УДК 616-006.487:[577.213.3:616-084.47]:616-097.1] DOI: 10.14427/jipai.2022.1.6

Выбор наиболее иммуногенного антигена для ДНК-вакцинации против нейробластомы

М.В. Стёганцева[1], В.А. Шинкевич[1,2], Е.М. Тумар[3], Е.П. Вашкевич[1], А.Н. Мелешко[1]

[1] Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Боровляны

[2] Институт фармакологии, Университет Марбурга, Марбург, Германия

[3] Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Selection of the most immunogenic antigen for DNA vaccination against neuroblastoma

M.V. Stegantseva[1], V.A. Shinkevich[1,2], E.M. Tumar[3], E.P. Vashkevich[1], A.N. Meleshko[1]

[1] Belorussian Center for pediatric oncology, hematology and immunology, v. Borovliany, Belarus

[2] Institute of Pharmacology, University of Marburg, Marburg, Germany

[3] Institute of Bioorganic Chemistry of Belarusian Academy of Science, Minsk, Belarus

Аннотация

Оценка иммуногенности антигена является одним из первоначальных и ключевых этапов выбора эффективной мишени для противоопухолевой вакцинации. Наиболее актуально это для опухолей, которые не имеют специфических маркеров или имеют слабый мутационный статус, как нейробластома. Целью данного исследования является выбор наиболее иммуногенного антигена для ДНК-вакцинации при нейробластоме, а также проведение сравнительного анализа результатов предсказательных программ и мышиной модели. Для оценки иммуногенности использовали мышей линии C57Bl/6, самок возрастом 8-10 недель (n=25). Мыши получали двукратную вакцинацию ДНК-конструкцией на основе антигенов тирозин гидроксилазы, Birc5 и Phox2b. На 28-й день извлекали селезенки и проводили оценку цитотоксической активности спленоцитов и уровня продукции ИФНγ. Наиболее высокий уровень цитотоксической активности (18,4%) и ИФНγ (60% ответивших на стимуляцию) наблюдался после вакцинации с Phox2b. Таким образом, наиболее иммуногенный по IEDB антиген продемонстрировал наилучший результат и в мышиной модели и может быть в дальнейшем использован для ДНК-вакцинации при нейробластоме.

Ключевые слова

ДНК-вакцина, Phox2b, иммуногенность, нейробластома.

Summary

Evaluation of the antigen immunogenicity is one of the initial steps in selecting an effective target for antitumor vaccination. This is most relevant for tumors that have no specific markers or have a weak mutational status like neuroblastoma. The purpose of this study is to select the most immunogenic antigen for DNA vaccination against neuroblastoma and to conduct a comparative analysis of predictive programs and a mouse model. To assess the immunogenicity C57Bl/6 female mice 8-10 weeks of age (n=25) were used. The mice received two vaccinations with a DNA construct based on tyrosine hydroxylase, Birc5, and Phox2b antigens. On the 28th day, the spleens were removed and the cytotoxic activity of splenocytes and the level of production ofIFNγ were assessed. The highest levels of cytotoxic activity (18.4%) and IFNγ (60% of those responding to stimulation) were observed after vaccination with Phox2b. Thus, the most immunogenic antigen according to IEDB showed the best results in the mouse model and can be further used for DNA vaccination in neuroblastoma.

Keywords

DNA vaccine, Phox2b, immunogenicity, neuroblastoma.

Введение

Одним из основных критериев оценки эффективности ДНК-вакцин является определение иммуногенности (ИГ) – способность антигена вызывать иммунный ответ [1]. Оценка ИГ позволяет продемонстрировать, что выбранный в качестве мишени антиген обладает необходимыми антигенными детерминантами (эпитопами) для успешной презентации клеткам эффекторам, а также то, что дизайн конструкции и метод доставки дают достаточно дополнительных активаторных сигналов для преодоления толерантности к опухоль-ассоциированным антигенам, экспрессирующимся и на нормальных клетках. Исследование иммуногенности может проводиться как in silico с помощью предсказательных программ и баз данных, так и экспериментально на животной модели. Комбинация указанных подходов позволяет получить наиболее точный результат.

