pro™ Reagent Kit III with Flat Bottom Plate (Bio-Rad), Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1, 37-Plex Standard, 1-pk (Bio-Rad), Bio-Plex Pro™ Human Chemokines Standard (Bio-Rad).

3.2. Расходные материалы

S-Monovette® 7.5ml LH (литий-гепарин) (Sarstedt) вакуумные пробирки использовались для сбора крови и дальнейшего выделения из нее мононуклеарных клеток.

Работа с иммунными клетками проводилась с использованием апиrogenного пластика: Nunclon Delta™ Treated Surface 6- и 24-луночные планшеты (Thermo Scientific), наконечники для пипеток с фильтрами (Brand), 50 и 15 мл пробирки Falcon® (Corning), 5 и 10 мл Costar® и 25 мл Cellstar® серологические пипетки (Corning, Greiner Bio-One).

3.3. Рекомбинантный аррестин-1

Рекомбинантный человеческий аррестин-1 был произведен в Отделе сигнальных систем клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и любезно предоставлен Е.Ю. Зернием.

3.4. Антитела

- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к зрительному аррестину (C-1) человека, Santa Cruz Biotechnology, кат. № sc-271159.
- Поликлональные козы IgG антитела к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена, abcam, кат. № ab6789
- Поликлональные козы IgG антитела к человеческим иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой хрена, abcam, кат. № ab6858;

- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD45 человека, конъюгированные с BD Horizon™ BV650 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 563717.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD3 человека, конъюгированные с PerCP-Cy™ 5.5 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 560835.
- Моноклональные мышиные IgG_{2b} антитела к CD14 человека, конъюгированные с BD Horizon™ BV510 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 563079.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD33 человека, конъюгированные с BD Horizon™ BV786 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 740974.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD11c человека, конъюгированные с R-phycoerythrin (PE) флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 555392.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD11b человека, конъюгированные с PE-Cy™ 7 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 557743.
- Моноклональные мышиные IgG_{2a} антитела к HLA-DR человека, конъюгированные с APC-H7 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 561358.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD80 человека, конъюгированные с BD Horizon™ BB515 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 565008.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD86 человека, конъюгированные с BD Horizon™ BUV395 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 747525.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD83 человека, конъюгированные с BD Horizon™ BV421 флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 562630.
- Моноклональные мышиные IgG₁ антитела к CD274 человека, конъюгированные с Allophycocyanin (APC) флуорохромом, BD Biosciences, кат. № 563741.

3.5. Наборы магнитных частиц и детектирующих антител для мультиплексного анализа

- Набор магнитных частиц и антител для детекции TNF-α Bio-Plex Pro™ Human Chemokine TNF-α Set, Bio-Rad, кат. № 171BK55MR2.
- Набор магнитных частиц и антител для детекции IFN-α2 Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1 IFN-α2 Set, Bio-Rad, кат. № 171BL007M.
- Набор магнитных частиц и антител для детекции IFN-γ Bio-Plex Pro™ Human Chemokine IFN-γ Set, Bio-Rad, кат. № 171BK25MR2.
- Набор магнитных частиц и антител для детекции IL-10 Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1 IL-10 Set, Bio-Rad, кат. № 171BL013M.
- Набор магнитных частиц и антител для детекции IL-12 (p40) Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1 IL-12 (p40) Set, Bio-Rad, кат. № 171BL015M.

- Набор магнитных частиц и антител для детекции IL-12 (p70) Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1 IL-12 (p70) Set, Bio-Rad, кат. № 171BL016M.
- Набор магнитных частиц и антител для детекции IL-6 (p70) Bio-Plex Pro™ Human Chemokine IL-6 Set, Bio-Rad, кат. № 171BK29MR2.

3.6. Векторы и плазмиды

- pQE80HSPA1B;
- pET11d-Recoverin.

3.7. Олигонуклеотиды

В работе были использованы следующие олигонуклеотиды (Таблица 7). Синтез олигонуклеотидов осуществлялся в компании Евроген.

Таблица 7. Олигонуклеотиды, использованные в работе.

Название	Нуклеотидная последовательность
SAG1-F	5'-TTAGTTTGGGAGATAGAGTAAGAT
SAG1-R	5'-AAAACCAACAATAAATAAACTACT
H1E1-dir	5'-TATAGTCGACGCCCTGTCCAAGGAGATCCTGG
H1E1-rev	5'-ATACTCGAGTTACAGCTCCTCCAGGATCTCCT
H1E2-dir	5'-TATAGTCGACACACTGGCCAATAAGGAAATTC
H1E2-rev	5'-ATACTCGAGTTACAGTCGCAGAATTTCCCTTAT
H1PolyE-dir	5'-TATAGTCGACTCCCTCTACGACGTGGACGGTAACGGG
H1PolyE-rev	5'-ATACTCGAGTTAGAGAAGCTTCACGTCCTCAGGGGTGATC
H2E1-dir	5'-TATGGATCCTACGTCATCGCCCTGCACATGACCACCGCGGG
H2E1-rev	5'-ATAAGATCTCTGGTTGGTCTTGCCCGCGGTGGTCATGTGCA
H2E2-dir	5'-TATGGATCCGAGTACGTCATCGCCCTGCACATGACCACCGC
H2E2-rev	5'-ATAAGATCTGTGTTGGTCTTGCCCGCGGTGGTCATGTGCAGGG
H2PolyE-dir	5'-TATGGATCCACCCTGGACTTCAAGGAGTACGTC
H2PolyE-rev	5'-ATAAGATCTCTGGTTGGTCTTGCCCGCGGT
Q-dir	5'-CGGATAACAATTTACACAG
Q-rev	5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG
HSPA1Bscreen1	5'-GGTCCCAAGGGAGGGTC
HSPA1Bscreen2	5'-AGGTGGTGCCAGGTC

3.8. Штаммы прокариот

- Штамм *E. coli* JM109, Invitrogen.

3.9. Цитокины

- GM-CSF, человеческий рекомбинантный, Miltenyi Biotec, кат. № 130-093-865.
- IL-4, человеческий рекомбинантный, Miltenyi Biotec, кат. № 130-093-922.
- TNF- α , человеческий рекомбинантный, Miltenyi Biotec, кат. № 130-094-023.
- IFN- γ 1b, человеческий рекомбинантный, Miltenyi Biotec, кат. № 130-096-484.
- CD40-Ligand, человеческий рекомбинантный, Miltenyi Biotec, кат. № 130-096-712.
- Простагландин E₂ (ПГЕ₂), Sigma, кат. № P0409.

4. Составы буферов и сред

4.1. Общие буферы

- PBS: 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.3, 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl.

4.2. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)

- ТГД (Трис-глицин-ДСН) буфер: 25 mM Трис, pH 8.3 (HCl), 192 mM глицин, 0.1% ДСН.
- 2 x буфер для нанесения образцов: 125 mM Трис, pH 6.8 (HCl), 20% глицерин, 4% ДСН, 0.004% бромфеноловый синий, 10% 2-меркаптоэтанол.
- Разделяющий гель: 375 mM Трис, pH 8.8 (HCl), 12% акриламид, 0.1% ДСН, 0.06% персульфат аммония, 1 мкл/мл ТМЭДА.
- Концентрирующий гель: 125 mM Трис, pH 6.8 (HCl), 4.5% акриламид, 0.1% ДСН, 0.06% персульфат аммония, 1 мкл/мл ТМЭДА.

4.3. Вестерн-блоттинг

- Буфер для переноса: 25 mM Трис, pH 8.3 (HCl), 192 mM глицин, 20% метанол.
- TBS (Tris-buffered saline): 20 mM Трис, pH 7.6 (HCl), 150 mM NaCl.
- TBST (TBS + Tween 20): 20 mM Трис, pH 7.6 (HCl), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20.
- Блокирующий буфер: 20 mM Трис, pH 7.6 (HCl), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 3% БСА.

4.4. Электрофорез в агарозном геле

- ТБЭ (Трис-борат-ЭДТА) буфер: 50 mM Трис, pH 8.3 (HCl), 50 mM борная кислота, 1 mM ЭДТА, 0.5 мг/мл этидий бромид.
- Агарозный гель: 1.5% агароза в ТБЭ буфере.

4.5. Работа с *E. coli*

- LB: 1% пептон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, pH 7.5 (NaOH).
- SOB: 2% пептон, 0.5% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, pH 7.0 (NaOH).
Добавлен MgCl_2 до 10 mM после автоклавирования.
- TB: 10 mM PIPES, pH 6.7 (KOH), 15 mM CaCl_2 , 250 mM KCl, 55 mM MnCl_2 .
- Буфер для экстракции: в PBS добавлены 0.4 M NaCl, 1 mM ЭДТА, 1% Tween 20, pH 7.8.

4.6. Металл-хелатная аффинная хроматография

- Уравновешивающий буфер: в PBS добавлены 0.4 M NaCl, 5 mM имидазол.
- Отмывочный буфер: в PBS добавлены 0.4 M NaCl, 5 mM имидазол, 0.1% Triton X-114).
- Элюирующий буфер: в PBS добавлены 0.4 M NaCl, 0.25 M имидазол.

4.7. Культивация клеток периферической крови

- Полная культуральная среда (ПКС) для клеток периферической крови: RPMI-1640 с 2 mM L-глутамином, 1.5% аутологичная сыворотка крови.

4.8. Проточная цитометрия

- FACS (fluorescence-activated cell sorting) буфер: DPBS без кальция и магния (Pan Biotech) с 0.02% азидом натрия и 0.5% БСА.

5. Анализ экспрессии аррестина-1 в тканях

Выявление наличия и выраженности экспрессии аррестина-1 в образцах тканей производилось с помощью ИГХ на базе клиники урологии Сеченовского Университета. Срезы собранных образцов тканей депарафинизировались и инкубировались с мышиными антителами к аррестину-1 в концентрации 30 мкг/мл. Визуализация производилась с помощью вторичных козьих антител к мышиным иммуноглобулинам, конъюгированных с пероксидазой хрена, и хромогенного субстрата пероксидазы. После расщепления субстрата аррестин-1-положительные клетки визуализировались в виде коричневого окрашивания цитоплазмы. Подсчет количества «окрашенных» клеток использовался для анализа выраженности экспрессии аррестина-1 в образцах и для выявления аррестин-1-отрицательных или аррестин-1-положительных образцов. Статус аррестин-1-отрицательного или аррестин-1-положительного образец получал если при подсчете определялось <10% или >10% аррестин-1-положительных клеток от общего числа клеток на микроскопическое поле зрения, соответственно. Процент аррестин-1-экспрессирующих клеток подсчитывался как среднее значение после подсчета клеток в 10 разных микроскопических полях зрения каждого образца.

6. Анализ сыворотки крови пациентов на наличие аутоантител к аррестину-1

Анализ сыворотки крови пациентов на наличие аутоантител к аррестину-1 производился с помощью метода вестерн блоттинг. Для этого, сначала производился электрофорез рекомбинантного аррестина-1 в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли [271]. Использовался ПААГ с 12%-ой концентрацией акриламида (см. пункт 4.2). Рекомбинантный аррестин-1 наносился на гель в количестве 2 мкг на дорожку. Перед нанесением соответствующий объем пробы белка смешивался с двукратным буфером для нанесения образцов (см. пункт 4.2) и инкубировался 5 мин при 98°C. Электрофорез осуществлялся в ТГД буфере (см. пункт 4.2) при комнатной температуре и силе тока 15-20 А.

Перенос рекомбинантного аррестина-1 из ПААГ осуществлялся на ПВДФ (поливинилиденфторида) мембрану из набора Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit (Bio-Rad) методом полусухого переноса с использованием прибора Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) по инструкции от производителя. Перед переносом ПВДФ мембрана активировалась инкубацией в этаноле в течение 1 мин и преинкубировалась с фильтровальной бумагой из набора Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit (Bio-Rad) в буфере для

переноса (см. пункт 4.3) в течение 5 мин. Перенос осуществлялся с использованием стандартной программы Low MW.

После переноса мембрана инкубировалась в блокирующем буфере (см. пункт 4.3) 2 ч при комнатной температуре на настольном шейкере. После блокирования мембрана нарезалась на полоски, соответствующие дорожкам ПААГ. Далее полоски мембраны инкубировались с сыворотками пациентов с ПКК или почечной онкоцитомой в разведении 1:20 в TBST буфере (см. пункт 4.3) в течение 2 ч при комнатной температуре на настольном шейкере. Инкубация полосок мембраны с моноклональными мышинными антителами к аррестину-1 в разведении 1:1000 в блокирующем буфере или с сывороткой крови пациентов с уrolитиазом в разведении 1:20 в TBST буфере в течение 2 ч при комнатной температуре на настольном шейкере производилась для положительного и отрицательного контролей, соответственно. После инкубации полосок мембраны с сыворотками крови или первичными антителами полоски отмывали в TBST буфере три раза по 10 мин на настольном шейкере. Далее полоски мембраны инкубировались со вторичными козьими антителами к человеческим иммуноглобулинам, или козьими антителами к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1:1000 в блокирующем буфере в течение 1 ч при комнатной температуре на настольном шейкере, с последующей трехкратной отмывкой в TBST буфере по 10 мин на настольном шейкере.

Визуализация иммунореактивных полосок на мембране производилась с помощью детекции хемилюминесценции субстрата пероксидазы из набора Clarity™ Western ECL (Bio-Rad) в соответствии с инструкцией от производителя. Детекция производилась с помощью прибора ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad). Полученные изображения обрабатывались с помощью программного обеспечения Image Lab™ 6.0.1 (Bio-Rad).

Образцы сывороток крови классифицировались как «положительные» на наличие аутоантител к аррестину-1 в случае формирования на мембране, инкубированной в соответствующей сыворотке крови, иммунореактивных полос, соответствующих молекулярной массе в сравнении с полосой из положительного контроля.

7. Бисульфитное секвенирование образцов ДНК

Геномная ДНК из образцов пациентов была денатурирована в 0.3 М NaOH при 65°C в течение 15 мин. Далее образцы инкубировались с 2 М бисульфитом натрия и 0.5 М гидрохиноном при 55°C в течение 4 ч. Далее, модифицированная ДНК была очищена с помощью набора Wizard DNA Clean-up System (Promega) в соответствии с инструкциями от производителя. Ампликоны для анализа размером 441 п.о. были получены при помощи ПЦР с праймерами SAG1-F и SAG1-R (см. пункт 3.7). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл состояла из 2.5 мкл 10 х ПЦР буфера (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 20-50 нг

бисульфит-преобразованной ДНК и 1 Ед. термофильной ДНК-полимеразы. Реакционная смесь нагревалась до 96°C на 6 мин с последующими 34 циклами ПЦР в следующем режиме: 95°C 40 с, 55°C 30 с, 72°C 40с. Финальная элонгация производилась при 72°C в течение 7 мин. Продукты ПЦР секвенировались с помощью системы ABI Prism 3500 Genetic Analyzer (Thermo Scientific) и входящих в набор реагентов и расходных материалов в соответствии с инструкциями от производителя.

8. Конструирование и продукция рекомбинантных слитых белков и пептидов

8.1. Конструирование плазмидных конструкций, кодирующих слитые белки

8.1.1. Подбор HLA-специфичных эпитопов реоверина

Подбор HLA I- и HLA II-специфичных эпитопов реоверина осуществлялся с помощью онлайн инструментов и баз данных по прогнозированию и анализу иммунных эпитопов (<http://tools.iedb.org>, <http://www.syfpeithi.de>). Для анализа использовалась аминокислотная последовательность реоверина человека (NCBI reference sequence: NP_002894.1), кодируемая геном *RCVRN* (NCBI gen ID: 5957). Эпитопы реоверина подбирались по специфичности к следующим типам человеческих лейкоцитарных антигенов (human leukocyte antigen, HLA): HLA-A*02, HLA-DRB1*11, HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*03. Подобранные эпитопы представлены в Таблице 8. Помимо четырех эпитопов (H1E1, H1E2, H2E1, H2E2), были подобраны полипептидные последовательности, перекрывающие несколько HLA I и HLA II эпитопов. Такие последовательности были обозначены как «полиэпитопы» (H1PolyEp, H2PolyEp).

Таблица 8. Подобранные HLA I- и HLA II-специфичные эпитопы реоверина человека.

Обозначение	HLA специфичность	Порядок аминокислот в реоверине	Аминокислотная последовательность (FASTA)	Кодирующая нуклеотидная последовательность
H1E1	HLA-A*02:01	8-17	ALSKEILEEL	gcc ctg tcc aag gag atc ctg gag gag ctg
H1E2		176-185	TLANKEILRL	aca ctg gcc aat aag gaa att ctg cga ctg
H1Polyep	Включает эпитопы: HLA-A*02:01; HLA-DRB1*11:01	107-141	SLYDVDGNGTISKNEVLE IVMAIFKMITPEDVKLL	tcc ctc tac gac gtg gac ggt aac ggg acc atc agc aag aat gaa gtg ctg gag atc gtc atg gct att ttc aaa atg atc acc cct gag gac gtg aag ctt ctc
H2E1	HLA-DQA1*05:01/ HLA-DQB1*03:01	86-100	YVIALHMTTAGKTNQ	tac gtc atc gcc ctg cac atg acc acc gcg ggc aag acc aac cag
H2E2		85-99	EYVIALHMTTAGKTN	gag tac gtc atc gcc ctg cac atg acc acc gcg ggc aag acc aac
H2Polyep	Включает эпитопы: HLA-DQA1*05:01/ HLA-DQB1*03:01; HLA-DRB1*11:01	80-100	TLDFKEYVIALHMTTAG KTNQ	acc ctg gac ttc aag gag tac gtc atc gcc ctg cac atg acc acc gcg ggc aag acc aac cag

8.1.2. Синтез кДНК эпитопов рековерина

Синтез кДНК эпитопов и полиэпитопов рековерина осуществлялся с помощью ПЦР. В случае эпитопов, амплификация кодирующих их кДНК производилась с помощью двух взаимноперекрывающихся праймеров для каждого эпитопа: H1E1-dir и H1E1-rev, H1E2-dir и H1E2-rev, H2E1-dir и H2E1-rev, H2E2-dir и H2E2-rev (см. пункт 3.7, таблица 7). В случае полиэпитопов, для амплификации в качестве матрицы использовалась плазида pET11d-Recoverin, кодирующая кДНК рековерина. Для H1Polyер использовались праймеры H1PolyE-dir и H1PolyE-rev, для H2Polyер - H2PolyE-dir и H2PolyE-rev (см. пункт 3.7, таблица 7). Праймеры для амплификации кДНК эпитопов кодировали в т.ч. сайты рестрикции BamHI и BglII в случае кДНК HLA II эпитопов и сайты рестрикции SalI и XhoI и стоп кодон в случае кДНК HLA I эпитопов. Амплификация производилась с использованием Phusion ДНК полимеразы (Thermo scientific, кат. № F530S) по рекомендации от производителя.

8.1.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Анализ фрагментов кДНК, кодирующих эпитопы рековерина производился с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле (см. пункт 4.4). Гели и ТБЭ буфер содержали 1 мкг/мл бромистого этидия. Образцы наносились на гель в растворе, содержащем 0.001% бромфенолового синего и 5% глицерина.

8.1.4. Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов кДНК, кодирующих эпитопы рековерина производилось с использованием QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, кат. № 28704) в соответствии с инструкцией от производителя.

8.1.5. Обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции. Лигирование

Рестрикция выделенных фрагментов кДНК, кодирующих эпитопы рековерина, и плазмиды pQE80HSPA1B, кодирующей HSPA1B (HSP70 человека), производилась с помощью эндонуклеаз рестрикции от Fermentas (Thermo scientific). Фрагменты кДНК, кодирующие HLA II-специфичные эпитопы рековерина, рестриктировались ферментами BamHI и BglII. Фрагменты кДНК, кодирующие HLA I-специфичные эпитопы рековерина, рестриктировались ферментами SalI и XhoI. Лигирование производилось в смеси, содержащей линейаризованную плазмиду pQE80HSPA1B (50-100 нг), встраиваемый фрагмент кДНК (100 нг), 10-кратный лигазный буфер и 5 Ед T4 ДНК-лигазы (Thermo scientific, кат. № EL0011). Реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Вставка полученных фрагментов кДНК эпитопов в плазмиду pQE80HSPA1B производилась в два этапа. Сначала плазида pQE80HSPA1B рестриктировалась по сайту SalI и линейаризованная плазида использовалась для лигирования с одним из фрагментов кДНК, кодирующих HLA I-специфичный эпитоп рековерина. Далее

производилась трансфекция клеток *E. coli* полученной лигазной смесью, селекция, наработка и выделение полученной плазмиды (см. пункты 8.1.6, 8.1.7, 8.1.8 ниже). Выделенная плазида с подтвержденной вставкой в правильном направлении рестриктировалась по сайту BamHI и линейаризованная плазида использовалась для лигирования с одним из фрагментов кДНК, кодирующих HLA II-специфичный эпитоп рековерина.

8.1.6. Трансфекция плазмидных конструкций в компетентные клетки *E. coli*

Компетентные клетки *E.coli* штамма XL1-Blue или JM109 готовились следующим образом. Клетки с чашки Петри (среда LB, 2% агар) засеивались в 250 мл среды SOB, наращивались до OD600=0.6. Далее, клеточная суспензия инкубировалась 10 минут на льду, центрифугировалась 10 минут при 4°C, 4000 gcf и клеточный осадок ресуспендировался в 80 мл холодного буфера ТВ. Ресуспендированные клетки еще раз центрифугировались в тех же условиях с последующим ресуспендированием клеточного осадка в 20 мл холодного буфера ТВ. К суспензии добавляли ДМСО до 7% и инкубировали 10 минут при 0°C. Полученные суспензии аликвотировались и замораживались в жидком азоте. Аликвоты хранились при -80°C.

Трансфекция плазмидных конструкций производилась следующим образом. К 100 мкл компетентных клеток *E.coli* XL1-Blue добавлялась лигазная смесь (~100 нг). Клеточная суспензия инкубировалась при 0°C в течение 30 минут. После инкубации производился тепловой шок путем короткого 30-секундного нагревания суспензии до 42°C. После этого суспензия переносилась в лед на 2 минуты и добавлялось 2 мл среды LB. Далее пробирки с суспензией инкубировались в течение 1 часа на орбитальном термостатируемом шейкере при 250 об/мин, 37°C. Селекция трансформированных клеток производилась на чашках Петри (среда LB, 2% агар) в присутствии антибиотика ампициллина.

8.1.7. Подтверждение наличия и правильного направления вставок кДНК эпитопов

Скрининг колоний и подтверждение наличия вставок кДНК, кодирующих HLA I- и HLA II-специфичные эпитопы рековерина, производилось с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовались собранные с чашки Петри единичные колонии трансформированных *E.coli* XL1-Blue. В случае скрининга вставки, кодирующей HLA I-специфичный эпитоп/полиэпитоп, для амплификации использовались праймеры HSPA1Bscreen1 или один из dir праймеров для амплификации кДНК HLA I-специфичных эпитопов/полиэпитопа и Q-rev (см. пункт 3.7, таблица 7). В случае скрининга вставки, кодирующей HLA II-специфичный эпитоп/полиэпитоп, для амплификации использовались праймеры Q-dir и HSPA1Bscreen2 или один из rev праймеров для амплификации кДНК HLA II-специфичных эпитопов/полиэпитопа (см. пункт 3.7, таблица 7). Нуклеотидная последовательность и отсутствие мутаций подтверждались секвенированием.

Для размножения подходящих клонов *E.coli* XL1-Blue соответствующие колонии с чашек

Петри пересеивались в пробирки со средой LB и инкубировались в течение ночи на орбитальном термостатируемом шейкере при 250 об/мин, 37°C.

8.1.8. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмид осуществлялось с помощью наборов Евроген Plasmid Miniprep или QIAGEN Plasmid Mini Kit в соответствии с инструкциями от производителей.

8.2. Нарботка и выделение рекомбинантных слитых белков

8.2.1. Трансфекция плазмидных конструкций в штамм *E. coli* JM109

Для получения штаммов-продуцентов рекомбинантных слитых белков, полученные плазмиды (по 150 нг) трансфецировались в компетентные клетки *E. coli* штамма JM109 (см. пункт 8.1.6). Селекция трансформированных клеток производилась на чашках Петри (среда LB, 2% агар) в присутствии антибиотика ампициллина. На следующий день после посева клеток на селекционную среду, отдельные колонии с чашки Петри пересеивались в 2 мл среды SOB и инкубировались на орбитальном термостатируемом шейкере при 250 об/мин, 37°C до OD600=0.6. Далее к суспензии добавляли глицерин до 8%, и полученная аликвота замораживались в жидком азоте. Аликвоты штаммов-продуцентов хранились при -80°C.

8.2.2. Культивирование штаммов-продуцентов и индукция экспрессии рекомбинантного белка

Ночную культуру штамма-продуцента *E. coli* JM109 переносили в колбу со средой LB и ампициллином (100 мг/мл). Колбу с суспензией инкубировали на орбитальном термостатируемом шейкере при 250 об/мин, 37°C до OD600~0.6-0.8. Для индукции экспрессии в колбу добавляли ИПТГ до 1 мМ и инкубировали на орбитальном термостатируемом шейкере при 250 об/мин, 37°C, примерно 3 часа, до OD600~2.3-2.5. Далее клеточная суспензия остужалась до 4°C и центрифугировалась 10 минут при 4°C, 8000 gcf. Клеточные осадки замораживались и хранились при -30°C.

8.2.3. Выделение и очистка рекомбинантных слитых белков

Выделение и очистка рекомбинантных слитых белков из клеточных осадков штаммов-продуцентов *E. coli* JM109 производилась с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для экстракции (см. пункт 4.5). Суспензия гомогенизировалась с помощью ультразвука в течение 2 мин, импульс 5 сек через 5 сек, амплитуда 20%, на льду с помощью ультразвукового процессора (Cole-Parmer) и центрифугировалась 15 минут при 4°C, 14000 gcf. Супернатант, представляющий растворимую фракцию общего клеточного белка замораживался и хранился при -30°C или сразу наносился на колонку, нагруженную Ni²⁺-активированной иминодиацетат-сефарозой (GE Healthcare) и промытую уравнивающим буфером в количестве (см. пункт 4.6) 5-10 объемов колонки.

Далее колонка отмывалась в течение ~12-14 часов 300-500 мл отмывочного буфера, содержащего 0.1% Triton X-114 (см. пункт 4.6). После отмывочного буфера колонка промывалась уравнивающим буфером до изолинии на считывающем устройстве, подключенном к спектрофотометру. Содержащую рекомбинантный белок фракцию элюировали с помощью буфера, содержащего 0.25 М имидазол (см. пункт 4.6) в стерильную апиrogenную пробирку под контролем спектрофотометра. Полученные элюаты диализовали против 400 объемов стерильного PBS в течение 48 часов при 4°C.

8.2.4. Анализ экспрессии и проверка чистоты препаратов рекомбинантных слитых белков

Анализ экспрессии рекомбинантных белков в штаммах-продуцентах, а так же анализ чистоты препаратов выделенных рекомбинантных белков производился в ПААГ по методу Лэммли [271]. Использовался ПААГ с концентрацией акриламида 12%. Перед нанесением на гель в пробы добавляли двукратный буфер для нанесения образцов (см. пункт 4.2) и до нанесения на гель инкубировали при 98°C в течение 5 минут.

8.2.5. Проверка препаратов рекомбинантных белков на присутствие эндотоксинов

Тестирование препаратов рекомбинантных слитых белков на наличие эндотоксинов производилось с помощью LAL тест картриджей (Charles River Laboratories, кат. № PTS20) и прибора The Endosafe-PTS Portable Test System (Charles River Laboratories) по инструкции от производителя. Для проведения тестов использовалась апиrogenная вода, наконечники для пипеток и лабораторная посуда.

8.3. Синтез пептидов рековерина

Пептиды, аминокислотные последовательности которых соответствовали подобранным эпитопам рековерина (Таблица 8), были синтезированы искусственно.

