



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.24

(51) Int. Cl. **C12N 15/87** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690892

(22) Дата подачи заявки
2014.10.28

(54) ЭЛЕКТРОПЕРЕНОС ГЕНОВ В КЛЕТКИ КОЖИ

(31) **13190550.7**

(32) **2013.10.28**

(33) **EP**

(43) **2016.11.30**

(86) **PCT/EP2014/073159**

(87) **WO 2015/063112 2015.05.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ИНВЕКТИС; САНТР НАСЪОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК (FR)**

(72) Изобретатель:

**Ланглад Демуайен Пьер, Юэ Тьерри,
Лиар Кристель, Талманзи Джесси,
Мир Луи М., Калве Кристоф (FR)**

(74) Представитель:

Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) ANDRE F.M. ET AL.: "Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin", HUMAN GENE THERAPY, vol. 19, no. 11, November 2008 (2008-11), pages 1261-1271, XP002720283, ISSN: 1043-0342, page 1266, column 2, paragraph 1, page 1267, column 1, paragraph 2, page 1263, column 1, paragraph 2, page 1261, column 1, paragraph 1, table 1

PAVSELJ N. ET AL.: "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 106, no. 3, 2 September 2005 (2005-09-02), pages 407-415, XP027664181, ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2005-09-02], page 409, column 1, paragraph 1

ANITA GOTHELF ET AL.: "Efficacy of transgene expression in porcine skin as a function of electrode choice", BIOELECTROCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 82, no. 2, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 95-102, XP028391011, ISSN: 1567-5394, DOI:10.1016/J.BIOELECTCHEM.2011.06.001 [retrieved on 2011-06-12], page 97, column 1, paragraphs 2, 3

SATKAUSKAS S. ET AL.: "Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer", HUMAN GENE THERAPY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 10, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 1194-1201, XP002709603, ISSN: 1043-0342, the whole document

BANGA AJAY K. ET AL.: "Iontophoresis and electroporation: Comparisons and contrasts", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 179, no. 1, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 1-19, XP002192323, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00360-3, the whole document

(57) Изобретение относится к способу предотвращения, подавления или уменьшения опухоли у субъекта in vivo, а также к способу противоопухолевой вакцинации или генной терапии субъекта in vivo, которые предусматривают введение нуклеиновой кислоты, кодирующей опухолевый антиген и индуцирующей клеточный иммунный ответ. Для наилучшей эффективности нуклеиновую кислоту вводят путем интрадермальной инъекции и электрической пермеабиллизации клеток кожи с помощью единичного импульса электрического поля высокого напряжения в пределах от 1100 до 1400 В/см и длительностью от 10 до 1000 мкс и последующего единичного импульса электрического поля низкого напряжения в пределах от 100 до 200 В/см и длительностью от 300 до 800 мс.

Настоящее изобретение относится к области электропермеабиллизации клеток для переноса генов.

Сведения о предшествующем уровне техники

Электропермеабиллизацию клеток, т.е. пермеабиллизацию клеток посредством локальной доставки электрических импульсов (EP), все чаще используют для лечения и предупреждения разнообразных патологий у человека и животных, включая рак.

Клеточная мембрана определяет границы двух компартментов, цитоплазмы и внеклеточной среды, которые содержат различные концентрации ионов, создавая, тем самым, трансмембранную разность потенциалов. Приложение к клеткам электрического поля индуцирует трансмембранный потенциал, который накладывается на потенциал покоя (Mir et al., 2005). Выше порогового значения возникает временная пермеабиллизация, которая приводит к обмену молекулами между цитоплазмой и внешней средой. Этот феномен, возникающий после приложения электрического импульса (EP) к клеткам и приводящий к потере проницаемости мембраны, называется электропермеабиллизацией. Эту технологию используют на протяжении трех десятков лет для усиления поглощения клетками не поглощающихся иначе молекул.