Нейробластома представляет собой экстракраниальную опухоль нервной ткани и характеризуется достаточно низким количеством антигенов, которые могут быть использованы как мишени для терапии [2]. Среди наиболее известных поверхностных антигенов можно выделить дисиалоганглиозид GD2 [3], рецептор к гастрин-релизинг пептиду GRPR и глипикан GPC2 [4]. Однако поверхностные антигены более пригодны для клеточной иммунотерапии, в частности при использовании лимфоцитов с химерным антигенным рецептором CAR-T, а также для таргетной терапии моноклональными антителами. Для вакцин локализация не имеет принципиального значения, так как реакции клеточного иммунитета против опухоли обусловлены процессингом и презентацией антигена в комплексе с MHC (от англ. Major histocompatibility complex). С помощью высокотехнологичных методов исследования для нейробластомы определен целый перечень таких антигенов, которые относятся к категории опухоль-ассоциированных и характеризуются повышенной экспрессией по сравнению со здоровой тканью [5]. Для проведения сравнительного анализа иммуногенности были выбраны три наиболее известных для нейробластомы антигена: тирозингидроксилаза (ТГ), Birc5 (ранее Survivin), Phox2b. Ген *TH* кодирует фермент, катализирующий первый этап биосинтеза катехоламинов – превращение L-тирозина в дигидроксилфенилаланин (DOPA), предшественник допамина и эпинефрина, нейромедиаторов, синтезирующихся в головном мозге и симпатической нервной системе [6]. Ген *BIRC5* (от англ. baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5) кодирует наименьший белок из семейства ингибиторов апоптоза [7]. Он играет важную роль в регуляции митоза, в частности в функционировании центросомы, а также сборке микротрубочек в метафазе и анафазе [8]. Он является ингибитором апоптоза, т.к. блокирует формирование апоптосомы за счет прямого или непрямого ингибирования каспаз независимо от природы сигнала. Ген *PHOX2B* (от англ. paired-like homeobox 2B) кодирует транскрипционный фактор, который способствует формированию нейронов и регулирует процесс их дифференцировки. Участвует в развитии нескольких крупных групп норадренергических нейронов и формировании нейротрансмиттерного фенотипа [9].

Материалы и методы

Вакцинация, мыши. Для оценки иммуногенности использовали мышей линии C57Bl/6, самок возрастом 8-10 недель (n=25). Мыши предоставлены виварием Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (ИБОХ) в рамках совместного проекта ГПНИ «Разработать и внедрить метод терапевтической ДНК-вакцинации против нейробластомы». Мыши содержались на базе вивария ИБОХ, разведение и уход осуществлялся сотрудниками согласно принятым санитарным нормам РБ по работе с лабораторными животными.

Мыши получали две внутримышечные инъекции плазмидной ДНК, конъюгированной с полиэтиленимином (ПЭИ), в день 0 и 14. Одна доза вакцины содержала 10 мкг ДНК и 20 мкг ПЭИ массой 20 кДа в объеме 100±20 мкл. Дизайн использованных генетических конструкций описан ранее [10]. Эвтаназию проводили на 28 день от начала эксперимента. Для получения фракции спленоцитов для клеточных тестов обрабатывали хирургическое поле 96% спиртом и делали небольшой надрез стерильным скальпелем в области левого подреберья. Селезенки извлекали пинцетом и помещали в охлажденную среду Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640. Затем с помощью пастеровской пипетки помещали селезенку на нейлоновый фильтр 40-100 μM (Falcon, США) и растирали с помощью поршня с резиновым навершием от шприца объемом 2-5 мл. Полученную суспензию клеток смешивали с 5 мкл среды, тщательно гомогенизировали и затем наслаивали на градиент плотности Histopaque (Sigma, США). Центрифугировали 20 минут при 1800 об/мин. Отбирали кольцо мононуклеаров и отмывали в среде RPMI [11].