9. Культивация иммунных клеток периферической крови

9.1. Подбор доноров крови

Для сбора периферической крови были отобраны пять здоровых (без новообразований, прогрессирующих заболеваний, или хронических заболеваний в острой фазе) лиц, согласных и готовых (с получением информированного согласия на использование биоматериала в исследовательских целях) предоставить свою кровь для HLA типирования и для дальнейшей сдачи крови, в случае соответствия критериям. HLA типирование проводилось с помощью секвенирования участков генома (SBT – sequence-based typing), кодирующих HLA типов A, B, C, DRB1, DQA1 и DQB1. Критерием отбора доноров являлось наличие требуемых HLA аллелей: HLA-A*02, HLA-DRB1*11, HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*03.

9.2. Сбор крови

Сбор крови осуществлялся с использованием стандартного оборудования для сбора

периферической венозной крови. Сбор крови для HLA типирования осуществлялся в вакуумные пробирки S-Monovette® 7.5ml EDTA (Sarstedt). Сбор крови для выделения мононуклеарных клеток осуществлялся в вакуумные пробирки S-Monovette® 7.5ml LH (Sarstedt).

9.3. Выделение мононуклеарных клеток и сыворотки периферической крови

Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови осуществлялось методом градиентного центрифугирования. В пробирке аккуратным пипетированием смешивались собранная периферическая кровь и DPBS в соотношении 1:1. Полученная смесь медленно аккуратно наслаивалась на разделяющий раствор Biocoll (Merck) в пропорции Biocoll к смеси крови с DPBS от 1:1 до 1:2, соответственно. Пробирки с полученным наслоением центрифугировались в бакет (bucket) роторе 20 минут, при комнатной температуре, 1200 gcf, без торможения. После центрифугирования интерфаза, состоящая из мононуклеарных клеток, аккуратно собиралась в отдельную пробирку. При необходимости получить сыворотку крови донора, в ту же пробирку к собранной интерфазе собирался супернатант до начала слоя разделяющего раствора. Далее пробирка с собранными мононуклеарными клетками с/без сыворотки крови центрифугировалась 10 минут, при комнатной температуре, 300 gcf. После центрифугирования супернатант, представляющий собой сыворотку крови, переносился в отдельную пробирку, если требуется. Клеточный осадок дважды отмывался путем ресуспендирования в 50 мл DPBS и последующего центрифугирования в течение 10 минут, при комнатной температуре, 300 gcf при первой отмывке и 200 gcf при второй отмывке. После отмывки клеточный осадок ресуспендировался в полной культуральной среде (RPMI-1640 с добавлением 1.5% аутологичной сыворотки крови) и подсчитывалось количество клеток. Полученные мононуклеарные клетки периферической крови сразу использовались для индукции дифференцировки моноцитов или замораживались для хранения в жидком азоте. Для заморозки к клеточной суспензии добавлялась аутологичная сыворотка до 20% и ДМСО до 10%. Полученная смесь аликвотировалась в криопробирки по 1 мл, в концентрации $\sim 10 \times 10^6$ клеток/мл. Криопробирки помещались в криоконтейнер CoolCell LX (Biocision) и инкубировались в течение суток при -80°C . Далее по необходимости криопробирки помещались в криохранилище с жидким азотом.

Пробирка с полученной аутологичной сывороткой крови центрифугировалась 20 минут, при комнатной температуре, 1200 gcf. После центрифугирования супернатант переносился в отдельную пробирку и инактивировался инкубацией при 56°C в течение 35 минут. После инактивации сыворотка центрифугировалась 20 минут, при комнатной температуре, 1200 gcf. Супернатант, представляющий собой инактивированную аутологичную сыворотку крови, аликвотировался в 15 мл пробирки, замораживался и хранился при -20°C .

9.4. Индукция дифференцировки моноцитов в дендритные клетки, инкубация дендритных клеток со слитым белком и индукция активации и созревания

В ходе представленной работы была отработана методика по получению незрелых дендритных клеток из моноцитов периферической крови, а также индукции их созревания (Рисунок 3). Мононуклеарные клетки периферической крови высевались на 6-луночный культуральный пластиковый планшет в количестве 10×10^6 клеток в 3 мл полной культуральной среды (RPMI-1640 с добавлением 1.5% аутологичной сыворотки крови) на лунку и инкубировались 1.5 часа для адгезии моноцитов при 37°C, 5% CO₂. После инкубации прикрепившиеся к пластику моноциты отмывались от не прикрепившихся и слабо прикрепившихся клеток средой RPMI-1640 без сыворотки под микроскопическим контролем (Рисунок 4, «День 0»). К оставшимся прикрепленным клеткам – моноцитам – добавлялась полная культуральная среда с 1000 Ед/мл IL-4 и 1000 Ед/мл GM-CSF для индукции дифференцировки в незрелые дендритные клетки в течение пяти дней, 37°C, 5% CO₂ (Рисунок 3). На пятый день инкубации незрелые дендритные клетки собирались с 6-луночного планшета (Рисунок 4, «День 5»), подсчитывались, высевались на 24-луночный планшет в количестве 2×10^5 клеток в 1 мл полной культуральной среды на лунку и в соответствующие лунки добавлялось или 0.4 мкМ одного из слитых рекомбинантных белков, или 0.4 мкМ рекомбинантного HSPA1B, или по 0.4 мкМ пептидов, соответствующих эпитопам реоверина слитого белка (Рисунок 3). Через 3 часа инкубации с рекомбинантными белками или пептидами к клеткам добавлялся 1 мл полной культуральной среды на лунку с коктейлем цитокинов для созревания до конечной концентрации 1000 Ед/мл IFN- γ b, 1000 Ед/мл TNF- α , 200 нг/мл CD40L, 2 мкг/мл PGE₂, 1000 Ед/мл IL-4, 1000 Ед/мл GM-CSF (Рисунок 3) и клетки инкубировались в течение 20-24 часов, 37°C, 5% CO₂. На шестой день после начала культивации (Рисунок 4, «День 6А», «День 6Б») клетки собирались с планшета и анализировались. Культуральная среда из каждой пробы клеток собиралась на шестой день в отдельные пробирки и замораживалась при -80°C для дальнейшего анализа секретированных дендритными клетками цитокинов.

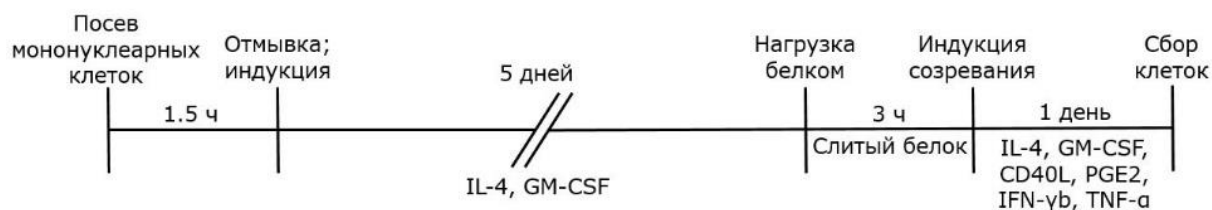


Рисунок 3. Схема получения зрелых дендритных клеток.

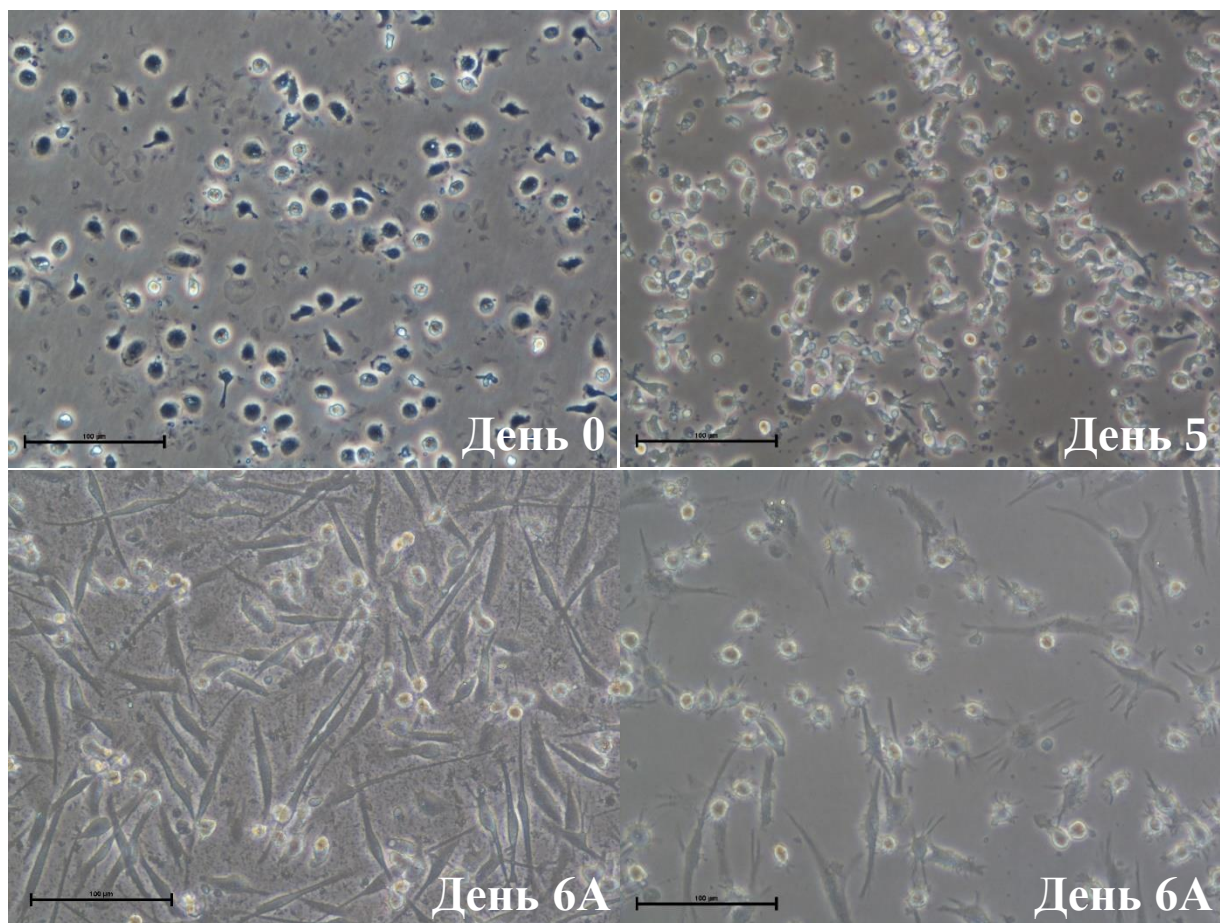
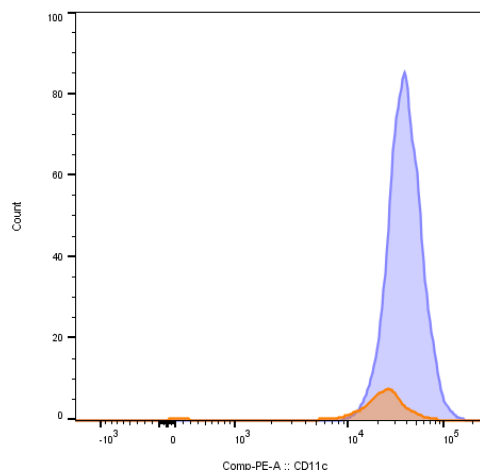


Рисунок 4. Микрофотографии дендритных клеток на разной стадии дифференцировки. Все клетки культивировались на среде RPMI1640 с добавлением 1.5% аутологичной сыворотки. «**День 0**» - моноциты после прикрепления к пластику; «**День 5**» - незрелые дендритные клетки после 5 дней инкубации моноцитов с 1000 Ед/мл IL-4 и 1000 Ед/мл GM-CSF; «**День 6А**» - зрелые дендритные клетки после 24 часов инкубации с 1000 Ед/мл IL-4, 1000 Ед/мл GM-CSF и 0.4 мкМ H2Polyер-HSPA1B- H1Polyер; «**День 6Б**» - зрелые дендритные клетки после 24 ч инкубации незрелых дендритных клеток с 1000 Ед/мл IL-4, 1000 Ед/мл GM-CSF, 200 нг/мл CD40L, 1 мкг/мл PGE2, 1000 Ед/мл IFN- γ b, 1000 Ед/мл TNF- α и 0.4 мкМ H2Polyер-HSPA1B- H1Polyер. Увеличение $\times 200$. Размерная шкала представляет 100 мкм.

10. Фенотипический анализ дендритных клеток проточной цитометрией

10.1. Анализ дендритных клеток

Контроль дифференцировки моноцитов в незрелые дендритные клетки и анализ активации и созревания дендритных клеток осуществлялся с помощью проточной цитометрии на пятый и шестой дни культивации, соответственно (Рисунок 3). Для анализа использовались меченные флуоресцентными метками антитела к человеческим CD45, CD3, CD14, CD33, CD11c, CD11b, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD274 (см. пункт 3.4). Незрелые дендритные клетки определялись как CD45⁺, CD14⁻, CD33⁺, CD11c⁺/CD11b⁺, HLA-DR^{low}, CD80^{low}, CD86^{low}, CD83^{low} (Рисунок 5). На шестой день (Рисунок 3) дендритные клетки анализировались на наличие и степень экспрессии маркеров активации и созревания HLA-DR, CD80, CD86 и CD83.



Образец	Популяция	Частота от общего количества, %	MFI
Моноциты без цитокинов, «День 5»	CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD14 ⁻ /CD33 ⁺ /CD11c ⁺	2.34	23,151
Моноциты с цитокинами, «День 5»	CD45 ⁺ /CD3 ⁻ /CD14 ⁻ /CD33 ⁺ /CD11c ⁺	22.1	37,892

Рисунок 5. Дифференцировка моноцитов в незрелые дендритные клетки по результатам проточной цитометрии. Оранжевым обозначены моноциты через 5 дней культивации без цитокинов. Бирюзовым обозначены моноциты, дифференцированные в незрелые дендритные клетки через 5 дней культивации с 1000 Ед/мл IL-4 и 1000 Ед/мл GM-CSF. MFI (median fluorescence intensity) – медианная интенсивность флуоресценции.

10.2. Подготовка образцов

Перед цитометрическим анализом интересующие образцы клеток собирались, центрифугировались 5 минут при комнатной температуре, 200 gcf и осадок ресуспендировался в требуемом объеме полной культуральной среды. Клеточная суспензия переносилась в 5 мл пробирки для проточной цитометрии по 100 мкл в пробирку. Для детекции внеклеточных маркеров к образцам добавлялись требуемые антитела, в соответствии с инструкциями от производителя (см. пункт 3.4), клеточные суспензии перемешивались на вортексе и инкубировались 15 минут в темноте при комнатной температуре. Далее к суспензиям добавлялось по 2 мл FACS буфера, суспензии перемешивались на вортексе и центрифугировались 5 минут при комнатной температуре, 500 gcf. Клеточный осадок ресуспендировался в 200-500 мкл FACS буфера и анализировался на проточном цитометре.

10.3. Анализ образцов

Анализ образцов производится на проточном цитометре BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) и с помощью программного обеспечения FACS Diva.

11. Мультиплексный анализ функциональной способности дендритных клеток

Функциональная способность полученных дендритных клеток секретировать провоспалительные и регуляторные цитокины анализировалась с помощью измерения концентрации цитокинов в культуральной среде, собранной на шестой день культивации (Рисунок 3). Измерение концентрации цитокинов в культуральной среде производилось с помощью мультиплексного анализа с использованием магнитных частиц, специфичных к TNF- α , IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-6, и соответствующих цитокин-специфичных детектирующих антител (см. пункт 3.5). Приготовление образцов для иммунодетекции

цитокинов осуществлялось с помощью набора Bio-Plex Pro™ Reagent Kit III with Flat Bottom Plate (Bio-Rad) по инструкции от производителя, с использованием Bio-Plex Pro™ Human Inflammation Panel 1, 37-Plex Standard, 1-pk (Bio-Rad) и Bio-Plex Pro™ Human Chemokines Standard (Bio-Rad) в качестве референсных контролей.

Анализ образцов производился на приборе Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad) с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.1.1.

12. Анализ данных

Статистическая обработка всех полученных данных производилась с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

12.1. Анализ выживаемости пациентов

Оценка общей выживаемости пациентов начиная с даты постановки диагноза ПМК и ее ассоциации с наличием экспрессии аррестина-1 в опухоли или наличием аутоантител к аррестину-1 рассчитывалась по методу Каплана-Майера с использованием log-rank теста Мантела-Кокса. Наблюдение за пациентами составляло 65 месяцев.

12.2. Сравнительный анализ экспрессии аррестина-1

Сравнительный количественный анализ выраженности экспрессии аррестина-1 в первичных опухолях и метастазах при ПМК представлен в виде гистограммы с доверительными интервалами и производился с помощью непарного t-теста Стьюдента.

12.3. Обработка данных проточной цитометрии

Обработка «сырых» данных проточной цитометрии производилась с помощью программного обеспечения FlowJo 10.6.2. Гейтинг стратегия (gating strategy) при обработке «сырых» данных проточной цитометрии отображена на Рисунке 6. Антиген-положительные популяции отделялись от антиген-отрицательных с помощью ФМО (флуоресценция минус один) контролей, использованных в панели антител (Таблица 9). При определении границы начала антиген-положительной популяции количество антиген-положительных событий в соответствующем ФМО контроле допускалось в пределе <1% от «родительской» популяции. Для определения уровня экспрессии интересующего антигена в выделенной популяции клеток использовалась медианная интенсивность флуоресценции (MFI – median fluorescence intensity) соответствующего конъюгированного с антителом флуорохрома, выраженная в безразмерных относительных единицах.

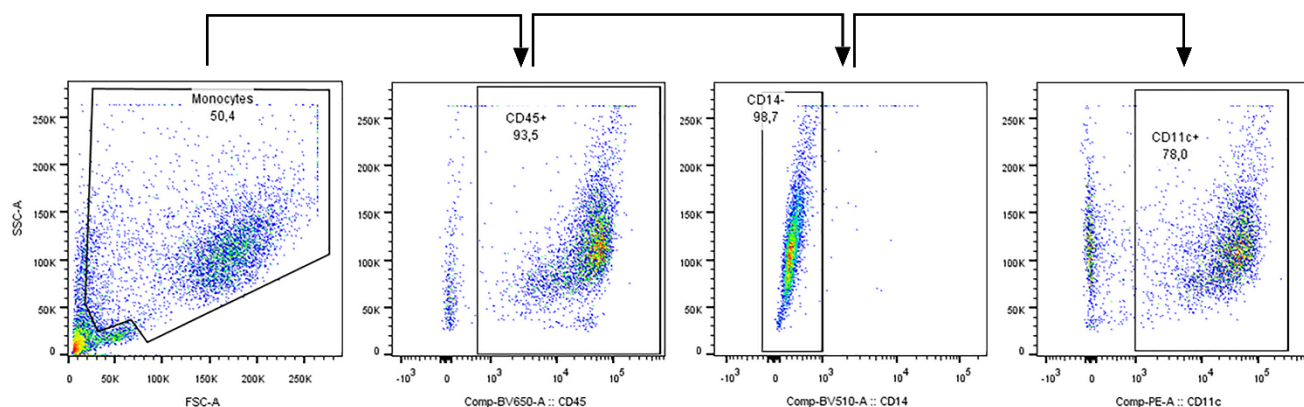


Рисунок 6. Гейтинг стратегия цитометрического анализа дендритных клеток. По оси ординат отложены величины бокового рассеивания пучка лазера, проходящего сквозь клетки (SSC, side scatter). По оси абсцисс отложены величины интенсивности флуоресценции конъюгированных с соответствующими антителами флуорохромов (BV650, BV510, PE), или величина прямого рассеивания пучка лазера, проходящего сквозь клетки (FSC, forward scatter).

Таблица 9. Панель антител для фенотипического анализа дендритных клеток.

Пробирка	BV650	PerCP Cy5.5	BV510	PE	PE-Cy7	APC-H7	BB515	BUV395	BV421	APC
Без антител	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ФМО 1	CD45	CD3	--	CD11c	CD11b	HLA-DR	CD80	CD86	CD83	CD274
ФМО 2	CD45	CD3	CD14	--	CD11b	HLA-DR	CD80	CD86	CD83	CD274
ФМО 3	CD45	CD3	CD14	CD11c	--	HLA-DR	CD80	CD86	CD83	CD274
ФМО 4	CD45	--	CD14	CD11c	CD11b	--	--	--	--	--
Образец	CD45	CD3	CD14	CD11c	CD11b	HLA-DR	CD80	CD86	CD83	CD274

В верхней строке указаны названия флуорохромов, конъюгированные с соответствующими антителами. Прочерком отмечено отсутствие антитела в соответствующей пробирке ФМО (флуоресценция минус один) или пробирке без антител.

12.4. Сравнительный анализ данных фенотипического и функционального анализа дендритных клеток

Сравнительный анализ количеств полученных маркер-положительных клеток и уровней экспрессии маркеров между образцами клеток представлен в виде гистограмм с доверительными интервалами и производился с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA (ANalysis Of VAriance)). Сравнительный анализ количества секретированных цитокинов различными образцами клеток производился с помощью метода one-way ANOVA или непарного t-теста Стьюдента.

Результаты работы

1. Аррестин-1 часто экспрессируется в первичной опухоли и метастазах при почечно-клеточной карциноме и почечной онкоцитоме

Для оценки наличия aberrантной экспрессии аррестина-1 в опухолевых клетках были проанализированы образцы ткани из первичных опухолей и метастазов пациентов с ПКК и почечной онкоцитомой. Иммуногистохимический анализ ткани здоровой почки (Рисунок 7 А) и сетчатки глаза (Рисунок 7 В) с использованием антител к аррестину-1 был использован в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно. Аррестин-1-экспрессирующие

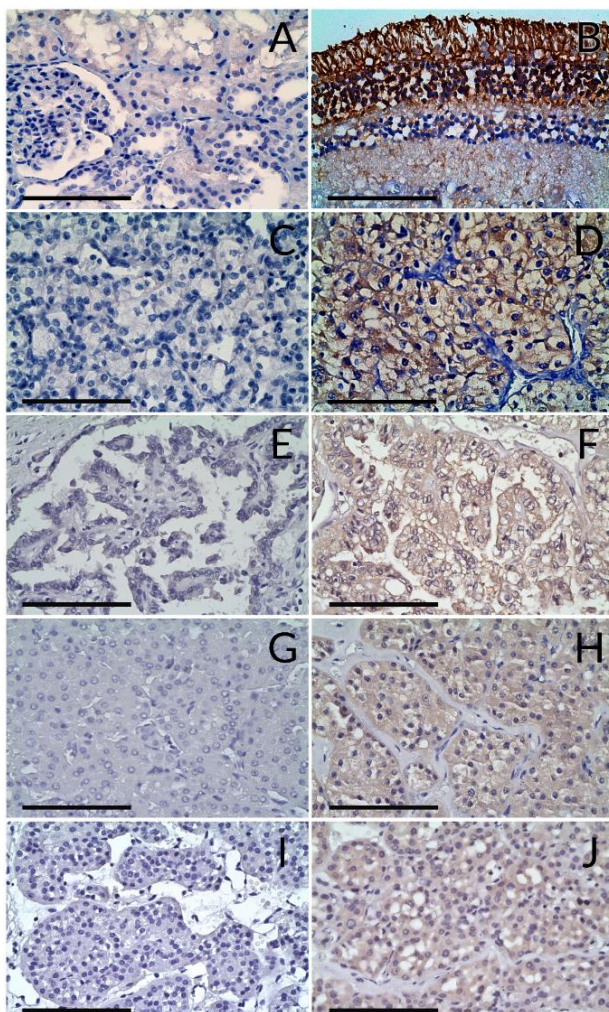


Рисунок 7. Репрезентативные микрофотографии, иллюстрирующие экспрессию аррестина-1 в первичных опухолях почек. Парафиновые срезы здоровой почки (А), сетчатки (В), опухолей при светлоклеточной ПКК (С/Д), папиллярной ПКК (Е/Ф), хромофобной ПКК (Г/Н) и почечной онкоцитоме (И/Ј) были окрашены с использованием кроличьих поликлональных аффинно-очищенных антител к аррестину-1, или мышиных моноклональных IgG1 антител к аррестину-1. Увеличение $\times 400$. Размерная шкала представляет 50 μm .

клетки в тканях детектировались в микропрепаратах с помощью антител к аррестину-1 и конъюгатов IgG с пероксидазой в виде коричневого окрашивания (Рисунок 7). Количество проанализированных с помощью ИГХ образцов первичной опухолевой ткани и метастазов при различных подтипах ПКК и почечной онкоцитоме отображено в Таблицах 10 и 11, соответственно.

Было продемонстрировано, что образцы одного и того же подтипа опухоли, полученные от разных пациентов, могут как содержать (Рисунок 7 Д, F, Н, Ј) так и не содержать (Рисунок 7 С, Е, G, І) кластеры аррестин-1-положительных клеток. Относительное количество пациентов с почечной онкоцитомой с наличием аррестин-1-положительных клеток в образцах первичной опухоли составило 90%. Относительное количество пациентов всех подтипов ПКК с наличием аррестин-1-положительных клеток в образцах первичной опухоли составило 58.7%. Относительное количество пациентов с наличием аррестин-1-положительных клеток в образцах первичных опухолей по каждому подтипу ПКК было следующим: 47% для светлоклеточной ПКК, 83.4% для хромофобной ПКК и 66.7% для папиллярной карциномы (Таблица 10).

Образцы ткани из метастатических сайтов были также собраны от всех шести пациентов с метастатической формой ПКК (Таблица 11). У пяти из этих пациентов гистологически определялась светлоклеточная ПКК как в первичных опухолях, так и в метастазах. У оставшегося пациента гистологически определялась хромофобная ПКК в первичной опухоли, но светлоклеточная и хромофобная в метастазах. Для каждого из этих шести пациентов анализ наличия экспрессии арестина-1 проводился как в первичной опухоли, так и в метастазах. Было продемонстрировано, что у четырех из пяти пациентов с метастатической формой светлоклеточной ПКК аррестин-1 экспрессировался и в первичной опухоли (Рисунок 8 Е), и в метастазах (Рисунок 8 F, G). У одного из пяти пациентов с метастатической формой светлоклеточной ПКК экспрессия аррестина-1 не была обнаружена ни в первичной опухоли, ни в метастазах (данные не показаны). Экспрессия аррестина-1 у оставшегося пациента с метастатической формой хромофобной ПКК была обнаружена и в первичной опухоли (Рисунок 8 В), и в метастазах (Рисунок 8 С, D). Сравнение уровня экспрессии аррестина-1 в первичных опухолях и в метастазах показало, что экспрессия аррестина-1 более выражена в метастазах (Рисунок 9).

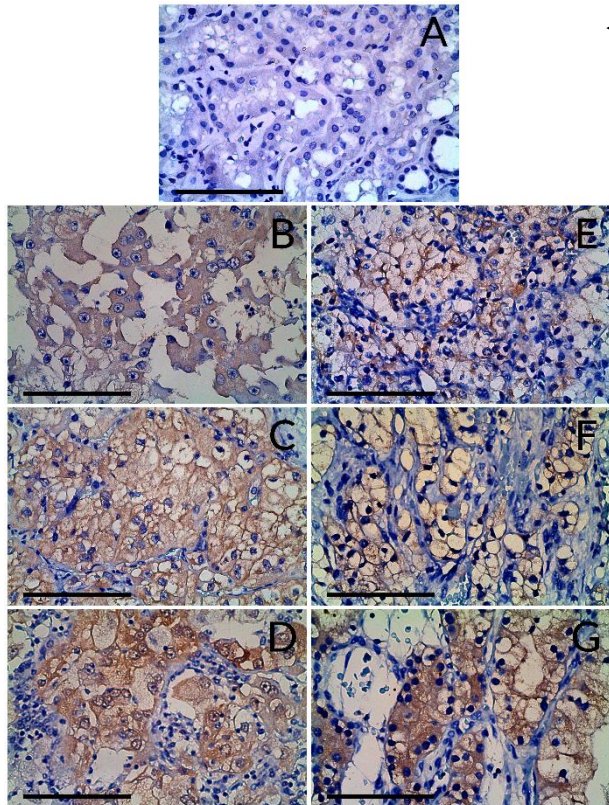
Анализ выживаемости пациентов с различными подтипами ПКК показал, что aberrantная экспрессия аррестина-1 в опухоли почки при ПКК ассоциируется со снижением пятилетней выживаемости пациентов до 70% (Рисунок 10).

