

## ПРОТИВОРАКОВАЯ ДНК-ВАКЦИНАЦИЯ: ПРИНЦИП И ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА

Стёганцева М.В., Мелешко А.Н.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, д. Боровляны, Минская обл., Республика Беларусь

**Резюме.** Традиционные методы лечения онкологических заболеваний приближаются к пределу своей эффективности. Стремительное развитие иммунологии и экспериментальной иммунотерапии привело к первым успехам вакцинации против опухолей. Последняя декада знаменательна переходом вакцинации из лаборатории в онкологическую клинику и ростом популярности ДНК-вакцин. На сегодняшний день накоплен большой массив экспериментальных данных и результатов клинических испытаний, связанных с разнообразными способами получения и применения ДНК-вакцин. В данном обзоре рассмотрены принципы получения ДНК-вакцин, разнообразие их конструкций, механизм действия, формы и способы доставки в организм.

*Ключевые слова:* онкология, иммунотерапия, антигены, вакцина, противоопухолевый иммунитет

## ANTICANCER DNA VACCINATION: PRINCIPLE AND PERSPECTIVES OF THE METHOD

Stegantseva M.V., Meleshko A.N.

Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany Village, Minsk Region, Republic of Belarus

**Abstract.** Conventional strategies for cancer treatment are close to their efficiency limits. Meanwhile, rapid development of experimental immunology and immunotherapy led to first successful experiences in antitumor vaccination. Over last decade, remarkable results were obtained by means of anticancer vaccination being implemented into clinical settings thus causing popularity and growth of interest to tumor-specific DNA vaccines. In this review, we discuss basic principles of a DNA vaccine construction, their structural characteristics and diversity, mechanisms of their biological action, pharmaceutical forms and delivery routes into the body.

*Keywords:* oncology, immunotherapy, antigens, vaccine, antitumor immunity

Проблема терапии онкологических заболеваний занимает важное место в сфере здравоохранения. Традиционные методы лечения включают химиотерапию цитостатическими и таргетными препаратами, хирургию и лучевую терапию.

Эффективность такого лечения зависит от типа опухоли, стадии и доступности терапевтических средств. В большинстве случаев традиционных методов оказывается недостаточно для достижения длительной ремиссии, и лечение сопро-

### Адрес для переписки:

Стёганцева Мария Владимировна  
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии  
223053, Республика Беларусь, Минская обл., д. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43.  
Тел.: +375 (29) 374-77-09.  
Факс: +375 (17) 265-42-22.  
E-mail: stsegantsevam@gmail.com

### Address for correspondence:

Stegantseva Maria V.  
Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology  
223053, Republic of Belarus, Minsk Region, Borovlyany Village, Frunzenskaya str., 43.  
Phone: +375 (29) 374-77-09.  
Fax: +375 (17) 265-42-22.  
E-mail: stsegantsevam@gmail.com

### Образец цитирования:

М.В. Стёганцева, А.Н. Мелешко «Противораковая ДНК-вакцинация: принцип и возможности метода» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 145-156. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-145-156

© Стёганцева М.В., Мелешко А.Н., 2017

### For citation:

M.V. Stegantseva, A.N. Meleshko "Anticancer DNA vaccination: principle and perspectives of the method", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 145-156. doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-145-156

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-2-145-156

воздаётся серьезными побочными эффектами. В связи с этим остается необходимость в новых стратегиях лечения, способах увеличения продолжительности и качества жизни. Одно из наиболее активно развивающихся направлений представляет иммунотерапия. Наиболее важным преимуществом иммунотерапии перед традиционными методами лечения является минимальное проявление побочных эффектов при достаточно высокой эффективности [72]. Основной целью данного вида лечения является задействование ресурсов собственной иммунной системы, ее активация и направленное на опухоль специфическое действие. За последние два десятка лет сформировалось множество направлений иммунотерапии. Выделяют пассивную иммунотерапию антителами, иммуноотоксинами и биспецифическими антителами [20], относимую также к таргетной терапии; иммуномодуляцию, цитокинотерапию [3], лектины [2]; клеточную терапию, включающую НК-клетки, ЛАК-терапию [7] и адаптивный перенос донорских лимфоцитов (DLI) [18]. Наконец, активная иммунотерапия, включающая различные варианты вакцинации, искусственные антигенпрезентирующие клетки [17], генетически модифицированные лимфоциты (T-CAR) [29].

Противоопухолевые вакцины в зависимости от формы антигена можно разделить на клеточные, белковые и ДНК-вакцины. Клеточные вакцины подразумевают использование ослабленных, разрушенных или даже генно-модифицированных аутологичных опухолевых клеток, а также дендритных клеток [50]. Наиболее исследуемыми являются аутологичные дендритные клетки (ДК), которые могут быть «нагружены» любым антигенным белком или опухолевым лизатом *ex vivo*, а затем перелиты обратно пациенту, где они мигрируют в лимфоузел и презентуют таргетный антиген Т-лимфоцитам [14].

Белковые и пептидные препараты вакцин получают из материала опухоли, но чаще используют рекомбинантные белки или синтетические пептиды [46]. Их вводят в виде белковых конъюгатов или в составе с адъювантом. Наконец, ДНК-вакцины представляют собой генетические конструкции (плазмиды), кодирующие определенный антиген. Экспрессия антигенного белка в этом случае происходит в организме после вакцинации. Особенности, механизм действия и способы доставки ДНК-вакцин рассматриваются в этом обзоре.

#### **Опухоль-ассоциированные антигены**

Опухолевые антигены — это белки, экспрессия которых формирует уникальный фенотип опухолевых клеток и/или не свойственна нормальным клеткам. Антигены, пригодные для вакцинации, должны распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами, однако это зависит от природы

антигена. Они могут обладать высокой или низкой опухолевой специфичностью [13].

К антигенам с высокой специфичностью относятся вирусные антигены, продукты мутированных генов, а также антигены, экспрессирующиеся в зародышевых центрах. Вирусы часто являются причиной возникновения опухоли, соответственно, вирусные белки экспрессируются опухолевыми клетками и могут распознаваться Т-лимфоцитами как чужеродные [70]. Примером может служить вирус папилломы человека (ВПЧ), ассоциированный с рядом онкологических заболеваний (рак яичников, шейки матки, гепатокарциномаи т.д.), антигены которого являются приоритетной мишенью для вакцинации. Мутации в генах, в частности в онкосупрессорах, приводят к смещению рамки считывания и синтезу белка, обладающего антигенными свойствами и являющегося потенциальной мишенью для CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов [38]. К этой же группе можно отнести транслокации между генами с образованием химерного транскрипта, который кодирует абсолютно новый белок с полезными для опухоли свойствами (BCR-ABL, TEL-AML1) [75, 76]. К высокоспецифичным антигенам также относятся зародышевые антигены из нескольких семейств MAGE, BAGE, GAGE, LAGE (NY-ESO1) и SSX. Все они располагаются на X-хромосоме и экспрессируются в норме только в зародышевых клетках и клетках трофобласта [19]. Их высокая экспрессия в опухолевых клетках связана с деметилированием промоторов данных генов и является характерной для многих солидных опухолей [63].