Несмотря на то что конкретный механизм электропермеабиллизации все еще остается объектом для обсуждения, эта технология указала путь для многих биомедицинских применений, в частности для терапий рака (Breton & Mir, 2011). Одна из терапий, называемая противоопухолевой электрохимиотерапией, заключается в сочетании электрического импульса (EP), прилагаемого непосредственно к участку опухоли, с введением блеомицина или цисплатина, которые спонтанно не диффундируют (или слабо диффундируют) через плазматическую мембрану (Mir et al., 1991; Mir, 2006). После вхождения в электропермеабиллизованные клетки эти два лекарственных средства генерируют повреждения ДНК и запускают гибель клеток. Не только лекарственные средства, но также нуклеиновые кислоты, которые являются непроницаемыми молекулами (Satkauskas et al., 2002; Andre & Mir, 2010), можно подвергать электропереносу в клетки с использованием электропермеабиллизации. ДНК была успешно перенесена в различные ткани живых животных, включая кожу, мышцы, печень, опухоль, роговую оболочку глаза, легкие, почки, головной мозг, мочевого пузыря и семенник (рассмотрено в работе Andre et al., 2008; Gothelf & Gehl, 2010). Одно из перспективных применений метода электропереноса генов относится к области вакцинации ДНК. Действительно, начиная с ранних 90-х годов вакцинация ДНК вызывала большой интерес. Впервые перенос ДНК в мышцы животного смог осуществить Wolff с сотрудниками. После трансфекции молекулы ДНК придали способность клеткам-мишеням продуцировать закодированный белок (Wolff et al., 1990). Tang et al. показал, что белок, закодированный ДНК, перенесенной в клетки кожи биолистическим методом, смог запустить иммунный ответ (Tang et al., 1992), и в работе Barry et al. показано, что генная вакцинация плазмидой, кодирующей белок патогена, защищала животных против заражения соответствующим патогеном (Barry et al., 1995). Эту технологию использовали в различных применениях, начиная с лабораторных инструментов и заканчивая лицензированными ветеринарными вакцинами (Anderson et al., 1996), и в настоящее время она находится в разработке в отношении лечения различных приобретенных патологий, таких как рак, малярия, гепатит В и С, или предупреждения некоторых вирусных инфекций, таких как грипп или вирус иммунодефицита человека (clinicaltrials.gov) (Bergman et al., 2003).

Таким образом, ДНК-вакцины обладают преимуществами с точки зрения изготовления, доступности и экономичности по сравнению с другими технологиями изготовления вакцин (Liu, 2011). Несмотря на тот факт, что ДНК-вакцины обеспечивают точную и гибкую стратегию для доставки антигенов в иммунные клетки и вызывают специфический иммунный ответ, вначале возникли трудности, связанные с переносом этой технологии с мелких грызунов на более крупных животных и, в конечном итоге, на пациентов (Rochard et al., 2011). Фактически, было обнаружено, что ДНК-вакцины являются слабо иммуногенными, отчасти из-за низкого поглощения молекул ДНК клетками в участке введения вакцины. Эту проблему решили путем использования электропереноса генов, который значительно улучшил характеристики ДНК-вакцин (Li et al., 2012; Gothelf & Gehl, 2012).

Однако для использования электропереноса, как предусматривается стратегиями вакцинации, требуется очень специфическая процедура. Электроперенос представляет собой многоступенчатый процесс, основанный на двух типах электрических импульсов (EP) (Andre & Mir, 2010; Satkauskas et al., 2005; Favard et al., 2007). Сначала ДНК приводят в непосредственную близость с окружением клеток-мишеней путем инъекции в предполагаемый участок введения вакцины (кожу, мышцы), затем одним или несколькими короткими (около 100 мкс) и интенсивными (около 1000 В/см) импульсами, называемыми импульсами высокого напряжения (HV), обратимо пермеабиллизуют клеточную мембрану. Через определенный интервал времени прилагают один или несколько длинных (около нескольких сотен миллисекунд) и менее интенсивных (около сотни вольт на сантиметр) импульсов, называемых импульсами низкого напряжения (LV). Импульсы LV предназначены для электрофоретического перемещения ДНК через внеклеточный матрикс вплоть до контакта с электропермеабиллизованной мембраной. Пока что не существует единого мнения относительно того, как молекулы ДНК пересекают плазматическую мембрану и входят до ядра для того, чтобы их начал воспринимать механизм трансляции клеток (Escoffre et al., 2009).

Интересно, что после введения ДНК с последующим электропереносом ни у животных, ни у человека не было выявлено серьезных побочных эффектов (Fioretti et al., 2013). Исследование показало, что

после введения ДНК-вакцина была в основном локализована вокруг участка инъекции, уровни ее локального обнаружения быстро падали с течением времени, она не интернализировалась гонадной тканью (очень низкий риск переноса в зародышевую линию) и вероятность интеграции была очень низкой, поскольку не был использован вирусный белок (Dolter et al., 2011). Более того, при использовании молекул ДНК для вакцинации в сочетании с методом электропереноса генов не возникало связанных с иммунитетом проблем до или после лечения в отличие от вирусных векторов, таких как аденовирусные векторы, обеспечивая, тем самым, возможность многократного введения (гомологичная прайм-буст вакцинация ДНК/ДНК или гетерологичная прайм-буст вакцинация ДНК/вектор или ДНК/белок) (Villemejane & Mir, 2009). Таким образом, в последние несколько лет привлекала интерес вакцинация ДНК в сочетании с электропереносом.

Что касается раковой патологии, ДНК-вакцины предназначены для запуска иммунного ответа против опухоль-специфических или опухоль-ассоциированных антигенов (Stevenson & Palucka, 2010). Действительно, раковые клетки обманывают иммунную систему, которая не всегда может эффективно инициировать иммунный ответ по причине множества сложных механизмов, таких как аутоотолерантность (Bei & Scardino, 2010), различных механизмов иммуносупрессии, включающих регуляторные Т-клетки или супрессорные дендритные клетки миелоидного происхождения (moDC) (Lindau et al., 2013), молекул, таких как CTLA-4, экспрессирующихся на поверхности иммунных клеток (Kolar et al., 2009; Shevach, 2009), и взаимодействия PD-1/PD-1L (Keir et al., 2008).