Таблица 10. Частота aberrantной экспрессии аррестина-1 в злокачественных и доброкачественных опухолях почек.

	Почечно-клеточная карцинома								Почечная онкоцитома	
	Светлоклеточная		Хромофобная		Папиллярная		Всего			
	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%
Всего образцов	17	100	6	100	6	100	29	100	10	100
Аррестин-1-положительные	8	47	5	83.4	4	66.7	17	58.7	9	90
Аррестин-1-отрицательные	9	53	1	16.6	2	33.3	12	41.3	1	10

Таблица 11. Экспрессия аррестина-1 в метастазах при ПКК.

№	Подтип ПКК первичной опухоли	Экспрессии аррестина-1 в опухоли	Подтип ПКК метастазах	Экспрессия аррестина-1 в метастазах	Сайты метастазирования
1	Светлоклеточная ПКК	-	Светлоклеточная ПКК	-	Позвонок, череп
2	Светлоклеточная ПКК	+	Светлоклеточная ПКК	+	Позвонок, кость
3	Светлоклеточная ПКК	+	Светлоклеточная ПКК	+	Кожа, мозг
4	Светлоклеточная ПКК	+	Светлоклеточная ПКК	+	Мозг, лимфатический узел
5	Светлоклеточная ПКК	+	Светлоклеточная ПКК	+	Надпочечник
6	Хромофобная ПКК	+	Светлоклеточная + хромофобная ПКК	+	Легкое, лимфатический узел



← **Рисунок 8.** Репрезентативные микрофотографии, иллюстрирующие экспрессию аррестина-1 в метастазах. Парафиновые срезы здоровой почки (A), первичной опухоли (B) и метастазов из лимфатического узла (C) и легкого (D) при хромофобной ПКК, первичной опухоли (E) и метастазов из кожи (F) и мозга (G) при светлоклеточной ПКК были окрашены с использованием кроличьих поликлональных аффинно-очищенных антител к аррестину-1, или мышиных моноклональных IgG1 антител к аррестину-1. Увеличение $\times 400$. Размерная шкала

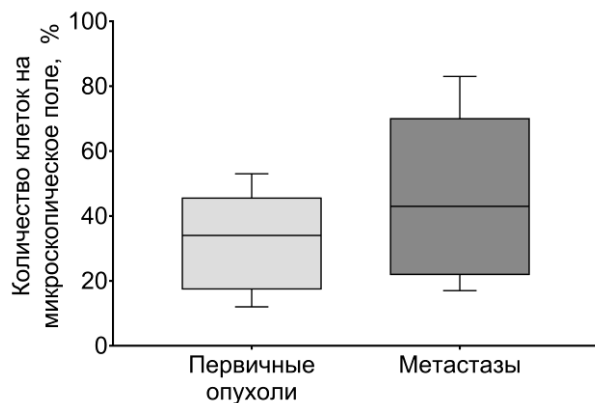
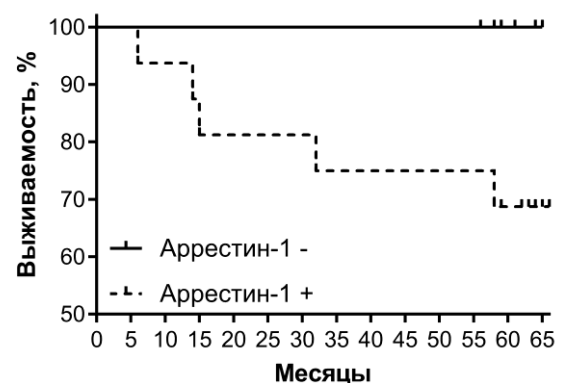


Рисунок 9. Количественный анализ экспрессии аррестина-1 в первичных опухолях и метастазах пациентов с ПКК. Уровень экспрессии рассчитывался как процент аррестин-1-экспрессирующих клеток на микроскопическое поле. Светло-серый столбец представляет фракцию аррестин-1-экспрессирующих клеток в первичных опухолях пациентов с метастатической ПКК. Темно-серый столбец представляет собой фракцию аррестин-1-экспрессирующих клеток в метастазах пациентов с метастатической ПКК.



Log-rank (Мантель-Кокс) тест	
Хи-квадрат	3.882
P-критерий	0.0488
P-значение заключение	значительно

Рисунок 10. Анализ выживаемости пациентов с ПКК с наличием и отсутствием экспрессии аррестина-1 в опухолях. Общая выживаемость представлена кривой Каплана-Майера и проанализирована с помощью log-rank теста.

2. Аберрантная экспрессия аррестина-1 не регулируется гипометилированием промотора его гена

Аррестин-1 (S-антиген) кодируется геном *SAG* (NCBI gene ID: 6295; HGNC gene ID: 10521). Промотор *SAG* не содержит CpG островков, что делает регуляцию гена с помощью метилирования маловероятной. Тем не менее, ранее было показано дифференциальное метилирование диссеминированных CpG пар в промоторах тканеспецифично-экспрессирующихся генов (например, промотор гена инсулина [272]). По аналогии был проанализирован статус метилирования диссеминированных CpG пар в промоторе *SAG*. Акцент был сделан на последовательности ДНК состоящей из 264 нуклеотидных пар между -1891 и -1627 нуклеотидами, т.к. паттерн метилирования этого участка демонстрировал вариации в различных тканях [273]. Интересующие CpG пары этого региона были условно обозначены как CpG-1, CpG-2, CpG-3, CpG-4, CpG-5 и CpG-6, начиная от центromеры.

Анализ статуса метилирования *SAG* был проведен с использованием образцов тотальной ДНК полученных из первичных опухолей 15 пациентов со светлоклеточной ПМК. Анализ образцов тотальной ДНК из лимфоцитов периферической крови здоровых доноров и двух аутопсийных образцов ткани почки без признаков малигнизации был проведен в качестве отрицательного контроля (Рисунок 11). В образцах из лимфоцитов периферической крови был обнаружен биаллельный паттерн метилирования для каждой из проанализированных CpG пар (Рисунок 11). В свою очередь, в образцах из здоровых почек обнаруживался моноаллельный паттерн метилирования для CpG-3 и CpG-6 пар и биаллельный паттерн метилирования для остальных CpG пар (Рисунок 11). Анализ образцов из первичных опухолей пациентов со светлоклеточной ПМК показал гетерогенный паттерн метилирования исследуемого локуса. В общем, паттерн метилирования анализируемого локуса из образцов первичных опухолей был схож с образцами нормальной почки: большинство образцов имели моноаллельный паттерн метилирования только для CpG-3 и CpG-6 пар (Таблица 12). В то же время, в трех образцах был обнаружен моноаллельный паттерн метилирования дополнительно для CpG-1, CpG-4 (Рисунок 11, «ПМК1») или CpG-5. Более того, в трех других образцах было обнаружено биаллельное деметилирование CpG-3 (Рисунок 11, «ПМК2») и CpG-6 пар. Так или иначе, ни одно из этих изменений в статусе метилирования промотора *SAG* в опухолевой ткани при светлоклеточной ПМК не коррелировало с экспрессией аррестина-1 (данные не отображены).

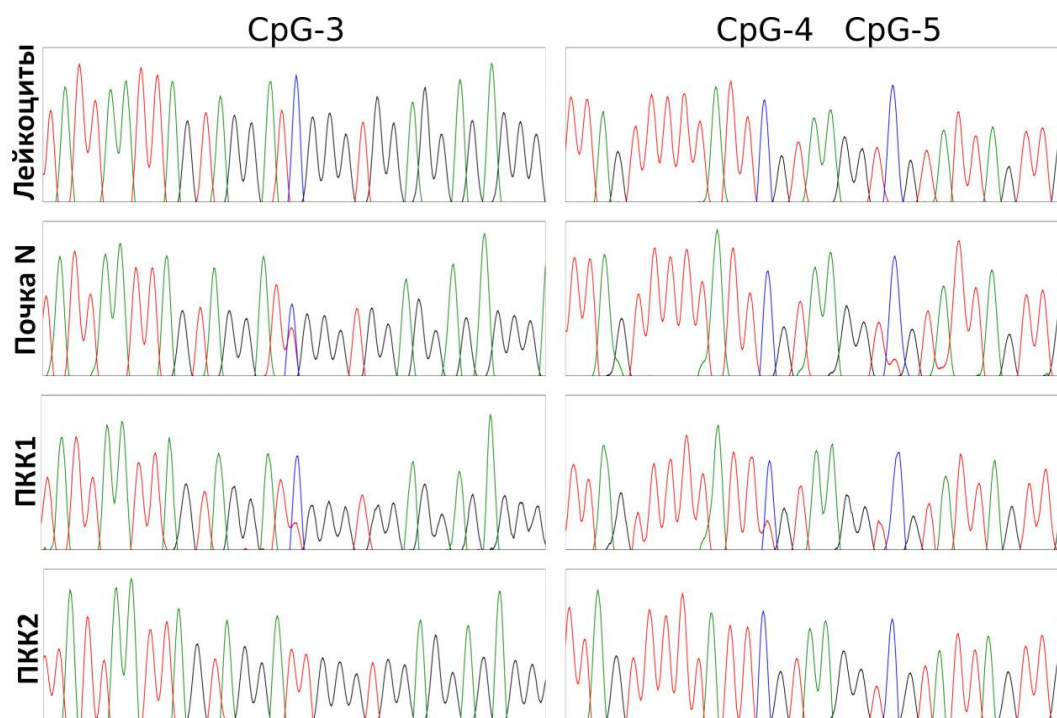


Рисунок 11. Статус метилирования CpG пар промотора SAG в клетках крови, ткани почки в норме и при светлоклеточной ПКК. Представлены репрезентативные результаты бисульфитного секвенирования CpG-3, CpG-4 и CpG-5 пар -1891/-1627 локуса SAG в периферических лейкоцитах, ткани нормальной почки («Почка N») и двух различных образцах ткани опухолей при светлоклеточной ПКК («ПКК1» и «ПКК2»).

Таблица 12. Паттерн метилирования CpG пар -1891/-1627 SAG локуса в клетках светлоклеточной ПКК.

	CpG-1	CpG-2	CpG-3	CpG-4	CpG-5	CpG-6
С/С паттерн	14	15	1	14	14	5
С/Т паттерн	1	0	12	1	1	9
Т/Т паттерн	0	0	2	0	0	1
Всего образцов	15					

3. Аутоантитела к аррестину-1 часто обнаруживаются у пациентов с почечно-клеточной карциномой

Для оценки возможности возникновения гуморального иммунного ответа на экспрессию аррестина-1 клетками опухоли при ПКК был проведен анализ наличия антител к аррестину-1 в сыворотке крови пациентов с ПКК. Для этого производилась иммунодетекция очищенного рекомбинантного аррестина-1 методом вестерн блоттинг с помощью 36 образцов сыворотки крови пациентов с ПКК и почечной онкоцитомой, а также с помощью образцов сыворотки крови от пациентов с неонкологическими уронефрологическими заболеваниями (например, уролитиаз) в качестве отрицательного контроля (Рисунок 12). Иммунодетекция рекомбинантного аррестина-1 с помощью поликлональных кроличьих антител к аррестину-1 использовалась в качестве положительного контроля.

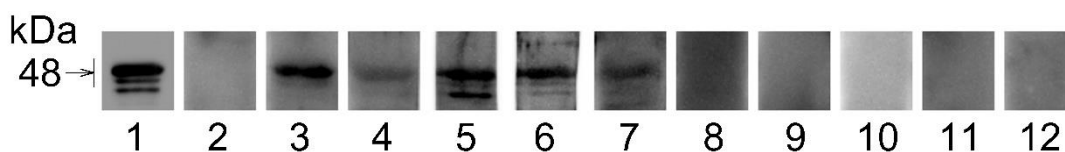


Рисунок 12. Репрезентативные фотографии иммунодетекции методом вестерн блоттинг рекомбинантного аррестина-1 (2 мкг на дорожку) с помощью сывороток крови пациентов с ПКК содержащих (3-7) и не содержащих (8-12) антитела к аррестину-1. Три независимых эксперимента были проведены для каждого образца сыворотки крови. Окрашивание рекомбинантного аррестина-1 (2 мкг на дорожку) с помощью кроличьих поликлональных антител к аррестину-1 (1) и сыворотки крови пациентов с уролитиазом (2) использовалось в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно.

В случае использования контрольных образцов сыворотки крови пациентов с уролитиазом окрашивание аррестина-1 не детектировалось, что демонстрирует отсутствие антител к аррестину-1 в этих образцах (Рисунок 12). В то же время окрашивание аррестина-1 детектировалось в 75% случаев при использовании образцов сыворотки крови пациентов с ПКК (Рисунок 12, таблица 13). Интересно, что у пациентов с почечной онкоцитомой наличие аутоантител к аррестину-1 в сыворотке крови выявлялось в 100% случаев (Таблица 13).

Анализ выживаемости пациентов с различными типами ПКК показал, что, несмотря на тренд на снижение, наличие антител к аррестину-1 не ассоциируется со снижением общей выживаемости при ПКК (Рисунок 13).

Таблица 13. Встречаемость аутоантител к аррестину-1 у пациентов с ПКК и почечной онкоцитомой.

	Почечно-клеточная карцинома								Почечная онкоцитома	
	Светлоклеточная		Хромофобная		Папиллярная		Всего			
	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%
Всего	24	100	4	100	5	100	33	100	3	100
Наличие антител	18	75	3	75	4	80	25	75.7	3	100
Отсутствие антител	6	25	1	25	1	20	8	24.3	0	0

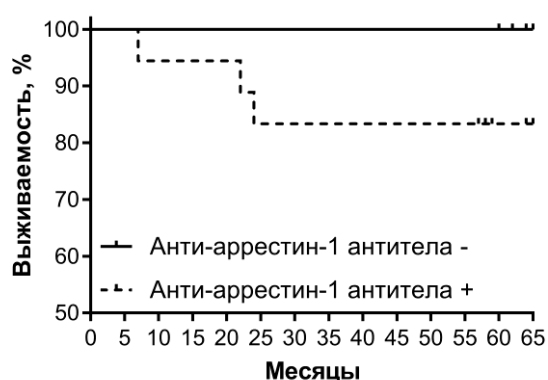
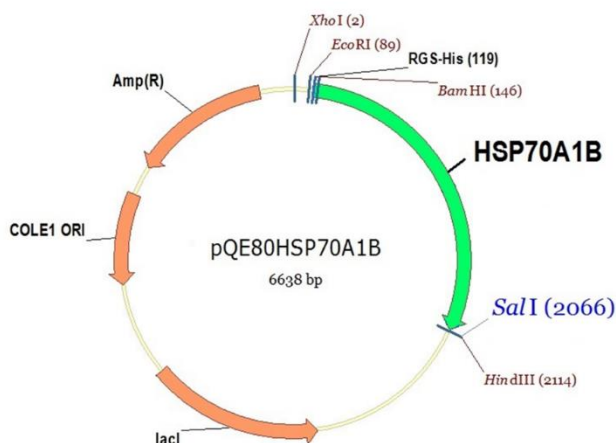


Рисунок 13. Анализ выживаемости пациентов с ПКК с наличием или отсутствием антител к аррестину-1. Общая выживаемость представлена кривой Каплана-Майера и проанализирована с помощью log-rank теста.

Log-rank (Мантель-Кокс) тест	
Хи-квадрат	1.238
P-критерий	0.2659
P-значение заключение	незначительно

4. Сконструированы рекомбинантные слитые белки на основе HSPA1B и эпитопов рековерина в качестве прототипа противоопухолевой вакцины

В качестве прототипов противоопухолевой вакцины были сконструированы рекомбинантные слитые белки, состоящие из HSPA1B (HSP70 человека) и HLA-специфичных эпитопов рековерина человека. Ранее было показано, что используемые в качестве иммуногенов слитые белки на основе белков теплового шока проявляют большую иммуногенность, если HLA II-специфичные эпитопы антигена располагаются на N-конце, а HLA I-специфичные эпитопы на C-конце белка теплового шока [21]. Полученные в данной работе слитые белки конструировались согласно этому феномену. Конструирование плазмид, кодирующих слитые белки, осуществлялось на основе имеющегося в коллекции лаборатории молекулярной биологии и биохимии плазмидного вектора системы pQE80 (Qiagen, USA) со встроенной кДНК гена *HSPA1B* (NCBI gen ID: 3304), кодирующего HSPA1B (Рисунок 14). Кодирующие девять слитых белков кДНК конструировались по одной схеме, согласно которой каждый закодированный



← **Рисунок 14.** Схема плазмидного вектора pQE80HSPA1B. Синими штрихами обозначены сайты рестрикции. RGS-6xHis tag – Arg-Gly-Ser-6xHis tag сайт. Amp(R) – сайт, кодирующий устойчивость к ампициллину. COLE1 ORI – ColE1 ориджин репликации. lacI – лактозный репрессор. Цифры в скобках указывают первый нуклеотид сайта.

слитый белок состоял из подобранных HLA II- и HLA I-специфичных эпитопов рековерина человека (Таблица 8), присоединенных к N- и C-концам HSPA1B, соответственно, через двуаминокислотные остатки от сайтов рестрикции, а также двух меток – RGS и 6xHis-tag (Рисунок 15). В итоге были получены 9 разных плазмидных векторов, кодирующих соответственно различные варианты слитых белков, представляющих собой все возможные комбинации подобранных HLA I и HLA II эпитопов рековерина в одном слитом белке:

1. H2E1-HSPA1B-H1E1;
2. H2E1-HSPA1B-H1E2;
3. H2E1-HSPA1B-H1Polyep;
4. H2E2-HSPA1B-H1E1;
5. H2E2-HSPA1B-H1E2;
6. H2E2-HSPA1B-H1Polyep;

7. H2Polyep-HSPA1B-H1E1;
8. H2Polyep-HSPA1B-H1E2;
9. H2Polyep-HSPA1B-H1Polyep.

Нуклеотидные последовательности встроенных кДНК эпитопов были подтверждены секвенированием по Сенгеру.



Рисунок 15. Схема слитой кДНК, кодирующей H2E1-HSPA1B-H1E1. RS - остаточная пара аминокислот аргинин и серин после лигирования по сайтам рестрикции BamHI и BglII. Остальные слитые белки были сконструированы по этой же схеме.

С помощью полученных плазмид - экспрессионных векторов, а также с помощью плазмиды pQE80HSPA1B была подготовлена коллекция из 10 бактериальных штаммов *E. coli* JM109, продуцентов рекомбинантных белков. Нарботка биомассы и продукция рекомбинантных белков производилась по стандартной методике с индукцией биосинтеза изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (Рисунок 16), с дальнейшим выделением и очисткой рекомбинантных белков из растворимой фракции методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Апирогенность белковых препаратов достигалась путем отмывки остаточных бактериальных

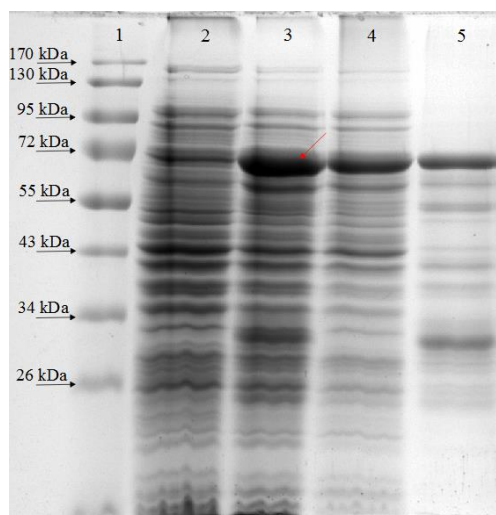


Рисунок 16. Индукция биосинтеза рекомбинантного слитого белка H2E1-HSPA1B-H1E1 в штамме *E. coli* JM109. (1) маркер молекулярной массы, (2) лизат *E. coli* JM109 до индукции, (3) лизат *E. coli* JM109 через 3 часа после индукции IPTG, (4) растворимая фракция общего клеточного белка, (5) нерастворимая фракция общего клеточного белка.

липополисахаридов (ЛПС) буфером, содержащим Triton X-114, так называемую «ловушку» для ЛПС. Тестирование препаратов рекомбинантных слитых белков на наличие эндотоксинов производилось с помощью LAL теста, который показал высокую степень апирогенности выделенных белковых препаратов – содержание эндотоксинов практически во всех препаратах слитых белков не превышало 10 ЭЕ/мг (Таблица 14). Остаточные количества ЛПС в препаратах могут не приниматься в расчет, т.к. было показано, что эндотоксины в количестве <10 ЭЕ/мг в препаратах HSPA1B не оказывают какой-либо эффект на иммуногенность моноцитов и дендритных клеток, полученных из моноцитов [183]. Таким образом, было наработано 10 рекомбинантных белков, основной центральной частью которых является HSPA1B, у девяти из которых к N- и C-концам HSPA1B присоединены

аминокислотные последовательности, являющиеся HLA II- и HLA I-специфичными эпитопами рековерина человека, соответственно.

Таблица 14. Содержание эндотоксинов в выделенных и очищенных препаратах рекомбинантных слитых белков.

№	Обозначение слитого белка	Содержание эндотоксинов, ЭЕ/мл	Содержание эндотоксинов, ЭЕ/мг
1	HSPA1B	<0.5 ЭЕ/мл	<1.27 ЭЕ/мг
2	H2E1-HSPA1B-H1E1	<0.5 ЭЕ/мл	<4.8 ЭЕ/мг
3	H2E1-HSPA1B-H1E2	<0.5 ЭЕ/мл	5.55 ЭЕ/мг
4	H2E1-HSPA1B-H1Polyep	5.19 ЭЕ/мл	24.8 ЭЕ/мг
5	H2E2-HSPA1B-H1E1	<0.5 ЭЕ/мл	<3.03 ЭЕ/мг
6	H2E2-HSPA1B-H1E2	<1.09 ЭЕ/мл	<5.53 ЭЕ/мг
7	H2E2-HSPA1B-H1Polyep	0.647 ЭЕ/мл	8.08 ЭЕ/мг
8	H2Polyep-HSPA1B-H1E1	<0.5 ЭЕ/мл	<2.8 ЭЕ/мг
9	H2Polyep-HSPA1B-H1E2	1.14 ЭЕ/мл	4.01 ЭЕ/мг
10	H2Polyep-HSPA1B-H1Polyep	0.577 ЭЕ/мл	5.54 ЭЕ/мг

5. Слитый белок, состоящий из HSPA1B и эпитопов рековерина, индуцирует активацию и созревание дендритных клеток

Для проверки иммуногенности рекомбинантного слитого белка, полученные на пятый день культивации незрелые дендритные клетки инкубировались с 0.4 мкМ H2Polyep-HSPA1B-H1Polyep. Через 3 часа после добавления слитого белка, в соответствующие лунки планшета добавлялся коктейль цитокинов для созревания дендритных клеток (IFN- γ b, TNF- α , CD40L, PGE₂) и клетки инкубировались в течение 20-24 часов. Таким образом, от каждого донора было подготовлено по 4 пробы клеток:

- Дендритные клетки + IL-4, GM-CSF;
- Дендритные клетки + IL-4, GM-CSF + H2Polyep-HSPA1B-H1Polyep;
- Дендритные клетки + IL-4, GM-CSF + CD40L, PGE₂, IFN- γ b, TNF- α ;
- Дендритные клетки + IL-4, GM-CSF + H2Polyep-HSPA1B-H1Polyep + CD40L, PGE₂, IFN- γ b, TNF- α .

В качестве контролей вместо слитого белка добавлялись рекомбинантный HSPA1B или синтетические пептиды, соответствующие аминокислотной последовательности эпитопов рековерина, входящих в состав слитого белка, в концентрации по 0.4 мкМ.

Морфология незрелых и зрелых дендритных клеток оценивалась под микроскопом на пятый и шестой дни культивации, соответственно. На пятый день культивации незрелые дендритные клетки представляли собой крупные открепившиеся от пластика клетки, правильной округлой формы (Рисунок 4, «День 5»). На шестой день после начала культивации дендритные клетки, проинкубированные с рекомбинантным белком, представляли собой крупные прикрепленные к пластику клетки веретенообразной формы (Рисунок 4, «День 6А»). Дендритные

клетки культивировавшиеся с коктейлем цитокинов для созревания, независимо от инкубации с рекомбинантным белком, на шестой день после начала культивации представляли собой крупные клетки типичной для зрелых дендритных клеток формы, в суспензии или прикрепленные к поверхности пластика, со множеством цитоплазматических выростов – дендритов (Рисунок 4, «День 6Б»).

Фенотипически дендритные клетки определялись с помощью проточной цитометрии как $CD45^+$, $CD14^-$, $CD11c^+$ популяция (Рисунок 6). Влияние инкубации со слитым белком и/или коктейля цитокинов на созревание и активацию дендритных клеток определялось по наличию и выраженности экспрессии различных поверхностных маркеров дендритных клеток, демонстрирующих статус их зрелости ($CD83$), иммуногенность ($HLA-DR$, $CD80$, $CD86$) и толерогенность ($CD274/PD-L1$) (Рисунки 17, 18, 19, 20). Сравнительный анализ четырех образцов дендритных клеток от каждого донора показал, что слитый белок H2Polyер-HSPA1B-H1Polyер способен индуцировать активацию и созревание дендритных клеток (Рисунки 21, 22, 23). Количество $CD80^+$ и $CD86^+$ дендритных клеток при инкубации со слитым белком значительно возрастало и этот эффект сравним с действием на дендритные клетки коктейля цитокинов для созревания (Рисунки 17, 18, 21 (А, Б)).

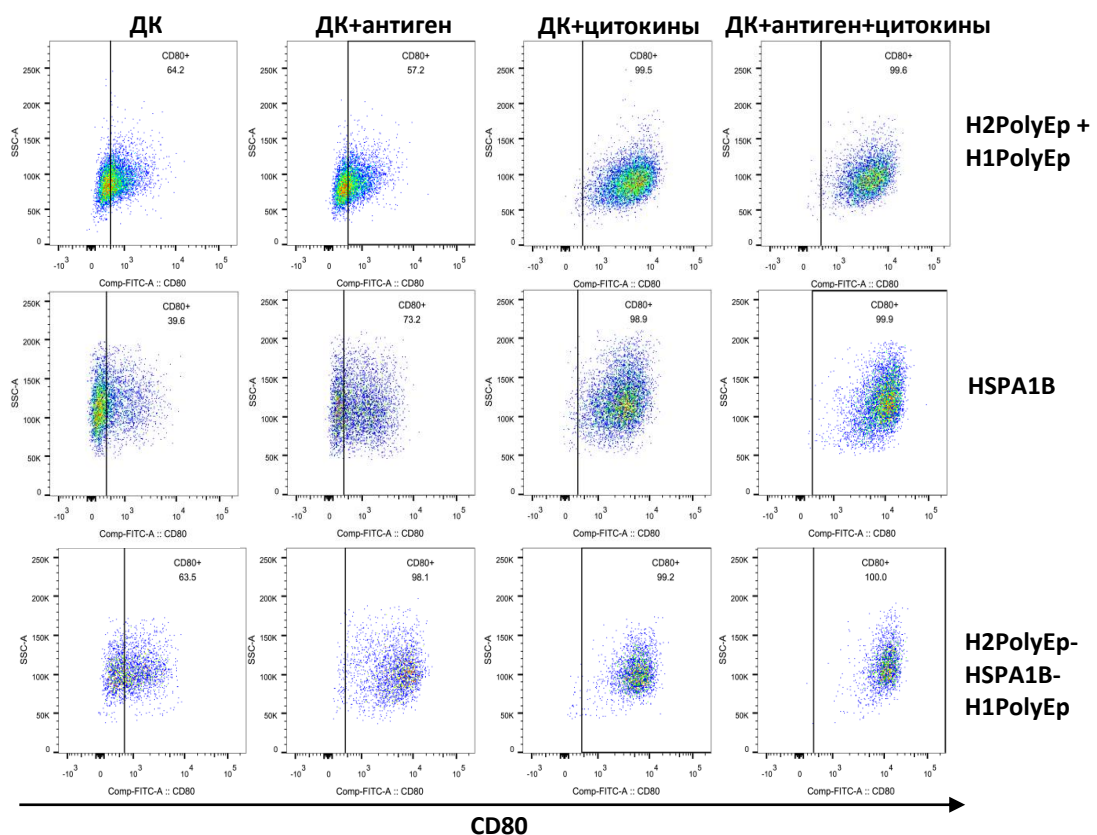


Рисунок 17. Популяции $CD80^+$ дендритных клеток из различных образцов на примере одного донора. По оси ординат отложена величина бокового рассеивания пучка лазера, проходящего сквозь клетки (SSC, side scatter). По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции BB515 (детекция в канале FITC), конъюгированного с антителами к $CD80$.

