

CpG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro*

А.А. Останин¹✉, О.Ю. Леплина¹, Е.А. Буракова^{2,3}, Т.В. Тыринова^{1,2}, А.А. Фокина^{2,3}, А.С. Проскурина³, С.С. Богачев³, Д.А. Стеценко^{2,3}, Е.Р. Черных¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Аннотация. Миелоидные дендритные клетки (ДК) играют важную роль в иммунном ответе, поэтому актуальной задачей является поиск соединений, способных эффективно активировать ДК. Целью настоящей работы было изучение влияния синтетических CpG олигодезоксинуклеотидов (CpG-ODN) на созревание и аллостимуляторную активность миелоидных ДК в сравнении с другими PAMP и DAMP молекулами. Для исследований были синтезированы CpG-ODN класса C (SD-101 и D-SL03), содержащие тиофосфатные межнуклеотидные группы, а также получены их оригинальные фосфат-модифицированные аналоги (SD-101M и D-SL03M) с мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами (M = μ -модификация). Эффекты CpG-ODN и других активаторов оценивали в культурах ДК, генерированных из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN- α (IFN-ДК) или IL-4 (IL4-ДК). Оценка внутриклеточной экспрессии TLR-9 показала, что оба типа ДК (IFN-ДК и IL4-ДК) содержали в среднем 52 и 80 % TLR-9-позитивных клеток соответственно. Исследуемые CpG-ODN усиливали аллостимуляторную активность IFN-ДК, причем эффект μ -модифицированных CpG-ODN был выше, чем тиофосфатных CpG-ODN. Стимулирующий эффект CpG-ODN в дозе 1.0 мкг/мл был сопоставим (для D-SL03, D-SL03M, SD-101) или превышал (для SD-101M) действие липополисахарида (LPS) в дозе 10 мкг/мл. При этом IFN-ДК характеризовались большей чувствительностью к действию CpG-ODN, чем IL4-ДК. Усиление аллостимуляторной активности ДК в присутствии CpG-ODN было связано с индукцией конечного созревания клеток, что подтверждалось значимым снижением количества CD14⁺ ДК, увеличением доли зрелых CD83⁺ ДК и тенденцией к возрастанию CD86⁺ ДК. Интересно, что характерная для LPS способность усиливать экспрессию костимуляторной молекулы OX40L на ДК была выявлена только для μ -аналога SD-101M. Кроме того, CpG-ODN (SD-101 и SD-101M) оказывали стимулирующий эффект на продукцию IFN- γ , сопоставимый с действием LPS. Полученные в целом данные свидетельствуют о стимулирующем действии CpG-ODN на созревание и аллостимуляторную активность миелоидных ДК человека, которое более выражено для μ -модифицированных аналогов.

Ключевые слова: моноциты; дендритные клетки; дифференцировка; созревание; PAMP- и DAMP-активаторы; алло-СКЛ; CpG-олигонуклеотид.

Для цитирования: Останин А.А., Леплина О.Ю., Буракова Е.А., Тыринова Т.В., Фокина А.А., Проскурина А.С., Богачев С.С., Стеценко Д.А., Черных Е.Р. CpG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(6):653-660. DOI 10.18699/VJ20.659

Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells

А.А. Останин¹✉, О.Ю. Леплина¹, Е.А. Буракова^{2,3}, Т.В. Тыринова^{1,2}, А.А. Фокина^{2,3}, А.С. Проскурина³, С.С. Богачев³, Д.А. Стеценко^{2,3}, Е.Р. Черных¹

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Abstract. Myeloid dendritic cells (DCs) play an important role in the immune response; therefore, the search for compounds that can effectively activate DCs is a needful goal. This study was aimed to investigate the effect of synthetic CpG oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on the maturation and allostimulatory activity of myeloid DCs in comparison with other PAMP and DAMP molecules. For the research, we synthesized known CpG-ODN class C (SD-101 and D-SL03) containing thiophosphate internucleotide groups, and their original phosphate-modified analogues (SD-101M and D-SL03M) with mesylphosphoramidate internucleotide groups (M = μ -modification). The effects of CpG-ODN and other

activators were evaluated on DCs generated from blood monocytes in the presence of GM-CSF and IFN- α (IFN-DC) or IL-4 (IL4-DC). Evaluation of the intracellular TLR-9 expression showed that both types of DCs (IFN-DC and IL4-DC) contained on average 52 and 80 % of TLR-9-positive cells, respectively. The CpG-ODNs studied enhanced the allostimulatory activity of IFN-DCs, and the effect of μ -modified CpG-ODNs was higher than that of CpG-ODNs with thiophosphate groups. The stimulating effect of CpG-ODN at a dose of 1.0 μ g/ml was comparable (for D-SL03, D-SL03M, SD-101) with or exceeded (for SD-101M) the effect of LPS at a dose of 10 μ g/ml. At the same time, IFN-DCs were characterized by greater sensitivity to the action of CpG-ODNs than IL4-DCs. The enhancement of DC allostimulatory activity in the presence of CpG-ODNs was associated with the induction of final DC maturation, which was confirmed by a significant decrease in the number of CD14⁺DC, an increase in mature CD83⁺DC and a trend towards an increase in CD86⁺DC. Interestingly, the characteristic ability of LPS to enhance the expression of the co-stimulatory molecule OX40L on DCs was revealed only for the μ -analogue SD-101M. In addition, CpG-ODNs (SD-101 and SD-101M) had a stimulatory effect on IFN- γ production comparable to the action of LPS. The data obtained indicate a stimulating effect of CpG-ODN on the maturation and allostimulatory activity of human myeloid DCs, which is more pronounced for μ -modified analogs. Key words: monocytes; dendritic cells; differentiation; maturation; PAMP- and DAMP-activators; allo-MLR; CpG-oligonucleotide.