Цитотоксический тест. Извлеченные у мышей спленоциты инкубировали в RPMI с содержанием 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% пенициллин/стрептомицин, 1% глютамин, 50 мкМ бета-меркаптоэтанол, 100 МЕ/мл ИЛ-2 в присутствии клеток-мишеней NB41A3 в соотношении эффекторы–мишени (25 к 1) в течение 18 часов. Клетки NB41A3 предварительно окрашивали красителем CFSE (от англ. Carboxyfluorescein succinimidyl ester). После инкубации все клетки окрашивали витальным красителем пропидиум йодидом и инкубировали не более 15 минут. Анализ проводили в дублях. Процент лизиса клеток-мишеней определяли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе FC500 (Backman Coulter, USA) [11].

ELISPOT. Интенсивность продукции мышиного гамма интерферона (ИФНγ) определяли методом ELISPOT с использованием набора BDTM ELISPOT mouse IFN-γ ELISPOT Set (BD Biosciences, USA). Анализ проводили в триплетах. В качестве положительного контроля использовали фитогемагглютинин (конечн. конц. 5 мкг/мл). Конечная концентрация антигена PVXCP составила 10 мкг/мл. Спленоциты брали в количестве 300 тыс. на лунку. Результаты детектировали с использованием CTL ImmunoSpot® S5 UV Analyzer (C.T.L., USA) [11].

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили на базе программы Statistica 7.0 и GraphPad Prism. Различия между группами оценивали по Манну-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Предсказание иммуногенности антигенов. Проверку ИГ собранных генетических конструкций, которые в качестве мишеней включают опухоль-ассоциированные антигены ТГ, Birc5 и Phox2b, проводили в два этапа. Первый включал оценку потенциальной ИГ *in silico* при помощи предсказательных программ, второй – оценку реальной *in vivo* ИГ на животной модели.

ИГ каждого из антигенов зависит от ряда параметров: размер молекулы, разнообразие аминокислот, наличие ароматических аминокислот (аАК), растворимость и т.д. [12]. Выбранные антигены были проанализированы на самые распространенные параметры иммуногенности с целью спрогнозировать оптимальный вариант для ДНК-вакцинации (табл. 1).

Белком с самой длинной аминокислотной последовательностью является Phox2b, и у него же обнаружено наибольшее содержание ароматических аминокислот. Прогнозы связывания MHC-I для моделирования иммуногенности антигенов были сделаны 12.6.2019 с использованием онлайн ресурса IEDB [13], который объединяет прогнозы из ANN aka NetMHC (4.0) [14-16], SMM [17] и Comblib [18]. Только Т-клеточные эпитопы с процентом сродства менее 10 считались высокоиммуногенными (границу отсечения подбирали эмпирически). Антигены ТГ и Phox2b имеют более подходящие эпитопы для гаплотипа H2Kb, соответствующего мышам C57Bl/6, по сравнению с антигеном Birc5. Расчет итоговых баллов производился следующим образом: 1 балл начислялся за каждую позицию за самый низкий среди антигенов результат, 3 балла начислялось за каждую позицию, в которой антиген имел самый высокий результат, и соответственно 2 балла получал антиген, занимающий промежуточное положение. Таким образом, по результатам полученных итоговых баллов спрогнозированных преимуществ каждого из антигенов, уровень иммуногенности будет возрастать в следующем ряду ТГ→ Birc5→Phox2b [19]. Однако теоретические расчеты не всегда со 100% вероятностью предсказывают эффективность антигена в качестве мишени, поэтому следующим этапом было провести исследования *in vivo*.

Оценка иммуногенности на мышиной модели. Практическая иммуногенность определялась на основании оценки клеточного иммунного ответа на животной модели с использованием полиэтиленимина в качестве метода доставки ДНК-вакцин. Внутримышечная инъекция включала конъюгат 10 мкг плазмидной ДНК, смешанной с ПЭИ 20 кДа в соотношении 1:2 в общем объеме 100±20 мкл.