К антигенам с низкой специфичностью относятся дифференцировочные антигены и гены с aberrантной экспрессией [70]. Представители данной группы не могут считаться истинными антигенами из-за своей аутологичной природы. Дифференцировочные антигены происходят от белков, которые экспрессируются как в опухолевой, так и в соответствующей здоровой ткани. Большинство идентифицированных дифференцировочных антигенов найдены в клетках меланомы и вовлечены в синтез меланина. К ним относятся gp100, MelanA/MART-1, gp75, TRP2 и др. [78]. Антигены, которые характеризуются опухоль-специфической повышенной экспрессией по сравнению со здоровыми тканями, также представляются потенциальными кандидатами для вакцинации. Например, клетки нейробластомы характеризуются повышенной экспрессией генов тирозин гидроксилазы и Survivin (BIRC-5) [5], а многие эпителиальные опухоли отличаются сверхэкспрессией гена эпителиального фактора роста ERBB2 [27]. Наибольшую сложность составляет определение того пограничного уровня экспрессии между нормальными и опухолевыми клетками, с которого начинается распознавание

Т-лимфоцитами. Значительным недостатком низкоспецифических антигенов является наличие аутоиммунных осложнений, как результата развития специфического иммунного ответа.

#### **Основы противоопухолевого иммунитета**

Противоопухолевый иммунитет включает те же клетки и механизмы, что и противовирусный иммунитет. Иммунологическое распознавание опухолевых клеток опосредовано рецепторами Т-лимфоцитов при презентации опухолевых антигенов в составе комплекса МНС-I или II классов. Эффекторное звено противоопухолевого иммунитета включает продукцию антител В-клетками, цитокинов группы Th1, а также активацию цитотоксических CD8-лимфоцитов. В отличие от противоифекционного иммунитета, иммунитет против опухоли, как правило, подавлен и не эффективен. Причинами этого являются: центральная толерантность лимфоцитов к аутологичным антигенам; снижение экспрессии молекул МНС опухолевыми клетками [30], а также активной иммуносупрессией, вызванной самой опухолью [73].

Согласно теории «иммунного редактирования» (immunoediting), в противоопухолевом иммунном ответе можно выделить три стадии: элиминация, равновесие и избегание [66]. Первый этап предполагает распознавание антигена и его полное уничтожение. Сканирование клеток на признаки перерождения осуществляется совместно компонентами врожденного и приобретенного иммунитета. Представители адаптивного звена CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) распознают антигены, связанные с МНС I класса, который экспрессируется практически на всех ядерных клетках, и реагируют на видоизмененные собственные антигены. Данный механизм может быть неэффективен в случае, когда опухолевые клетки имеют тот же спектр антигенной экспрессии и фенотипически не отличаются от нормальных, в результате, в силу ауто толерантности иммунитета, злокачественные клетки принимаются за свои и игнорируются. Клетки же с отличным от здоровых антигенным репертуаром (мутационные изменения, aberrantная экспрессия) зачастую характеризуются низкой экспрессией молекул МНС I класса, которая достигается нарушением процесса сборки функциональной молекулы, а также процессинга антигена [43]. Натуральные киллеры (NK), клетки врожденного иммунитета, в свою очередь, распознают отсутствие на поверхности клеток «своих» МНС-I, а также активаторных молекул MICA, MICB, ULbp-1,2,3. В ответ опухолевые клетки начинают экспрессировать неклассические молекулы МНС-I — HLA-E, которые оказывают ингибирующее действие, а в растворимой форме приводят к дистанционной активации NK-клеток [33]. В таком случае происходит неполная элиминация

опухолевых клеток, и система переходит в фазу равновесия, когда скорость роста опухоли только сдерживается иммунной системой. В этот период злокачественные клетки накапливают мутации, и под давлением иммунитета отбираются наиболее полезные из них, позволяющие ингибировать активность иммунных клеток [35]. В результате наступает стадия избегания, когда иммунная система больше не в состоянии сдерживать прогрессию опухоли.

Первые эксперименты по вакцинации против опухоли были сомнительны, но широкое развитие экспериментальных моделей позволило достичь терапевтической эффективности. Накопленные экспериментальные данные позволяют выделить те условия, выполнение которых позволит преодолеть иммунологическую толерантность опухоли:

1. Наличие сильных (доминантных) эпитопов МНС-I в составе антигена [54].
2. Активация врожденного иммунитета для обеспечения костимуляции [15].
3. Привлечение дендритных клеток, макрофагов, или доставка вакцины в локусы антигенпрезентирующих клеток.
4. Обеспечение надежной помощи Т-хэлперов 1 типа за счет структуры вакцины и содержание в ней эпитопов распознавания МНС-II [54, 56].

Все эти аспекты учитываются в конструкции ДНК-вакцины и выборе способа ее доставки.

#### **ДНК-вакцины: принцип и история создания**

Родоначальниками ДНК-вакцинации принято считать Tang и коллег, которые в 1992 году показали, что инъекция плазмиды, содержащей гормон роста человека, способна вызывать гуморальный иммунный ответ против гормона, что свидетельствует о том, что ДНК может быть использована для индукции специфического иммунного ответа [67]. С этого момента мировое научное сообщество захлестнула волна исследований, которая имела два доминирующих течения: противоифекционная и противораковая вакцинация. В рамках противораковой вакцинации намечилось две стратегии: первая подразумевала поддержание собственного иммунитета посредством внесения генов активирующих цитокинов (IL-2, IL-12) [12], вторая же была нацелена на индукцию гуморального и клеточного иммунитета против вносимого антигена [12, 52]. Уже в 1994 году начались клинические испытания генетических вакцин против меланомы и других солидных опухолей [25]. За последние два десятка лет данная отрасль науки существенно обогатилась, и на сегодняшний день ДНК-вакцина представляет собой сложную многокомпонентную генетическую конструкцию, каждое звено которой выполняет определенную функцию.