For citation: Ostanin A.A., Leplina O.Y., Burakova E.A., Tyrinova T.V., Fokina A.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S., Stetsenko D.A., Chernykh E.R. Phosphate-modified CpG oligonucleotides induce *in vitro* maturation of human myeloid dendritic cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(6):653-660. DOI 10.18699/VJ20.659

Введение

Дендритные клетки (ДК) играют важную роль в иммунном ответе, что позволяет рассматривать их в качестве мишени и перспективного клеточного продукта при разработке новых методов иммунотерапии рака. Поскольку иммуностимулирующая активность характерна только для зрелых ДК с высокой экспрессией антигенпрезентирующих и костимуляторных молекул (Banchereau et al., 2000), то, несомненно, актуальным направлением исследований представляется поиск соединений, способных эффективно активировать ДК и индуцировать их созревание.

Природными активаторами ДК являются консервативные молекулы патогенов класса PAMP (pathogen-associated molecular patterns) и высвобождающиеся при повреждении собственных клеток молекулы класса DAMP (damage-associated molecular patterns). Эффекты первых опосредуются через паттерн-распознающие рецепторы. Молекулы класса DAMP распознаются внутриклеточными сенсорами и активируют ДК через вторичные мессенджеры, например фактор некроза опухоли-альфа (Jounai et al., 2013; Kawasaki, Kawai, 2014). Действие различных соединений на ДК человека оценивается обычно в культурах ДК моноцитарного происхождения, генерированных *in vitro* в присутствии цитокинов GM-CSF/IL4 или GM-CSF/IFN- α (Cehim, Chies, 2019). При этом в качестве одного из стандартных активаторов используют липополисахарид (LPS), являющийся лигандом TLR-4. Однако в силу пирогенности LPS не может использоваться в клинических исследованиях.

Бактериальная и вирусная ДНК также способны активировать конечное созревание ДК. Эта активность связана с наличием в их структуре неметилированных CpG динуклеотидов и может имитироваться синтетическими CpG олигодезоксинуклеотидами (CpG-ODN), опосредующими сигналинг через TLR-9 (Половинкина, Марков, 2010). Синтетические CpG-ODN продемонстрировали выраженный иммуностимулирующий и противоопухолевый эффект *in vivo* и рассматриваются в настоящее время в качестве перспективных адьювантов в иммунотерапии рака (Scheiermann, Klinman, 2014; Shiota, Klinman, 2014; Shiota et al., 2015). В экспериментальных исследованиях

на мышах показано, что наряду с плазмацитоидными ДК CpG-ODN оказывают стимулирующий эффект и на костномозговые ДК (Behboudi et al., 2000). В то же время у человека чувствительность к CpG-ODN связывают преимущественно с плазмацитоидными ДК, а данные об эффектах CpG-ODN на миелоидные ДК представлены единичными исследованиями, результаты которых противоречивы (Behboudi et al., 2000; Hoene et al., 2006).

Целью настоящей работы было изучение влияния CpG-ODN на созревание и аллостимуляторную активность миелоидных ДК, генерированных из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN- α (IFN-ДК) или IL-4 (IL4-ДК), в сравнении с другими PAMP- (LPS) и DAMP-активаторами. Планировалось проанализировать эффекты CpG-ODN класса C: SD-101 (Levy et al., 2016) и D-SL03 (Yang et al., 2013), содержащих тиофосфатные межнуклеотидные группы, а также оригинальных фосфат-модифицированных аналогов (SD-101M, D-SL03M) с мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами (μ -модификация) (Челобанов и др., 2017).

Для сравнения в качестве активаторов класса DAMP планировалось оценить эффект двуцепочечной ДНК человека (дцДНК), а также синтетического поликатионного адьюванта азоксимер бромида (Kabanov, 2004; Powell et al., 2015), способного усиливать антиген-презентирующую функцию ДК через активацию провоспалительных сигнальных путей (Dyakonova et al., 2004).

Материалы и методы

Для исследования нами были синтезированы, очищены и охарактеризованы CpG-ODN класса C: SD-101 и D-SL03, содержащие тиофосфатные межнуклеотидные группы, а также оригинальные модифицированные аналоги (SD-101M, D-SL03M) с мезилфосфорамидными (μ) межнуклеотидными связями. Последовательности полученных CpG-ODN приведены в табл. 1.

Для получения ДК из гепаринизированной венозной крови здоровых доноров выделяли мононуклеарные клетки (МНК) центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина. IFN-ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК во флаконах

Таблица 1. CpG-олигонуклеотиды (CpG-ODN), использованные в работе

Обозначение	Последовательность (5'-3')	Длина, нт	Межнуклеотидная группа	CpG (есть/нет)
SD-101	tcgaacggttcgaacggttcgaac: gttcgaat	30	PS	CpG
SD-101M	tcgaacggttcgaacggttcgaac: gttcgaat	30	μ	CpG
D-SL03	tcgcgaacggttcgcccgttc: gaacgagg	29	PS	CpG
D-SL03M	tcgcgaacggttcgcccgttc: gaacgagg	29	μ	CpG
ODNcontrol	tgcaagcttgcaagcttgcaag: cttgcaat	30	μ	Контроль без CpG

Примечание. CpG динуклеотиды выделены жирным шрифтом; палиндромная последовательность подчеркнута; середина палиндрома обозначена двоеточием. PS – тиофосфатная группа; μ – мезилфосфорамидная группа.

Falcon (BD Biosciences, Великобритания) в течение 3 сут в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0.3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5 % сыворотки плодов коровы («БиолоТ», Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и IFN-альфа (Роферон-А, Roche, Швейцария, 1000 Ед/мл) с последующим созреванием с липополисахаридом (LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, 10 мкг/мл) в течение 48 ч.