Базовый уровень цитотоксической активности (ЦТА) во всех экспериментальных группах плазмидного контроля, получавших пустой вектор pING, составил 6,1 (3,5-8,1)%, что обусловлено преимущественно активностью NK-клеток и спонтанной цитотоксичностью перекрестно реагирующих CD8+ Т-лимфоцитов памяти (рис. 1А).

Мыши, вакцинированные конструкцией с ТГ, имеют ЦТА на уровне контроля (4,9(1,9-7,7)%), что согласуется с результатами предсказательной модели, где ТГ был самым низкоиммуногенным антигеном. Значимое увеличение ЦТА наблюдается после вакцинации Birc5 и Phox2b, где процент лизиса клеток-мишеней достигал 17,8% и 18,4% соответственно. В этих группах в лизисе клеток мышиной нейробластомы уча-

Таблица 1. Моделирование иммуногенности антигенов

Антиген	N (АК)	N (аАК)	N (Т-клеточные эпитопы с PR<10)*	Медиана PR (Мин-Макс)*	Общий счет ИГ
TH	124	8	27	4,9 (0,23-9,75)	7
Birc5	140	14	17	3,85 (0,5-9,85)	8
Phox2b	158	19	24	5,25 (0,12-9,5)	9

Примечание: АК – аминокислота, аАК – ароматическая АК, ИГ – иммуногенность. Представлены только Т-клеточные эпитопы с процентным сродством (PR) к MHC-I <10, * – предсказание связывания MHC-I проведено для гаплотипа H2Kb

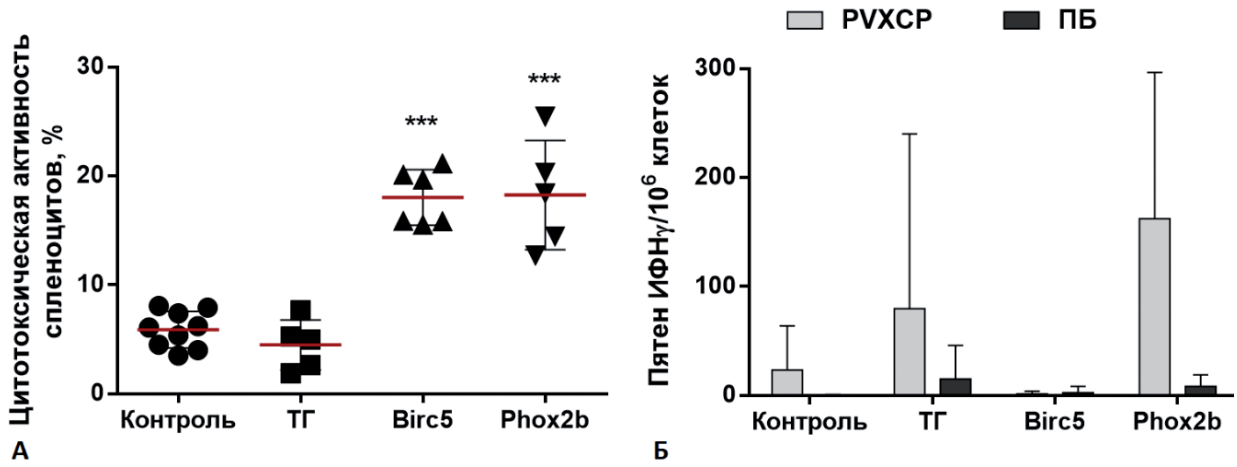

Рис. 1. Результаты *in vivo* иммуногенности конструкций на основе антигенов ТГ (n=5), Birc5 (n=6), Phox2b (n=5) и в контрольной группе, получавшей пустой вектор pING (n=9)

Примечание: А – цитотоксическая активность спленоцитов мышей против клеточной линии NB41A3 ($Me_{Min/Max}$), Б – уровень продукции ИФНγ спленоцитами мышей в ответ на стимуляцию белком PVXCP и пептидной библиотекой соответствующего антигена в тесте Elispot (Ср±ОС). *** – p<0.001

ствуют CD8+ клетки-памяти и активированные антиген-специфические CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ), киллинговые эффекты которых и приводят к увеличению ЦТА.