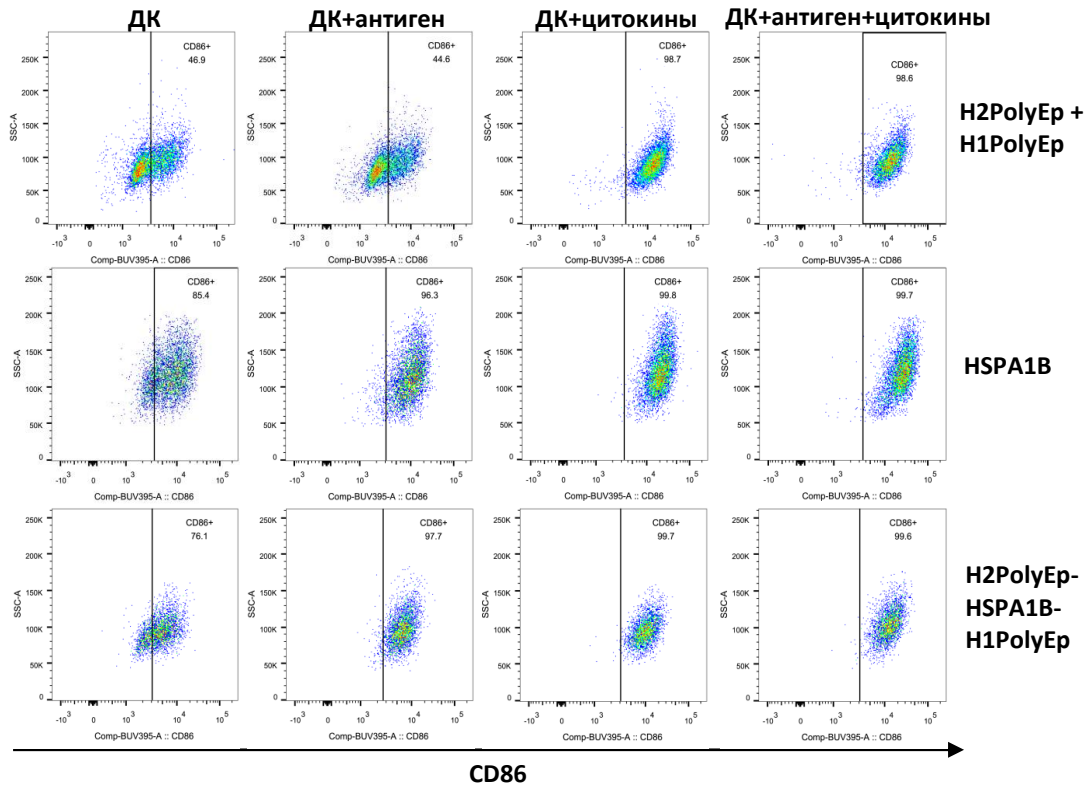


Рисунок 18. Популяции $CD86^+$ дендритных клеток из различных образцов на примере одного донора. По оси ординат отложена величина бокового рассеивания пучка лазера, проходящего сквозь клетки (SSC, side scatter). По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции BUV395, конъюгированного с антителами к CD86.

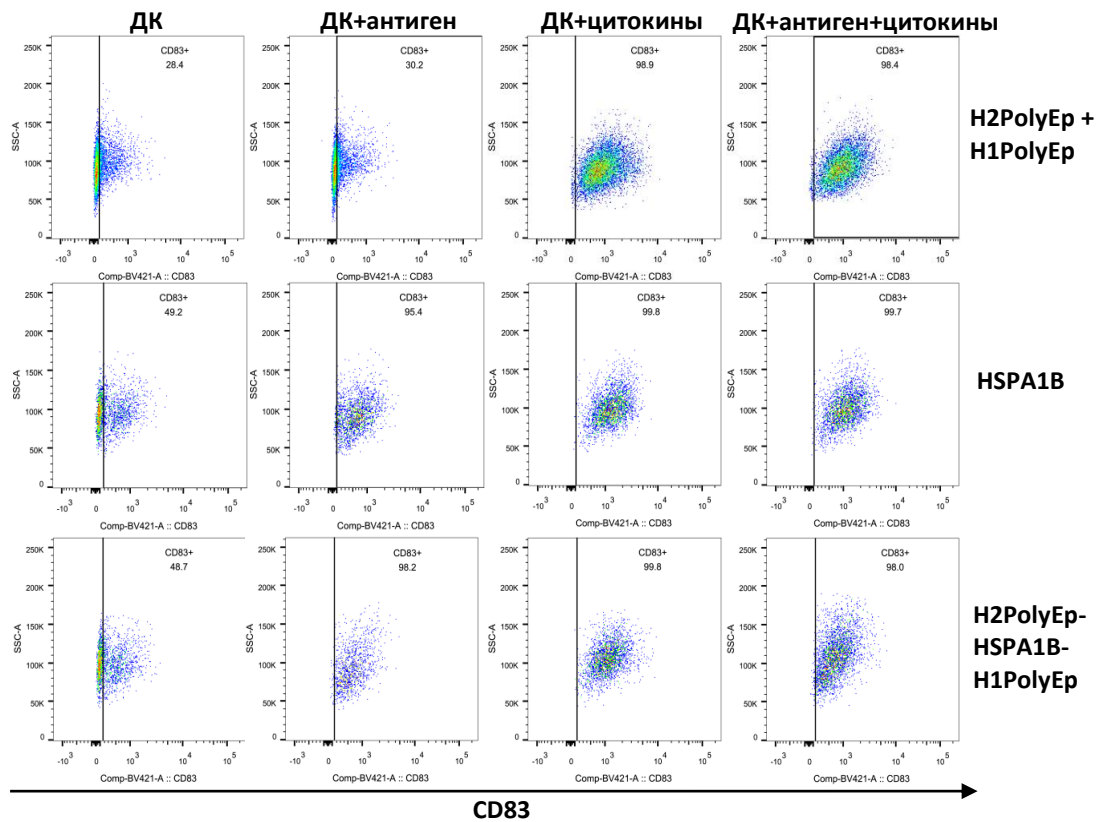


Рисунок 19. Популяции $CD83^+$ дендритных клеток из различных образцов на примере одного донора. По оси ординат отложена величина бокового рассеивания пучка лазера, проходящего сквозь клетки (SSC, side scatter). По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции BV421, конъюгированного с антителами к CD83.

Слитый белок так же приводил к значительному усилению экспрессии CD80 и CD86 на поверхности дендритных клеток (Рисунки 20 (А, Б), 22 (А, Б)). Более того, наблюдался накопительный эффект, выражающийся в более высоком уровне экспрессии CD80 и CD86, если к проинкубированным со слитым белком клеткам добавлялся коктейль цитокинов для созревания. Схожие, но несколько менее выраженные эффекты наблюдались, если дендритные клетки инкубировались с белком HSPA1B, не содержащим полиэпитопов реоверина (Рисунки 17, 18, 20 (А, Б), 21 (А, Б), 22 (А, Б)). Инкубация же дендритных клеток отдельно с пептидами, соответствующими полиэпитопам реоверина, но без HSPA1B, не приводила к активации дендритных клеток, тогда как одновременно наблюдалось значительное увеличение количества активированных дендритных клеток и усиление экспрессии CD80 и CD86 при добавлении коктейля цитокинов для созревания, независимо от присутствия полиэпитопов (Рисунки 17, 18, 20 (А, Б), 21 (А, Б), 22 (А, Б)).

При анализе экспрессии CD83 – маркера зрелости дендритных клеток – было показано, что уровень его экспрессии остается относительно постоянным независимо от инкубации дендритных клеток с отдельными полиэпитопами, HSPA1B или слитым белком, а также остается малозависимым от присутствия коктейля цитокинов (Рисунки 20 В, 22 В). Тем не менее, значительно увеличивается количество CD83-экспрессирующих дендритных клеток при их инкубации со слитым белком, сравнимое с теми же количествами в присутствии цитокинов (Рисунок 19, 21 В). Схожая, но не значительная тенденция наблюдается при инкубации дендритных клеток с HSPA1B, тогда как инкубация дендритных клеток с отдельными соответствующими полиэпитопами реоверина, но без HSPA1B, не приводила к увеличению количества CD83-экспрессирующих клеток, в отличие от соответствующих образцов, где присутствовал коктейль цитокинов (Рисунки 19, 21 В, 23).

Клетки всех образцов постоянно экспрессировали HLA-DR, что является нормой для дендритных клеток (Рисунки 21 Г, 23). С добавлением слитого белка или коктейля цитокинов для созревания увеличивался уровень экспрессии HLA-DR (Рисунки 22 Г, 23). Тем не менее, эта тенденция была статистически незначима (Рисунок 23).

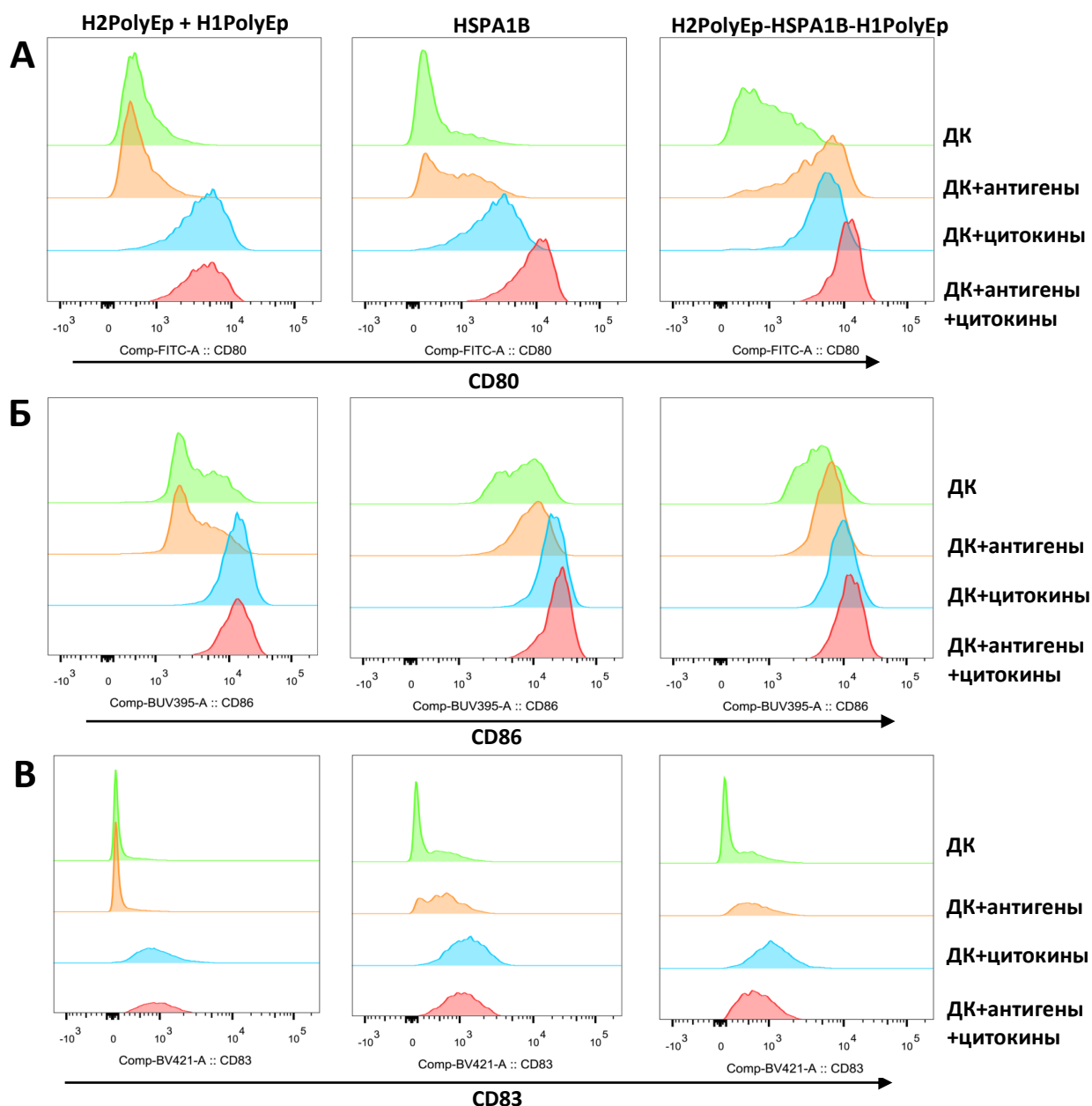


Рисунок 20. Репрезентативные данные сравнительного анализа выраженности экспрессии маркеров активации и созревания ДК на примере образцов от одного донора. По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции флуорохромов, конъюгированных с антителами к соответствующим антигенам: **(А)** CD80, **(Б)** CD86, **(В)** CD83. Представлены контрольный образец ДК (зеленый), проинкубированные с антигеном ДК (по столбцам: H2PolyEp и H1PolyEp пептидами, рекомбинантным HSPA1B, или H2PolyEp-HSPA1B-H1PolyEp) (оранжевый), инкубированные с коктейлем цитокинов для созревания ДК (голубой) и одновременно проинкубированные с антигеном и с коктейлем цитокинов для созревания (красный).

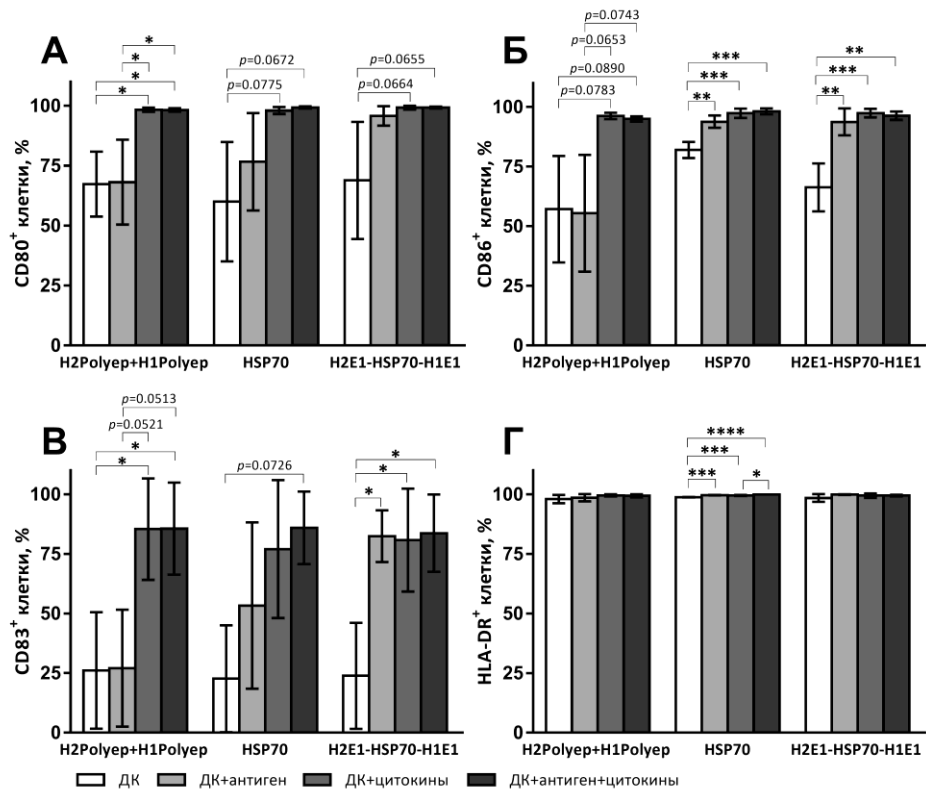


Рисунок 21. Количественный фенотипический анализ дендритных клеток (ДК). На фигуре представлен анализ CD80⁺ (А), CD86⁺ (Б), CD83⁺ (В) и HLA-DR⁺ (Г) популяций ДК. Данные представляют собой средние значения относительных количеств клеток от родительской популяции ± доверительный интервал от трех независимых экспериментов с участием трех разных доноров. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

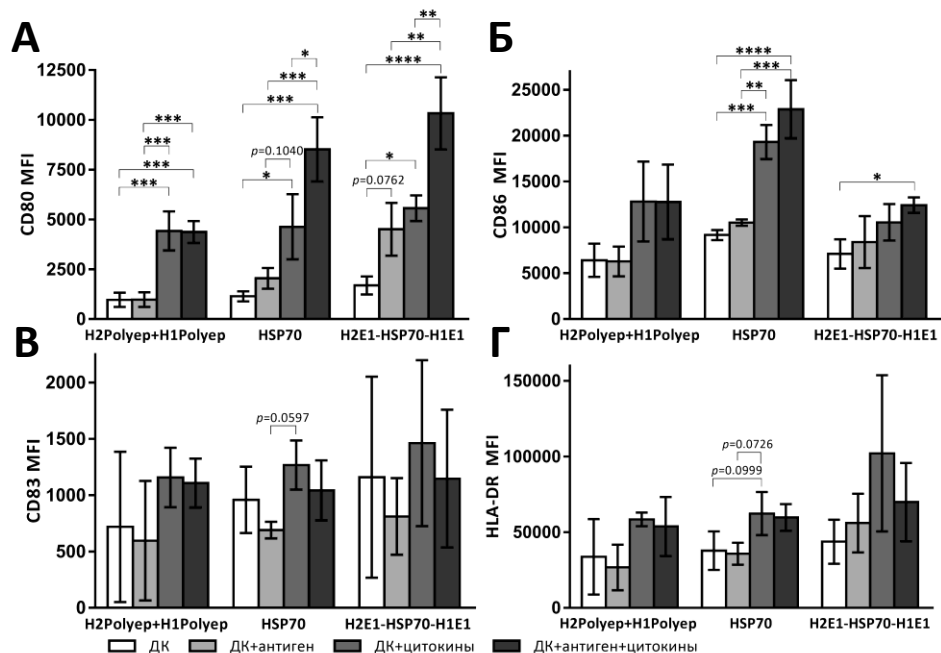


Рисунок 22. Экспрессия маркеров созревания и активации дендритных клеток (ДК). На фигуре представлен анализ экспрессии CD80⁺ (А), CD86⁺ (Б), CD83⁺ (В) и HLA-DR⁺ (Г) на ДК. Данные представляют собой средние значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI, median fluorescence intensity) ± доверительный интервал от трех независимых экспериментов с участием трех разных доноров. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Сравнение образцов, инкубированных с отдельными полиэпитопами, HSPA1B или слитым белком показывает, что белок теплового шока сам по себе приводит к значительной активации и созреванию дендритных клеток (Рисунок 23). Более того, наблюдается тенденция к увеличению, в отдельных случаях значительному, этих эффектов, если HSPA1B слит с полиэпитопами рековерина, тогда как инкубация дендритных клеток только с полиэпитопами не приводит к какому-либо эффекту (Рисунок 23). Так же стоит отметить, что коктейль цитокинов для созревания, являясь методом неспецифической активации и используемый для усиления иммунного ответа, как таковой так же индуцировал активацию дендритных клеток (Рисунки 21, 22). Интересно, что при его одновременном использовании с проинкубированными со слитым белком клетками наблюдался синергический эффект в виде усиления экспрессии CD80 и CD86 по сравнению с дендритными клетками, проинкубированными либо со слитым белком, либо с коктейлем цитокинов для созревания отдельно (Рисунок 22 А, Б).

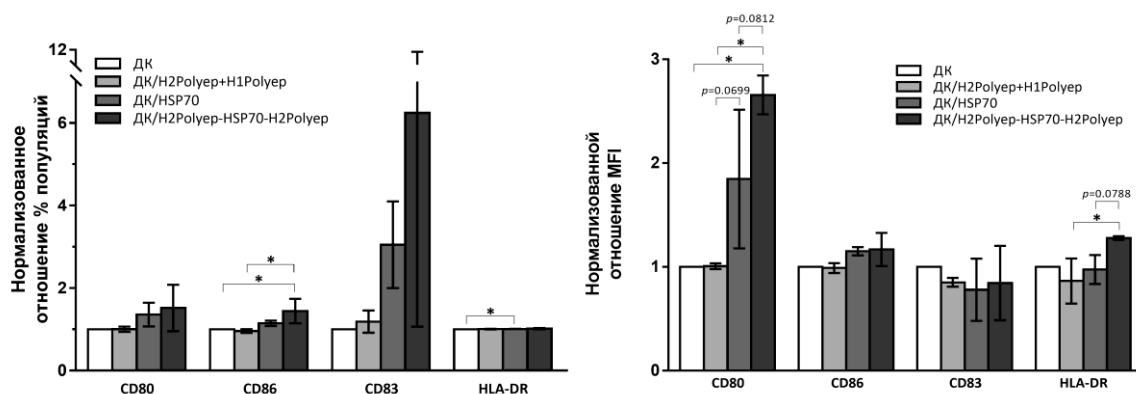


Рисунок 23. Сравнительный анализ величин популяций дендритных клеток (ДК) и уровней экспрессии маркеров созревания и активации. Данные представляют собой средние нормализованные по контрольным ДК значения относительных количеств клеток и медианной интенсивности флуоресценции (MFI, median fluorescence intensity) $\pm$ доверительный интервал от трех независимых экспериментов с участием трех разных доноров. * $p < 0.05$

Интересный эффект наблюдался при анализе экспрессии CD274-экспрессирующих клеток. Судя по всему, HSPA1B, помимо индукции активации и созревания дендритных клеток, обладает и некой толерогенной функцией. При инкубации дендритных клеток только с HSPA1B наблюдалась тенденция к увеличению количества CD274-экспрессирующих дендритных клеток (Рисунок 24). В свою очередь, при инкубации дендритных клеток с отдельными соответствующими полиэпитопами рековерина наблюдалась тенденция к снижению экспрессии CD274 (Рисунок 24). Более того, наблюдался промежуточный эффект, если дендритные клетки инкубировались со слитым белком (Рисунок 24). Тем не менее, результаты анализа полученных данных экспрессии CD274 не были статистически значимы и интерпретировать их стоит с осторожностью.

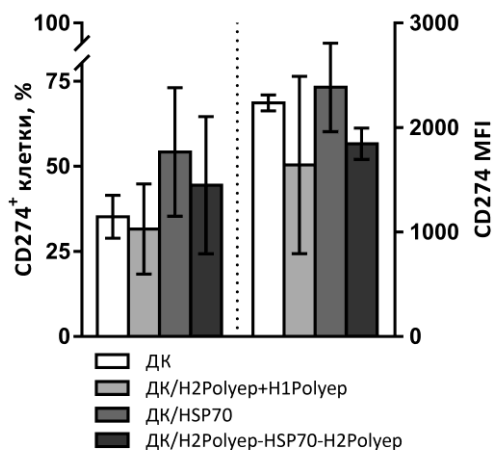


Рисунок 24. Сравнительный анализ экспрессии CD274 (PD-L1) на дендритных клетках (ДК). Данные представляют собой количественные данные об относительном количестве CD274-экспрессирующих ДК, а также уровень экспрессии CD274 $\pm$ доверительный интервал от трех независимых экспериментов с участием трех разных доноров.

6. Дендритные клетки, проинкубированные со слитым белком, секретируют про-воспалительные цитокины

Для проверки функциональной способности дендритных клеток, инкубированных со слитым белком, анализировалась их способность секретировать про-воспалительные и регуляторные цитокины. В качестве образцов для анализа использовалась культуральная среда, собранная от проб дендритных клеток на их шестой день культивации, через 24 часа после инкубации с 0.4 мкМ H2Polyep-HSPA1B-H1Polyep и/или активацией коктейлем цитокинов (см. «Результаты работы», пункт 5). Культуральная среда от дендритных клеток количественно анализировалась на присутствие в ней цитокинов TNF- α , IFN- α 2, IFN- γ , IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-6. Учитывая, что использованный коктейль цитокинов для созревания дендритных клеток содержал в т.ч. TNF- α и IFN- γ b, измерение концентрации данных цитокинов в пробах культуральной среды от дендритных клеток, проинкубированных с коктейлем для цитокинов, было необъективно. Таким образом, анализ наличия TNF- α и IFN- γ b производился только в культуральной среде от контрольных дендритных клеток и от дендритных клеток, проинкубированных только со слитым белком.

В результате мультиплексного анализа цитокины IFN- α 2, IFN- γ и IL-12 (p70) ни в одном проанализированном образце обнаружить не удалось, либо их концентрация была незначительна. Нижний порог чувствительности мультиплексного анализа для этих цитокинов в соответствии с построенной по референсным стандартным контролям кривой составлял 5.81 пг/мл для IFN- α 2, 3.72 пг/мл для IFN- γ и 0.36 пг/мл для IL-12 (p70). Анализ данных секреции IL-12 (p40) проведен не был, т.к. количество образцов, концентрация IL-12 (p40) в которых превысила соответствующий нижний порог чувствительности (5.48 пг/мл) не соответствовало критериям для должного статистического анализа (данные не отображены).

Измерение концентрации про-воспалительного цитокина TNF- α в культуральной среде показал значительное увеличение его секреции дендритными клетками, проинкубированными со

слитым белком, по сравнению с контрольными дендритными клетками. Секреция TNF- α проинкубированными со слитым белком дендритными клетками увеличивалась более чем в 13 раз (Рисунок 25 А). В свою очередь, концентрацию IL-6, так же являющегося провоспалительным цитокином, было возможно измерить в т.ч. в образцах дендритных клеток, индуцированных коктейлем цитокинов для созревания. Анализ полученных данных показал тенденцию к увеличению секреции IL-6 дендритными клетками, проинкубированными со слитым белком, или индуцированными коктейлем цитокинов. Более того, дендритные клетки, проинкубированные со слитым белком и впоследствии индуцированные коктейлем цитокинов, показывали примерно в 33 раза превосходящую секрецию IL-6, по сравнению с контрольными дендритными клетками, и примерно в 13 и 5 раз превосходящую секрецию IL-6 по сравнению с дендритными клетками, проинкубированными только со слитым белком или только индуцированными цитокинами, соответственно (Рисунок 25 Б).

Анализ секреции дендритными клетками регуляторного цитокина IL-10 не выявил каких-либо значимых отличий в паттерне его экспрессии среди всех образцов дендритных клеток по сравнению с контрольным образцом (Рисунок 25 В). Обнаруженные же следовые количества IL-10 в пробах (2-5 пг/мл) можно отнести к погрешности.