Для генерации ИЛ4-ДК прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF, ИЛ-4 (Sigma-Aldrich, 40 нг/мл) и 5 % сыворотки плодов коровы на протяжении 5 сут с последующим созреванием с LPS в течение 48 ч. Для индукции конечного созревания ДК употребляли также другие активаторы: азоксимер бромид (АБ, «Петровакс») в дозе 2 нг/мл, двуцепочечную ДНК (дцДНК) в дозе 5 мкг/мл, а также исследуемые соединения CpG-ODN в различных концентрациях.

Внутриклеточную экспрессию TLR-9 среди незрелых ДК (ДК₀) оценивали в популяциях IFN-ДК и ИЛ4-ДК на 3-и и 5-е сутки генерации соответственно. Для этого проводили процедуру пермеабилзации клеток, применяя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабилзации (BD Cytotfix/ Cytoperm™, США) согласно методике производителя и APC-меченные анти-TLR-9 антитела (BD PharMingen, США). В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичным флуорохромом. Процентное содержание ДК, экспрессирующих TLR-9, рассчитывали на 10000 клеток.

Стимуляторную активность ДК оценивали в аллогенной смешанной культуре лейкоцитов (алло-СКЛ), используя в качестве отвечающих клеток МНК доноров, которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах (0.1 × 10⁶/луночку) в среде RPMI-1640 с 10 % инактивированной сыворотки доноров группы АВ (IV) при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили ДК в соотношении МНК : ДК = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивали на 5-е сутки радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мккюри/луночку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

Иммунофенотип генерированных IFN-ДК определяли методом проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител, меченных фикоэритрином (PE) анти-CD14 («Сорбент», Москва) и анти-OX40L (анти-CD252, BioLegend, США), меченных FITC анти-CD83, анти-CD86 (BD PharMingen, США) и анти-HLA-DR («Сорбент», Москва).

Содержание цитокинов (TNF-α, IFN-γ) в 5-суточных супернатантах генерированных IFN-ДК оценивали методом ИФА с помощью тест-систем согласно инструкции фирмы производителя («Вектор-Бест», Новосибирск).

Статистическую обработку данных проводили в пакете прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR; LQ-UQ). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Вилкоксона (для связанных выборок). Выявленные различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

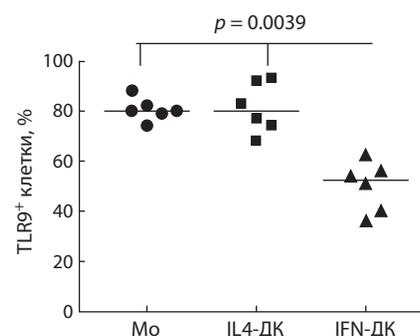


Рис. 1. Внутриклеточная экспрессия TLR-9 моноцитами и незрелыми ИЛ4-ДК и IFN-ДК здоровых доноров (n = 6).

Данные представлены в виде индивидуальных и медианных значений; p – U-критерий Манна-Уитни.

Результаты

Оценка внутриклеточной экспрессии TLR-9 среди свежeweделенных моноцитов крови здоровых доноров, а также «незрелых» IFN-ДК и ИЛ4-ДК, генерированных соответственно в течение 3 и 5 сут, показала, что доля TLR-9-позитивных клеток среди моноцитов-предшественников и ИЛ4-ДК составляет в среднем 80 % (рис. 1). Содержание TLR-9⁺ клеток в популяции IFN-ДК было значимо ниже, варьируя в диапазоне от 40 до 56 % (Me 52.5 %, $p < 0.05$). Тем не менее полученные данные свидетельствуют о потенциальной чувствительности ДК, генерированных с помощью как ИЛ-4, так и IFN-альфа, к стимулирующему действию CpG-ODN в качестве созревающих сигналов.

Поэтому на следующем этапе провели скрининг полученных нами CpG олигонуклеотидов в диапазоне доз от 0.5 до 5.0 мкг/мл по их влиянию на способность IFN-ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ (табл. 2). Аллостимулятор-

Таблица 2. Т-клеточный пролиферативный ответ в алло-СКЛ (срм) и аллостимуляторная активность (FI) IFN-ДК, генерированных с различными CpG-ODN

Варианты алло-СКЛ	Контроль	CpG-ODN			
		0.5 мкг/мл	1.0 мкг/мл	2.5 мкг/мл	5.0 мкг/мл
МНК + ДК ₀	срм	2310 (1630–2600)			
МНК + ДК _{ODNконтроль}	срм	2350 (2100–2500)			
	FI	1.03 (0.99–1.39)			
МНК + ДК _{LPS}	срм	7730 (5630–9620)			
	FI	2.9 (2.5–4.6)			
МНК + ДК _{SD-101}	срм	5520 (4650–11 890)	6550 (3510–9650)	7520 (4950–10 380)	6960 (5830–10 130)
	FI	3.0 (2.4–5.0)	3.1 (1.8–4.6)	3.6 (3.1–4.9)	3.0 (2.6–4.8)
МНК + ДК _{SD-101M}	срм	7680 (6450–14 170)	9030 (8010–12 100)	7520 (6030–13 710)	6530 (6030–13 700)
	FI	4.6 (3.0–6.7)**	5.0 (3.7–6.0)**	4.5 (2.8–6.5)*	4.2 (2.7–6.1)
МНК + ДК _{D-SL03}	срм	3060 (2290–10 080)	4660 (3550–12 960)	4260 (3200–11 140)	5180 (3210–11 460)
	FI	1.6 (1.2–4.8)	2.4 (1.5–5.3)	2.4 (1.5–5.3)	2.5 (2.0–4.8)
МНК + ДК _{D-SL03M}	срм	5930 (3380–11 420)	7210 (5080–16 060)	6670 (4700–17 100)	6000 (3760–14 150)
	FI	2.5 (1.6–5.4)**	4.0 (2.1–6.7)**	3.7 (2.0–7.7)**	2.7 (2.1–6.1)

Примечание. Данные двух независимых экспериментов ($n = 8$) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках); срм (count per minute) – импульсы в минуту; FI – индексы влияния. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – значимость различий μ -CpG-ODN по сравнению с PS-CpG-ODN в соответствующих дозах (W-критерий Вилкоксона).