Помимо цитотоксической активности, важным фактором в активации клеточного иммунного ответа является продукция ИФНγ. Основными продуцентами ИФНγ являются NK-клетки, а также CD4+ Th1. В отношении противоопухолевого иммунного ответа ключевой является активация Th1, которые координируют дальнейшие пути формирования первичного иммунного ответа. За счет секреции ИФНγ и ряда других цитокинов они обеспечивают поддержку CD8+ ЦТЛ и служат важным фактором их активации. Так как используемые для вакцинации конструкции содержат два ключевых компонента, а именно опухолевый антиген и ген-энхансер PVXCP, оценку продукции ИФНγ проводили в ответ на оба стимулятора. В случае с PVXCP использовали цельный белок, а для антигенов – перекрывающуюся пептидную библиотеку. Вакцинация Birc5 не привела к усилению продукции интерферона Т-лимфоцитами независимо от компонента вакцины (рис. 1Б). ТГ и Phox2b продемонстрировали увеличение активности в ответ на белок PVXCP и в значительно меньшей степени на пептидную библиотеку (ПБ). Более высокая продукция ИФНγ в ответ на стимуляцию PVXCP по сравнению с ПБ, вероятно, связана с вирусной природой белка [20]. С целью установить, насколько каждый из исследуемых антигенов воспроизводимо иммуногенен для всех животных в группе, было проанализировано количество мышей, ответивших на стимуляцию пептидной библиотекой. Ответившими считали мышей, у которых уровень секреции ИФНγ был не менее, чем в 2 раза выше по сравнению с контролем. Самые высокие результаты были характерны для Phox2b, где на инкубацию с ПБ отреагировало 60% животных. Для Birc5 данный показатель составил 33%, а для ТГ – 40%. Таким образом, по результатам вакцинации с Phox2b уровень про-

дукции ИФНγ увеличился как количественно, так и качественно.

Данные, полученные на животной модели, были оценены по балльной системе таким же образом, как и при анализе *in silico*. Иммуногенность в рамках исследуемых параметров возрастает в ряду Birc5→TT→Phox2b, что только частично совпадает с предсказанными результатами. При этом наиболее эффективный кандидат для вакцинации подтвержден иммунологическими исследованиями.

Заключение

Использование предсказательных моделей позволяет провести предварительный скрининг иммуногенности потенциальных антигенов для иммунотерапии, что сохраняет время и трудозатраты на тестирование. Проведенное исследование позволяет рассматривать антиген Phox2b как наиболее иммуногенный для вакцинации при нейробластоме по сравнению с другими опухоль-ассоциированными кандидатами.

Литература

1. Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999, 608 с.

2. Cheung N.K.V., Dyer M.A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. Nature Rev. Cancer. 2013; 13 (6): 397–411. DOI: 10.1038/nrc3526.

3. Sait S., Modak S.I. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastomas. Expert Rev. of Anticancer Therapy. 2018; 17 (10): 889–904. DOI: 10.1080/14737140.2017.1364995.

4. Bosse K. Immunogenomic approaches to more effective childhood cancer therapies [Electronic resource]. FDA.gov. Mode of access: https://www.fda.gov/media/129851/download.

5. Kohler M.E., Johnson B.D., Palen K. et al. Tumor antigen analysis in neuroblastoma by serological interrogation of bioinformatic data. Cancer science. 2010; 101 (11): 2316–2324. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01694.x.