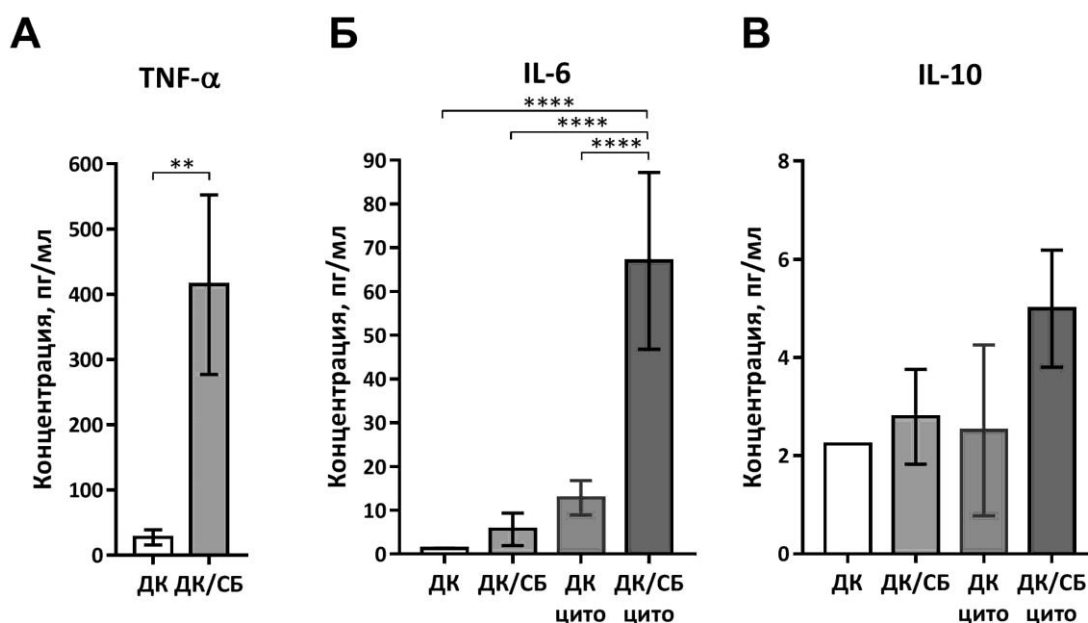


Рисунок 25. Секреция цитокинов дендритными клетками, проинкубированными с H2Polyер-HSPA1B-H1Polyер. Концентрация TNF- α (А), IL-6 (Б) и IL-10 (В) измерялась в культуральных средах, собранных на 6 день культивации соответствующих клеток. ДК – дендритные клетки, СБ – слитый белок, цито – коктейль цитокинов для созревания.

Обсуждение результатов

К настоящему времени были предложены различные подходы для усовершенствования ранней диагностики злокачественных новообразований, в т.ч. почечно-клеточной карциномы. Различные биомолекулы, такие как опухолеассоциированные антигены и нуклеиновые кислоты, были предложены в качестве диагностических биомаркеров. Охарактеризованные для этих целей биомаркеры включают в себя различные микроРНК (miR-210, miR-378, miR-451, miR-1233) [274-276], белки CAIX [277], Tu M2-РК, эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) [278], опухолеассоциированный ингибитор трипсина (TATI) [279], рековерин [14], AMACR [280], виментин [281], HIFPНЗ [282], СК7, СК19, СК20 и другие [283]. Однако не было найдено ни одного надежного биомаркера для раннего выявления ПКК, поскольку все предложенные обладали недостаточной чувствительностью и/или специфичностью [284]. Более того, неоднородность опухолей, а также нестабильность биомаркеров, поступающих в кровоток, в отношении протеаз и нуклеаз еще больше ограничивают их диагностическую ценность [265].

Перспективным типом биомаркеров, которые могут применяться для диагностики злокачественных новообразований, являются аутоантитела к опухолевым антигенам. Антитела, как биомаркеры, обладают несколькими преимуществами над опухолеассоциированными антигенами и нуклеиновыми кислотами, циркулирующими в крови. Антитела намного более устойчивы к деградации протеазами, а также они появляются достаточно рано и на длительный период в ответ на экспрессию опухолевых белков [285]. Более того, довольно небольшого уровня экспрессии опухолеассоциированных антигенов достаточно для развития эффективного гуморального ответа и начала продукции антител. Существует постоянно увеличивающееся количество исследований, которые показывают преимущество использования антител в качестве диагностических биомаркеров для онкологических заболеваний. Аутоантитела к опухолеассоциированным антигенам детектировались при карциномах яичников [286,287], панкреатической железы [286], легких [288], молочных желез [289], пищевода [290], простатической железы [291] и прямой кишки [292]. В нескольких исследованиях сообщается о возможности использования аутоантител к опухолеассоциированным антигенам в качестве биомаркера и при ПКК. Наиболее упоминаемыми являются аутоантитела к белкам HIFPНЗ и ливину (livin) [293,294]. Помимо экспрессии в нормальных тканях, HIFPНЗ сверхэкспрессирован в клетках опухоли при ПКК и, таким образом, титр антител к HIFPНЗ у пациентов с ПКК выше в сравнении со здоровыми лицами [294]. В свою очередь антитела к ливину представляют собой более подходящий биомаркер, т.к. экспрессия ливина отсутствует в здоровых тканях, несмотря на то, что экспрессия этого антигена была обнаружена у пациентов с различными онкологическими заболеваниями [293,295].

Целью настоящей диссертационной работы было изучение потенциала использования аррестина-1 и аутоантител к аррестину-1 в качестве биомаркеров ПКК. Аррестин-1 (также известный как зрительный аррестин, S-антиген, аррестин палочек) это фоторецепторный белок, который принадлежит подсемейству зрительных/сенсорных аррестинов семейства аррестинов (включающего в себя зрительные и β -аррестины), которое вместе с α -аррестинами образует большую группу регуляторных скаффолдов, имеющих общие аррестиновые домены [296,297]. α - и β -аррестины экспрессируются повсеместно в каждом типе ткани, тогда как экспрессия зрительных аррестинов ограничена сетчаткой глаза. Несмотря на то, что мРНК аррестина-1 была обнаружена в некоторых иммунопривилегированных тканях, таких как головной мозг, спинной мозг, плацента, герминальные клетки, аррестин-1 как белок не детектировался в здоровых тканях, кроме сетчатки [7]. Поскольку сетчатка глаза отделена гематоретинальным барьером, аберрантная экспрессия аррестина-1 является высокоиммуногенной. К примеру, экспрессия аррестина-1 в клетках меланомы индуцирует выраженное образование соответствующих аутоантител, которые в свою очередь вызывают меланома-ассоциированную ретинопатию [11].

Аррестин-1 может классифицироваться как раково-сетчаточный антиген, недавно описанная группа сетчаточных белков, феномен аберрантной экспрессии которых может потенциально использоваться для диагностики и лечения онкологических заболеваний [5]. К настоящему времени, наиболее изученным раково-сетчаточным антигеном является рековерин [8]. Его аберрантная экспрессия была обнаружена в клетках меланомы, карциномах легких, желудка, прямой кишки, поджелудочной железы, простатической железы, молочной железы, яичников, а также в ПКК [10]. Тем не менее, мало что известно о других раково-сетчаточных антигенах. Имеются свидетельства, позволяющие относить аррестин-1 к раково-сетчаточным антигенам, большинство из которых связаны с меланомой [24]. Например, аутоантитела к аррестину-1 были обнаруживались у пациентов с меланома-ассоциированной ретинопатией. Между тем, лишь несколько сообщений демонстрируют, что аберрантная экспрессия аррестина-1 связана с другими злокачественными новообразованиями. Присутствие аутоантител к аррестину-1 было обнаружено в образцах сыворотки крови больных карциномой молочной железы [22] и тератомой яичника [23]. До сих пор, все данные касающиеся аррестина-1 при онкологических заболеваниях, кроме меланомы, основаны на детекции аутоантител и только у пациентов с диагностированной опухолеассоциированной ретинопатией.

Для определения наличия аррестина-1 в злокачественных клетках почки, в рамках данной работы производилось иммуногистохимическое исследование образцов опухолей почек. Было обнаружено, что аррестин-1 часто экспрессируется у пациентов с почечными онкологическими заболеваниями, а именно, экспрессия аррестина-1 была обнаружена в 17 образцах ПКК, что

составляет 58.6% от всех случаев ПКК, включенных в исследование. Неожиданным оказалось то, что более частая экспрессия аррестина-1 (90% случаев) была обнаружена при доброкачественной опухоли почек – почечной онкоцитоме. Таким образом, аррестин-1 является неподходящим биомаркером для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных опухолей почек. Тем не менее, частая экспрессия аррестина-1 в опухолях делает этот белок многообещающей мишенью для будущих терапевтических стратегий лечения онкологических заболеваний почек. Например, полученные данные являются основанием для создания противоопухолевых вакцин на основе эпитопов аррестина-1 [26].

Среди пациентов с ПКК, образцы тканей которых были исследованы на наличие aberrантной экспрессии аррестина-1, было шесть пациентов, у которых развилась метастатическая форма ПКК. Образцы ткани метастатических сайтов от этих пациентов были также собраны и проанализированы с помощью ИГХ в парах с образцами первичных опухолей соответствующих пациентов. За исключением одного пациента, в образцах которого экспрессия аррестина-1 обнаружена не была, во всех остальных образцах от пяти пациентов аррестин-1 обнаруживался как в первичных опухолях, так и в метастазах. Более того, уровень экспрессии аррестина-1 был значительно выше в метастазах, чем в первичных опухолевых клетках, что особенно было заметно в метастазах в головной мозг. Таким образом, увеличение экспрессии аррестина-1 может быть ассоциировано с развитием и распространением метастазов.

Для оценки влияния экспрессии аррестина-1 на прогноз пациентов с ПКК был произведен анализ выживаемости. Было обнаружено, что экспрессия аррестина-1 в клетках ПКК ассоциируется со снижением пятилетней выживаемости пациентов до 70%. Тем не менее стоит отметить, что у всех пациентов, у которых была обнаружена aberrантная экспрессия аррестина-1 в опухоли и кто умер, развилась метастатическая болезнь, тогда как известно, что выживаемость пациентов с ПКК при развитии метастатической болезни достоверно снижается. Таким образом, предположения о корреляции между экспрессией аррестина-1 при ПКК и выживаемостью пациентов следует делать с осторожностью. В то же время, из полученных данных следует предположение, что экспрессия аррестина-1 в клетках ПКК может быть связана с его вовлечением в процесс малигнизации. Ранее в исследованиях *in vivo* уже было показано, что нарушение регуляции экспрессии β -аррестинов, гомологов аррестина-1, связано с более агрессивными фенотипами злокачественных клеток и худшими исходами при онкологических заболеваниях [298].

В рамках изучения раково-сетчаточных антигенов интересно каким образом запускается их aberrантная экспрессия в опухолевых клетках. В ходе малигнизации происходят различные отклонения в эпигенетической машинерии опухолевых клеток, вызывая тем самым в них

абберантную экспрессию несоответствующих исходной ткани белков. Существуют различные эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов, которые включают механизмы организации ДНК и ее ковалентной модификации [299]. В данной работе была предпринята попытка понять, является ли метилирование промотора гена аррестина-1 (*SAG*) эпигенетическим механизмом, который регулирует экспрессию аррестина-1 в клетках ПКК. По результатам бисульфитного секвенирования тотальной ДНК, полученной из клеток ПКК, было показано, что статус метилирования гена *SAG* значимо не отличается от контрольных образцов, полученных из лимфоцитов здоровых доноров или из клеток нормальной почечной ткани. Таким образом, гипометилирование не является механизмом, регулирующим экспрессию аррестина-1 в клетках ПКК. Можно предположить, что в регуляции экспрессии аррестина-1 при ПКК задействованы эпитранскриптомные механизмы, включающие в себя различные варианты сплайсинга мРНК аррестина-1 и/или регуляцию экспрессии различными типами микроРНК и малых интерферирующих РНК, что требует дальнейшего изучения.

Ключевые данные были получены после исследования образцов сывороток крови пациентов с ПКК на наличие аутоантител к аррестину-1. Как описывалось ранее, гуморальный ответ против опухоли развивается при экспрессии опухолью чужеродных для аутологичной иммунной системы белков. Таким образом, следующим шагом после обнаружения экспрессии аррестина-1 в клетках ПКК стало исследование того, образуются ли аутоантитела к аррестину-1 у пациентов с ПКК, а также оценка возможности использования этого феномена в целях диагностики ПКК. Оказалось, что в сыворотках крови 75.7% пациентов с различными подтипами ПКК обнаруживались аутоантитела к аррестину-1, что почти вдвое выше, чем для любого известного на данный момент биомаркера ПКК. Более того, аутоантитела к аррестину-1 обнаруживались в сыворотках всех исследованных пациентов с почечной онкоцитомой. Отдельно была выделена группа из десяти пациентов, у которых одновременно были доступны образцы сывороток крови и ткани опухолей. На основании данных, полученных от этих десяти пациентов, была проанализирована взаимосвязь между экспрессией аррестина-1 и образованием аутоантител к аррестину-1. Было обнаружено, что аррестин-1 экспрессировался в клетках ПКК у семи из десяти пациентов, тогда как аутоантитела к аррестину-1 обнаруживались в сыворотках крови всех десяти пациентов данной группы. Похожие результаты были получены в работе о другом опухолеассоциированном антигене при ПКК, ливине. У тринадцати процентов пациентов с очень низкой экспрессией ливина (<10% ливин-положительных клеток на микроскопическое поле зрения) обнаруживалась продукция соответствующих анти-ливин антител в сыворотке крови [293]. Было высказано предположение, что даже незначительные популяции ливин-экспрессирующих клеток могут активировать ливин-специфический иммунный ответ.

Подобным образом, по результатам текущей работы можно предположить, что в выделенной группе из десяти пациентов клетки ПКК всех десяти экспрессировали аррестин-1, но в 30% случаев аррестин-1-положительные оставались необнаруженными по результатам ИГХ, или количество аррестин-1-положительных клеток было $<10\%$ на микроскопическое поле зрения и эти образцы не включались в пул аррестин-1-положительных. Действительно, чувствительность иммуногистохимического метода детекции зачастую недостаточна для обнаружения небольших популяций антиген-экспрессирующих клеток, или, более того, единичных антиген-экспрессирующих клеток. Вдобавок, участки опухоли с аррестин-1-экспрессирующими клетками могли не попасть в биопсийный материал. Так или иначе, даже низкие уровни экспрессии опухолеассоциированных антигенов могут вызывать сильный гуморальный ответ у отдельных пациентов, как это наблюдалось у пациентов с ПКК, продуцирующих антитела к ливину [293], или к аррестину-1 (в текущей работе).

Учитывая наблюдаемую картину, можно предположить использование детекции аутоантител к аррестину-1 в диагностических целях. Рассматривая аутоантитела к аррестину-1 в качестве биомаркера ПКК, их использование в качестве прогнозирующего биомаркера или в прогностических целях малоперспективно. Очевидно, что гуморальный ответ начинает развиваться вскоре после начала экспрессии опухолеассоциированного антигена. Даже если экспрессия опухолеассоциированного антигена будет прекращена из-за устранения опухолевых клеток, антитела еще будут циркулировать какое-то время в крови пациента. По этой причине циркуляция аутоантител к аррестину-1 вряд ли будет коррелировать с ответом пациентов на лечение или с прогрессированием заболевания из-за их постоянного присутствия. Использование аутоантител к аррестину-1 в качестве диагностического биомаркера более перспективно, хотя и в этом случае могут возникнуть некоторые ограничения. Например, аутоантитела к аррестину-1 нельзя использовать для дифференциальной диагностики различных подтипов ПКК, поскольку они были обнаружены у пациентов с каждым подтипом этого заболевания. Наилучшим применением детекции аутоантител к аррестину-1 может быть ранняя диагностика различных форм ПКК. Как указано выше, даже низкий уровень экспрессии опухолеассоциированного антигена на ранней стадии прогрессирования опухоли достаточен для того, чтобы вызвать значительный гуморальный ответ. Таким образом, ранняя детекция аутоантител к аррестину-1 может быть предупреждающим сигналом для врача, чтобы он начал более детальное обследование пациента, особенно в отношении почек.

Стоит добавить, что экспрессия аррестина-1 и образование аутоантител к аррестину-1 не специфичны для пациентов с ПКК и почечной онкоцитомой. Как указано выше, были описаны случаи образования аутоантител к аррестину-1 и последующего развития паранеопластических

сндромов связанных с этим в случаях с меланомой и карциномой молочной железы [24]. Тем не менее, продукция аутоантител к аррестину-1 более специфична для ПКК, чем продукция аутоантител к другому раково-сетчаточному антигену рековерину. В предыдущей работе была показана относительно низкая частота присутствия аутоантител к рековерину в сыворотке крови пациентов с ПКК, несмотря на большое количество случаев обнаружения рековерин-положительных клеток в опухолях [14]. Таким образом, диагностическое значение может иметь тщательное изучение паттернов экспрессии аутоантител к раково-сетчаточным антигенам в крови пациентов вместе с анализом других соответствующих признаков и симптомов.

Механизмы, лежащие в основе иммуногенности опухолеассоциированных антигенов и в т.ч. продукции аутоантител к ним, включают в себя дефекты центральной толерантности во время дифференцировки лимфоцитов, сверхэкспрессию или мутацию опухолевых белков, а также воспаление в опухолевом микроокружении и некротическую смерть опухолевых клеток [300]. Однако можно утверждать, что перечисленные механизмы не являются напрямую ответственными за продукцию аутоантител к аррестину-1. Учитывая специфическую локализацию экспрессии аррестина-1 в норме в сетчатке, которая является иммунопривилегированной тканью из-за наличия гематоретинального барьера, аррестин-1 является чужеродным белком для аутологичной иммунной системы. При выработке центральной толерантности к аутологичным антигенам, лимфоциты в процессе селекции не подвергаются воздействию антигенов, локализованных в аутологичных иммунопривилегированных тканях. Следовательно, в общей циркуляции присутствуют популяции аррестин-1-специфичных лимфоцитов, которые будут распознавать аррестин-1 как чужеродный белок с формированием последующего цитотоксического и гуморального иммунного ответа, в т.ч. при развитии аррестин-1-экспрессирующей опухоли, как было показано в текущей работе на примере обнаружения аутоантител к аррестину-1 у больных аррестин-1-экспрессирующей ПКК. Таким образом, такие иммунопривилегированные антигены как раково-сетчаточные, в т.ч. аррестин-1 или рековерин, обладают высокой иммуногенностью и способностью запускать иммунный ответ без сильной зависимости от их концентрации и конформации. Учитывая их частую aberrantную экспрессию злокачественными клетками, это является обоснованием для возможного использования раково-сетчаточных антигенов в качестве компонентов противоопухолевых вакцин.

Для получения доказательства концепции (proof of concept) использования раково-сетчаточных антигенов в качестве компонентов противоопухолевых вакцин были созданы прототипы противоопухолевых вакцин на основе белка теплового шока человека HSPA1B, содержащие эпитопы раково-сетчаточного белка рековерина. В литературе хорошо

охарактеризовано применение белков теплового шока в противоопухолевых вакцинах в качестве доставщиков антигенов в антиген-презентирующие клетки и адъювантов (см. «Обзор литературы», пункт 1.2.2.2). Более того, многие препараты на основе белков теплового шока дошли до клинических испытаний (Таблица 4).

В результате данной работы была получена панель рекомбинантных слитых (fusion) белков, со взятой за основу полной аминокислотной последовательностью HSPA1B с присоединенными к ее N- и C-концам различными HLA II- и HLA I-специфичными эпитопами рековерина. Учитывая свойства HSPA1B связываться с антиген-презентирующими клетками и направлять интернализацию связанных с ним антигенов по эндоцитарному пути, а также высокую иммуногенность раково-сетчаточных антигенов, а именно рековерина, было предположено, что полученные рекомбинантные конструкции будут эффективно активировать дендритные клетки для дальнейшей индукции ими цитотоксического и гуморального иммунного ответа.

По результатам данной работы оказалось, что такие конструкции действительно обладают способностью к значительной активации дендритных клеток. Активированные и зрелые дендритные клетки общепринято описываются как CD80^{high}, CD86^{high}. Инкубация дендритных клеток со слитым белком приводила к значительному увеличению CD80⁺ и CD86⁺ популяций дендритных клеток. Наблюдаемый эффект от инкубации со слитым белком был сравним с неспецифической активацией дендритных клеток только коктейлем про-воспалительных цитокинов, или применением и слитого белка, и коктейля цитокинов одновременно. При инкубации дендритных клеток с HSPA1B в качестве контроля также наблюдалось увеличение CD80⁺ и CD86⁺ популяций дендритных клеток. Тем не менее, при сравнении эффектов от инкубации, в случае с HSPA1B тенденция к увеличению была статистически незначима, тогда как инкубация со слитым белком приводила к статистически значимому увеличению CD86⁺ популяций дендритных клеток. Слитый белок так же приводил к значительному усилению экспрессии CD80 и CD86 на поверхности дендритных клеток. Более того, наблюдался накопительный эффект, выражающийся в более высоком уровне экспрессии CD80, если к проинкубированным со слитым белком клеткам добавлялся коктейль цитокинов для созревания. Схожие, но несколько менее выраженные эффекты наблюдались, если дендритные клетки инкубировались с белком HSPA1B, не содержащим полиэпитопов рековерина. Сравнение уровней экспрессии CD80 и CD86 на дендритных клетках показало, что, несмотря на тенденцию на увеличение при использовании только HSPA1B, статистически значимы были результаты только в образцах, проинкубированных со слитым белком.

Общепринятым маркером зрелых дендритных клеток считается CD83. При анализе было показано, что уровень экспрессии CD83 остается относительно постоянным независимо от

инкубации дендритных клеток с отдельными полиэпитопами, с HSPA1B или со слитым белком, а также остается малозависимым от присутствия коктейля цитокинов для созревания. Тем не менее, значительно увеличивалось количество CD83-экспрессирующих дендритных клеток при их инкубации со слитым белком, сравнимое с теми же количествами в присутствии цитокинов. Схожая, но незначительная тенденция наблюдается при инкубации дендритных клеток с HSPA1B. Можно говорить об относительно постоянном уровне экспрессии CD83 на зрелых дендритных клетках и значительном увеличении CD83⁺ популяции зрелых дендритных клеток в случае инкубации изначально незрелых дендритных клеток с антигеном.

Инкубация дендритных клеток в качестве контроля отдельно с пептидами, соответствующими полиэпитомам реоверина, не приводила ни к активации, ни к созреванию дендритных клеток, тогда как одновременно наблюдалось значительное увеличение количества активированных и зрелых дендритных клеток, а также усиление экспрессии CD80 и CD86 при добавлении коктейля цитокинов для созревания, независимо от присутствия полиэпитопов.

Также была предпринята попытка оценить толерогенный потенциал полученных дендритных клеток. Интересный эффект наблюдался при анализе экспрессии полученными дендритными клетками CD274 (PD-L1), одного из широко известных иммунных чекпойнтов, отвечающих за передачу толерогенных сигналов эффекторным Т клеткам. Судя по всему, HSPA1B, помимо индукции активации и созревания дендритных клеток, а также способности доставлять антигены в дендритные клетки, обладает и некой толерогенной функцией. При инкубации дендритных клеток только с HSPA1B наблюдалась тенденция к увеличению количества CD274-экспрессирующих дендритных клеток. В свою очередь, при инкубации дендритных клеток с отдельными соответствующими полиэпитопами реоверина наблюдалась тенденция к снижению экспрессии CD274. Более того, наблюдался промежуточный эффект, если дендритные клетки инкубировались со слитым белком. Тем не менее, результаты анализа полученных данных экспрессии CD274 не были статистически значимы и интерпретировать их стоит с осторожностью.

Учитывая наблюдаемую в образцах с HSPA1B тенденцию, полученные в текущей работе данные сопоставимы с предыдущими работами, в которых было показано, что белки теплового шока обладают адьювантной активностью, выражающейся в неспецифической активации и индукции созревания дендритных клеток. Тем не менее, для полноценного созревания дендритных клеток и развития антиген-специфического цитотоксического ответа необходима кросс-презентация антигена. К сожалению, инкубация дендритных клеток только с пептидами, соответствующими эпитомам реоверина, не приводила к каким-либо значимым эффектам. Из полученных данных видно, что именно слитый белок, несущий в себе последовательность и

HSPA1B, и эпитопов рековерина, был максимально эффективен в качестве индуктора иммунного ответа. Таким образом, вакцины на основе HSPA1B являются перспективным иммунотерапевтическим агентом, позволяющим не только приводить к неспецифической активации дендритных клеток, но и доставлять антигены в антиген-презентирующие клетки.

Полученные, таким образом, данные объективно показывают, что нагруженные слитым белком, содержащим эпитопы рековерина, дендритные клетки в полной мере активируются и являются зрелыми, что на уровне организма фенотипически соответствует зрелым дендритным клеткам, локализованным в лимфатических узлах, и готовым к кросс-презентации и активации аутологичных Т лимфоцитов. Потенциальный прайминг и активация Т лимфоцитов, в свою очередь, будет приводить к возникновению рековерин-специфичного цитотоксического и гуморального иммунного ответа.

Возможность полученных дендритных клеток, нагруженных слитым белком, активировать Т лимфоциты была показана в исследовании их функционального статуса. Было показано, что активированные рекомбинантным слитым белком дендритные клетки секретируют провоспалительные цитокины IL-6 и TNF- α и не секретируют IL-10. При этом отмечалось многократное, в некоторых случаях на порядок, усиление секреции IL-6 и TNF- α дендритными клетками.

Секретируемый нагруженными слитым белком дендритными клетками IL-6 стимулирует их активацию и созревание еще больше по аутокринному механизму [301]. Известно, что секреция IL-6 антиген-презентирующими клетками начинается в ответ на воздействие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [302]. Таким образом, секреция IL-6 дендритными клетками говорит о том, что происходит именно процесс их созревания, а также, что полученный слитый белок обладает в т.ч. адьювантными свойствами. Учитывая характеристику белков теплового шока, можно предположить, что именно HSPA1B в составе слитых белков ответственен за данный феномен. Помимо усиления процесса созревания самих дендритных клеток, известно, что IL-6 индуцирует развитие Th17 клеток и в то же время ингибирует дифференцировку регуляторных Т клеток. Эти субпопуляции Т клеток имеют ключевые функции в регуляции иммунного ответа: IL-17-продуцирующие Th17 клетки являются провоспалительными, тогда как регуляторные Т клетки ограничивают чрезмерный эффекторный ответ Т клеток [303]. Дифференцировка Th17 клеток в основном происходит за счет презентации IL-6 нагруженного на соответствующий рецептор на поверхности дендритных клеток в процессе, называемом транс-презентацией [304].

Эндогенный TNF- α , также секретируемый дендритными клетками после их активации, по аналогии с IL-6 стимулирует активацию и созревание тех же дендритных клеток по

аутокринному механизму и является критическим для выживаемости дендритных клеток [305]. Помимо этого, TNF- α является всесторонне изученным про-воспалительным цитокином, участвующем в регуляции множественных ветвей про-воспалительного иммунного ответа через активацию NF- κ B и MAPK сигнальных путей [306,307].

Среди других цитокинов, продуцируемых дендритными клетками, в т.ч. толерогенными, IL-10 известен как ключевой регуляторный цитокин, ограничивающий и в конечном счете прекращающий чрезмерный Т-клеточный ответ для предотвращения хронического воспаления и повреждения тканей [308]. В контексте данной работы начало секреции дендритными клетками IL-10 означало бы потенциальную толерогенность дендритных клеток, чего требуется избегать при создании противоопухолевых вакцин. Таким образом, отсутствие значимого увеличения секреции IL-10 дендритными клетками, нагруженными слитым белком, является несомненным преимуществом.

Все эти результаты свидетельствует о том, что полученные нагрузкой слитым белком дендритные клетки являются функционально активными и иммуногенными, способными к активации и праймингу про-воспалительных Т лимфоцитов.

Полученные в текущей диссертационной работе данные в совокупности составляют обоснование предлагаемого персонализированного подхода для лечения онкологических заболеваний. Исходя из полученных данных о раково-сетчаточных антигенах аррестине-1 и рековерине, использование диагностических тестов на наличие аутоантител к раково-сетчаточным антигенам в сыворотке, помимо своей диагностической ценности в виде ранней диагностики злокачественных новообразований, в т.ч. ПКК, позволит обнаруживать специфическую терапевтическую мишень, для таргетинга которой впоследствии можно применить рековерин- или аррестин-1-содержащую противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока HSPA1B.