Таблица 3. Т-клеточный пролиферативный ответ в алло-СКЛ (срм) и аллостимуляторная активность (FI) IFN-ДК и IL4-ДК, генерированных с различными активаторами

Варианты алло-СКЛ		IFN-ДК	IL4-ДК
МНК + ДК ₀	срм	2250 (1900–2600)	2720 (2180–3080)
МНК + ДК _{дцДНК}	срм	5710 (4810–8510)	6070 (4950–7100)
	FI	2.6 (2.3–3.1)	2.4 (2.0–2.5)
МНК + ДК _{АБ}	срм	7350 (6040–8160)	4410 (3880–5410)
	FI	2.8 (2.4–3.7)	1.7 (1.5–2.0)
МНК + ДК _{SD-101M}	срм	7900 (6090–9510)	7200 (5460–8470)
	FI	3.3 (2.9–5.0)	2.6 (2.5–2.8)
МНК + ДК _{D-SL03M}	срм	7050 (5590–10 560)	5540 (4420–7650)
	FI	3.2 (2.6–4.6)	2.0 (1.8–2.7)

Примечание. Данные двух независимых экспериментов ($n = 8$) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках); срм – импульсы в минуту; FI – индексы влияния. Активаторы: дцДНК 5 мкг/мл; АБ 2 нг/мл; SD-101M и D-SL03M 1 мкг/мл.

ная активность ДК служит интегральным показателем, поскольку ассоциирована со степенью зрелости ДК, экспрессией HLA-антигенов и костимуляторных молекул, а также со спектром и уровнем продуцируемых ими цитокинов. В качестве позитивного контроля использовали «классический» РAMP-активатор LPS в дозе 10 мкг/мл, в качестве негативного – ODN с μ -модификациями, но не содержащий CpG динуклеотидов, в дозе 1 мкг/мл. LPS практически трехкратно усиливал аллостимуляторную активность ДК (см. табл. 2). Контрольный ODN, не содержащий CpG, не оказывал стимулирующего влияния на функциональную активность ДК в алло-СКЛ (FI = 1.03;

IQR 0.99–1.39), тогда как все тестируемые CpG-ODN индуцировали созревание IFN-ДК, что проявлялось статистически значимым усилением аллостимуляторной активности ДК.

Характерно, что CpG-ODN с мезилфосфорамидными (μ) группами (SD-101M и D-SL03M) в дозах 0.5, 1.0 и 2.5 мкг/мл более эффективно ($p < 0.01$) индуцировали конечное созревание IFN-ДК по сравнению с аналогичными CpG-ODN с тиофосфатными группами. При этом SD-101M обладал наиболее выраженным эффектом. Так, SD-101M в минимальной тестируемой дозе (0.5 мкг/мл) проявлял дозревающий эффект, сопоставимый по своей

Таблица 4. Иммунофенотип IFN-ДК, генерированных с различными активаторами

Варианты IFN-ДК	CD14 ⁺ , %	CD83 ⁺ , %	CD86 ⁺ , %	HLA-DR ⁺ , %	HLA-DR ⁺ OX40L ⁺ , %
ДК ₀ (контроль)	41.5 (38–47)	11.5 (9–16)	72.0 (44–87)	83.5 (76–87)	8.0 (5.5–17.0)
ДК _{LPS}	31.5 (26–37) ↓**	33.0 (16–44) ↑*	80.5 (77–91)	86.5 (81–90)	15.0 (7.8–24.0) ↑*
ДК _{дцДНК}	30.0 (27–33) ↓**	20.0 (11–38)	84.0 (81–88)	81.5 (79–91)	9.3 (5.4–24.0)
ДК _{АБ}	30.5 (23–34) ↓**	22.5 (12–43) ↑*	81.0 (79–85)	83.0 (76–88)	9.0 (6.3–20.0)
ДК _{SD-101}	37.0 (32–38)	20.0 (14–35) ↑*	82.5 (77–86)	81.0 (69–92)	7.0 (6.0–27.0)
ДК _{SD-101М}	33.5 (32–36) ↓**	18.5 (16–42) ↑*	79.0 (67–81)	82.0 (76–91)	12.5 (7.3–27.0) ↑*

Примечание. Данные трех независимых экспериментов (n = 7; % позитивных IFN-ДК) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках). Активаторы: LPS 10 мкг/мл; дцДНК 5 мкг/мл; АБ 2 нг/мл; SD-101 и SD-101М 1 мкг/мл. * p < 0.05; ** p < 0.01 – vs контроль (W-критерий Вилкоксона).