6. Сухарева Е.В., Калинина Т.С., Булыгина В.В. и др. Тирозингидроксилаза мозга и ее регуляция глюкокортикоидами. Вавил. журн. генетики и селекции. 2016; 20 (2): 212–219. DOI:10.18699/VJ16.156.

7. Chen X., Duan N., Zhang C. et al. Survivin and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. J. of Cancer. 2016; 7 (3): 314–323. DOI:10.7150/jca.13332.

8. Khan Z., Khan A.A., Yadav H. et al. Survivin, a molecular target for therapeutic interventions in squamous cell carcinoma. Cellular a. Molecular Biology Letters. 2017; 22 (1): 1–32. DOI: 10.1186/s11658-017-0038-0.

9. Mosse Y.P., Laudenslager M, Khazi D. et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. Amer. J. of Human Genetics. 2004; 75 (4): 727–730. DOI: 10.1086/424530.

10. Стёганцева М.В., Шинкевич В.А., Мелешко А.Н. Получение рекомбинантных плазмид для ДНК-вакцинации против нейробластомы. БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. рец. науч. работ. 2017; 7: 195–200.

11. Стёганцева М.В., Шинкевич В.А., Вашкевич Е.П. и др. Полиэтиленимин усиливает иммуногенность ДНК-вакцины на основе гена тирозин-гидроксилазы в мышиной модели нейробластомы. Вес. Нац. акад. навук Беларуси. Сер. мед. навук. 2018; 19 (3): 323-330. DOI: 10.29235/1814-6023-2018-15-3-323-330.

12. Guideline on immunogenicity assessment of therapeutic proteins [Electronic resource]. European Medicines Agency. Mode of access: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-immunogenicity-assessment-therapeutic-proteins-revision-1_en.pdf.

13. Kim Y., Ponomarenko J., Zhu Z. et al. Immune epitope database analysis resource. Nucleic Acids Research. 2012; 40: 525–530. DOI: 10.1093/nar/gks438.

14. Nielsen M., Lundegaard C., Worning P. et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. Protein Science. 2003; 12 (5): 1007–1017. DOI: 10.1110/ps.0239403.

15. Lundegaard C., Lamberth K., Harndahl M. et al. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse, and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. Nucleic Acids Research. 2008; 36: 509–512. DOI: 10.1093/nar/gkn202.

16. Andreatta M., Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. Bioinformatics. 2016; 32 (4): 511–517. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv639.

17. Peters B., Sette A. Generating quantitative models describing the sequence specificity of biological processes with the stabilized matrix method. BMC Bioinformatics. 2005; 6 (132). DOI: 10.1186/1471-2105-6-132.

18. Sidney J., Assarsson E., Moore C. et al. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries. Immunome Research. 2008; 4 (2). DOI: 10.1186/1745-7580-4-2.

19. Stegantseva M.V., Shinkevich V.A., Tumar E.M. et al. Multi-antigen DNA-vaccine delivered by polyethylenimine and *Salmonella enterica* in neuroblastoma mouse model. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2020; 69 (12): 2613-2622. DOI: 10.1007/s00262-020-02652-2.

20. Стеганцева М.В., Шинкевич В.А., Тумар Е.М. и др. Иммунологическая эффективность ДНК-вакцинации против нейробластомы в комбинации с полиэтиленимином и Salmonella Enteric. Аллергология и иммунология. 2018; 19 (3): 135–139.

Сведения об авторах:

Стёганцева Мария Владимировна – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии. 223053, Минский р-н, д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43. E-mail: stsegantsevam@gmail.com, тел.: +375293747709.

Шинкевич Вероника Александровна – младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. PhD student, Institute of Pharmacology, University of Marburg, Marburg, Germany, Karl-von-Frisch Str.2, 35043.

Вашкевич Екатерина Петровна – старший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Тумар Елена Михайловна – старший научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований, Институт биоорганической химии НАН Беларуси.

Мелешко Александр Николаевич – к.б.н., зав. лабораторией генетических биотехнологий, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Поступила 10.01.2022 г.