Конечной целью эффективной ДНК-вакцины, доставляемой посредством технологии электропереноса, должно быть генерирование правильного вида иммунных ответов против антигена, закодированного представляющей интерес плазмидой. Хотя технология электропереноса достаточно полно описана в отношении внутримышечного пути введения (заявка на патент WO 2007/026236) (Mir et al., 2005; Andre & Mir, 2010), имеется мало информации о параметрах электропереноса в кожу в целях вакцинации. Иммунный ответ должен быть достаточно интенсивным и длительным для генерирования положительных терапевтических эффектов у пациентов с конкретной патологией. Следует отметить, что интенсивность иммунного ответа зависит, по меньшей мере отчасти, от уровня экспрессии антигена (Lee et al., 1997; Kirman & Seder, 2003), который сам тесно связан с эффективностью переноса генов. Что касается эффективности электропереноса генов в кожу, то она зависит от нескольких параметров, включая интенсивность электрических импульсов (EP) и тип электродов, используемых для их доставки (Gothelf & Gehl, 2010).

Краткое описание изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что эффективность электропереноса в кожу может быть улучшена путем использования специфической комбинации импульсов высокого и низкого напряжения.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения, подавления или уменьшения опухоли у субъекта *in vivo* с помощью введения нуклеиновой кислоты, кодирующей опухолевый антиген и индуцирующей клеточный иммунный ответ. В данном способе нуклеиновую кислоту вводят путем интрадермальной инъекции и электрической пермеабилзации клеток кожи с помощью

единичного импульса электрического поля высокого напряжения в пределах от 1100 до 1400 В/см и длительностью от 10 до 1000 мкс;

последующего единичного импульса электрического поля низкого напряжения в пределах от 100 до 200 В/см и длительностью от 300 до 800 мс.

В одном из воплощений способа в нем используются неинвазивные пластинчатые электроды.

Также предусмотрено воплощение способа, где импульс высокого напряжения и импульс низкого напряжения отделены друг от друга интервалом времени. Продолжительность этого интервала времени может составлять от 300 до 3000 мс.

Еще одной целью настоящего изобретения является способ противоопухолевой вакцинации или генной терапии субъекта, включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей опухолевый антиген и индуцирующей клеточный иммунный ответ. В данном способе предусмотрено введение нуклеиновой кислоты путем интрадермальной инъекции и электрической пермеабилзации клеток кожи с помощью

единичного импульса электрического поля высокого напряжения в пределах от 1100 до 1400 В/см и длительностью от 10 до 1000 мкс;

последующего единичного импульса электрического поля низкого напряжения в пределах от 100 до 200 В/см и длительностью от 300 до 800 мс.

Согласно одному варианту воплощения импульс высокого напряжения и импульс низкого напряжения разделены интервалом времени.

Клеточный ответ, индуцируемый способами по изобретению, может представлять собой ответ CD8 Т-клеток.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлено схематическое изображение плазмидного ДНК-вектора INVAC-1. Основания 1-3478: вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI (NTC); основания 3479-3484: сайт клонирования HindIII (NTC/Invectys); основания 3485-6967: транскрипционный сайт Ubi-теломеразы (Invectys); основания 6968-6973: сайт клонирования XbaI (Invectys/NTC); основания 6974-7120: вектор NTC8685-eRNA41H-HindIII-XbaI (NTC).

На фиг. 2А и В представлены графики, которые показывают, что электроперенос является предпочтительным для переноса генов и иммунизации. (А) Изображение интенсивностей биолюминесценции у мышей C57BL/6J после инъекции pCMV-luc с последующим электрическим импульсом (EP) или без последующего электрического импульса (EP), n=5 мышей только для ID инъекции pCMV-luc, n=10 (от 5 мышей, две обработки на мышшь) для ID инъекции pCMV-luc + EP. (В) Частота hTERT-специфических INF γ + CD8 Т-клеток, обнаруженных у мышей C57BL/6J, вакцинированных INVAC-1 с последующим EP или без последующего EP, n=6-8 мышей. Столбцы представляют средние значения. * p<0,05, ** p<0,01, Тест Вилкоксона-Манна-Уитни.

На фиг. 3А и В представлены графики, которые показывают выбор лучших электродов. (А) Изображение интенсивностей биолюминесценции у мышей C57BL/6J после электропереноса pCMV-luc с использованием трех типов электродов, n=14 мышей только для ID инъекции pCMV-luc, n=8-10 (от 4 до 5 мышей, две обработки на мышшь) для ID у мышей HLA-B7, вакцинированных INVAC-1 с использованием трех типов электродов, n=3 мышей для контрольной иммунизации PBS и n=4-9 мышей для INVAC-1-опосредованной иммунизации. Столбцы представляют средние значения. * p<0,05, *** p<0,001, тест Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с критерием Данна (Dunn) для множественных сравнений.