Выводы

1. Аберрантная экспрессия аррестина-1 обнаруживается в первичной почечно-клеточной карциноме в 58.7% случаев. Экспрессия аррестина-1 более выражена в метастазах, по сравнению с аутологичной первичной почечно-клеточной карциномой. Аберрантная экспрессия аррестина-1 в почечно-клеточной карциноме снижает пятилетнюю выживаемость.
2. Аберрантная экспрессия аррестина-1 в почечно-клеточной карциноме не регулируется метилированием промотора его гена.
3. Аутоантитела к аррестину-1 у пациентов с почечно-клеточной карциномой продуцируются в 75.7% случаев.
4. Слитый белок, состоящий из HSPA1B и эпитопов рековерина, способен индуцировать активацию и созревание дендритных клеток. Полученные таким образом дендритные клетки функционально активны и проявляют про-воспалительный фенотип.

Список сокращений

ПКК	–	Почечно-клеточная карцинома
КТ	–	Компьютерная томография
TNM	–	Tumor, nodus, metastasis
MPT	–	Магнитно-резонансная томография
БСА	–	Бычий сывороточный альбумин
ДСН	–	Додecilсульфат натрия
ТМЭДА	–	Тетраметилэтилендиамин
ИПТГ	–	Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
ЭДТА	–	Этилендиаминтетрауксусная кислота
PIPES	–	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
ECL	–	Enhanced chemiluminescence
BCA	–	Bicinchonic acid
HSP	–	Heat shock protein
GM-CSF	–	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL-4	–	Interleukine-4
TNF- α	–	Tumor necrosis factor- α
IFN- γ 1b	–	Interferon- γ 1b
ПГЕ ₂	–	Простагландин E ₂
PBS	–	Phosphate buffered saline
ТБЭ	–	Трис-борат-ЭДТА
LB	–	Lysogeny broth
TBS	–	Tris-buffered saline
ПААГ	–	Полиакриламидный гель
ТГД	–	Трис-глицин-ДСН
SOB	–	Super optimal broth
ПКС	–	Полная культуральная среда
FACS	–	Fluorescence-activated cell sorting
DPBS	–	Dulbecco's phosphate buffered saline
HLA	–	Human leukocyte antigen
ФМО	–	Флуоресценция минус один
ANOVA	–	Analysis of variance
ИГХ	–	Иммуногистохимия

NK	–	Natural killer
FDA	–	U.S. Food and Drug Administration
PSA	–	Prostate-specific antigen
PD-L1	–	Programmed death-ligand 1

Список литературы

1. Schooten, E.; Di Maggio, A.; van Bergen En Henegouwen, P.M.P.; Kijanka, M.M. MAGE-A antigens as targets for cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* **2018**, *67*, 54-62, doi:10.1016/j.ctrv.2018.04.009.
2. Smith, C.C.; Selitsky, S.R.; Chai, S.; Armistead, P.M.; Vincent, B.G.; Serody, J.S. Alternative tumour-specific antigens. *Nature reviews. Cancer* **2019**, *19*, 465-478, doi:10.1038/s41568-019-0162-4.
3. Richters, M.M.; Xia, H.; Campbell, K.M.; Gillanders, W.E.; Griffith, O.L.; Griffith, M. Best practices for bioinformatic characterization of neoantigens for clinical utility. *Genome Med* **2019**, *11*, 56, doi:10.1186/s13073-019-0666-2.
4. Jiang, T.; Shi, T.; Zhang, H.; Hu, J.; Song, Y.; Wei, J.; Ren, S.; Zhou, C. Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 93, doi:10.1186/s13045-019-0787-5.
5. Golovastova, M.O.; Bazhin, A.V.; Philippov, P.P. Cancer-retina antigens -- a new group of tumor antigens. *Biochemistry. Biokhimiia* **2014**, *79*, 733-739, doi:10.1134/S000629791408001X.
6. Eichmuller, S.B.; Bazhin, A.V. Onconeural versus paraneoplastic antigens? *Current medicinal chemistry* **2007**, *14*, 2489-2494.
7. Bazhin, A.V.; Schadendorf, D.; Willner, N.; De Smet, C.; Heinzelmann, A.; Tikhomirova, N.K.; Umansky, V.; Philippov, P.P.; Eichmuller, S.B. Photoreceptor proteins as cancer-retina antigens. *International journal of cancer* **2007**, *120*, 1268-1276, doi:10.1002/ijc.22458.
8. Bazhin, A.V.; Schadendorf, D.; Philippov, P.P.; Eichmuller, S.B. Recoverin as a cancer-retina antigen. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2007**, *56*, 110-116, doi:10.1007/s00262-006-0132-z.
9. Polans, A.S.; Witkowska, D.; Haley, T.L.; Amundson, D.; Baizer, L.; Adamus, G. Recoverin, a photoreceptor-specific calcium-binding protein, is expressed by the tumor of a patient with cancer-associated retinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92*, 9176-9180.
10. Matsuo, S.; Ohguro, H.; Ohguro, I.; Nakazawa, M. Clinicopathological roles of aberrantly expressed recoverin in malignant tumor cells. *Ophthalmic research* **2010**, *43*, 139-144, doi:10.1159/000253486.
11. Potter, M.J.; Thirkill, C.E.; Dam, O.M.; Lee, A.S.; Milam, A.H. Clinical and immunocytochemical findings in a case of melanoma-associated retinopathy. *Ophthalmology* **1999**, *106*, 2121-2125, doi:10.1016/S0161-6420(99)90493-1.
12. Bazhin, A.V.; Savchenko, M.S.; Shifrina, O.N.; Demoura, S.A.; Chikina, S.Y.; Jaques, G.; Kogan, E.A.; Chuchalin, A.G.; Philippov, P.P. Recoverin as a paraneoplastic antigen in lung cancer: the occurrence of anti-recoverin autoantibodies in sera and recoverin in tumors. *Lung cancer* **2004**, *44*, 193-198, doi:10.1016/j.lungcan.2003.10.006.
13. Savchenko, M.S.; Goncharskaia, M.A.; Skorikova, E.E.; Eichmuller, S.B.; Kushlinsky, N.E.; Bazhin, A.V.; Philippov, P.P. Autoantibodies against the Ca(2+)-binding protein recoverin in blood sera of patients with various oncological diseases. *Oncology letters* **2012**, *3*, 377-382, doi:10.3892/ol.2011.464.
14. Golovastova, M.O.; Tsoy, L.V.; Bocharnikova, A.V.; Korolev, D.O.; Gancharova, O.S.; Alekseeva, E.A.; Kuznetsova, E.B.; Savvateeva, L.V.; Skorikova, E.E.; Strelnikov, V.V., et al. The cancer-retina antigen recoverin as a potential biomarker for renal tumors. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2016**, *37*, 9899-9907, doi:10.1007/s13277-016-4885-5.
15. Baldin, A.V.; Zamyatnin, A.A.; Bazhin, A.V.; Xu, W.H.; Savvateeva, L.V. Advances in the Development of Anticancer HSP-based Vaccines. *Current medicinal chemistry* **2018**, *10.2174/0929867325666180129100015*, doi:10.2174/0929867325666180129100015.
16. Tamura, Y.; Peng, P.; Liu, K.; Daou, M.; Srivastava, P.K. Immunotherapy of tumors with

- autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Science* **1997**, 278, 117-120.
17. Reitsma, D.J.; Combest, A.J. Challenges in the development of an autologous heat shock protein based anti-tumor vaccine. *Human vaccines & immunotherapeutics* **2012**, 8, 1152-1155, doi:10.4161/hv.21382.
 18. Savvateeva, L.V.; Schwartz, A.M.; Gorshkova, L.B.; Gorokhovets, N.V.; Makarov, V.A.; Reddy, V.P.; Aliev, G.; Zamyatnin, A.A., Jr. Prophylactic Admission of an In Vitro Reconstructed Complexes of Human Recombinant Heat Shock Proteins and Melanoma Antigenic Peptides Activates Anti-Melanoma Responses in Mice. *Current molecular medicine* **2015**, 15, 462-468.
 19. Mizukami, S.; Kajiwara, C.; Ishikawa, H.; Katayama, I.; Yui, K.; Udono, H. Both CD4+ and CD8+ T cell epitopes fused to heat shock cognate protein 70 (hsc70) can function to eradicate tumors. *Cancer science* **2008**, 99, 1008-1015, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00788.x.
 20. Takemoto, S.; Nishikawa, M.; Otsuki, T.; Yamaoka, A.; Maeda, K.; Ota, A.; Takakura, Y. Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes by increased cytosolic delivery of MHC class I epitope fused to mouse heat shock protein 70 via polyhistidine conjugation. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2009**, 135, 11-18, doi:10.1016/j.jconrel.2008.11.024.
 21. Takemoto, S.; Nishikawa, M.; Guan, X.; Ohno, Y.; Yata, T.; Takakura, Y. Enhanced generation of cytotoxic T lymphocytes by heat shock protein 70 fusion proteins harboring both CD8(+) T cell and CD4(+) T cell epitopes. *Molecular pharmaceutics* **2010**, 7, 1715-1723, doi:10.1021/mp1001069.
 22. Misiuk-Hojlo, M.; Ejma, M.; Gorczyca, W.A.; Szymaniec, S.; Witkowska, D.; Fortuna, W.; Miedzybrodzki, R.; Rogozinska-Szczepka, J.; Bartnik, W. Cancer-associated retinopathy in patients with breast carcinoma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2007**, 55, 261-265, doi:10.1007/s00005-007-0026-6.
 23. Turaka, K.; Kietz, D.; Krishnamurti, L.; Mitchell, E.; Scanga, H.; Fu, V.L.; Sylvester, C. Carcinoma-associated retinopathy in a young teenager with immature teratoma of the ovary. *J AAPOS* **2014**, 18, 396-398, doi:10.1016/j.jaapos.2014.03.007.
 24. Bazhin, A.V.; Dalke, C.; Willner, N.; Abschutz, O.; Wildberger, H.G.; Philippov, P.P.; Dummer, R.; Graw, J.; de Angelis, M.H.; Schadendorf, D., et al. Cancer-retina antigens as potential paraneoplastic antigens in melanoma-associated retinopathy. *International journal of cancer* **2009**, 124, 140-149, doi:10.1002/ijc.23909.
 25. Stabile, H.; Fionda, C.; Gismondi, A.; Santoni, A. Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front Immunol* **2017**, 8, 293, doi:10.3389/fimmu.2017.00293.
 26. Coulie, P.G.; Van den Eynde, B.J.; van der Bruggen, P.; Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature reviews. Cancer* **2014**, 14, 135-146, doi:10.1038/nrc3670.
 27. Chen, D.S.; Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **2013**, 39, 1-10, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
 28. Ridge, J.P.; Di Rosa, F.; Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **1998**, 393, 474-478, doi:10.1038/30989.
 29. Barinov, A.; Galgano, A.; Krenn, G.; Tanchot, C.; Vasseur, F.; Rocha, B. CD4/CD8/Dendritic cell complexes in the spleen: CD8+ T cells can directly bind CD4+ T cells and modulate their response. *PloS one* **2017**, 12, e0180644, doi:10.1371/journal.pone.0180644.
 30. Beuneu, H.; Garcia, Z.; Bousso, P. Cutting edge: cognate CD4 help promotes recruitment of antigen-specific CD8 T cells around dendritic cells. *Journal of immunology* **2006**, 177, 1406-1410, doi:10.4049/jimmunol.177.3.1406.
 31. Motz, G.T.; Coukos, G. Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* **2013**, 39, 61-73, doi:10.1016/j.immuni.2013.07.005.
 32. Trombetta, E.S.; Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual review of immunology* **2005**, 23, 975-1028, doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538.

33. Guernonprez, P.; Valladeau, J.; Zitvogel, L.; Thery, C.; Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* **2002**, *20*, 621-667, doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.
34. Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* **2004**, *4*, 336-347, doi:10.1038/nri1349.
35. Waisman, A.; Lukas, D.; Clausen, B.E.; Yorgev, N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol* **2017**, *39*, 153-163, doi:10.1007/s00281-016-0583-z.
36. Kretschmer, K.; Apostolou, I.; Hawiger, D.; Khazaie, K.; Nussenzweig, M.C.; von Boehmer, H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* **2005**, *6*, 1219-1227, doi:10.1038/ni1265.
37. Fukaya, T.; Murakami, R.; Takagi, H.; Sato, K.; Sato, Y.; Otsuka, H.; Ohno, M.; Hijikata, A.; Ohara, O.; Hikida, M., et al. Conditional ablation of CD205+ conventional dendritic cells impacts the regulation of T-cell immunity and homeostasis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 11288-11293, doi:10.1073/pnas.1202208109.
38. Mathan, T.S.; Figdor, C.G.; Buschow, S.I. Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol* **2013**, *4*, 372, doi:10.3389/fimmu.2013.00372.
39. Montoya, C.J.; Jie, H.B.; Al-Harhi, L.; Mulder, C.; Patino, P.J.; Rugeles, M.T.; Krieg, A.M.; Landay, A.L.; Wilson, S.B. Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *Journal of immunology* **2006**, *177*, 1028-1039, doi:10.4049/jimmunol.177.2.1028.
40. Brigl, M.; Tatituri, R.V.; Watts, G.F.; Bhowruth, V.; Leadbetter, E.A.; Barton, N.; Cohen, N.R.; Hsu, F.F.; Besra, G.S.; Brenner, M.B. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *The Journal of experimental medicine* **2011**, *208*, 1163-1177, doi:10.1084/jem.20102555.
41. Joffre, O.P.; Segura, E.; Savina, A.; Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 557-569, doi:10.1038/nri3254.
42. Delamarre, L.; Pack, M.; Chang, H.; Mellman, I.; Trombetta, E.S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **2005**, *307*, 1630-1634, doi:10.1126/science.1108003.
43. Accapezzato, D.; Visco, V.; Francavilla, V.; Molette, C.; Donato, T.; Paroli, M.; Mondelli, M.U.; Doria, M.; Torrisi, M.R.; Barnaba, V. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *The Journal of experimental medicine* **2005**, *202*, 817-828, doi:10.1084/jem.20051106.
44. Belizaire, R.; Unanue, E.R. Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 17463-17468, doi:10.1073/pnas.0908583106.
45. Burgdorf, S.; Kautz, A.; Bohnert, V.; Knolle, P.A.; Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* **2007**, *316*, 612-616, doi:10.1126/science.1137971.
46. Rodriguez, A.; Regnault, A.; Kleijmeer, M.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* **1999**, *1*, 362-368, doi:10.1038/14058.
47. Jarvis, C.M.; Zwick, D.B.; Grim, J.C.; Alam, M.M.; Prost, L.R.; Gardiner, J.C.; Park, S.; Zimdars, L.L.; Sherer, N.M.; Kiessling, L.L. Antigen structure affects cellular routing through DC-SIGN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2019**, *116*, 14862-14867, doi:10.1073/pnas.1820165116.
48. Mo, X.Y.; Cascio, P.; Lemerise, K.; Goldberg, A.L.; Rock, K. Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *Journal of immunology* **1999**,

- 163, 5851-5859.
49. Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* **2006**, 6, 476-483, doi:10.1038/nri1845.
50. Sallusto, F.; Cella, M.; Danieli, C.; Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* **1995**, 182, 389-400, doi:10.1084/jem.182.2.389.
51. Reis e Sousa, C.; Stahl, P.D.; Austyn, J.M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *The Journal of experimental medicine* **1993**, 178, 509-519, doi:10.1084/jem.178.2.509.
52. Svensson, M.; Stockinger, B.; Wick, M.J. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *Journal of immunology* **1997**, 158, 4229-4236.
53. Theriault, J.R.; Adachi, H.; Calderwood, S.K. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *Journal of immunology* **2006**, 177, 8604-8611.
54. Trombetta, E.S.; Ebersold, M.; Garrett, W.; Pypaert, M.; Mellman, I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* **2003**, 299, 1400-1403, doi:10.1126/science.1080106.
55. Delamarre, L.; Holcombe, H.; Mellman, I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *The Journal of experimental medicine* **2003**, 198, 111-122, doi:10.1084/jem.20021542.
56. Gil-Torregrosa, B.C.; Lennon-Dumenil, A.M.; Kessler, B.; Guernonprez, P.; Ploegh, H.L.; Fruci, D.; van Endert, P.; Amigorena, S. Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *European journal of immunology* **2004**, 34, 398-407, doi:10.1002/eji.200324508.
57. Hawiger, D.; Inaba, K.; Dorsett, Y.; Guo, M.; Mahnke, K.; Rivera, M.; Ravetch, J.V.; Steinman, R.M.; Nussenzweig, M.C. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* **2001**, 194, 769-779, doi:10.1084/jem.194.6.769.
58. Takenaka, M.C.; Quintana, F.J. Tolerogenic dendritic cells. *Semin Immunopathol* **2017**, 39, 113-120, doi:10.1007/s00281-016-0587-8.
59. Probst, H.C.; McCoy, K.; Okazaki, T.; Honjo, T.; van den Broek, M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* **2005**, 6, 280-286, doi:10.1038/ni1165.
60. Schildknecht, A.; Brauer, S.; Brenner, C.; Lahl, K.; Schild, H.; Sparwasser, T.; Probst, H.C.; van den Broek, M. FoxP3⁺ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8⁺ T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, 199-203, doi:10.1073/pnas.0910620107.
61. Yogev, N.; Frommer, F.; Lukas, D.; Kautz-Neu, K.; Karam, K.; Ielo, D.; von Stebut, E.; Probst, H.C.; van den Broek, M.; Riethmacher, D., et al. Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells. *Immunity* **2012**, 37, 264-275, doi:10.1016/j.immuni.2012.05.025.
62. Escors, D.; Gato-Canas, M.; Zuazo, M.; Arasanz, H.; Garcia-Granda, M.J.; Vera, R.; Kochan, G. The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduct Target Ther* **2018**, 3, 26, doi:10.1038/s41392-018-0022-9.
63. Joyce, J.A.; Fearon, D.T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **2015**, 348, 74-80, doi:10.1126/science.aaa6204.
64. Galli, F.; Aguilera, J.V.; Palermo, B.; Markovic, S.N.; Nistico, P.; Signore, A. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* **2020**, 39, 89, doi:10.1186/s13046-020-01586-y.
65. Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, 21, 309-322, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.

66. Pickup, M.W.; Mouw, J.K.; Weaver, V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* **2014**, *15*, 1243-1253, doi:10.15252/embr.201439246.
67. Buck, M.D.; Sowell, R.T.; Kaech, S.M.; Pearce, E.L. Metabolic Instruction of Immunity. *Cell* **2017**, *169*, 570-586, doi:10.1016/j.cell.2017.04.004.
68. Sprooten, J.; Ceusters, J.; Coosemans, A.; Agostinis, P.; De Vleeschouwer, S.; Zitvogel, L.; Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Garg, A.D. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1638212, doi:10.1080/2162402X.2019.1638212.
69. Zhang, L.; Conejo-Garcia, J.R.; Katsaros, D.; Gimotty, P.A.; Massobrio, M.; Regnani, G.; Makrigiannakis, A.; Gray, H.; Schlienger, K.; Liebman, M.N., et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine* **2003**, *348*, 203-213, doi:10.1056/NEJMoa020177.
70. Johansson-Percival, A.; He, B.; Ganss, R. Immunomodulation of Tumor Vessels: It Takes Two to Tango. *Trends in immunology* **2018**, *39*, 801-814, doi:10.1016/j.it.2018.08.001.
71. Feig, C.; Jones, J.O.; Kraman, M.; Wells, R.J.; Deonaraine, A.; Chan, D.S.; Connell, C.M.; Roberts, E.W.; Zhao, Q.; Caballero, O.L., et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 20212-20217, doi:10.1073/pnas.1320318110.
72. Binnewies, M.; Roberts, E.W.; Kersten, K.; Chan, V.; Fearon, D.F.; Merad, M.; Coussens, L.M.; Gabrilovich, D.I.; Ostrand-Rosenberg, S.; Hedrick, C.C., et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine* **2018**, *24*, 541-550, doi:10.1038/s41591-018-0014-x.
73. Vinay, D.S.; Ryan, E.P.; Pawelec, G.; Talib, W.H.; Stagg, J.; Elkord, E.; Lichtor, T.; Decker, W.K.; Whelan, R.L.; Kumara, H., et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in cancer biology* **2015**, *35 Suppl*, S185-S198, doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.004.
74. Haanen, J.B.; Robert, C. Immune Checkpoint Inhibitors. *Prog Tumor Res* **2015**, *42*, 55-66, doi:10.1159/000437178.
75. Postow, M.A.; Callahan, M.K.; Wolchok, J.D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 1974-1982, doi:10.1200/JCO.2014.59.4358.
76. Topalian, S.L.; Taube, J.M.; Anders, R.A.; Pardoll, D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **2016**, *16*, 275-287, doi:10.1038/nrc.2016.36.
77. Sharma, P.; Allison, J.P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **2015**, *348*, 56-61, doi:10.1126/science.aaa8172.
78. Palucka, K.; Banchereau, J. Diversity and collaboration for effective immunotherapy. *Nature medicine* **2016**, *22*, 1390-1391, doi:10.1038/nm.4249.
79. Garg, A.D.; Vandenberk, L.; Van Woensel, M.; Belmans, J.; Schaaf, M.; Boon, L.; De Vleeschouwer, S.; Agostinis, P. Preclinical efficacy of immune-checkpoint monotherapy does not recapitulate corresponding biomarkers-based clinical predictions in glioblastoma. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1295903, doi:10.1080/2162402X.2017.1295903.
80. Anguille, S.; Smits, E.L.; Lion, E.; van Tendeloo, V.F.; Berneman, Z.N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet. Oncology* **2014**, *15*, e257-267, doi:10.1016/S1470-2045(13)70585-0.
81. Garg, A.D.; Vara Perez, M.; Schaaf, M.; Agostinis, P.; Zitvogel, L.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Trial watch: Dendritic cell-based anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1328341, doi:10.1080/2162402X.2017.1328341.
82. Christofi, T.; Baritaki, S.; Falzone, L.; Libra, M.; Zaravinos, A. Current Perspectives in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11101472.
83. Rosenberg, S.A.; Yang, J.C.; Sherry, R.M.; Kammula, U.S.; Hughes, M.S.; Phan, G.Q.; Citrin,

- D.E.; Restifo, N.P.; Robbins, P.F.; Wunderlich, J.R., et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2011**, *17*, 4550-4557, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
84. Besser, M.J.; Shapira-Frommer, R.; Itzhaki, O.; Treves, A.J.; Zippel, D.B.; Levy, D.; Kubi, A.; Shoshani, N.; Zikich, D.; Ohayon, Y., et al. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma: intent-to-treat analysis and efficacy after failure to prior immunotherapies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2013**, *19*, 4792-4800, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0380.
 85. Sukari, A.; Abdallah, N.; Nagasaka, M. Unleash the power of the mighty T cells-basis of adoptive cellular therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **2019**, *136*, 1-12, doi:10.1016/j.critrevonc.2019.01.015.
 86. Debets, R.; Donnadieu, E.; Chouaib, S.; Coukos, G. TCR-engineered T cells to treat tumors: Seeing but not touching? *Seminars in immunology* **2016**, *28*, 10-21, doi:10.1016/j.smim.2016.03.002.
 87. Spear, T.T.; Nagato, K.; Nishimura, M.I. Strategies to genetically engineer T cells for cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2016**, *65*, 631-649, doi:10.1007/s00262-016-1842-5.
 88. Zhang, J.; Wang, L. The Emerging World of TCR-T Cell Trials Against Cancer: A Systematic Review. *Technol Cancer Res Treat* **2019**, *18*, 1533033819831068, doi:10.1177/1533033819831068.
 89. Leung, W.; Heslop, H.E. Adoptive Immunotherapy with Antigen-Specific T Cells Expressing a Native TCR. *Cancer Immunol Res* **2019**, *7*, 528-533, doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0888.
 90. Wolf, B.; Zimmermann, S.; Arber, C.; Irving, M.; Trueb, L.; Coukos, G. Safety and Tolerability of Adoptive Cell Therapy in Cancer. *Drug Saf* **2019**, *42*, 315-334, doi:10.1007/s40264-018-0779-3.
 91. Sharpe, M.E. T-cell Immunotherapies and the Role of Nonclinical Assessment: The Balance between Efficacy and Pathology. *Toxicol Pathol* **2018**, *46*, 131-146, doi:10.1177/0192623317752101.
 92. Xia, A.L.; Wang, X.C.; Lu, Y.J.; Lu, X.J.; Sun, B. Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors: challenges and opportunities. *Oncotarget* **2017**, *8*, 90521-90531, doi:10.18632/oncotarget.19361.
 93. Zabel, M.; Tauber, P.A.; Pickl, W.F. The making and function of CAR cells. *Immunology letters* **2019**, *212*, 53-69, doi:10.1016/j.imlet.2019.06.002.
 94. Gross, G.; Waks, T.; Eshhar, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 10024-10028, doi:10.1073/pnas.86.24.10024.
 95. Brocker, T.; Karjalainen, K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **1995**, *181*, 1653-1659, doi:10.1084/jem.181.5.1653.
 96. Lamers, C.H.; Sleijfer, S.; Vulto, A.G.; Kruit, W.H.; Kliffen, M.; Debets, R.; Gratama, J.W.; Stoter, G.; Oosterwijk, E. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2006**, *24*, e20-22, doi:10.1200/JCO.2006.05.9964.
 97. Till, B.G.; Jensen, M.C.; Wang, J.; Chen, E.Y.; Wood, B.L.; Greisman, H.A.; Qian, X.; James, S.E.; Raubitschek, A.; Forman, S.J., et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* **2008**, *112*, 2261-2271, doi:10.1182/blood-2007-12-128843.
 98. Kochenderfer, J.N.; Wilson, W.H.; Janik, J.E.; Dudley, M.E.; Stetler-Stevenson, M.; Feldman, S.A.; Maric, I.; Raffeld, M.; Nathan, D.A.; Lanier, B.J., et al. Eradication of B-lineage cells and

- regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* **2010**, *116*, 4099-4102, doi:10.1182/blood-2010-04-281931.
99. Porter, D.L.; Kalos, M.; Zheng, Z.; Levine, B.; June, C. Chimeric Antigen Receptor Therapy for B-cell Malignancies. *J Cancer* **2011**, *2*, 331-332, doi:10.7150/jca.2.331.
 100. Buning, H.; Uckert, W.; Cichutek, K.; Hawkins, R.E.; Abken, H. Do CARs need a driver's license? Adoptive cell therapy with chimeric antigen receptor-redirected T cells has caused serious adverse events. *Hum Gene Ther* **2010**, *21*, 1039-1042, doi:10.1089/hum.2010.131.
 101. Yanez, L.; Sanchez-Escamilla, M.; Perales, M.A. CAR T Cell Toxicity: Current Management and Future Directions. *Hemasphere* **2019**, *3*, e186, doi:10.1097/HS9.0000000000000186.
 102. Maude, S.L.; Frey, N.; Shaw, P.A.; Aplenc, R.; Barrett, D.M.; Bunin, N.J.; Chew, A.; Gonzalez, V.E.; Zheng, Z.; Lacey, S.F., et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine* **2014**, *371*, 1507-1517, doi:10.1056/NEJMoa1407222.
 103. Bonifant, C.L.; Jackson, H.J.; Brentjens, R.J.; Curran, K.J. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* **2016**, *3*, 16011, doi:10.1038/mto.2016.11.
 104. Gust, J.; Finney, O.C.; Li, D.; Brakke, H.M.; Hicks, R.M.; Futrell, R.B.; Gamble, D.N.; Rawlings-Rhea, S.D.; Khalatbari, H.K.; Ishak, G.E., et al. Glial injury in neurotoxicity after pediatric CD19-directed chimeric antigen receptor T cell therapy. *Annals of neurology* **2019**, *86*, 42-54, doi:10.1002/ana.25502.
 105. Neelapu, S.S.; Tummala, S.; Kebriaei, P.; Wierda, W.; Gutierrez, C.; Locke, F.L.; Komanduri, K.V.; Lin, Y.; Jain, N.; Daver, N., et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, 47-62, doi:10.1038/nrclinonc.2017.148.
 106. Topalian, S.L.; Weiner, G.J.; Pardoll, D.M. Cancer immunotherapy comes of age. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2011**, *29*, 4828-4836, doi:10.1200/JCO.2011.38.0899.
 107. Moynihan, K.D.; Opel, C.F.; Szeto, G.L.; Tzeng, A.; Zhu, E.F.; Engreitz, J.M.; Williams, R.T.; Rakhra, K.; Zhang, M.H.; Rothschilds, A.M., et al. Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nature medicine* **2016**, *22*, 1402-1410, doi:10.1038/nm.4200.
 108. Apostolopoulos, V.; Thalhammer, T.; Tzakos, A.G.; Stojanovska, L. Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development. *J Drug Deliv* **2013**, *2013*, 869718, doi:10.1155/2013/869718.
 109. Tacken, P.J.; Figdor, C.G. Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Seminars in immunology* **2011**, *23*, 12-20, doi:10.1016/j.smim.2011.01.001.
 110. Santos, P.M.; Butterfield, L.H. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *Journal of immunology* **2018**, *200*, 443-449, doi:10.4049/jimmunol.1701024.
 111. Cerboni, S.; Gentili, M.; Manel, N. Diversity of pathogen sensors in dendritic cells. *Adv Immunol* **2013**, *120*, 211-237, doi:10.1016/B978-0-12-417028-5.00008-9.
 112. Gallucci, S.; Matzinger, P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* **2001**, *13*, 114-119, doi:10.1016/s0952-7915(00)00191-6.
 113. Coffman, R.L.; Sher, A.; Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **2010**, *33*, 492-503, doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002.
 114. Cyster, J.G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *The Journal of experimental medicine* **1999**, *189*, 447-450, doi:10.1084/jem.189.3.447.
 115. Randolph, G.J.; Angeli, V.; Swartz, M.A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 617-628, doi:10.1038/nri1670.
 116. Morse, M.A.; Chapman, R.; Powderly, J.; Blackwell, K.; Keler, T.; Green, J.; Riggs, R.; He, L.Z.; Ramakrishna, V.; Vitale, L., et al. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self-antigens in cancer