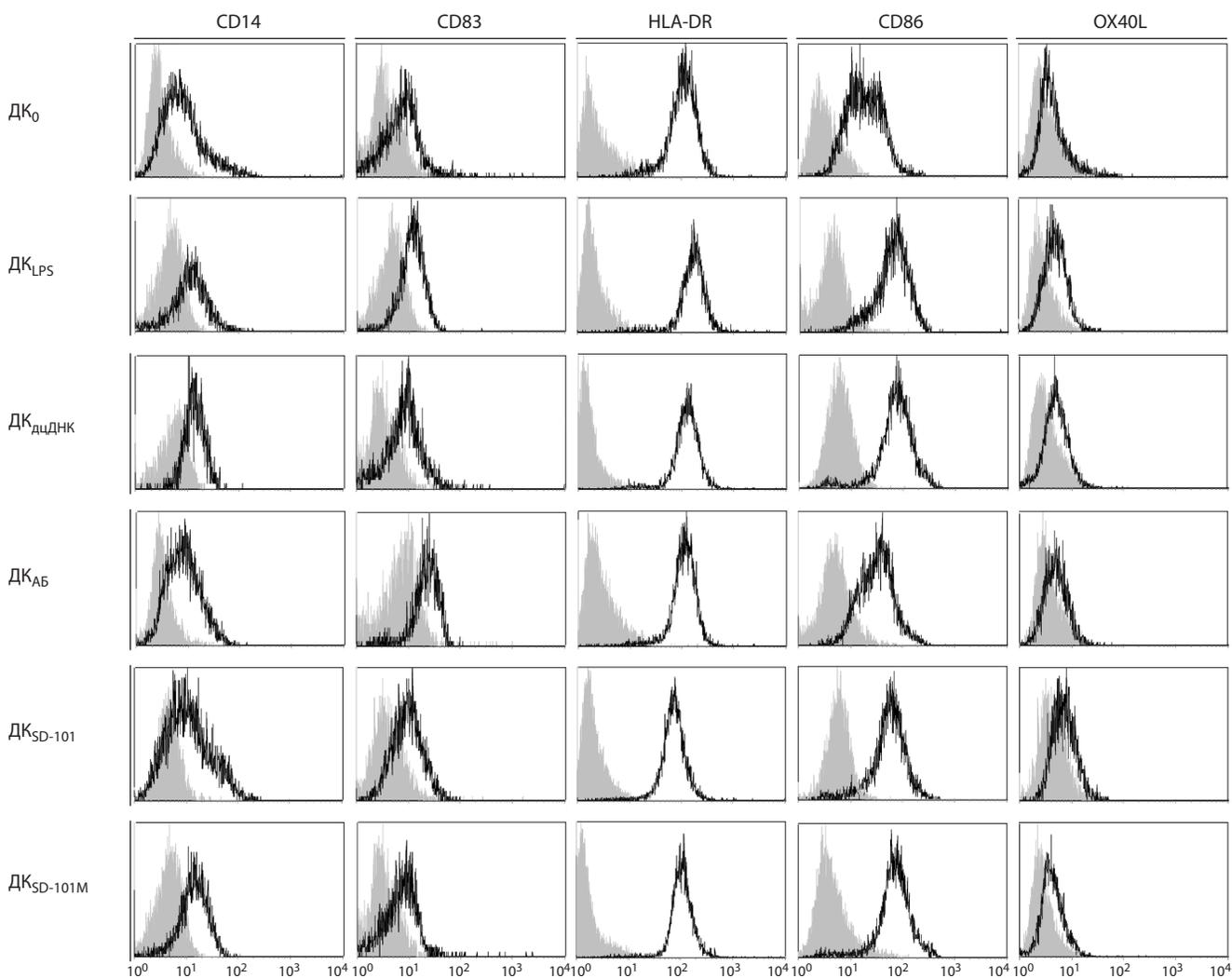


Рис. 2. Фенотипический анализ IFN-ДК, генерированных *in vitro* с различными активаторами.

Незрелые IFN-ДК культивировали с различными активаторами в течение 24 ч, затем методом проточной цитометрии оценивали поверхностную экспрессию CD14, CD83, HLA-DR, CD86, OX40L. Репрезентативные гистограммы экспрессии указанных маркеров выделены жирной линией, соответствующих изотипических контролей – серым цветом.

выраженности с LPS в дозе 10 мкг/мл, а эффективность действия μ -аналога SD-101 в дозе 1.0 мкг/мл была значимо выше, чем LPS ($p < 0.05$).

В отдельной серии экспериментов провели сравнительное исследование влияния μ -аналогов CpG-ODN

(SD-101M и D-SL03M) и активаторов класса DAMP (дцДНК, АБ) на аллостимуляторную активность двух типов дендритных клеток – IFN-ДК и IL4-ДК (табл. 3). Из представленных данных видно, что стимулирующий эффект μ -аналогов CpG-ODN в дозе 1 мкг/мл на функ-

Таблица 5. Продукция TNF- α и IFN- γ в культурах IFN-ДК, генерированных с различными активаторами

Варианты IFN-ДК		TNF- α	IFN- γ
ДК ₀ (контроль)	пг/мл	290 (206–500)	130 (90–190)
ДК _{LPS}	пг/мл	1680 (840–1790)**	225 (145–385)**
	FI	3.7 (1.4–8.4)	1.6 (1.3–2.0)
ДК _{дцДНК}	пг/мл	785 (264–1250)	250 (190–400)*
	FI	1.4 (0.9–2.7)	1.4 (1.1–2.0)
ДК _{АБ}	пг/мл	240 (145–670)	240 (185–460)*
	FI	0.9 (0.8–1.1)	1.2 (1.1–1.9)
ДК _{SD-101}	пг/мл	220 (70–490)	230 (160–460)*
	FI	0.7 (0.3–1.9)	1.71 (1.5–2.1)
ДК _{SD-101M}	пг/мл	215 (120–740)	230 (180–380)*
	FI	1.0 (0.6–1.9)	1.74 (1.3–2.1)

Примечание. Данные шести независимых экспериментов ($n = 13$) представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – vs контроль (W-критерий Вилкоксона).