На фиг. 4 представлен набор снимков, показывающих локализацию экспрессии гена люциферазы у мышей C57BL/6J после ID инъекции и электропереноса pCMV-luc с использованием пластинчатых электродов.

На фиг. 5 представлен график, который показывает определение оптимальной интенсивности импульсов HV у мышей C57BL/6J для электропереноса интрадермально введенного pCMV-luc с использованием пластинчатых электродов, n=24 мышей только для ID инъекции pCMV-luc, n=8 (от 4 мышей, две обработки на мышшь) для ID инъекции pCMV-luc + EP. Столбцы представляют средние значения. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, тест Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с критерием Данна (Dunn) для множественных сравнений.

На фиг. 6А и В представлены графики, которые показывают выбор наилучшей комбинации импульсов HV-LV у мышей C57BL/6J. (А) Биолюминесценция, полученная после ID инъекции pCMV-luc при различных комбинациях импульсов HV-LV, n=30 мышей только для ID инъекции pCMV-luc и n=6 (от 3 мышей, две обработки на мышшь) для ID инъекции pCMV-luc + EP. (В) Частота hTERT-специфических INF γ + CD8 Т-клеток, обнаруженных у мышей C57BL/6J, вакцинированных INVAC-1 в соответствии с различными комбинациями импульсов HV-LV, n=8 мышей для контрольной иммунизации PBS, и n=5 мышей для INVAC-1-опосредованной иммунизации. Столбцы представляют средние значения. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, тест Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis) с критерием Данна (Dunn) для множественных сравнений.

Подробное описание изобретения

Определения

Термин "HV" означает высокое напряжение, и термин "LV" означает низкое напряжение.

Используемый здесь термин "кожа" означает кожу животного, например человека или не относящегося к человеку млекопитающего, такого как грызун (например, мышь, кролик или крыса), собака, кошка или примат, лошадь, коза, свинья, овца, корова и т.д. В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновую кислоту переносят в клетки дермы. Клетки кожи, в которые перенесена нуклеиновая кислота в соответствии с изобретением, предпочтительно представляют собой дендритные клетки, но также могут включать кератиноциты, меланоциты, фибробласты или же миелоидные или лимфоидные клетки. Термин "нуклеиновая кислота" означает любую представляющую интерес нуклеиновую кислоту, в частности любую нуклеиновую кислоту, способную экспрессировать представляющий интерес белок. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК (например, антисмысловой или интерферирующей РНК). Предпочтительно это ДНК, предпочтительно двухцепочечная ДНК. В предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота представляет собой экспрессирующий ДНК вектор хорошо известного в данной области типа. Как правило, экспрессионный вектор содержит промотор, функционально связанный с последовательностью ДНК, которая кодирует представляющий интерес белок.

Термин "TERT" относится к "теломеразной обратной транскриптазе", которая является основной детерминантой активности теломеразы, включая теломеразу дикого типа или ее варианты.

Термин "иммуногенный" означает, что композиция или конструкция, к которой он относится, при введении способна вызывать иммунный ответ. "Иммунный ответ" у субъекта относится к развитию вро-

жденного и адаптивного иммунного ответа на антиген, включая гуморальный иммунный ответ, клеточный иммунный ответ или и тот и другой. "Гуморальный иммунный ответ" относится к ответу, опосредованному антителами. "Клеточный иммунный ответ" представляет собой ответ, опосредованный Т-лимфоцитами. Он включает выработку цитокинов, хемокинов и других подобных молекул, продуцируемых активированными Т-клетками, белыми клетками крови или и теми и другими. Иммунные ответы можно определить с использованием стандартных иммуноанализов и проб на нейтрализацию для детекции гуморального иммунного ответа, которые известны в данной области. В отношении противораковой вакцинации иммунный ответ предпочтительно охватывает стимуляцию или пролиферацию цитотоксических CD8 Т-клеток и/или CD4 Т-клеток и может быть определен с использованием иммуноанализов, таких как анализ ELISpot, анализ цитотоксичности *in vivo* или анализ связывания в отношении секреции цитокинов.

Используемый здесь термин "лечение", или "терапия", или "иммунотерапия" относится к любому из смягчения, ослабления и/или устранения, уменьшения и/или стабилизации (например, отсутствию прогрессирования в более поздние стадии) симптома, а также задержке прогрессирования заболевания или его симптома. В случае, если заболевание представляет собой рак, термин включает достижение эффективного противоопухолевого ответа, наблюдаемого у раковых пациентов.

Используемый здесь термин "предупреждение" или "предотвращение" относится к смягчению, ослаблению и/или устранению, уменьшению и/или стабилизации (например, отсутствию прогрессирования в более поздние стадии) признаков, предшествующих началу заболевания, т.е. любого изменения или симптома (или набора симптомов), которые могут указывать на начало заболевания до возникновения специфических симптомов.