Как же устроена ДНК-вакцина? «Костяк» конструкции представлен плазмидным век-

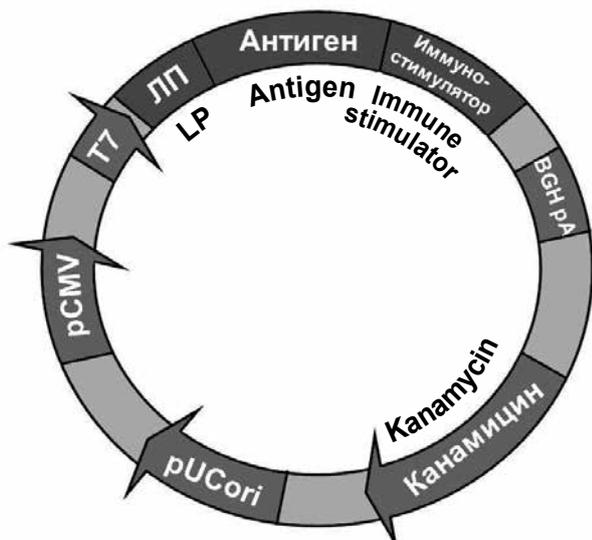


Рисунок 1. Схематическое изображение ДНК-вакцины  
Примечание. ЛП – лидерный пептид, BGHра – сайт полиаденилирования, рUCori – точка начала репликации, рСМВ – эукариотический промотер, Т7 – бактериальный промотер.

Figure 1. Schematic view of DNA vaccine

Note. LP, leader peptide; BGHра, polyadenylation site; рUCori, replication starting point; рСМВ, eukaryotic promoter; Т7, bacterial promoter.

тором, в который по рестрикционным сайтам встроена полноразмерная кДНК интересующего нас опухолевого антигена или ее часть (рис. 1). Важными составляющими самого вектора являются наличие мощного промотера, который обеспечит длительную экспрессию трансгена, например промотер цитомегаловируса (рСМВ), наличие точек начала репликации для бактерий (рUCori) и эукариот (SV40 ori), а также ген устойчивости к антибиотику для селекции клонов. Наиболее часто используется селекция по канамицину и ампициллину. Самыми распространенными векторами являются рING, рсDNA3 (3.1) и рСМВ. Существует ряд требований и к встраиваемой кДНК. Безусловно, она должна начинаться со старт-кодона (ATG) и заканчиваться одним из терминирующих кодонов (TAG, TAA). Иногда рекомендуют достраивать несколько стоп-кодонов подряд, чтобы транскрипция наверняка закончилась в конце кодируемого гена. Следует учитывать также тот факт, что в самом транскрипте может содержаться несколько старт-кодонов, и чтобы трансляция началась именно с первого, его обозначают консенсусной последовательностью Козак, которая является важным элементом для инициации трансляции. Для обеспечения проникновения ДНК-вакцины в ядро клетки, часто к конструкции «пришивают» пептид ядерной локализации, который распознается транспортными системами клетки [77].

Индукция антительного иммунного ответа существенно усиливается для секретируемых белков. Для этого в состав конструкции иногда включают лидерный пептид, который способствует транспорту таргетного белка из клетки [56].

В последнее время популярностью пользуются мультиэпитопные конструкции [9], которые содержат несколько опухолевых антигенов, и последовательность иммуностимулятора для усиления иммуногенности, и/или ген цитокина, который должен задавать направление развитию иммунного ответа. Зачастую используют IL-2 и IL-12 для сдвига иммунного ответа в сторону Th1 [21]. Такое разнообразие компонентов вакцины и позволяет ей индуцировать полноценный специфический иммунный ответ против опухоли.

#### Механизм действия ДНК-вакцин

Механизм действия ДНК-вакцин до сих пор до конца не изучен и зависит от множества факторов: компонентов вакцины, пути введения, носителей ДНК, локализации антигена и др. После инъекции препарата ДНК попадает в межклеточное пространство и может трансффицировать либо стромальные клетки, либо напрямую проникать в местные профессиональные антигенпрезентирующие клетки (пАПК), например ДК. Наиболее распространенным путем проникновения нуклеиновых кислот в клетку является эндоцитоз, в результате чего образуется эндосома с рН = 6. Данная среда не является разрушительной для генетического материала, и, прежде чем эндосома сольется с лизосомой, ДНК высвобождается из везикулы и мигрирует в ядро, избегая тем самым ферментативного разрушения [37]. В ядре происходит транскрипция закодированного антигена и высвобождение транслированного белка в цитоплазму или секреция его из клетки, в зависимости от того, как это предусмотрено конструкцией вакцины. Цитоплазматический белок с большей вероятностью будет презентирован в составе МНС-I, секреторный – поглощаться другими клетками и презентирован в составе МНС-II. Несмотря на стремление достичь с помощью вакцинации цитотоксического иммунного ответа против внутриклеточных белков, секреторные антигены более эффективны в дизайне ДНК-вакцин, так как вовлекают больше клеток в контакт с белком [54]. В случае ДК это приводит к их созреванию и миграции в близлежащий лимфатический узел, где и происходит презентация антигена «наивным» CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитам. Однако, прямая трансфекция ДК плазмидной ДНК редкое событие, наиболее вероятно активация АПК через стромальные клетки. Клетки стромы, например мышечные клетки, могут высвобождать наработанный Ag во внеклеточное пространство, где он поглощается ДК и, как экзогенный Ag, пре-

зентируется в составе МНС-II класса «наивным» CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитам. В зависимости от спектра цитокинов в микроокружении и костимуляторных сигналов от ДК CD4<sup>+</sup>Т-лимфоциты могут дифференцироваться в различные подтипы хелперных клеток (Th). Фолликулярные Th праймируют В-лимфоциты к переходу в плазматические клетки, а спектр продуцируемых ими цитокинов может влиять на переключение изотипов антител (Аг). Под действием интерлейкина-12 (IL-12), гамма-интерферона (IFN $\gamma$ ) и интерферонов I типа (IFN-I) CD4<sup>+</sup>Т-клетки дифференцируются в Th 1 типа (Th1), которые, в свою очередь, продуцируют IFN $\gamma$  и IL-2. Первый служит медиатором воспаления и аттрактантом для новых иммунных клеток, а второй является главным активатором CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов [16]. Кроме того, ДК способны презентировать экзогенный Аг, полученный от близлежащих клеток, в комплексе с МНС-I класса CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитам. Это возможно благодаря явлению под названием «кросс-презентация» [24, 55]. Одним из главных индукторов кросс-презентации является IFN-I, секретируемый стромальными клетками при поглощении Аг [16].

Важным компонентом ДНК-вакцины, способным вызывать активацию врожденного иммунитета, является наличие патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP, от англ. Pathogen associated molecular patterns), а именно не метилированные CpG динуклеотиды, которые с высокой плотностью содержатся в вирусной и бактериальной ДНК и, в частности, в плазмидной ДНК (пДНК). Они обеспечивают первый «сигнал угрозы», который получает иммунная система при инфекции. Эти сигнальные участки детектируются рецептором TLR9, расположенным в стромальных и дендритных клетках [32]. В связи с тем что врожденный иммунитет развивается значительно быстрее и стимулирует адаптивный иммунный ответ, целесообразным является искусственное внесение в ДНК-конструкцию дополнительных CpG нуклеотидов, а также использование в качестве адъювантов генов вирусных частиц.