циональную активность IFN-ДК и IL4-ДК в алло-СКЛ был сопоставим с действием дцДНК и АБ. При этом по сравнению с IL4-ДК дендритные клетки, генерированные из моноцитов крови в присутствии интерферона-альфа (IFN-ДК), отличались большей чувствительностью к действию исследуемых соединений, поэтому дальнейшие исследования эффектов CpG-ODN проводили в культурах IFN-ДК.

Чтобы убедиться, что усиление аллостимуляторной активности обусловлено конечным созреванием ДК, изучали изменение иммунофенотипа IFN-ДК, культивируемых в присутствии CpG-ODN в сравнении с другими PAMP- и DAMP-активаторами. Для тестирования в данной серии экспериментов были отобраны CpG-ODN SD-101 и его μ -аналог SD-101M с наиболее выраженной стимулирующей активностью (табл. 4, рис. 2). Указанные CpG-ODN обладали аналогичным с LPS эффектом на созревание ДК, который проявлялся снижением числа CD14⁺ моноцитарных предшественников и увеличением доли зрелых CD83⁺ ДК, а также на уровне отчетливого тренда ДК, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD86 ($p = 0.07–0.11$). Схожий эффект был зарегистрирован для дцДНК и АБ. Интересно, что LPS тоже значимо повышал относительное содержание ДК, экспрессирующих OX40L. Прирост этих клеток составил в среднем 45 % (с 8 до 15 %). Влияние CpG-ODN с мезилфосфорамидными межнуклеотидными связями (SD-101M) на экспрессию OX40L было сопоставимо с действием LPS: количество OX40L⁺ ДК увеличилось в среднем на 39 % (до 12.5 %, $p = 0.0282$). В то же время эффект дцДНК, АБ и SD-101 с тиофосфатными группами на экспрессию OX40L был менее выраженным и статистически незначимым.

Поскольку созревание ДК сопровождается усилением продукции цитокинов с провоспалительной и Th1-стимулирующей активностью, в завершение оценили влияние CpG-ODN SD-101 и его μ -аналога SD-101M на продукцию TNF- α и IFN- γ в 5-суточных культурах IFN-ДК (табл. 5). По сравнению с незрелыми клетками LPS-активированные

ДК продуцировали более высокие уровни TNF- α и IFN- γ ($p < 0.01$). CpG-ODN SD-101 и SD-101M, так же как и АБ, не усиливали продукцию TNF- α . Концентрация TNF- α в культурах ДК в присутствии дцДНК возрастала в среднем на 43 %, но этот эффект не был статистически значимым.

В то же время SD-101 и SD-101M значимо повышали способность IFN-ДК продуцировать IFN- γ (в среднем на 71 и 74 % соответственно; $p < 0.05$), что сопоставимо с эффектом LPS. Другие DAMP-активаторы (дцДНК и АБ) также усиливали продукцию IFN- γ дендритными клетками.

Обсуждение

Полученные результаты продемонстрировали, что генерируемые из моноцитов IFN-ДК или IL4-ДК экспрессируют внутриклеточно TLR-9 и чувствительны к действию CpG-ODN класса С. Эффект CpG-ODN проявляется усилением способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ и сопряжен с возрастанием экспрессии на ДК дифференцировочных антигенов (CD83) и костимуляторных молекул (OX40L, CD86), а также продукции IFN- γ . При этом IFN-ДК характеризуются большей чувствительностью к стимулирующему действию CpG-ODN, чем IL4-ДК.

Согласно данным литературы, у мышей экспрессия TLR-9 и чувствительность к действию CpG-ODN характерна как для плазмацитоидных, так и для миелоидных ДК (Behboudi et al., 2000; Iwasaki, Medzhitov, 2004). Ранние исследования у человека, основанные на анализе RT-PCR, выявили конститутивную экспрессию мРНК TLR-9 только в плазмацитоидных ДК при ее отсутствии в миелоидных ДК или ДК моноцитарного происхождения (Bauer et al., 2001; Rothenfusser et al., 2002; Krug et al., 2001). Тем не менее позднее H. Tada обнаружил мРНК TLR-9 в генерируемых из моноцитов ДК (мо-ДК) и показал усиление продукции IL-12p70 и IFN- γ в культурах мо-ДК в ответ на стимуляцию CpG-ODN (Tada et al., 2005). В свою очередь V. Hoene с коллегами продемонстрировали наличие TLR-9

белка в мо-ДК, причем в таких же количествах, как и в плазматитоидных ДК. CpG-ODN класса А, по данным этих авторов, стимулировали созревание ДК и усиливали способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток (Hoene et al., 2006). Полученные нами данные служат еще одним подтверждением чувствительности миелоидных ДК человека к стимулирующему действию CpG-ODN и, учитывая моноцитарное происхождение большинства ДК в опухолевом микроокружении (Veglia, Gabrilovich, 2017), обосновывают перспективность использования CpG-ODN для активации ДК, в том числе при проведении внутриопухолевой иммунотерапии.

Вторым важным результатом исследования является то, что в настоящей работе впервые проведено сравнение классических тиофосфатных CpG-ODN класса С (SD-101 и D-SL03) и их оригинальных аналогов с мезилфосфорамидными (μ -модифицированными) межнуклеотидными группами (SD-101M и D-SL03M). CpG-ODN класса С совмещают иммуномодулирующие свойства CpG-ODN классов А и В (Marshall et al., 2005) и обладают выраженным иммуностимулирующим и противоопухолевым эффектом (Li et al., 2020). Так, например, L. Yang с коллегами продемонстрировали выраженную стимулирующую активность CpG-ODN D-SL03, которая проявлялась в способности активировать В-клетки, NK-клетки и Т-клетки человека *in vitro*, усилить экспрессию CD80, CD86 и HLA-DR в культурах мононуклеарных клеток, а также оказывать противоопухолевый эффект в модели рака молочной железы у мышей *in vivo* (Yang et al., 2013). В свою очередь, CpG-ODN SD-101 продемонстрировал иммуностимулирующий и противоопухолевый эффект при проведении локальной противоопухолевой иммунотерапии у человека (Levy et al., 2016; Li et al., 2020). На основе указанных CpG-ODN нами впервые получены модифицированные аналоги SD-101M и D-SL03M, содержащие мезилфосфорамидные межнуклеотидные группы, которые, согласно нашим ранним результатам, обеспечивают более высокую стабильность к ферментативному расщеплению (Miroshnichenko et al., 2019).