"Пациент" или "субъект" обычно представляет собой субъекта, относящегося к млекопитающему, как указано выше, предпочтительно человеку любого возраста, пола или тяжести состояния.

Параметры электропереноса.

Нуклеиновая кислота предпочтительно предназначена для приведения в контакт с клетками кожи до применения единичного импульса LV и еще более предпочтительно до применения единичного импульса HV. Интервал времени между инъекцией нуклеиновой кислоты и электрическими импульсами, особенно между инъекцией и единичным импульсом HV не является важным. Обычно интервал времени (до приложения импульса HV) после приведения фармацевтической композиции в контакт с клетками кожи составляет от нескольких секунд до 10 мин, например от 30 с до 5 мин. Интервал времени до приложения импульса HV, составляющий от 5 до 10 мин, также является приемлемым. Нуклеиновую кислоту или фармацевтическую композицию, содержащую нуклеиновую кислоту, приводят в контакт с клетками кожи (т.е. клетками дермы) путем интрадермальной инъекции.

В предпочтительном аспекте изобретения единичный импульс высокого напряжения предпочтительно имеет напряженность поля от 1100 до 1400 В/см, предпочтительно 1250 В/см.

Единичный импульс высокого напряжения может иметь длительность от 50 до 150 мкс, предпочтительно 100 мкс.

В предпочтительном аспекте изобретения единичный импульс низкого напряжения предпочтительно имеет напряженность поля от 100 до 200 В/см, предпочтительно 180 В/см.

Единичный импульс низкого напряжения может предпочтительно иметь продолжительность от 350 до 600 мс, более предпочтительно 400 мс.

В предпочтительном варианте осуществления единичный импульс высокого напряжения предпочтительно имеет напряженность поля от 1100 до 1400 В/см, предпочтительно 1250 В/см и длительность от 50 до 150 мкс, предпочтительно 100 мкс, и единичный импульс низкого напряжения имеет напряженность поля от 100 до 200 В/см, предпочтительно 180 В/см и длительность от 350 до 600 мс, более предпочтительно 400 мс.

В конкретном варианте осуществления, когда субъектом является человек, единичный импульс высокого напряжения может иметь напряженность поля 1250 В/см и предпочтительно длительность 100 мкс, и единичный импульс низкого напряжения может иметь напряженность поля 180 В/см и предпочтительно длительность 400 мс.

Импульс низкого напряжения (LV) может иметь такую же полярность или полярность, противоположную полярности импульса HV. Предпочтительно единичный импульс LV представляет собой квадратный импульс. Он также может быть трапецеидальным или периодическим. Предпочтительно единичный импульс HV представляет собой квадратный импульс.

Импульсы HV и LV могут быть разделены интервалом времени, и этот интервал времени предпочтительно составляет от 300 до 3000 мс, предпочтительно от 500 до 1200 мс, как правило, 1000 мс.

Целью изобретения является метод электропорации как таковой, включающий помещение электродов вблизи клеток дермы, содержащих интерстициально нуклеиновую кислоту, затем электрическую пермеабиллизацию клеток дермы следующим образом:

сначала с помощью единичного импульса электрического поля высокого напряжения в диапазоне от 1000 до 1500 В/см и длительностью от 10 мкс до 1000 мкс;

затем предпочтительно после определенного интервала времени с помощью единичного импульса электрического поля низкого напряжения в диапазоне от 50 до 250 В/см и длительностью от 300 до 800 мс,

при этом в результате этих электрических импульсов происходит перенос нуклеиновой кислоты в клетки дермы.

Может быть использован программируемый генератор напряжения.

Можно использовать электроды, которые представляют собой инвазивные игольчатые электроды (такие как N-30-4B, IGEA), обычно состоящие из двух рядов по четыре длинные иглы, расположенные на расстоянии 4 мм друг от друга, или инвазивные пальцеобразные электроды (такие как F-05-OR, IGEA), обычно состоящие из двух рядов по три короткие иглы, расположенные на расстоянии 4 мм друг от друга, но предпочтительно представляют собой неинвазивные пластинчатые электроды (такие как P30-8B, IGEA).

Электроды располагают в непосредственной близости от участка инъекции таким образом, чтобы электрическое поле между электродами проходило через участок или область инъекции, при этом инъекционная жидкость диффундирует после введения. Предпочтительно используют проводящий гель, известный специалисту в данной области.

В конкретном варианте осуществления электроды могут содержаться в устройстве, посредством которого можно осуществлять как введение, так электрическую стимуляцию.

Генетические конструкции, иммуногенные композиции.

Предпочтительно нуклеиновая кислота представляет собой генетическую конструкцию, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую представляющий интерес белок, и регуляторные последовательности (такие как подходящий промотор(ы), энхансер(ы), терминатор(ы) и т.п.), обеспечивая экспрессию (например, транскрипцию и трансляцию) белкового продукта в клетке-хозяине или организме-хозяине.