- patients. *Clin Cancer Res* **2011**, 17, 4844-4853, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0891.
117. Somaiah, N.; Block, M.S.; Kim, J.W.; Shapiro, G.I.; Do, K.T.; Hwu, P.; Eder, J.P.; Jones, R.L.; Lu, H.; Ter Meulen, J.H., et al. First-in-Class, First-in-Human Study Evaluating LV305, a Dendritic-Cell Tropic Lentiviral Vector, in Sarcoma and Other Solid Tumors Expressing NY-ESO-1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2019**, 25, 5808-5817, doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1025.
 118. Gargett, T.; Abbas, M.N.; Rolan, P.; Price, J.D.; Gosling, K.M.; Ferrante, A.; Ruzskiewicz, A.; Atmosukarto, I.I.C.; Altin, J.; Parish, C.R., et al. Phase I trial of Lipovaxin-MM, a novel dendritic cell-targeted liposomal vaccine for malignant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **2018**, 67, 1461-1472, doi:10.1007/s00262-018-2207-z.
 119. Dhodapkar, M.V.; Sznol, M.; Zhao, B.; Wang, D.; Carvajal, R.D.; Keohan, M.L.; Chuang, E.; Sanborn, R.E.; Lutzky, J.; Powderly, J., et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* **2014**, 6, 232ra251, doi:10.1126/scitranslmed.3008068.
 120. Maki, R.G.; Livingston, P.O.; Lewis, J.J.; Janetzki, S.; Klimstra, D.; Desantis, D.; Srivastava, P.K.; Brennan, M.F. A phase I pilot study of autologous heat shock protein vaccine HSPPC-96 in patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* **2007**, 52, 1964-1972, doi:10.1007/s10620-006-9205-2.
 121. Ji, N.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Xie, J.; Wang, Y.; Hao, S.; Gao, Z. Heat shock protein peptide complex-96 vaccination for newly diagnosed glioblastoma: a phase I, single-arm trial. *JCI Insight* **2018**, 3, doi:10.1172/jci.insight.99145.
 122. Bloch, O.; Lim, M.; Sughrue, M.E.; Komotar, R.J.; Abrahams, J.M.; O'Rourke, D.M.; D'Ambrosio, A.; Bruce, J.N.; Parsa, A.T. Autologous Heat Shock Protein Peptide Vaccination for Newly Diagnosed Glioblastoma: Impact of Peripheral PD-L1 Expression on Response to Therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2017**, 23, 3575-3584, doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1369.
 123. Bloch, O.; Crane, C.A.; Fuks, Y.; Kaur, R.; Aghi, M.K.; Berger, M.S.; Butowski, N.A.; Chang, S.M.; Clarke, J.L.; McDermott, M.W., et al. Heat-shock protein peptide complex-96 vaccination for recurrent glioblastoma: a phase II, single-arm trial. *Neuro Oncol* **2014**, 16, 274-279, doi:10.1093/neuonc/not203.
 124. Einstein, M.H.; Kadish, A.S.; Burk, R.D.; Kim, M.Y.; Wadler, S.; Streicher, H.; Goldberg, G.L.; Runowicz, C.D. Heat shock fusion protein-based immunotherapy for treatment of cervical intraepithelial neoplasia III. *Gynecol Oncol* **2007**, 106, 453-460, doi:10.1016/j.ygyno.2007.04.038.
 125. Van Doorslaer, K.; Reimers, L.L.; Studentsov, Y.Y.; Einstein, M.H.; Burk, R.D. Serological response to an HPV16 E7 based therapeutic vaccine in women with high-grade cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* **2010**, 116, 208-212, doi:10.1016/j.ygyno.2009.05.044.
 126. Pilla, L.; Patuzzo, R.; Rivoltini, L.; Maio, M.; Pennacchioli, E.; Lamaj, E.; Maurichi, A.; Massarut, S.; Marchiano, A.; Santantonio, C., et al. A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon-alpha in metastatic melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2006**, 55, 958-968, doi:10.1007/s00262-005-0084-8.
 127. Russo, V.; Pilla, L.; Lunghi, F.; Crocchiolo, R.; Greco, R.; Ciceri, F.; Maggioni, D.; Fontana, R.; Mukenge, S.; Rivoltini, L., et al. Clinical and immunologic responses in melanoma patients vaccinated with MAGE-A3-genetically modified lymphocytes. *International journal of cancer* **2013**, 132, 2557-2566, doi:10.1002/ijc.27939.
 128. Snider, D.P.; Kaubisch, A.; Segal, D.M. Enhanced antigen immunogenicity induced by bispecific antibodies. *The Journal of experimental medicine* **1990**, 171, 1957-1963, doi:10.1084/jem.171.6.1957.
 129. de Jong, J.M.; Schuurhuis, D.H.; Ioan-Facsinay, A.; van der Voort, E.I.; Huizinga, T.W.; Ossendorp, F.; Toes, R.E.; Verbeek, J.S. Murine Fc receptors for IgG are redundant in facilitating

- presentation of immune complex derived antigen to CD8⁺ T cells in vivo. *Molecular immunology* **2006**, *43*, 2045-2050, doi:10.1016/j.molimm.2006.01.002.
130. Berlyn, K.A.; Schultes, B.; Leveugle, B.; Noujaim, A.A.; Alexander, R.B.; Mann, D.L. Generation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses by dendritic cells armed with PSA/anti-PSA (antigen/antibody) complexes. *Clin Immunol* **2001**, *101*, 276-283, doi:10.1006/clim.2001.5115.
 131. van Leeuwen-Kerkhoff, N.; Lundberg, K.; Westers, T.M.; Kordasti, S.; Bontkes, H.J.; de Gruijl, T.D.; Lindstedt, M.; van de Loosdrecht, A.A. Transcriptional profiling reveals functional dichotomy between human slan(+) non-classical monocytes and myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* **2017**, *102*, 1055-1068, doi:10.1189/jlb.3MA0117-037R.
 132. Calzetti, F.; Tamassia, N.; Micheletti, A.; Finotti, G.; Bianchetto-Aguilera, F.; Cassatella, M.A. Human dendritic cell subset 4 (DC4) correlates to a subset of CD14(dim/-)CD16(++) monocytes. *J Allergy Clin Immunol* **2018**, *141*, 2276-2279 e2273, doi:10.1016/j.jaci.2017.12.988.
 133. Turville, S.G.; Cameron, P.U.; Handley, A.; Lin, G.; Pohlmann, S.; Doms, R.W.; Cunningham, A.L. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nature immunology* **2002**, *3*, 975-983, doi:10.1038/ni841.
 134. Ochoa, M.T.; Loncaric, A.; Krutzik, S.R.; Becker, T.C.; Modlin, R.L. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1⁺ dendritic cells and CD209⁺ macrophages. *J Invest Dermatol* **2008**, *128*, 2225-2231, doi:10.1038/jid.2008.56.
 135. Bigley, V.; McGovern, N.; Milne, P.; Dickinson, R.; Pagan, S.; Cookson, S.; Haniffa, M.; Collin, M. Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c⁺ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141^{high} XCR1⁺ dendritic cells. *J Leukoc Biol* **2015**, *97*, 627-634, doi:10.1189/jlb.1HI0714-351R.
 136. Wollenberg, A.; Mommaas, M.; Oppel, T.; Schottdorf, E.M.; Gunther, S.; Moderer, M. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* **2002**, *118*, 327-334, doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x.
 137. Mahnke, K.; Guo, M.; Lee, S.; Sepulveda, H.; Swain, S.L.; Nussenzweig, M.; Steinman, R.M. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *The Journal of cell biology* **2000**, *151*, 673-684, doi:10.1083/jcb.151.3.673.
 138. Rhodes, J.W.; Tong, O.; Harman, A.N.; Turville, S.G. Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection. *Front Immunol* **2019**, *10*, 1088, doi:10.3389/fimmu.2019.01088.
 139. Kato, M.; McDonald, K.J.; Khan, S.; Ross, I.L.; Vuckovic, S.; Chen, K.; Munster, D.; MacDonald, K.P.; Hart, D.N. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International immunology* **2006**, *18*, 857-869, doi:10.1093/intimm/dx1022.
 140. Shrimpton, R.E.; Butler, M.; Morel, A.S.; Eren, E.; Hue, S.S.; Ritter, M.A. CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular immunology* **2009**, *46*, 1229-1239, doi:10.1016/j.molimm.2008.11.016.
 141. Bonifaz, L.C.; Bonnyay, D.P.; Charalambous, A.; Darguste, D.I.; Fujii, S.; Soares, H.; Brimnes, M.K.; Molledo, B.; Moran, T.M.; Steinman, R.M. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *The Journal of experimental medicine* **2004**, *199*, 815-824, doi:10.1084/jem.20032220.
 142. Johnson, T.S.; Mahnke, K.; Storn, V.; Schonfeld, K.; Ring, S.; Nettelbeck, D.M.; Haisma, H.J.; Le Gall, F.; Kontermann, R.E.; Enk, A.H. Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2008**, *14*, 8169-8177, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1474.
 143. Cao, J.; Jin, Y.; Li, W.; Zhang, B.; He, Y.; Liu, H.; Xia, N.; Wei, H.; Yan, J. DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor immunity in mice. *BMC Immunol* **2013**, *14*, 39, doi:10.1186/1471-2172-14-39.

144. Wang, B.; Kuroiwa, J.M.; He, L.Z.; Charalambous, A.; Keler, T.; Steinman, R.M. The human cancer antigen mesothelin is more efficiently presented to the mouse immune system when targeted to the DEC-205/CD205 receptor on dendritic cells. *Ann N Y Acad Sci* **2009**, *1174*, 6-17, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04933.x.
145. Hawiger, D.; Masilamani, R.F.; Bettelli, E.; Kuchroo, V.K.; Nussenzweig, M.C. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* **2004**, *20*, 695-705, doi:10.1016/j.immuni.2004.05.002.
146. Iberg, C.A.; Hawiger, D. Advancing immunomodulation by in vivo antigen delivery to DEC-205 and other cell surface molecules using recombinant chimeric antibodies. *Int Immunopharmacol* **2019**, *73*, 575-580, doi:10.1016/j.intimp.2019.05.037.
147. Neubert, K.; Lehmann, C.H.; Heger, L.; Baranska, A.; Staedtler, A.M.; Buchholz, V.R.; Yamazaki, S.; Heidkamp, G.F.; Eissing, N.; Zebroski, H., et al. Antigen delivery to CD11c+CD8- dendritic cells induces protective immune responses against experimental melanoma in mice in vivo. *Journal of immunology* **2014**, *192*, 5830-5838, doi:10.4049/jimmunol.1300975.
148. Wang, B.; Zaidi, N.; He, L.Z.; Zhang, L.; Kuroiwa, J.M.; Keler, T.; Steinman, R.M. Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer Res* **2012**, *14*, R39, doi:10.1186/bcr3135.
149. Cheong, C.; Choi, J.H.; Vitale, L.; He, L.Z.; Trumpfheller, C.; Bozzacco, L.; Do, Y.; Nchinda, G.; Park, S.H.; Dandamudi, D.B., et al. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood* **2010**, *116*, 3828-3838, doi:10.1182/blood-2010-06-288068.
150. Caminschi, I.; Proietto, A.I.; Ahmet, F.; Kitsoulis, S.; Shin Teh, J.; Lo, J.C.; Rizzitelli, A.; Wu, L.; Vremec, D.; van Dommelen, S.L., et al. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* **2008**, *112*, 3264-3273, doi:10.1182/blood-2008-05-155176.
151. Poulin, L.F.; Salio, M.; Griessinger, E.; Anjos-Afonso, F.; Craciun, L.; Chen, J.L.; Keller, A.M.; Joffre, O.; Zelenay, S.; Nye, E., et al. Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **2010**, *207*, 1261-1271, doi:10.1084/jem.20092618.
152. Robbins, S.H.; Walzer, T.; Dembele, D.; Thibault, C.; Defays, A.; Bessou, G.; Xu, H.; Vivier, E.; Sellars, M.; Pierre, P., et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* **2008**, *9*, R17, doi:10.1186/gb-2008-9-1-r17.
153. Bachem, A.; Guttler, S.; Hartung, E.; Ebstein, F.; Schaefer, M.; Tannert, A.; Salama, A.; Movassaghi, K.; Opitz, C.; Mages, H.W., et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **2010**, *207*, 1273-1281, doi:10.1084/jem.20100348.
154. Jongbloed, S.L.; Kassianos, A.J.; McDonald, K.J.; Clark, G.J.; Ju, X.; Angel, C.E.; Chen, C.J.; Dunbar, P.R.; Wadley, R.B.; Jeet, V., et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine* **2010**, *207*, 1247-1260, doi:10.1084/jem.20092140.
155. Schreiber, G.; Klinkenberg, L.J.; Cruz, L.J.; Tacken, P.J.; Tel, J.; Kreutz, M.; Adema, G.J.; Brown, G.D.; Figdor, C.G.; de Vries, I.J. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* **2012**, *119*, 2284-2292, doi:10.1182/blood-2011-08-373944.
156. Li, J.; Ahmet, F.; Sullivan, L.C.; Brooks, A.G.; Kent, S.J.; De Rose, R.; Salazar, A.M.; Reis e Sousa, C.; Shortman, K.; Lahoud, M.H., et al. Antibodies targeting Clec9A promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates. *European journal of immunology* **2015**, *45*, 854-864, doi:10.1002/eji.201445127.

157. Tullett, K.M.; Leal Rojas, I.M.; Minoda, Y.; Tan, P.S.; Zhang, J.G.; Smith, C.; Khanna, R.; Shortman, K.; Caminschi, I.; Lahoud, M.H., et al. Targeting CLEC9A delivers antigen to human CD141(+) DC for CD4(+) and CD8(+) T cell recognition. *JCI Insight* **2016**, *1*, e87102, doi:10.1172/jci.insight.87102.
158. Murphy, J.E.; Tedbury, P.R.; Homer-Vanniasinkam, S.; Walker, J.H.; Ponnambalam, S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* **2005**, *182*, 1-15, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.036.
159. Bansal, P.; Mukherjee, P.; Basu, S.K.; George, A.; Bal, V.; Rath, S. MHC class I-restricted presentation of maleylated protein binding to scavenger receptors. *Journal of immunology* **1999**, *162*, 4430-4437.
160. Vandaveer, S.S.; Erf, G.F.; Durdik, J.M. Avian T helper one/two immune response balance can be shifted toward inflammation by antigen delivery to scavenger receptors. *Poult Sci* **2001**, *80*, 172-181, doi:10.1093/ps/80.2.172.
161. Kissick, H.T.; Dunn, L.K.; Ghosh, S.; Nechama, M.; Kobzik, L.; Arredouani, M.S. The scavenger receptor MARCO modulates TLR-induced responses in dendritic cells. *PloS one* **2014**, *9*, e104148, doi:10.1371/journal.pone.0104148.
162. Mukhopadhyay, S.; Varin, A.; Chen, Y.; Liu, B.; Tryggvason, K.; Gordon, S. SR-A/MARCO-mediated ligand delivery enhances intracellular TLR and NLR function, but ligand scavenging from cell surface limits TLR4 response to pathogens. *Blood* **2011**, *117*, 1319-1328, doi:10.1182/blood-2010-03-276733.
163. Abraham, R.; Singh, N.; Mukhopadhyay, A.; Basu, S.K.; Bal, V.; Rath, S. Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by maleylation to target scavenger receptors on macrophages. *Journal of immunology* **1995**, *154*, 1-8.
164. Yin, W.; Gorvel, L.; Zurawski, S.; Li, D.; Ni, L.; Duluc, D.; Upchurch, K.; Kim, J.; Gu, C.; Ouedraogo, R., et al. Functional Specialty of CD40 and Dendritic Cell Surface Lectins for Exogenous Antigen Presentation to CD8(+) and CD4(+) T Cells. *EBioMedicine* **2016**, *5*, 46-58, doi:10.1016/j.ebiom.2016.01.029.
165. Zhang, Z.; Chen, J.; Ding, L.; Jin, H.; Lovell, J.F.; Corbin, I.R.; Cao, W.; Lo, P.C.; Yang, M.; Tsao, M.S., et al. HDL-mimicking peptide-lipid nanoparticles with improved tumor targeting. *Small* **2010**, *6*, 430-437, doi:10.1002/smll.200901515.
166. Qian, Y.; Jin, H.; Qiao, S.; Dai, Y.; Huang, C.; Lu, L.; Luo, Q.; Zhang, Z. Targeting dendritic cells in lymph node with an antigen peptide-based nanovaccine for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **2016**, *98*, 171-183, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.05.008.
167. Ellis, R.J. Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Advances in experimental medicine and biology* **2007**, *594*, 1-13, doi:10.1007/978-0-387-39975-1_1.
168. Udonon, H.; Srivastava, P.K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *The Journal of experimental medicine* **1993**, *178*, 1391-1396.
169. Blachere, N.E.; Li, Z.; Chandawarkar, R.Y.; Suto, R.; Jaikaria, N.S.; Basu, S.; Udonon, H.; Srivastava, P.K. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* **1997**, *186*, 1315-1322.
170. Banerjee, S.; Lin, C.F.; Skinner, K.A.; Schiffhauer, L.M.; Peacock, J.; Hicks, D.G.; Redmond, E.M.; Morrow, D.; Huston, A.; Shayne, M., et al. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer research* **2011**, *71*, 318-327, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1778.
171. Miller-Graziano, C.L.; De, A.; Laudanski, K.; Herrmann, T.; Bandyopadhyay, S. HSP27: an anti-inflammatory and immunomodulatory stress protein acting to dampen immune function. *Novartis Foundation symposium* **2008**, *291*, 196-208; discussion 208-111, 221-194.
172. Rayner, K.; Chen, Y.X.; McNulty, M.; Simard, T.; Zhao, X.; Wells, D.J.; de Belleruche, J.; O'Brien, E.R. Extracellular release of the atheroprotective heat shock protein 27 is mediated by estrogen and competitively inhibits acLDL binding to scavenger receptor-A. *Circulation*

- research* **2008**, 103, 133-141, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.172155.
173. De, A.K.; Kodys, K.M.; Yeh, B.S.; Miller-Graziano, C. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *Journal of immunology* **2000**, 165, 3951-3958.
 174. de Kleer, I.; Vercoulen, Y.; Klein, M.; Meeding, J.; Albani, S.; van der Zee, R.; Sawitzki, B.; Hamann, A.; Kuis, W.; Prakken, B. CD30 discriminates heat shock protein 60-induced FOXP3+ CD4+ T cells with a regulatory phenotype. *Journal of immunology* **2010**, 185, 2071-2079, doi:10.4049/jimmunol.0901901.
 175. Aalberse, J.A.; Kapitein, B.; de Roock, S.; Klein, M.R.; de Jager, W.; van der Zee, R.; Hoekstra, M.O.; van Wijk, F.; Prakken, B.J. Cord blood CD4+ T cells respond to self heat shock protein 60 (HSP60). *PloS one* **2011**, 6, e24119, doi:10.1371/journal.pone.0024119.
 176. Cohen-Sfady, M.; Nussbaum, G.; Pevsner-Fischer, M.; Mor, F.; Carmi, P.; Zanin-Zhorov, A.; Lider, O.; Cohen, I.R. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *Journal of immunology* **2005**, 175, 3594-3602.
 177. Ueki, K.; Tabeta, K.; Yoshie, H.; Yamazaki, K. Self-heat shock protein 60 induces tumour necrosis factor-alpha in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease. *Clinical and experimental immunology* **2002**, 127, 72-77.
 178. Gastpar, R.; Gehrmann, M.; Bausero, M.A.; Asea, A.; Gross, C.; Schroeder, J.A.; Multhoff, G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer research* **2005**, 65, 5238-5247, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3804.
 179. Vega, V.L.; Rodriguez-Silva, M.; Frey, T.; Gehrmann, M.; Diaz, J.C.; Steinem, C.; Multhoff, G.; Arispe, N.; De Maio, A. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *Journal of immunology* **2008**, 180, 4299-4307.
 180. Gehrmann, M.; Marienhagen, J.; Eichholtz-Wirth, H.; Fritz, E.; Ellwart, J.; Jaattela, M.; Zilch, T.; Multhoff, G. Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell death and differentiation* **2005**, 12, 38-51, doi:10.1038/sj.cdd.4401510.
 181. Luo, X.; Zuo, X.; Zhou, Y.; Zhang, B.; Shi, Y.; Liu, M.; Wang, K.; McMillian, D.R.; Xiao, X. Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor-alpha induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis research & therapy* **2008**, 10, R41, doi:10.1186/ar2399.
 182. Stocki, P.; Wang, X.N.; Dickinson, A.M. Inducible heat shock protein 70 reduces T cell responses and stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* **2012**, 287, 12387-12394, doi:10.1074/jbc.M111.307579.
 183. Bausinger, H.; Lipsker, D.; Ziylan, U.; Manie, S.; Briand, J.P.; Cazenave, J.P.; Muller, S.; Haeuw, J.F.; Ravanat, C.; de la Salle, H., et al. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *European journal of immunology* **2002**, 32, 3708-3713, doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3708::AID-IMMU3708>3.0.CO;2-C.
 184. Pockley, A.G.; Muthana, M.; Calderwood, S.K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in biochemical sciences* **2008**, 33, 71-79, doi:10.1016/j.tibs.2007.10.005.
 185. Facciponte, J.G.; Wang, X.Y.; Subjeck, J.R. Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *European journal of immunology* **2007**, 37, 2268-2279, doi:10.1002/eji.200737127.
 186. Tang, D.; Khaleque, M.A.; Jones, E.L.; Theriault, J.R.; Li, C.; Wong, W.H.; Stevenson, M.A.; Calderwood, S.K. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell stress & chaperones* **2005**, 10, 46-58.
 187. Calderwood, S.K.; Gong, J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in biochemical sciences* **2016**, 41, 311-323, doi:10.1016/j.tibs.2016.01.003.

188. Calderwood, S.K.; Mambula, S.S.; Gray, P.J., Jr.; Theriault, J.R. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS letters* **2007**, *581*, 3689-3694, doi:10.1016/j.febslet.2007.04.044.
189. Srivastava, P.K.; DeLeo, A.B.; Old, L.J. Tumor rejection antigens of chemically induced sarcomas of inbred mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 3407-3411.
190. Maki, R.G.; Old, L.J.; Srivastava, P.K. Human homologue of murine tumor rejection antigen gp96: 5'-regulatory and coding regions and relationship to stress-induced proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 5658-5662.
191. Blachere, N.E.; Udonon, H.; Janetzki, S.; Li, Z.; Heike, M.; Srivastava, P.K. Heat shock protein vaccines against cancer. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy* **1993**, *14*, 352-356.
192. Ishii, T.; Udonon, H.; Yamano, T.; Ohta, H.; Uenaka, A.; Ono, T.; Hizuta, A.; Tanaka, N.; Srivastava, P.K.; Nakayama, E. Isolation of MHC class I-restricted tumor antigen peptide and its precursors associated with heat shock proteins hsp70, hsp90, and gp96. *Journal of immunology* **1999**, *162*, 1303-1309.
193. Stocki, P.; Morris, N.J.; Preisinger, C.; Wang, X.N.; Kolch, W.; Multhoff, G.; Dickinson, A.M. Identification of potential HLA class I and class II epitope precursors associated with heat shock protein 70 (HSPA). *Cell stress & chaperones* **2010**, *15*, 729-741, doi:10.1007/s12192-010-0184-z.
194. Noessner, E.; Gastpar, R.; Milani, V.; Brandl, A.; Hutzler, P.J.; Kuppner, M.C.; Roos, M.; Kremmer, E.; Asea, A.; Calderwood, S.K., et al. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *Journal of immunology* **2002**, *169*, 5424-5432.
195. Belli, F.; Testori, A.; Rivoltini, L.; Maio, M.; Andreola, G.; Sertoli, M.R.; Gallino, G.; Piris, A.; Cattelan, A.; Lazzari, I., et al. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunologic findings. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2002**, *20*, 4169-4180, doi:10.1200/JCO.2002.09.134.
196. Mazzaferro, V.; Coppa, J.; Carrabba, M.G.; Rivoltini, L.; Schiavo, M.; Regalia, E.; Mariani, L.; Camerini, T.; Marchiano, A.; Andreola, S., et al. Vaccination with autologous tumor-derived heat-shock protein gp96 after liver resection for metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2003**, *9*, 3235-3245.
197. Randazzo, M.; Terness, P.; Opelz, G.; Kleist, C. Active-specific immunotherapy of human cancers with the heat shock protein Gp96-revisited. *International journal of cancer* **2012**, *130*, 2219-2231, doi:10.1002/ijc.27332.
198. Gancberg, D.; Di Leo, A.; Cardoso, F.; Rouas, G.; Pedrocchi, M.; Paesmans, M.; Verhest, A.; Bernard-Marty, C.; Piccart, M.J.; Larsimont, D. Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2002**, *13*, 1036-1043.
199. Ito, H.; Hatori, M.; Kinugasa, Y.; Irie, T.; Tachikawa, T.; Nagumo, M. Comparison of the expression profile of metastasis-associated genes between primary and circulating cancer cells in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer research* **2003**, *23*, 1425-1431.
200. Flynn, G.C.; Chappell, T.G.; Rothman, J.E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* **1989**, *245*, 385-390.
201. Staib, F.; Distler, M.; Bethke, K.; Schmitt, U.; Galle, P.R.; Heike, M. Cross-presentation of human melanoma peptide antigen MART-1 to CTLs from in vitro reconstituted gp96/MART-1 complexes. *Cancer immunity* **2004**, *4*, 3.
202. Ciupitu, A.M.; Petersson, M.; O'Donnell, C.L.; Williams, K.; Jindal, S.; Kiessling, R.; Welsh, R.M. Immunization with a lymphocytic choriomeningitis virus peptide mixed with heat shock protein 70 results in protective antiviral immunity and specific cytotoxic T lymphocytes. *The*