Кроме самого опухоль-ассоциированного антигена, в конструкцию могут быть закодированы гены различных цитокинов и хемокинов, что позволит создать первоначальное микроокружение и направить развитие ИО. На сегодняшний день для доклинических исследований применяют ДНК-вакцины с IL-2 [45], IL-12 [65], MIP3A [49], GM-CSF [6] и др. Другим способом стимуляции иммунного ответа является включение ксеногенной последовательности бактериального или вирусного белка, содержащего сильные эпитопы МНС-II для распознавания CD4-лимфоцитами. Наиболее часто используют фрагмент С столбнячного токсина (FrCTT) [53], реже исполь-

зуют другие гены: GFP, белок капсида вируса X-картофеля (PVXCP) [57].

Теоретически мультикомпонентные ДНК-вакцины должны вызывать полноценный иммунный ответ, однако большое значение имеет место введения препарата. Среди наиболее часто описанных можно выделить: внутривенный, внутримышечный, внутрикожный и доставка к слизистым. Преимущества внутривенного введения заключаются в быстром распределении вакцины по организму и контакте с большим количеством иммунных клеток. В то же время кровь является достаточно агрессивной средой для плазмидной ДНК, которая быстро деградирует под действием ферментов. Недостатком внутримышечной доставки пДНК является отсутствие на поверхности миоцитов важных костимуляторных молекул, необходимых для успешной презентации антигена в комплексе с МНС-I класса CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитам [62]. Комплексообразование Аг с МНС-II класса также затруднено, т.к. в мышечной ткани ДК и резидентные макрофаги встречаются довольно редко. Тем не менее принято полагать, что сама по себе инъекция вызывает образование воспалительного инфильтрата, который несет пАПК, поглощающие Аг. С этой точки зрения наиболее удачным является внутрикожное введение, в связи с тем, что оно является первым защитным барьером на пути чужеродных микроорганизмов и содержит большое количество макрофагов, или клеток Лангерганса [1]. То же можно отнести и к доставке вакцин к слизистым оболочкам. Самыми популярными на сегодняшний день являются вагинальная, интраназальная и слизистая оболочка рта и кишечника [48].

Отдельно следует отметить два инновационных пути введения ДНК-вакцин: внутрь опухоли (интратуморально) [51] и в близлежащий к опухоли лимфоузел [28, 64]. Оба метода имеют высокую эффективность по сравнению с более стандартными, но при этом связаны с рядом неудобств. Так, опухоль не всегда доступна над поверхностью тела и визуально доступна, а инъекция в лимфоузел должна проводиться под контролем УЗИ.

#### **Преимущества и недостатки ДНК-вакцин**

ДНК-вакцинация, как и любой вид терапии, имеет свои преимущества и недостатки (табл. 1). ДНК как материал вакцины обеспечивает ее безопасность и минимальные проявления побочных эффектов, связанных в основном с кодируемым антигеном. Процесс производства вакцины прост, экономичен и обеспечивает должную чистоту конечного продукта, что сокращает нежелательные иммунные реакции, в отличие, например, от белковых вакцин, производство и очистка которых весьма затратна. ДНК обладает достаточно высокой стабильностью и не требует особых условий содержания, что облегчает

транспортировку и хранение вакцины. Главным преимуществом ДНК-вакцины является пластичность ее дизайна, т.к. компоненты можно менять и комбинировать в зависимости от целей исследования методами генной инженерии. Конструкция может включать один или несколько антигенов, гены-костимуляторы, различные регуляторные элементы, а также кодировать белки, определяющие транспортировку и метаболизм экспрессируемого антигена. Стоит также отметить, что специфический антиген, закодированный в виде молекулы ДНК, внутри клетки будет подвергнут такому же гликозилированию и посттрансляционным модификациям, как и «родные» белки. Благодаря такому многообразию компонентов ДНК-вакцина может индуцировать клеточное и гуморальное звено как адаптивного, так и врожденного иммунитета [74].

Главным и, пожалуй, единственным существенным недостатком ДНК-вакцин является низкая иммуногенность, которая обусловлена рядом причин. Часть пДНК разрушается в межклеточном пространстве. Молекулы ДНК несут отрицательный заряд, что препятствует их проникновению через положительно заряженную липидную мембрану клетки. В случае успешного эндоцитоза пДНК попадает в эндосому, рН которой постоянно падает, соответственно,

высвобождение из эндосомы является важным фактором на пути достижения ядра [37]. Несмотря на такое количество препятствий, даже введение «голой» пДНК доказало свою эффективность в доклинических исследованиях [26]. В связи с этим основные усилия исследователей направлены на разработку способов повышения иммуногенности ДНК-вакцин путем облегчения внутриклеточного трафика и создания микроокружения, способствующего быстрому реагированию иммунной системы.

#### Способы доставки ДНК-вакцин

Одним из методов усиления эффективности ДНК-вакцинации является подбор оптимального способа доставки. За последний десяток лет предложено множество носителей пДНК, которые способны не только «провести» вакцину в ядро клетки, но и обеспечить ей дополнительную иммуногенность. Согласно природе каждого из переносчиков нуклеиновых кислот, их можно разделить на химические, физические и биологические (табл. 2).

Первая группа химических носителей, которые могут быть как синтетическими, так и природными соединениями, представлена катионными полимерами, такими как полиэтиленмин (ПЭИ), полилизин, хитозан, и др. Механизм их действия заключается в наличии высокой кон-

ТАБЛИЦА 1. ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ДНК-ВАКЦИН  
TABLE 1. BENEFITS AND LIMITATIONS OF DNA VACCINES

Преимущества Benefits	Характеристика Characteristics	Недостатки Limitations
<b>Безопасность</b> Safety	<b>Побочных эффектов на данный момент в ходе клинических испытаний не выявлено, биodeградируемы, не токсичны</b> No side effects are revealed during clinical trials so far, biodegradable, non-toxic	<b>Не известны последствия длительной персистенции чужеродного генетического материала в организме</b> Lack of information on the long-term consequences of foreign genetic substance in the body
<b>Простота в изготовлении и экономичность</b> Simplicity of production and low-cost procedures	<b>Дизайн конструкции полностью зависит от цели исследования и может включать несколько антигенов, гены-костимуляторы, регуляторные элементы</b> Design of the genetic construct entirely depends on the purpose of the study which may include several antigens, costimulator genes, regulatory elements	<b>Для достижения напряженного иммунитета требуется несколько инъекций</b> Several injections are required to develop efficient immune response
<b>Иммуногенность</b> Immunogenicity	<b>Индукцируют как врожденный, так и приобретенный иммунитет (клеточный и гуморальный)</b> The DNA vaccines induce both innate and adaptive immunity (i.e., cellular and humoral response)	<b>Необходимо использование иммуностимуляторов</b> Immunostimulatory agents should be used
<b>Стабильность</b> Stability	<b>Высокая термоустойчивость, длительное время экспрессии</b> High thermostability, long-term expression	<b>Легко разрушаются в межклеточном пространстве и внутриклеточно</b> Prone to degradation both in extracellular space and intracellularly