Генетические конструкции согласно изобретению обычно находятся в форме, подходящей для трансформации заданных клеток-хозяина или организма-хозяина, в форме, подходящей для встраивания в геномную ДНК заданных клеток-хозяев, или в форме, подходящей для независимой репликации, поддержания и/или наследования в заданной клетке или организме. Например, генетические конструкции согласно изобретению могут находиться в форме вектора, такого как, например, плаزمид, космида, YAC, вирусный вектор или транспозон. В частности, вектор может представлять собой экспрессионный вектор, т.е. вектор, который может обеспечить транскрипцию РНК и/или экспрессию белков *in vivo*, особенно в клетках дермы.

В предпочтительном, но не ограничивающем аспекте генетическая конструкция согласно изобретению содержит i) по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту, кодирующую представляющий интерес белок, функционально связанную с ii) одним или несколькими регуляторными элементами, такими как промотор и необязательно подходящий терминатор, и необязательно также iii) один или несколько дополнительных элементов генетических конструкций, таких как 3'- или 5'-UTR последовательности, лидерные последовательности, маркеры селекции, маркеры экспрессии/репортерные гены, и/или элементы, которые могут содействовать или повышать (эффективность) трансформации или интеграции.

Следует понимать, что применение в соответствии с изобретением предусматривает случай, когда для изготовления фармацевтической композиции используют две или более нуклеиновых кислот, способных экспрессировать *in vivo* различные активные молекулы. Нуклеиновые кислоты выбирают таким образом, чтобы они были комплементарными и/или действовали синергически при лечении заболевания. В этом случае нуклеотидные последовательности, кодирующие различные молекулы, могут находиться под контролем одного и того же промотора или различных промоторов. Могут быть получены композиции, содержащие указанную нуклеиновую кислоту(ы) или вектор(ы). В одном варианте осуществления композиции являются иммуногенными. Они могут содержать носитель или вспомогательные вещества, которые являются подходящими для введения человеку или млекопитающим (т.е. нетоксичными). Такие вспомогательные вещества включают жидкие, полутвердые или твердые разбавители, которые служат в качестве фармацевтических носителей, изотонических агентов, стабилизаторов или любого адьюванта.

Некодирующие нуклеиновые кислоты.

В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота не кодирует ни один представляющий интерес белок, но ингибирует или ослабляет экспрессию целевого гена. Например, нуклеиновая кислота может представлять собой антисмысловую РНК или интерферирующую РНК. Нуклеиновые кислоты могут представлять собой природные молекулы РНК нуклеиновой кислоты или аналоги нуклеиновой кислоты, такие как PLNA. В частности, нуклеиновая кислота может представлять собой малую интерферирующую РНК (миРНК), например, одноцепочечную или двухцепочечную РНК, такую как короткая одноцепочечная или двухцепочечная РНК длиной примерно от 17 до 29 нуклеотидов, предпочтительно длиной примерно от 19 до 25 нуклеотидов, которые направлены воздействуют на целевую мРНК. В случае двухцепочечной РНК, такая миРНК содержит смысловую цепь РНК и комплементарную антисмысловую цепь РНК, которые загибризованы друг с другом.

Вакцинация и/или генная терапия.

В конкретном варианте осуществления нуклеиновая кислота является полезной в генной терапии и/или вакцинации посредством экспрессии представляющего интерес белка. В предпочтительном варианте осуществления представляющий интерес белок обладает иммуностимулирующим действием, более предпочтительно вакцинным эффектом. Предпочтительно получают гуморальный иммунный ответ.

В предпочтительном аспекте нуклеиновая кислота содержит последовательности нуклеиновой кислоты, способные экспрессировать *in vivo* в трансфицированных клетках кожи одну или более чем одну терапевтически активную молекулу (молекулы), предпочтительно представляющий интерес белок или белки.

Эта активная молекула или представляющий интерес белок может действовать в самой коже и/или снаружи кожи в другом месте в пределах организма, например на опухоли, локализованной где-либо в организме, если экспрессирующаяся молекула является активной в качестве противоопухолевой вакцины, или инфекции, локализованной где-либо в пределах организма, если экспрессирующаяся молекула является активной в качестве противоинойфекционной вакцины.

Примером представляющей интерес терапевтической молекулы является белок TERT, полезный в качестве противоопухолевой вакцины. Следует учесть, что не существует ограничения на вид молекул, которые могут экспрессироваться в соответствии с изобретением, и, следовательно, специалист в данной области сможет осуществить изобретение с использованием представляющей интерес молекулы, зная ее кодирующую последовательность, и обычных экспериментов для выбора наилучшей конструкции или экспрессионного вектора.

В одном интересном аспекте нуклеиновая кислота, как терапевтически активная молекула, кодирует один или несколько иммуногенов (или иммуногенных пептидов, полипептидов или белков, включая гликопротеины), которые способны вызывать иммунный ответ у хозяина. В одном варианте осуществления иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ для хозяина. В этом варианте осуществления изобретение относится к получению иммуногенной композиции или же профилактической или терапевтической вакцины, которая направлена против рака или против микроорганизмов, например, вирусов или бактерий.