- Journal of experimental medicine* **1998**, 187, 685-691.
203. Moroi, Y.; Mayhew, M.; Trcka, J.; Hoe, M.H.; Takechi, Y.; Hartl, F.U.; Rothman, J.E.; Houghton, A.N. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 3485-3490, doi:10.1073/pnas.070550797.
 204. Flechtner, J.B.; Cohane, K.P.; Mehta, S.; Slusarewicz, P.; Leonard, A.K.; Barber, B.H.; Levey, D.L.; Andjelic, S. High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8⁺ T lymphocyte immune responses. *Journal of immunology* **2006**, 177, 1017-1027.
 205. Murshid, A.; Gong, J.; Stevenson, M.A.; Calderwood, S.K. Heat shock proteins and cancer vaccines: developments in the past decade and chaperoning in the decade to come. *Expert review of vaccines* **2011**, 10, 1553-1568, doi:10.1586/erv.11.124.
 206. Bystryń, J.C.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Oratz, R.; Shapiro, R.L.; Harris, M.N.; Roses, D.F. Double-blind trial of a polyvalent, shed-antigen, melanoma vaccine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2001**, 7, 1882-1887.
 207. Young, M.D.; Gooch, W.M., 3rd; Zuckerman, A.J.; Du, W.; Dickson, B.; Maddrey, W.C. Comparison of a triple antigen and a single antigen recombinant vaccine for adult hepatitis B vaccination. *Journal of medical virology* **2001**, 64, 290-298.
 208. Willadsen, P. Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends in parasitology* **2008**, 24, 164-167, doi:10.1016/j.pt.2008.01.005.
 209. Suzue, K.; Zhou, X.; Eisen, H.N.; Young, R.A. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex class I presentation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, 13146-13151.
 210. More, S.; Breloer, M.; Fleischer, B.; von Bonin, A. Activation of cytotoxic T cells in vitro by recombinant gp96 fusion proteins irrespective of the 'fused' antigenic peptide sequence. *Immunology letters* **1999**, 69, 275-282.
 211. Udono, H.; Yamano, T.; Kawabata, Y.; Ueda, M.; Yui, K. Generation of cytotoxic T lymphocytes by MHC class I ligands fused to heat shock cognate protein 70. *International immunology* **2001**, 13, 1233-1242.
 212. Graziano, D.F.; Finn, O.J. Tumor antigens and tumor antigen discovery. *Cancer treatment and research* **2005**, 123, 89-111, doi:10.1007/0-387-27545-2_4.
 213. Jager, D.; Filonenko, V.; Gout, I.; Frosina, D.; Eastlake-Wade, S.; Castelli, S.; Varga, Z.; Moch, H.; Chen, Y.T.; Busam, K.J., et al. NY-BR-1 is a differentiation antigen of the mammary gland. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* **2007**, 15, 77-83.
 214. Theurillat, J.P.; Zurrer-Hardi, U.; Varga, Z.; Storz, M.; Probst-Hensch, N.M.; Seifert, B.; Fehr, M.K.; Fink, D.; Ferrone, S.; Pestalozzi, B., et al. NY-BR-1 protein expression in breast carcinoma: a mammary gland differentiation antigen as target for cancer immunotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2007**, 56, 1723-1731, doi:10.1007/s00262-007-0316-1.
 215. Godoy, H.; Mhawech-Fauceglia, P.; Beck, A.; Miliotto, A.; Miller, A.; Lele, S.; Odunsi, K. Developmentally restricted differentiation antigens are targets for immunotherapy in epithelial ovarian carcinoma. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **2013**, 32, 536-540, doi:10.1097/PGP.0b013e318275a550.
 216. Metcalf, R.A.; Monabati, A.; Vyas, M.; Roncador, G.; Gualco, G.; Bacchi, C.E.; Younes, S.F.; Natkunam, Y.; Freud, A.G. Myeloid cell nuclear differentiation antigen is expressed in a subset of marginal zone lymphomas and is useful in the differential diagnosis with follicular lymphoma. *Human pathology* **2014**, 45, 1730-1736, doi:10.1016/j.humpath.2014.04.004.
 217. Brichard, V.; Van Pel, A.; Wolfel, T.; Wolfel, C.; De Plaen, E.; Lethe, B.; Coulie, P.; Boon, T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* **1993**, 178, 489-495.
 218. Bakker, A.B.; Schreurs, M.W.; Tafazzul, G.; de Boer, A.J.; Kawakami, Y.; Adema, G.J.; Figdor, C.G. Identification of a novel peptide derived from the melanocyte-specific gp100 antigen as the

- dominant epitope recognized by an HLA-A2.1-restricted anti-melanoma CTL line. *International journal of cancer* **1995**, 62, 97-102.
219. Coulie, P.G.; Brichard, V.; Van Pel, A.; Wolfel, T.; Schneider, J.; Traversari, C.; Mattei, S.; De Plaen, E.; Lurquin, C.; Szikora, J.P., et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine* **1994**, 180, 35-42.
 220. Wang, W.; Epler, J.; Salazar, L.G.; Riddell, S.R. Recognition of breast cancer cells by CD8+ cytotoxic T-cell clones specific for NY-BR-1. *Cancer research* **2006**, 66, 6826-6833, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3529.
 221. Fisk, B.; Savary, C.; Hudson, J.M.; O'Brian, C.A.; Murray, J.L.; Wharton, J.T.; Ioannides, C.G. Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy* **1995**, 18, 197-209.
 222. Peoples, G.E.; Goedegebuure, P.S.; Smith, R.; Linehan, D.C.; Yoshino, I.; Eberlein, T.J. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER2/neu-derived peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92, 432-436.
 223. Gravalos, C.; Jimeno, A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2008**, 19, 1523-1529, doi:10.1093/annonc/mdn169.
 224. Richman, S.D.; Southward, K.; Chambers, P.; Cross, D.; Barrett, J.; Hemmings, G.; Taylor, M.; Wood, H.; Hutchins, G.; Foster, J.M., et al. HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *The Journal of pathology* **2016**, 238, 562-570, doi:10.1002/path.4679.
 225. Sotiropoulou, P.A.; Perez, S.A.; Voelter, V.; Echner, H.; Missitzis, I.; Tsavaris, N.B.; Papamichail, M.; Baxevanis, C.N. Natural CD8+ T-cell responses against MHC class I epitopes of the HER-2/ neu oncoprotein in patients with epithelial tumors. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **2003**, 52, 771-779, doi:10.1007/s00262-003-0420-9.
 226. Ladjemi, M.Z.; Jacot, W.; Pelegrin, A.; Navarro-Teulon, I. [Anti-HER2 vaccines: The HER2 immunotargeting future?]. *Pathologie-biologie* **2011**, 59, 173-182, doi:10.1016/j.patbio.2009.04.002.
 227. Wolfel, T.; Hauer, M.; Schneider, J.; Serrano, M.; Wolfel, C.; Klehmann-Hieb, E.; De Plaen, E.; Hankeln, T.; Meyer zum Buschenfelde, K.H.; Beach, D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* **1995**, 269, 1281-1284.
 228. Robbins, P.F.; El-Gamil, M.; Li, Y.F.; Kawakami, Y.; Loftus, D.; Appella, E.; Rosenberg, S.A. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **1996**, 183, 1185-1192.
 229. Yanuck, M.; Carbone, D.P.; Pendleton, C.D.; Tsukui, T.; Winter, S.F.; Minna, J.D.; Berzofsky, J.A. A mutant p53 tumor suppressor protein is a target for peptide-induced CD8+ cytotoxic T-cells. *Cancer research* **1993**, 53, 3257-3261.
 230. Coulie, P.G.; Lehmann, F.; Lethe, B.; Herman, J.; Lurquin, C.; Andrawiss, M.; Boon, T. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92, 7976-7980.
 231. Avantaggiati, M.L.; Natoli, G.; Balsano, C.; Chirillo, P.; Artini, M.; De Marzio, E.; Collepardo, D.; Levrero, M. The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements. *Oncogene* **1993**, 8, 1567-1574.
 232. Koutsky, L.A.; Ault, K.A.; Wheeler, C.M.; Brown, D.R.; Barr, E.; Alvarez, F.B.; Chiacchierini, L.M.; Jansen, K.U.; Proof of Principle Study, I. A controlled trial of a human papillomavirus

- type 16 vaccine. *The New England journal of medicine* **2002**, 347, 1645-1651, doi:10.1056/NEJMoa020586.
233. van der Bruggen, P.; Traversari, C.; Chomez, P.; Lurquin, C.; De Plaen, E.; Van den Eynde, B.; Knuth, A.; Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **1991**, 254, 1643-1647.
 234. Fiszer, D.; Kurpysz, M. Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *American journal of reproductive immunology* **1998**, 40, 172-176.
 235. Bart, J.; Groen, H.J.; van der Graaf, W.T.; Hollema, H.; Hendrikse, N.H.; Vaalburg, W.; Sleijfer, D.T.; de Vries, E.G. An oncological view on the blood-testis barrier. *The Lancet. Oncology* **2002**, 3, 357-363.
 236. Van Der Bruggen, P.; Zhang, Y.; Chaux, P.; Stroobant, V.; Panichelli, C.; Schultz, E.S.; Chapiro, J.; Van Den Eynde, B.J.; Brasseur, F.; Boon, T. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunological reviews* **2002**, 188, 51-64.
 237. Engelhardt, B.; Coisne, C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids and barriers of the CNS* **2011**, 8, 4, doi:10.1186/2045-8118-8-4.
 238. Sallusto, F.; Impellizzieri, D.; Basso, C.; Laroni, A.; Uccelli, A.; Lanzavecchia, A.; Engelhardt, B. T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunological reviews* **2012**, 248, 216-227, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01140.x.
 239. Jacobson, D.M.; Thirkill, C.E.; Tipping, S.J. A clinical triad to diagnose paraneoplastic retinopathy. *Annals of neurology* **1990**, 28, 162-167, doi:10.1002/ana.410280208.
 240. Rosenblum, M.K. Paraneoplasia and autoimmune injury of the nervous system: the anti-Hu syndrome. *Brain pathology* **1993**, 3, 199-212.
 241. Giometto, B.; Taraloto, B.; Graus, F. Autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes. *Brain pathology* **1999**, 9, 261-273.
 242. Bazhin, A.V.; Shifrina, O.N.; Savchenko, M.S.; Tikhomirova, N.K.; Goncharskaia, M.A.; Gorbunova, V.A.; Senin, II; Chuchalin, A.G.; Philippov, P.P. Low titre autoantibodies against recoverin in sera of patients with small cell lung cancer but without a loss of vision. *Lung cancer* **2001**, 34, 99-104.
 243. Gromadzka, G.; Karlinska, A.G.; Lysiak, Z.; Blazejewska-Hyzorek, B.; Litwin, T.; Czlonkowska, A. Positivity of serum "classical" onconeural antibodies in a series of 2063 consecutive patients with suspicion of paraneoplastic neurological syndrome. *Journal of neuroimmunology* **2013**, 259, 75-80, doi:10.1016/j.jneuroim.2013.04.007.
 244. Dalmau, J.; Furneaux, H.M.; Cordon-Cardo, C.; Posner, J.B. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *The American journal of pathology* **1992**, 141, 881-886.
 245. Luque, F.A.; Furneaux, H.M.; Ferziger, R.; Rosenblum, M.K.; Wray, S.H.; Schold, S.C., Jr.; Glantz, M.J.; Jaecle, K.A.; Biran, H.; Lesser, M., et al. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Annals of neurology* **1991**, 29, 241-251, doi:10.1002/ana.410290303.
 246. Peterson, K.; Rosenblum, M.K.; Kotanides, H.; Posner, J.B. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology* **1992**, 42, 1931-1937.
 247. Polans, A.S.; Buczylo, J.; Crabb, J.; Palczewski, K. A photoreceptor calcium binding protein is recognized by autoantibodies obtained from patients with cancer-associated retinopathy. *The Journal of cell biology* **1991**, 112, 981-989.
 248. Ohguro, H.; Odagiri, H.; Miyagawa, Y.; Ohguro, I.; Sasaki, M.; Nakazawa, M. Clinicopathological features of gastric cancer cases and aberrantly expressed recoverin. *The Tohoku journal of experimental medicine* **2004**, 202, 213-219.
 249. Weber, J.; Salgaller, M.; Samid, D.; Johnson, B.; Herlyn, M.; Lassam, N.; Treisman, J.; Rosenberg, S.A. Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating

- agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer research* **1994**, 54, 1766-1771.
250. Bazhin, A.V.; De Smet, C.; Golovastova, M.O.; Schmidt, J.; Philippov, P.P. Aberrant demethylation of the recoverin gene is involved in the aberrant expression of recoverin in cancer cells. *Experimental dermatology* **2010**, 19, 1023-1025, doi:10.1111/j.1600-0625.2010.01126.x.
 251. Zhao, R.Y.; Mifsud, N.A.; Xiao, K.; Chan, K.F.; Oveissi, S.; Jackson, H.M.; Dimopoulos, N.; Guillaume, P.; Knights, A.J.; Lowen, T., et al. A novel HLA-B18 restricted CD8+ T cell epitope is efficiently cross-presented by dendritic cells from soluble tumor antigen. *PloS one* **2012**, 7, e44707, doi:10.1371/journal.pone.0044707.
 252. Germeau, C.; Ma, W.; Schiavetti, F.; Lurquin, C.; Henry, E.; Vigneron, N.; Brasseur, F.; Lethe, B.; De Plaen, E.; Velu, T., et al. High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *The Journal of experimental medicine* **2005**, 201, 241-248, doi:10.1084/jem.20041379.
 253. Rubbia-Brandt, L.; Giostra, E.; Brezault, C.; Roth, A.D.; Andres, A.; Audard, V.; Sartoretti, P.; Dousset, B.; Majno, P.E.; Soubrane, O., et al. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2007**, 18, 299-304, doi:10.1093/annonc/mdl386.
 254. Dosset, M.; Vargas, T.R.; Lagrange, A.; Boidot, R.; Vegrn, F.; Roussey, A.; Chalmin, F.; Dondaine, L.; Paul, C.; Lauret Marie-Joseph, E., et al. PD-1/PD-L1 pathway: an adaptive immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncoimmunology* **2018**, 7, e1433981, doi:10.1080/2162402X.2018.1433981.
 255. Susumu, S.; Nagata, Y.; Ito, S.; Matsuo, M.; Valmori, D.; Yui, K.; Udono, H.; Kanematsu, T. Cross-presentation of NY-ESO-1 cytotoxic T lymphocyte epitope fused to human heat shock cognate protein 70 by dendritic cells. *Cancer science* **2008**, 99, 107-112, doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00654.x.
 256. Siddhardha, B.; Parasuraman, P. Chapter 3 - Theranostics application of nanomedicine in cancer detection and treatment. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, Grumezescu, A.M., Ed. William Andrew Publishing: 2019; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816505-8.00014-Xpp>. 59-89.
 257. Chu, Y.; Liu, Q.; Wei, J.; Liu, B. Personalized cancer neoantigen vaccines come of age. *Theranostics* **2018**, 8, 4238-4246, doi:10.7150/thno.24387.
 258. Sahin, U.; Derhovannessian, E.; Miller, M.; Kloke, B.P.; Simon, P.; Lower, M.; Bukur, V.; Tadmor, A.D.; Luxemburger, U.; Schrors, B., et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **2017**, 547, 222-226, doi:10.1038/nature23003.
 259. Ott, P.A.; Hu, Z.; Keskin, D.B.; Shukla, S.A.; Sun, J.; Bozym, D.J.; Zhang, W.; Luoma, A.; Giobbie-Hurder, A.; Peter, L., et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* **2017**, 547, 217-221, doi:10.1038/nature22991.
 260. Baldin, A.V.; Savvateeva, L.V.; Bazhin, A.V.; Zamyatnin, A.A., Jr. Dendritic Cells in Anticancer Vaccination: Rationale for Ex Vivo Loading or In Vivo Targeting. *Cancers (Basel)* **2020**, 12, doi:10.3390/cancers12030590.
 261. Shlyapnikov, Y.M.; Morozov, V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels. *Anal Chim Acta* **2017**, 966, 47-53, doi:10.1016/j.aca.2017.02.037.
 262. Morozov, V.N.; Mikheev, A.Y.; Shlyapnikov, Y.M.; Nikolaev, A.A.; Lyadova, I.V. Non-invasive lung disease diagnostics from exhaled microdroplets of lung fluid: perspectives and technical challenges. *J Breath Res* **2017**, 12, 017103, doi:10.1088/1752-7163/aa88e4.
 263. Mader, S.; Pantel, K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat* **2017**, 40, 404-408, doi:10.1159/000478018.
 264. Murphy, M.A.; O'Leary, J.J.; Cahill, D.J. Assessment of the humoral immune response to cancer. *J Proteomics* **2012**, 75, 4573-4579, doi:10.1016/j.jprot.2012.01.021.

265. Ngo, T.C.; Wood, C.G.; Karam, J.A. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol* **2014**, *32*, 243-251, doi:10.1016/j.urolonc.2013.07.011.
266. Barua, A.; Bradaric, M.J.; Kebede, T.; Espionosa, S.; Edassery, S.L.; Bitterman, P.; Rotmensch, J.; Luborsky, J.L. Anti-tumor and anti-ovarian autoantibodies in women with ovarian cancer. *American journal of reproductive immunology* **2007**, *57*, 243-249, doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00470.x.
267. Li, J.; Dai, L.; Lei, N.; Xing, M.; Li, P.; Luo, C.; Casiano, C.A.; Zhang, J.Y. Evaluation and characterization of anti-RalA autoantibody as a potential serum biomarker in human prostate cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43546-43556, doi:10.18632/oncotarget.9869.
268. Xu, Y.W.; Peng, Y.H.; Xu, L.Y.; Xie, J.J.; Li, E.M. Autoantibodies: Potential clinical applications in early detection of esophageal squamous cell carcinoma and esophagogastric junction adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* **2019**, *25*, 5049-5068, doi:10.3748/wjg.v25.i34.5049.
269. Qiu, J.; Keyser, B.; Lin, Z.T.; Wu, T. Autoantibodies as Potential Biomarkers in Breast Cancer. *Biosensors (Basel)* **2018**, *8*, doi:10.3390/bios8030067.
270. Srigley, J.R.; Delahunt, B.; Eble, J.N.; Egevad, L.; Epstein, J.I.; Grignon, D.; Hes, O.; Moch, H.; Montironi, R.; Tickoo, S.K., et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *The American journal of surgical pathology* **2013**, *37*, 1469-1489, doi:10.1097/PAS.0b013e318299f2d1.
271. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685, doi:10.1038/227680a0.
272. Kuroda, A.; Rauch, T.A.; Todorov, I.; Ku, H.T.; Al-Abdullah, I.H.; Kandeel, F.; Mullen, Y.; Pfeifer, G.P.; Ferreri, K. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PloS one* **2009**, *4*, e6953, doi:10.1371/journal.pone.0006953.
273. Wang, H.; Maurano, M.T.; Qu, H.; Varley, K.E.; Gertz, J.; Pauli, F.; Lee, K.; Canfield, T.; Weaver, M.; Sandstrom, R., et al. Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res* **2012**, *22*, 1680-1688, doi:10.1101/gr.136101.111.
274. Zhao, A.; Li, G.; Peoc'h, M.; Genin, C.; Gigante, M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* **2013**, *94*, 115-120, doi:10.1016/j.yexmp.2012.10.005.
275. Redova, M.; Poprach, A.; Nekvindova, J.; Iliev, R.; Radova, L.; Lakomy, R.; Svoboda, M.; Vyzula, R.; Slaby, O. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* **2012**, *10*, 55, doi:10.1186/1479-5876-10-55.
276. Wulfken, L.M.; Moritz, R.; Ohlmann, C.; Holdenrieder, S.; Jung, V.; Becker, F.; Herrmann, E.; Walgenbach-Brunagel, G.; von Ruecker, A.; Muller, S.C., et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PloS one* **2011**, *6*, e25787, doi:10.1371/journal.pone.0025787.
277. Wykoff, C.C.; Beasley, N.J.; Watson, P.H.; Turner, K.J.; Pastorek, J.; Sibtain, A.; Wilson, G.D.; Turley, H.; Talks, K.L.; Maxwell, P.H., et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer research* **2000**, *60*, 7075-7083.
278. Rioux-Leclercq, N.; Fergelot, P.; Zerrouki, S.; Leray, E.; Jouan, F.; Bellaud, P.; Epstein, J.I.; Patard, J.J. Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Human pathology* **2007**, *38*, 1489-1495, doi:10.1016/j.humpath.2007.02.014.
279. Lukkonen, A.; Lintula, S.; von Boguslawski, K.; Carpen, O.; Ljungberg, B.; Landberg, G.; Stenman, U.H. Tumor-associated trypsin inhibitor in normal and malignant renal tissue and in serum of renal-cell carcinoma patients. *International journal of cancer* **1999**, *83*, 486-490, doi:10.1002/(sici)1097-0215(199911)83:4<486::aid-ijc9>3.0.co;2-o.
280. Tretiakova, M.S.; Sahoo, S.; Takahashi, M.; Turkyilmaz, M.; Vogelzang, N.J.; Lin, F.; Krausz, T.; Teh, B.T.; Yang, X.J. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in papillary renal cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology* **2004**, *28*, 69-76, doi:10.1097/00000478-

- 200401000-00007.
281. Skinnider, B.F.; Folpe, A.L.; Hennigar, R.A.; Lim, S.D.; Cohen, C.; Tamboli, P.; Young, A.; de Peralta-Venturina, M.; Amin, M.B. Distribution of cytokeratins and vimentin in adult renal neoplasms and normal renal tissue: potential utility of a cytokeratin antibody panel in the differential diagnosis of renal tumors. *The American journal of surgical pathology* **2005**, *29*, 747-754, doi:10.1097/01.pas.0000163362.78475.63.
 282. Sato, E.; Torigoe, T.; Hirohashi, Y.; Kitamura, H.; Tanaka, T.; Honma, I.; Asanuma, H.; Harada, K.; Takasu, H.; Masumori, N., et al. Identification of an immunogenic CTL epitope of HIFPH3 for immunotherapy of renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2008**, *14*, 6916-6923, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0466.
 283. Pastore, A.L.; Palleschi, G.; Silvestri, L.; Moschese, D.; Ricci, S.; Petrozza, V.; Carbone, A.; Di Carlo, A. Serum and urine biomarkers for human renal cell carcinoma. *Dis Markers* **2015**, *2015*, 251403, doi:10.1155/2015/251403.
 284. Golovastova, M.O.; Korolev, D.O.; Tsoy, L.V.; Varshavsky, V.A.; Xu, W.H.; Vinarov, A.Z.; Zernii, E.Y.; Philippov, P.P.; Zamyatnin, A.A., Jr. Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives. *Curr Urol Rep* **2017**, *18*, 3, doi:10.1007/s11934-017-0655-1.
 285. Desmetz, C.; Mange, A.; Maudelonde, T.; Solassol, J. Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection. *Journal of cellular and molecular medicine* **2011**, *15*, 2013-2024, doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01355.x.
 286. Gnjjatic, S.; Ritter, E.; Buchler, M.W.; Giese, N.A.; Brors, B.; Frei, C.; Murray, A.; Halama, N.; Zornig, I.; Chen, Y.T., et al. Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 5088-5093, doi:10.1073/pnas.0914213107.
 287. Chatterjee, M.; Mohapatra, S.; Ionan, A.; Bawa, G.; Ali-Fehmi, R.; Wang, X.; Nowak, J.; Ye, B.; Nahhas, F.A.; Lu, K., et al. Diagnostic markers of ovarian cancer by high-throughput antigen cloning and detection on arrays. *Cancer research* **2006**, *66*, 1181-1190, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2962.
 288. Yao, Y.; Fan, Y.; Wu, J.; Wan, H.; Wang, J.; Lam, S.; Lam, W.L.; Girard, L.; Gazdar, A.F.; Wu, Z., et al. Potential application of non-small cell lung cancer-associated autoantibodies to early cancer diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2012**, *423*, 613-619, doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.050.
 289. Chapman, C.; Murray, A.; Chakrabarti, J.; Thorpe, A.; Woolston, C.; Sahin, U.; Barnes, A.; Robertson, J. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2007**, *18*, 868-873, doi:10.1093/annonc/mdm007.
 290. Shimada, H.; Takeda, A.; Arima, M.; Okazumi, S.; Matsubara, H.; Nabeya, Y.; Funami, Y.; Hayashi, H.; Gunji, Y.; Suzuki, T., et al. Serum p53 antibody is a useful tumor marker in superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **2000**, *89*, 1677-1683.
 291. Nilsson, B.O.; Carlsson, L.; Larsson, A.; Ronquist, G. Autoantibodies to prostasomes as new markers for prostate cancer. *Ups J Med Sci* **2001**, *106*, 43-49, doi:10.3109/2000-1967-171.
 292. Chen, H.; Werner, S.; Tao, S.; Zornig, I.; Brenner, H. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer. *Cancer Lett* **2014**, *346*, 178-187, doi:10.1016/j.canlet.2014.01.007.
 293. Kitamura, H.; Honma, I.; Torigoe, T.; Hariu, H.; Asanuma, H.; Hirohashi, Y.; Sato, E.; Sato, N.; Tsukamoto, T. Expression of livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients. *Urology* **2007**, *70*, 38-42, doi:10.1016/j.urology.2007.03.040.
 294. Tanaka, T.; Kitamura, H.; Torigoe, T.; Hirohashi, Y.; Sato, E.; Masumori, N.; Sato, N.; Tsukamoto, T. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **2011**, *137*, 789-794, doi:10.1007/s00432-010-0940-6.

295. Hariu, H.; Hirohashi, Y.; Torigoe, T.; Asanuma, H.; Hariu, M.; Tamura, Y.; Aketa, K.; Nabeta, C.; Nakanishi, K.; Kamiguchi, K., et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2005**, *11*, 1000-1009.
296. Gurevich, E.V.; Gurevich, V.V. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol* **2006**, *7*, 236, doi:10.1186/gb-2006-7-9-236.
297. Peterson, Y.K.; Luttrell, L.M. The Diverse Roles of Arrestin Scaffolds in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Pharmacol Rev* **2017**, *69*, 256-297, doi:10.1124/pr.116.013367.
298. Sobolesky, P.M.; Moussa, O. The role of beta-arrestins in cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2013**, *118*, 395-411, doi:10.1016/B978-0-12-394440-5.00015-2.
299. Ahuja, N.; Sharma, A.R.; Baylin, S.B. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annual review of medicine* **2016**, *67*, 73-89, doi:10.1146/annurev-med-111314-035900.
300. Zaenker, P.; Gray, E.S.; Ziman, M.R. Autoantibody Production in Cancer--The Humoral Immune Response toward Autologous Antigens in Cancer Patients. *Autoimmun Rev* **2016**, *15*, 477-483, doi:10.1016/j.autrev.2016.01.017.
301. Hwang, W.; Jung, K.; Jeon, Y.; Yun, S.; Kim, T.W.; Choi, I. Knockdown of the interleukin-6 receptor alpha chain of dendritic cell vaccines enhances the therapeutic potential against IL-6 producing tumors. *Vaccine* **2010**, *29*, 34-44, doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.027.
302. Dittrich, E.; Rose-John, S.; Gerhartz, C.; Mullberg, J.; Stoyan, T.; Yasukawa, K.; Heinrich, P.C.; Graeve, L. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, 19014-19020.
303. Kimura, A.; Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European journal of immunology* **2010**, *40*, 1830-1835, doi:10.1002/eji.201040391.
304. Heink, S.; Yogev, N.; Garbers, C.; Herwerth, M.; Aly, L.; Gasperi, C.; Husterer, V.; Croxford, A.L.; Moller-Hackbarth, K.; Bartsch, H.S., et al. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* **2017**, *18*, 74-85, doi:10.1038/ni.3632.
305. Lehner, M.; Kellert, B.; Proff, J.; Schmid, M.A.; Diessenbacher, P.; Ensser, A.; Dorrie, J.; Schaft, N.; Leverkus, M.; Kampgen, E., et al. Autocrine TNF is critical for the survival of human dendritic cells by regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *Journal of immunology* **2012**, *188*, 4810-4818, doi:10.4049/jimmunol.1101610.
306. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews. Cancer* **2009**, *9*, 361-371, doi:10.1038/nrc2628.
307. Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation* **2003**, *10*, 45-65, doi:10.1038/sj.cdd.4401189.
308. Schulke, S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front Immunol* **2018**, *9*, 455, doi:10.3389/fimmu.2018.00455.