Сравнительный анализ активности тестируемых CpG-ODN показал, что μ -модифицированные аналоги в большей степени усиливают аллостимуляторную активность ДК, чем CpG-ODN с тиофосфатными группами. Кроме того, именно μ -форма SD-101 (SD-101M) обладает свойственной для LPS способностью усиливать в популяции IFN-ДК экспрессию молекулы OX40L, которая является важным костимуляторным сигналом, регулирующим интенсивность пролиферации Т-клеток в алло-СКЛ (Ukyo et al., 2003).

Следует отметить, что, будучи лигандом TLR-4, LPS является мощным активатором созревания ДК и часто используется в исследованиях *in vitro* в качестве положительного контроля. Сигналинг через TLR-4 вызывает возрастание экспрессии костимуляторных молекул, повышает продукцию провоспалительных цитокинов и усиливает способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и индуцировать Th1-ответ (Cehim, Chies, 2019), подтверждая иммунологическую «функциональность» активированных ДК. В исследованиях V. Hoene с коллегами стимулирующий эффект D19

(CpG-ODN класса А) на созревание и аллостимуляторную активность ДК был ниже, чем эффект LPS (Hoene et al., 2006). В наших исследованиях активность SD-101M превышала эффект LPS, а для SD-101, D-SL03 и D-SL03M была сопоставима с LPS. Усиление продукции IFN- γ под влиянием CpG-ODN (SD-101 и SD-101M) было также сопоставимо с действием LPS.

В настоящем исследовании мы сравнили CpG-ODN класса С не только с действием LPS, но и с действием DAMP-активаторов – дцДНК человека и азоксимера бромида. Оказалось, что стимулирующий эффект SD-101M на созревание ДК и их аллостимуляторную активность сопоставим с действием дцДНК и АБ. Стимулирующее влияние дцДНК на созревание и аллостимуляторную активность мо-ДК было продемонстрировано нами ранее (Alyamkina et al., 2010; Orishchenko et al., 2013). В то же время способность отечественного полимерного адьюванта на основе АБ стимулировать *in vitro* созревание ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IL-4 или IFN- α , а также усиливать их аллостимуляторную активность описана нами впервые и является важным аргументом, обосновывающим эффективность данного адьюванта в составе противовирусных вакцин. При этом надо отметить, что по ряду параметров (в частности, индукции экспрессии OX40L и продукции IFN- γ) SD-101M превосходил эффекты дцДНК и АБ.

Заключение

В целом полученные данные свидетельствуют о выраженном стимулирующем эффекте CpG-ODN класса С (SD-101 и D-SL03) на миелоидные ДК человека, который сопоставим с действием активаторов PAMP- (LPS) и DAMP-класса (дцДНК, АБ), а для мезилфосфорамидного (μ) аналога SD-101M превышает таковые. Необходимы дальнейшие исследования в мышинных экспериментальных моделях, чтобы проанализировать эффективность применения μ -модифицированных CpG-ODN (SD-101M с мезилфосфорамидными межнуклеотидными группами) в противоопухолевой иммунотерапии.

Список литературы / References

- Половинкина В.С., Марков Е.Ю. Структура и иммуноадьювантные свойства CpG-ДНК. *Мед. иммунология*. 2010;12(6):469-476. DOI 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476.
- [Polovinkina V.S., Markov E.Yu. Structure and immune adjuvant properties of CpG-DNA. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2010;12(6):469-476. DOI 10.15789/1563-0625-2010-6-469-476. (in Russian)]
- Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Фокина А.А., Стеценко Д.А. Новые производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидную *N*-(метансульфонил)-фосфорамидную (мезилфосфорамидную) группу. *Биорг. химия*. 2017; 43(6):644-649. DOI 10.7868/S0132342317060070.
- [Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A. New oligodeoxynucleotide derivatives containing *N*-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl phosphoramidate) internucleotide group. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017;43(6):664-668. DOI 10.1134/S1068162017060024.]
- Alyamkina E.A., Lepina O.Yu., Sakhno L.V., Chernykh E.R., Ostani A.A., Efremov Ya.R., Shilov A.G., Orishchenko K.E., Likhacheva A.S., Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Zagrebniy S.N., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of double-stranded DNA on