В качестве только примера, нуклеиновая кислота кодирует один или несколько иммуногенов HIV, HBV, вируса Эпштейна-Барра, вируса псевдобешенства, синтиций-образующего вируса, онковируса, папилломавируса и т.д. Специалист в данной области имеет доступ к нуклеиновым кислотам, кодирующим представляющие наибольший интерес молекулы для выбранного применения, например, к наиболее эффективным иммуногенам или комбинациям иммуногенов для конкретного заболевания.

В другом варианте осуществления иммунный ответ приводит к выработке антител, особенно поликлональных антител, и эти антитела извлекают из полученной сыворотки и используют обычным путем.

В еще другом варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует антигенный пептид или белок, который при введении субъекту, например мышам, запускает выработку специфических антител.

Лечение опухолей.

В конкретном варианте осуществления описан способ предупреждения или лечения опухоли или нежелательной пролиферации клеток (например, дисплазии) у пациента, при этом способ включает введение эффективного количества нуклеиновой кислоты или иммуногенной композиции пациенту, нуждающемуся в этом, с использованием метода электропорации согласно изобретению. Указанную нуклеиновую кислоту или иммуногенную композицию вводят в количестве, достаточном для индукции иммунного ответа у пациента.

Опухоль может представлять собой любую нежелательную пролиферацию клеток, в частности доброкачественную опухоль или злокачественную опухоль, в особенности рак.

Рак может находиться на любой стадии развития, включая метастатическую стадию.

Таким образом, нуклеиновая кислота предпочтительно экспрессирует одну или несколько активных молекул, выбранных таким образом, чтобы фармацевтическая композиция была эффективной в отношении уменьшения, супрессии или регрессии ангиогенеза опухоли, или уменьшения или супрессии роста опухоли, или ингибирования метастазирования. Например, можно использовать нуклеиновую кислоту, кодирующую опухолевый антиген (например, TERT).

В конкретном варианте осуществления опухоль представляет собой солидный рак, саркому или карциному. В частности, опухоль может быть выбрана из группы, состоящей из меланомы, опухоли головного мозга, такой как глиобластома, нейробластома и астроцитомы, а также карциномы мочевого пузыря, молочной железы, шейки матки, толстой кишки, легких, особенно немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), поджелудочной железы, предстательной железы, рака головы и шеи или рака желудка.

В другом варианте осуществления опухоль может представлять собой жидкую опухоль, например гематопэтическую опухоль, лимфому или лейкоз, такой как лимфоцитарный лейкоз, миелоидный лейкоз, лимфому, включая болезнь Ходжкина, множественную миелому, злокачественную миелому.

Хотя должно быть понятно, что количество необходимого материала будет зависеть от иммуногенности каждой отдельной конструкции и не может быть предсказано априори, процесс определения под-

ходящей дозы для заданной конструкции является несложным. В частности, серии возрастающих доз, например начиная с около 5-30 мкг или предпочтительно 20-25 мкг, вплоть до около 500-1000 мкг, вводят соответствующим видам и наблюдают конечный иммунный ответ, например, путем детекции клеточного иммунного ответа с помощью ELISpot-IFN γ -анализа (описанного в экспериментальном разделе), путем детекции ответов цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) с использованием анализа лизиса *in vivo*, определяемого по стандартным тестам высвобождения хрома, или путем детекции ответа ТН (хелперных Т-клеток) с использованием анализа высвобождения цитокинов.

В предпочтительном варианте осуществления режимы вакцинации включают от одной до трех инъекций, предпочтительно повторяющихся через три или четыре недели. В конкретном варианте осуществления схема вакцинации может состоять из одной или двух инъекций и по меньшей мере одного последующего цикла через три или четыре недели, состоящего из трех-пяти инъекций. В другом варианте осуществления первая доза состоит из одной-трех инъекций с последующей, по меньшей мере, бустерной дозой, вводимой каждый год или каждые два или более лет. Это только примеры, и любой другой режим вакцинации охвачен настоящим изобретением.

Настоящее изобретение описано более подробно с помощью следующих неограничивающих экспериментов.

Примеры

Процедура электропереноса генов для противоопухолевой вакцинации.

В настоящем исследовании оптимизировали процедуру электропереноса генов в дерму в целях вакцинации против опухолевого антигена теломеразы. В первой оценке использовали репортерный ген люциферазы для оценки эффективности электропереноса генов в дерму как функцию используемых параметров. Во второй оценке эти параметры тестировали на их эффективность в отношении иммунизации мышей против эпитопов теломеразы. Использовали различные типы электродов, неинвазивных или инвазивных, а также ряд различных прилагаемых электрических полей.

Оценивали два важных параметра, первым из которых являлась интенсивность экспрессии люциферазы в участке электропереноса, и вторым являлась интенсивность специфических к вакцине, интерферон γ (IFN γ)-положительных CD8 Т-клеток, которые представляют вид иммунного ответа, ожидаемый для противораковых вакцин (Vesely et al., 2011). Изучали три основных фактора электропереноса: типы электродов и воздействие импульсов HV и LV.