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ДОСТАВКИ ДНК-ВАКЦИН  
TABLE 2. CHARACTERISTICS OF DELIVERY TECHNIQUES FOR DNA-BASED VACCINES

Группа Class of methods	Метод Method	Решаемые проблемы Problems resolved	Побочные эффекты Side effects
Химические Chemical	Катионные полимеры Cationic polymers	<p>Облегчают транспорт через мембрану клетки Easier transportation via cell membrane</p> <p>Высвобождение из эндосомы Endosomal release</p> <p>Защищают от нуклеаз Nuclease protection</p> <p>Увеличивают цитоплазматическую мобильность Higher cytoplasmic mobility</p> <p>Низкая стоимость Low costs</p>	<p>Микротромбы при системном введении Microthrombi arise upon systemic injections</p> <p>Лимфопения Lymphopenia</p> <p>Повышения уровня печеночных ферментов, некроз печени Increased liver enzymes in serum, liver necrosis</p> <p>Некоторые представители не биodeградируемы Some species are bio-nondegradable</p> <p>Дозозависимая токсичность Dose-dependent toxicity</p>
	Липиды Lipids	<p>Высокий процент комплексования с ДНК High-rate complexing with DNA</p> <p>Облегчают транспорт через мембрану клетки Easier transportation via cell membrane</p> <p>Высвобождение из эндосомы (некоторые) Endosomal release (in some models)</p> <p>Биodeградируемы Biodegradable</p>	<p>Токсичны Toxicity problems</p>
Биологические Biological	Аттенуированные бактерии Attenuated bacteria	<p>Прямая доставка в клетки хозяина Direct delivery to the host cells</p> <p>Предохраняет от деградации Prevents from degradation</p> <p>Активируют врожденный и адаптивный иммунитет Activation of innate and adaptive immunity</p>	<p>Побочные эффекты (диарея) Side effects (diarrhea)</p>
	«Тени» «Cell ghosts»	<p>Обладают тропностью к АПК Exhibit tropicity for antigen-presenting cells (APC)</p> <p>Предохраняет от деградации Prevent from degradation</p> <p>Активируют врожденный и адаптивный иммунитет Activation of innate and adaptive immunity</p>	<p>Не описаны Not described</p>
Физико-механические Physico-mechanical	Баллистическая трансфекция (генная пушка) Ballistic transfection (gene gun)	<p>Прямая трансфекция АПК и сателлитных клеток Direct transfection of APC and satellite cells</p> <p>Эффективно в низких концентрациях Effective at low concentrations</p>	<p>Дискомфорт во время процедуры Discomfort during the procedure</p>
	Электропорация Electroporation	<p>Прямая трансфекция АПК и сателлитных клеток Direct transfection of APC and satellite cells</p> <p>Эффективно в низких концентрациях Effective at low concentrations</p> <p>Возможность использования нескольких эпитопов для вакцинации An opportunity for several epitopes participating in vaccination</p> <p>Невысокая стоимость Reasonable costs</p>	<p>Дискомфорт во время процедуры Discomfort during the procedure</p>
	Татуаж Tattooing	<p>Большая площадь поверхности Big vaccination area</p> <p>Формирование «сигналов угрозы» Formation of «alert (threat) signals»</p>	<p>Дискомфорт во время процедуры Discomfort during the procedure</p>

центрации положительно заряженных атомов азота, которые способны электростатически связывать отрицательно заряженные фосфатные группы нуклеиновых кислот [31]. Это приводит к конденсации ДНК и образованию так называемого полиплекса. Все потенциальные катионные переносчики, кроме ПЭИ, показали незначительную эффективность даже *in vitro*, т.к. последний характеризуется наибольшей плотностью заряда и высокой степенью комплексования с ДНК [23]. Образование положительно заряженного полиплекса облегчает проникновение пДНК через отрицательно заряженную фосфолипидную мембрану, защищает от эндонуклеаз в цитоплазме клетки, а также обеспечивает избежание эндосомального лизиса, т.к. ПЭИ выступает в роли акцептора протонов. Имеются сведения, что полимер может взаимодействовать с фибриллами актина, изменяя структуру цитоскелета, тем самым увеличивая проницаемость ядерной мембраны для крупных молекул. При всех своих преимуществах ПЭИ имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, он не подвергается метаболизму и, соответственно, не выводится из организма, а накапливается в печени, что может приводить к повышению уровня печеночных ферментов, а в высоких дозах к некрозу печени [10]. При системном введении ПЭИ многократно усиливает адгезивную способность лейкоцитов за счет повышения экспрессии рецептора CD11b, а также приводит к агрегации тромбоцитов и микротромбам [10].

В связи с высокой трансфецирующей активностью ПЭИ ученые пытаются преодолеть его негативные свойства. Для вакцинации предлагается использование линейного ПЭИ с низкой молекулярной массой (8-25 kDa), обладающего наименьшей токсичностью [36]. Проведен ряд исследований по созданию биодegradуемых форм ПЭИ за счет присоединения к нему другого соединения посредством соответствующих химических групп: эстеразной, дисульфидной, амидной и др. [8]. Также используется создание вокруг полиплекса микросферы, которая сможет экранировать его от внешней среды, предотвращая побочные эффекты. Kodama et al. предложили комплексовать ПЭИ/ДНК с полинуклеотидами, среди которых полицитидиновая кислота (PolyC) оказалась наиболее эффективной [34]. Также полиплексы «одевают» в полиэтиленгликоль (ПЭГ), фолат-ПЭГ и др. [59].

Ко второй группе химических носителей относятся катионные липиды. Принцип их действия такой же, как и у катионных полимеров. За счет электростатического взаимодействия образуется комплекс липид/ДНК, или липоплекс [39]. Преимущества липидных носителей заключается в высокой степени комплексования

с пДНК независимо от ее количества, в отличие от, например, ПЭИ, значительная часть которого остается в несвязанном состоянии и может повреждать клетки [31]. Все используемые для ДНК-трансфекции липиды отличаются только катионной группой головки, линкером и липофильным хвостом молекулы – три главные структуры, которые всегда присутствуют в липидах, используемых для трансфекции. Среди наиболее исследованных можно выделить 1,2-диолеил-3-триметиламониум (DOTAP) [11]. Катионные липиды часто используются в комбинации с нейтральными вспомогательными липидами, такими как L-альфа-диолеилфосфатидилэтаноламин или холестерол, для усиления трансфецирующих способностей комплекса [79]. Существенным недостатком липидов является их токсичность.