- maturation of dendritic cells *in vitro*. *Cell. Immunol.* 2010;266(1): 46-51. DOI 10.1016/j.cellimm.2010.08.011.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Palendran B., Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:767-811. DOI 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Bauer S., Kirschning C.J., Hacker H., Redecke V., Hausmann S., Akira S., Wagner H., Lipford G.B. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(16):9237-9242. DOI 10.1073/pnas.161293498.
- Behboudi S., Chao D., Klenerman P., Austyn J. The effects of DNA containing CpG motif on dendritic cells. *Immunology.* 2000;99(3): 361-366. DOI 10.1046/j.1365-2567.2000.00979.x.
- Cehim G., Chies J.A.B. *In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells methodological aspects in a comprehensive review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2019;91:e20190310. DOI 10.1590/0001-3765201920190310.
- Dyakonova V.A., Dambaeva S.V., Pinegin B.V., Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxidoionium immunomodulator and the human immune system cells. *Inter. Immunopharm.* 2004;4(13): 1615-1623. DOI 10.1016/j.intimp.2004.07.015.
- Hoene V., Peiser M., Wanner R. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J. Leuk. Biol.* 2006;80(6):1328-1336. DOI 10.1189/jlb.0106011.
- Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2004;5(10):987-995. DOI 10.1038/ni1112.
- Jounai N., Kobiyama K., Takeshita F., Ishii K.J. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 2:168. DOI 10.3389/fcimb.2012.00168.
- Kabanov V.A. From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. *Pure Appl. Chem.* 2004;76(9):1659-1677. DOI 10.1351/pac.200476091659.
- Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 2014. DOI 10.3389/fimmu.2014.00461.
- Krug A., Towarowski A., Britsch S., Rothenfusser S., Hornung V., Bals V., Giese T., Engelmann H., Endres S., Krieg A.M., Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 2001;31(10):3026-3037. DOI 10.1002/1521-4141(200110)31:10<3026::aid-immu3026>3.0.co;2-h.
- Levy R., Reagan P.M., Friedberg J.W., Bartlett N.L., Gordon L.I., Leung A., Peterkin J., Xing B., Coffman R., Janssen R., Candia A., Khodadoust M., Frank M.J., Long S.R., Czerwinski D.K., Chu M. SD-101, a novel class C CpG-oligodeoxynucleotide (ODN) toll-like receptor 9 (TLR9) agonist, given with low dose radiation for untreated low grade B-cell lymphoma: interim results of a phase 1/2 trial. *Blood.* 2016;128(22):2974. DOI 10.1182/blood.V128.22.2974.2974.
- Li T., Wu J., Zhu S., Zang G., Li S., Lv X., Yue W., Qiao Y., Cui J., Shao Y., Zhang J., Liu Y.-J., Chen J. A novel C type CpG oligodeoxynucleotide exhibits immunostimulatory activity *in vitro* and enhances antitumor effect *in vivo*. *Front. Pharmacol.* 2020;11:8. DOI 10.3389/fphar.2020.00008.
- Marshall J.D., Fearon K.L., Higgins D., Hessel E.M., Kanzler H., Abbate C., Yee P., Gregorio J., Cruz T.D., Lizcano J.O., Zolotarev A., McClure H.M., Brasky K.M., Murthy K.K., Coffman R.L., Nest G.V. Superior activity of the type C class of ISS *in vitro* and *in vivo* across multiple species. *DNA Cell Biol.* 2005;24(2):63-72. DOI 10.1089/dna.2005.24.63.
- Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116(4): 1229-1234. DOI 10.1073/pnas.1813376116.
- Orishchenko K.E., Ryzhikova S.L., Druzhinina Y.G., Ryabicheva T.G., Varaksin N.A., Alyamkina E.A., Dolgova E.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Strunov A.A., Kiseleva E.V., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Sidorov S.V., Mayorov V.I., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Effect of human double-stranded DNA preparation on the production of cytokines by dendritic cells and peripheral blood cells from relatively healthy donors. *Cancer Ther.* 2013;8:191-205.
- Powell B.S., Andrianov A.K., Fusco P.C. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2015;4(1):23-45. DOI 10.7774/cevr.2015.4.1.23.
- Rothenfusser S., Tuma E., Endres S., Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum. Immunol.* 2002;63(12):1111-1119. DOI 10.1016/s0198-8859(02)00749-8.
- Scheiermann J., Klinman D.M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine.* 2014;32(48):6377-6389. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.06.065.
- Shirota H., Klinman D.M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines.* 2014;13(2):299-312. DOI 10.1586/14760584.2014.863715.
- Shirota H., Tross D., Klinman D.M. CpG oligonucleotides as cancer vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel).* 2015;3(2):390-407. DOI 10.3390/vaccines3020390.
- Tada H., Aiba S., Shibata K., Ohteki T., Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect. Immun.* 2005;73(12):7967-7976. DOI 10.1128/IAI.73.12.7967-7976.2005.
- Ukyo N., Hori T., Yanagita S., Ishikawa T., Uchiyama T. Costimulation through OX40 is crucial for induction of an alloreactive human T-cell response. *Immunology.* 2003;109(2):226-231. DOI 10.1046/j.1365-2567.2003.01648.x.
- Veglia F., Gabrilovich D.I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.* 2017;45:43-51. DOI 10.1016/j.coi.2017.01.002.
- Yang L., Wu X., Wan M., Yu Y., Yu Y., Wang L. CpG oligodeoxynucleotides with double stem-loops show strong immunostimulatory activity. *Int. Immunopharmacol.* 2013;15(1):89-96. DOI 10.1016/j.intimp.2012.10.020.

ORCID ID

A.A. Ostanin orcid.org/0000-0001-6895-938X
O.Y. Leplina orcid.org/0000-0003-3169-8643
E.A. Burakova orcid.org/0000-0001-6644-5959
T.V. Tyrinova orcid.org/0000-0002-7987-2017
A.A. Fokina orcid.org/0000-0001-5692-2483
A.S. Proskurina orcid.org/0000-0002-7650-4331
S.S. Bogachev orcid.org/0000-0002-2019-9382
D.A. Stetsenko orcid.org/0000-0002-5215-5704
E.R. Chernykh orcid.org/0000-0003-2346-6279

Благодарности. Работа поддержана грантом РФФИ № 18-29-09045 и частично грантом Министерства образования и науки РФ (проект FSUS-2020-0035).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.05.2020. После доработки 05.08.2020. Принята к публикации 11.08.2020.