С целью преодолеть недостатки данных методов ученые разрабатывают все более сложные и многофункциональные конструкции для доставки ДНК. Так, Veiman et al. сконструировали вектор для доставки, который подразумевает комплекс ДНК с белком, обеспечивающим проникновение в клетку (cell penetrating peptide), и с субстратом для металлопротеиназ, которые должны разъединить комплекс. Все это «одето» в микросферу из ПЭГ. Показано, что данный вектор усиливает экспрессию антигена преимущественно в опухолевых клетках, избегая нормальных тканей [68].

Также стоит отметить одну из последних разработок по доставке ДНК на основе липидов – солидные липидные наночастицы (СЛН) [44]. Они усиливают доставку в АПК, обеспечивают проникновение комплекса в клетку, а также защищают его от дегградации. Это коллоидные системы, которые состоят из физиологически адаптированных компонентов. Они имеют крайне низкую степень токсичности и показывают отличные результаты в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. СЛН являются одними из наночастиц, одобренных для клинического применения на людях [59].

Биологические способы доставки ДНК-вакцин представлены генно-модифицированными и аттенуированными бактериями, а также их оболочками. Данный метод представляется очень перспективным, т.к. сами по себе бактерии являются очень сильным триггером для иммунной системы и вызывают развитие как гуморального, так и клеточного иммунитета. Кроме того, некоторые бактерии способны доставлять антиген напрямую в клетки. Суть данного процесса заключается в том, что бактерия, несущая трансген, проникает в клетку хозяина, зачастую АПК, где вокруг нее формируется лизосома. Бактерия разрушается, высвобождая плазмиду в цитоплазму клетки. Затем пДНК мигрирует в ядро, где и происходит транскрипция и последующая

трансляция интересующего нас белка. К наиболее используемым для вакцинации внутриклеточным патогенным микроорганизмам относятся *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* [47, 60], в отдельных случаях испытывали *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* и *E. coli* [40, 61]. Достоинствами такого способа доставки вакцин является прямая доставка в клетки-мишени, защита от нуклеаз и лизосомальных ферментов. Бактерии – это природные носители РАР, что модулирует врожденный и запускает адаптивный иммунитет [48].

Физико-механические способы доставки включают достаточно дорогостоящие и порой болезненные методы, по эффективности сопоставимые с химическими. Основной целью данных методов является прямая трансфекция АПК. В случае «генной пушки» пДНК комплексируется с золотыми микрочастицами, которые под действием сжатого гелия бомбардируют эпидермис, пробивая клетки Лангерганса. Согласно последним исследованиям данный метод более эффективен, нежели внутримышечные инъекции [41].

Электропорация (ЭП) применяется как для внутрикожной, так и для внутримышечной доставки. ЭП использует короткие электрические импульсы для дестабилизации клеточной мембраны. Это приводит к фазовым переходам мембраны и образованию транзиторных пор, которые позволяют макромолекулам, таким как ДНК, проникать внутрь клетки [22]. Электротрансфекция мышечных клеток более продуктивна по сравнению с кожей, т.к. экспрессия трансгена продолжается до нескольких месяцев

вместо нескольких недель. Это обусловлено скоростью обновления клеток. В целом электропорация представляется довольно перспективным направлением, и разработано уже несколько коммерческих систем, применяемых для проведения клинических исследований: DERMA VAX™, TriGrid и др.

Одним из новых веяний в области ДНК-вакцин является татуаж для внутрикожной доставки препарата. Verstrepen et al. показали эффективность данной методики в исследованиях на мышах и не человекообразных приматах. Иммуногенность такого рода доставки, вероятно, обусловлена «сигналами угрозы», которые формируются в результате механического повреждения кожи татуировочной иглой. На данный момент проходят клинические испытания, которые должны показать, насколько эффективна данная методика применительно к людям [69].

Среди прочих следует упомянуть такие методы, как Jet-инжекторы, ультразвук и микроиглы [58, 71].

## Заключение

На протяжении уже двух десятков лет продолжают исследования ДНК-вакцин. Многочисленные клинические испытания подтверждают целесообразность и рентабельность их использования. Ввиду значительных преимуществ ДНК-вакцин необходимы дальнейшие исследования по повышению иммуногенности данного вида иммунотерапии.

## Список литературы / References

1. Попов Ю.А., Микшис Н.И. Генетические (ДНК) вакцины // Проблемы особо опасных инфекций, 2010. Т. 105. С. 20-24. [Popov Yu.A., Mikshis N.I. Genetic (DNA) vaccines. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Plague Problems*, 2010, Vol. 105, pp. 20-24. (In Russ.)]
2. Южакова Д.В., Ширманова М.В., Сергеева Т.Ф., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А. Иммуноterapia злокачественных новообразований // Современные технологии в медицине, 2016. Т. 8, № 1. С. 173-182. [Yuzhakova D.V., Shirmanova M.V., Sergeeva T.F., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A. Immunotherapy of Cancer. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2016, Vol. 8, no. 1, pp. 173-182. (In Russ.)]
3. Ardolino M., Hsu J., Raulet D.H. Cytokine treatment in cancer immunotherapy. *Oncotarget.*, 2015, Vol. 6, no. 23, pp. 19346-19347.
4. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, Vol. 92, no. 16, pp. 7297-7301.
5. Brodeur G.M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, Vol. 3, no. 3, pp. 203-216.
6. Chang D.Z., Lomazow W., Somberg C.J., Stan R., Perales M.A. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor: an adjuvant for cancer vaccines. *Hematology*, 2004, Vol. 9, no. 3, pp. 207-215.
7. Cheng M., Chen Y., Xiao W., Sun R., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell. Mol. Immunol.*, 2013, Vol. 10, no. 3, pp. 230-252.
8. Cho C.S. Design and development of degradable polyethylenimines for delivery of DNA and small interfering RNA. *ISRN Materials Science*, 2012, Vol. 2012, pp. 1-24.
9. Cho H.I., Celis E. Design of immunogenic and effective multi-epitope DNA vaccines for melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 3, pp. 343-351.
10. Chollet P., Favrot M.C., Hurbin A., Coll J.L. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *J. Gene Med.*, 2002, Vol. 4, no. 1, pp. 84-91.

11. Christensen D., Korsholm K.S., Andersen P., Agger E.M. Cationic liposomes as vaccine adjuvants. *Expert Rev. Vaccines*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 785-796.
12. Conry R.M., LoBuglio A.F., Kantor J., Schlom J., Loechel F., Moore S.E., Sumerel L.A., Barlow D.L., Abrams S., Curiel D.T. Immune response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. *Cancer Res.*, 1994, Vol. 54, no. 5, pp. 1164-1168.
13. Coulie P.G., Eynde B.J., Bruggen P., Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2014, Vol. 14, no. 2, pp. 135-146.
14. Datta J., Terhune J.H., Lowenfeld L., Cintolo J.A., Xu S., Roses R.E., Czerniecki B.J. Optimizing dendritic cell-based approaches for cancer immunotherapy. *Yale J. Biol. Med.*, 2014, Vol. 87, no. 4, pp. 491-518.
15. Dempsey A., Bowie A.G. Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*, 2015, Vol. 479-480, pp. 146-152.
16. Desmet C.J., Ishii K.J. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 479-491
17. Eggermont L.J., Paulis L.E., Tel J., Figdor C.G. Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends Biotechnol.*, 2014, Vol. 32, no. 9, pp. 456-465.
18. El-Jurdi N., Reljic T., Kumar A., Pidala J., Bazarbachi A., Djulbegovic B., Kharfan-Dabaja M.A. Efficacy of adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusion in relapsed lymphoid malignancies. *Immunotherapy*, 2013, Vol. 5, no. 5, pp. 457-466.
19. Fratta E., Corals., Covre A., Parisi G., Colizzi F., Danielli R., Nicolay H.J., Sigalotti L., Maio M. The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol. Onc.*, 2011, Vol. 5, no. 2, pp. 164-182.
20. Geresu M.A., Sultan A.F., Seifudin K.A., Gezahegne M.K. Immunotherapy against cancer: A comprehensive review. *J. Cancer Res. Exp. Oncol.*, 2016, Vol. 8, no. 2, pp. 15-25.
21. Giedlin M.A. Cytokines as vaccine adjuvants: the use of interleukin-2. Ed. O'Hagan D.T. *Vaccine Adjuvants*, 2000, Vol. 42, pp. 283-297.
22. Gothelf A., Gehl J. What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2012, Vol. 8, no. 11, pp. 1694-1702.
23. Grant E.V., Thomas M., Fortune J., Klivanov A.M., Letvin N.L. Enhancement of plasmid DNA immunogenicity with linear polyethylenimine. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 11, pp. 2937-2948.
24. Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol. Rev.*, 2004, Vol. 199, no. 1, pp. 9-26.
25. Hersh E.M., Akporiaye E., Harris D., Stopeck A.T., Unger E.C., Warneke J.A., Kradjian S.A. Phase I study of immunotherapy of malignant melanoma by direct gene transfer. *Hum. Gene Ther.*, 1994, Vol. 5, no. 11, pp. 1371-1384.
26. Herweijer H., Wolff J.A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Therapy*, 2003, Vol. 10, no. 6, pp. 453-458.
27. Hynes N.E., Lane H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, Vol. 5, no. 7, pp. 341-354.
28. Jeanbart L., Ballester M., Titta A., Corthesy P., Romero P., Hubbell J.A., Swartz M.A. Enhancing efficacy of anticancer vaccines by targeted delivery to tumor-draining lymph nodes. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 5, pp. 436-447.
29. Khalil D.N., Smith E.L., Brentjens R.J., Wolchok J.D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Onc.*, 2016, Vol. 13, no. 5, pp. 273-290.
30. Khanna R. Tumor surveillance: missing peptides and MHC molecules. *Immunol. Cell Biol.*, 1998, Vol. 76, no. 1, pp. 20-26.
31. Kichler A., Behr J.P., Erbacher P. Polyethylenimines: a family of potent polymers for nucleic acid delivery. Ed. Huang L., Hung M.C., Wagner E. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*, 1999, pp. 191-206.
32. Kobiyama K., Jounai N., Aoshi T., Tozuka M., Takeshita F., Coban C., Ishii K.J. Innate immune signaling by and genetic adjuvants for DNA vaccination. *Vaccines*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 278-292.
33. Kochan G., Escors D., Breckpot K., Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunol.*, 2013, Vol. 2, no 11, pp. e26491-e26498.
34. Kodama Y., Ohkubo C., Kurosaki T., Egashira K., Sato K., Fumoto S., Nishida K., Higuchi N., Kitahara T., Nakamura T., Sasaki H. Secure and effective delivery system of plasmid dna coated by polynucleotide. *J. Drug Target.*, 2014, Vol. 23, no. 1, pp.43-51.
35. Koh Y.T., García-Hernández M.L., Kast W.M. Tumor immune escape mechanisms. Ed. Teicher B. *Cancer Drug Resistance*, 2006, pp. 577-602.
36. Kunath K., Harpe A., Fischer D., Petersen H., Bickel U., Voigt K., Kissel T. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and *in vivo* distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J. Control. Release*, 2003, Vol. 89, no. 1, pp. 113-125.
37. Liang W., Lam K.W. Endosomal escape pathways for non-viral nucleic acid delivery systems. *J. Control. Release*, 2012, Vol. 151, no. 3, pp. 220-228.
38. Linnebacher M., Gebert J., Rudy W. Frameshift peptide derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int. J. Cancer*, 2001, Vol. 93, no. 1, pp. 6-11.

39. Ma B., Zhang S., Jiang H., Zhao B., Lu H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Control. Release*, 2007, Vol. 123, pp. 184-194.
40. Mariri A., Tibor A., Lestrade P., Mertens P., Bolle X., Letesson J.J. *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.*, 2002, Vol. 70, no. 4, pp. 1915-1923.
41. McAllister J., Proll D. Comparison of DNA vaccine delivery systems: intramuscular injection versus gene gun administration. *DSTO*, 2004, Vol. 0567, pp. 1-9.
42. McCreery T.P., Sweitzer R.H., Unger E.C., Sullivan S. DNA Delivery to cells *in vivo* by ultrasound gene delivery to mammalian cells. Ed. Heiser W.C. *Methods in Molecular Biology*, 2004, Vol. 245, pp. 293-298.
43. Melero I., Gaudernack G., Gerritsen W., Huber C., Parmiani G., Scholl S., Thatcher N., Wagstaff J., Zielinski C., Faulkner I., Mellstedt H. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Onc.*, 2014, Vol. 11, pp. 509-524.
44. Mukherjee S., Ray S., Thakur R.S. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J. Pharm. Sci.*, 2009, Vol. 71, no. 4, pp. 349-358.
45. Overwijk W.W., Theoret M.R., Restifo N.P. The future of interleukin-2: enhancing therapeutic anticancer vaccines. *Cancer J. Sci. Am.*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. S76-S80.
46. Parmiani G., Russo V., Maccalli C., Parolini D., Rizzo N., Maio M. Peptide-based vaccines for cancer therapy. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2014, Vol. 10, no. 11, pp. 3175-3178.
47. Paterson Y., Guirnalda P.D., Wood L.M. *Listeria* and *Salmonella* bacterial vectors of tumor-associated antigens for cancer immunotherapy. *Semin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 3, pp. 183-189.
48. Pereira V.B., Zurita-Turk M., Saraiva T.L., Castro C.P. DNA vaccine approach: from concepts to applications. *World J. Vaccin.*, 2014, Vol. 4, no. 2, pp. 50-71.
49. Qin H., Cha S., Neelapu S.S., Lou Y., Wei J., Liu Y.J., Kwak L.W. Vaccine site inflammation potentiates idiotype DNA vaccine-induced therapeutic T cell-, and not B cell-, dependent antilymphoma immunity. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 19, pp. 4142-4149.
50. Radhakrishnan A.K. Advances in immunotherapy using dendritic cells. *JSME*, 2012, Vol. 6, pp. 113-117.
51. Radkevich-Brown O., Piechocki M.P., Back J.B., Weise A.M., Pilon-Thomas S., Wei W.Z. Intratumoral DNA electroporation induces anti-tumor immunity and tumor regression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, Vol. 59, no. 3, pp. 409-417.
52. Restifo N.P., Minev B.R., Taggarse A.S., McFarland B.J., Wang M., Irvine K.R. Enhancing the recognition of tumour associated antigens. *Folia Biol.*, 1994, Vol. 40, no. 1-2, pp. 74-88.
53. Rice J., Elliott T., Buchan S., Stevenson F.K. DNA fusion vaccine designed to induce cytotoxic T cell responses against defined peptide motifs: implications for cancer vaccines. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1558-1565.
54. Rice J., Ottensmeier C.H., Stevenson F.K. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2008, Vol. 8, no. 2, pp. 108-120.
55. Rock K.L., Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 207, no. 1, pp. 166-183.
56. Savelyeva N., Allen A., Chotprakaikiat W., Harden E., Jobsri J., Godeseth R., Wang Y., Stevenson F., Ottensmeier C. Linked CD4 T cell help: broadening immune attack against cancer by vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2016 [Epub ahead of print].
57. Savelyeva N., Zhu D., Stevenson F.K. Engineering DNA vaccines that include plant virus coat proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2003, Vol. 20, no. 1, pp. 101-116.
58. Seok H.Y., Suh H., Baek S., Kim Y.C. Microneedle applications for DNA vaccine delivery to the skin. *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1143, pp. 141-158.
59. Shah M.A. Nanoparticles for DNA vaccine delivery. *J. Biomed. Nanotech.*, 2014, Vol. 10, no. 9, pp. 2332-2349.
60. Shahabi V., Maciag P.C., Rivera S., Wallecha A. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng. Bugs.*, 2010, Vol. 1, no. 4, pp. 235-243.
61. Shata M.T., Hone D.M. Vaccination with a *Shigella* DNA vaccine vector induces antigen-specific CD8<sup>+</sup>T cells and antiviral protective immunity. *J. Virol.*, 2001, Vol. 75, no. 20, pp. 9665-9670.
62. Shedlock D.J., Weiner D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leuk. Biol.*, 2000, Vol. 68, no. 6, pp. 793-806.
63. Sigalotti L., Fratta E., Coral S. Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, no. 24, pp. 9167-9171.
64. Smith K.A. Multivalent immunity targeting tumor-associated antigens by intra-lymph node DNA-prime, peptide-boost vaccination. *Cancer Gene Ther.*, 2011, Vol. 18, no. 1, pp. 63-76.
65. Song K., Chang Y., Prud'homme G.J. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune-gene knockout mice. *Gene Therapy*, 2000, Vol. 7, no. 18, pp. 1527-1535.
66. Swann J.B. Immune surveillance of tumors. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1137-1146.
67. Tang D.C., DeVit M., Johnston S.A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 1992, Vol. 356, no. 6365, pp. 152-154.
68. Veiman K.L., Künnapuu K., Lehto T., Kiisholts K., Pärn K., Langel Ü., Kurrikoff K. PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery *in vivo*. *J. Control. Release*, 2015, Vol. 209, pp. 238-247.
69. Verstrepen B.E., Bins A.D., Rollier C.S., Mooij P., Koopman G., Sheppard N.C., Sattentau Q., Wagner R., Wolf H., Schumacher T.N., Heeney J.L., Haanen J.B. Improved HIV-1 specific T-cell responses by short-interval

DNA tattooing as compared to intramuscular immunization in non-human primates. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 26, pp. 346-351.

70. Vigneron N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, pp. 1-17.

71. Walther W., Fichtner I., Schlag P.M., Stein U.S. Nonviral jet-injection technology for intratumoral *in vivo* gene transfer of naked DNA. Ed. Walther W., Stein U.S. *Gene Therapy of Cancer*, 2009, Vol. 542, pp. 195-208.

72. Weir G.M., Liwski R.S., Mansour M. Immune modulation by chemotherapy or immunotherapy to enhance cancer vaccines. *Cancers*, 2011, Vol. 3, no. 3, pp. 3114-3142.

73. Whiteside T.L., Mandapathil M., Szczepanski M., Szajnik M. Mechanisms of tumor escape from the immune system: Adenosine-producing Treg, exosomes and tumor-associated TLRs. *Bull. Cancer*, 2011, Vol. 98, no. 2, pp. 25-31.

74. Williams J.A. Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 225-249.

75. Yotnda P., Firat H., Garcia-Pons F. Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, no. 10, pp. 2290-2296.

76. Yotnda P., Garcia F., Peuchmaur M. Cytotoxic T cell response against the chimeric ETV6-AML1 protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* 1998, Vol. 102, no. 2, pp. 455-462.

77. Zanta M.A., Belguise-Valladier P., Behr J.P. Gene delivery: A single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *PNAS*, 1998, Vol. 96, no. 1, pp. 91-96.

78. Zeuthen J., Kirkin A.F. Recognition of human tumours: melanoma differentiation antigens. Ed. Robins R.A., Rees R.C., *Cancer Immunol.*, 2001, Vol. 30, pp 59-72.

79. Zhang S., Xu Y., Wang B., Qiao W., Liu D., Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J. Control. Release*, 2004, Vol. 100, no. 2, pp. 165-180.

---

**Авторы:**

**Стёганцева М.В.** — магистр биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории генетических биотехнологий, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минская обл., д. Боровляны, Республика Беларусь

**Мелешко А.Н.** — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических исследований, Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минская обл., д. Боровляны, Республика Беларусь

---

**Authors:**

**Stegantseva M.V.**, MBs, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Genetic Research, Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany Village, Minsk Region, Republic of Belarus

**Meleshko A.N.**, PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Genetic Research, Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Borovlyany Village, Minsk Region, Republic of Belarus

---

Поступила 09.11.2016

Отправлена на доработку 24.11.2016

Принята к печати 10.12.2016

---

Received 09.11.2016

Revision received 24.11.2016

Accepted 10.12.2016