Материалы и методы.

Мыши.

Мыши HLA-B7 представляют собой трансгенных мышей, экспрессирующих молекулу класса I HLA-B*0702. Они являются нокаутными по молекулам класса I H2D^b и H2K^b. Они были описаны ранее в работе Rohrllich et al., 2003 и получены в результате скрещивания (internal breeding) в Институте Пастера (The Pasteur Institute). Самок мышей C57BL/6J (в возрасте 6-8 недель) получали из лабораторий Janvier (Saint-Berthevin, Франция) или Harlan (Gannat, Франция).

Животных содержали в особых условиях, не содержащих патогенов, в лаборатории Института Пастера (Pasteur Institute) или Института Гюстава Русси (Gustave Roussy Institute). Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с этическим руководством Европейского Комитета (Directive 2010/63/EU), и манипуляции с животными проводились в строгом соответствии с положительной практикой обращения с животными.

Плазмиды.

pCMV-luc (PF461, Plasmid Factory, Bielefeld, Германия) представляет собой двухцепочечную плазмидную ДНК размером 6233 пар оснований, кодирующую репортерный ген люциферазы светлячка, помещенный под контроль промотора цитомегаловируса (pCMV).

INVAC-1 представляет собой двухцепочечную плазмидную ДНК размером 7120 пар оснований, кодирующую модифицированную последовательность белка теломеразы, слитую с белковой последовательностью убиквитина. Закодированный белок теломеразы является ферментативно неактивным, но все еще может вызывать иммунные ответы *in vivo* против эпитопов теломеразы. Вставку убиквитин-теломераза клонировали в экспрессионный вектор NTC8685-ERNA41H-HindIII-XbaI, разработанный фирмой Nature Technology Corporation (Lincoln, Nebraska). Присутствие убиквитина повышает перенос белка теломеразной обратной транскриптазы (TERT) в протеасому и увеличивает путь презентации пептидов, происходящих из TERT, МНС класса I (Rodriguez et al., 1997; Wang et al., 2012). Последовательность ДНК, кодирующая белок TERT, содержит делецию в 47 аминокислот в N-концевой области, которая включает сигнал ядрышковой локализации. Кроме того, три аминокислоты были удалены внутри каталитического сайта TERT (VDD) для устранения ферментативной активности белка. Плазмиду INVAC-1 хранили при -20°C в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS) при концентрации 2 мг/мл до использования. На фиг. 1 представлена карта плазмиды INVAC-1.

Генератор EP и электроды.

Электроперенос генов выполняли с использованием Cliniporator® (IGEA, Carpi, Италия), доставляющего импульсы HV и импульсы LV. Величину напряжения устанавливали в соответствии с расстоя-

нием между двумя рядами электродов. Использовали различные типы электродов: (1) инвазивные игольчатые электроды (N-30-4B, IGEA), состоящие из двух рядов по четыре длинные иглы, которые отстоят друг от друга на расстоянии 4 мм, (2) инвазивные пальцеобразные электроды (F-05-OR, IGEA), состоящие из двух рядов по три короткие иглы, которые отстоят друг от друга на расстоянии 4 мм, (3) неинвазивные пластинчатые электроды (P30-8B, IGEA), состоящие из двух металлических пластин толщиной 1 мм и отстоящие друг от друга на расстоянии 5 мм.

Электроперенос генов *in vivo*.

Мышей анестезировали перед интрадермальными (ID) инъекциями с использованием смеси газов для анестезии 2% изофлуран/кислород (Abbot, Suresnes, France) или смешанного раствора (интраперитонеальный способ) 2% ксилазина (Rompun, Bayer Santé, Loos, Франция) и 8% кетамина (Imalgen 1000, Merial, Lyon, Франция) в PBS в соответствии с индивидуальной массой тела животного. Интрадермальную (ID) инъекцию выполняли после бритья в нижнюю часть бока животного (билатеральные инъекции) с помощью инсулиновых специфических игл толщиной 29 G. Каждое животное мышиной линии HLA-B7 или C57BL/6J получало однократную дозу ДНК, соответствующую 100 мкг плазмиды INVAC-1 (50 мкг в 25 мкл PBS на бок) или 10 мкг плазмиды rCMV-luc (5 мкг в 25 мкл PBS на бок).

Сразу же после ID инъекции выполняли электроперенос генов с использованием импульса HV (длительностью 100 мкс) с последующим одним импульсом LV (длительностью 400 мс) через 1000 мс. Электроды помещали таким образом, чтобы они окружали волдырик, образовавшийся в результате инъекции плазмиды. Пальцеобразные или игольчатые электроды вдавливали в кожу на глубину около 5 мм. Для пластинчатых электродов использовали проводящий гель (Labo FH, gel de contact bleu, NM Médical, Франция) для улучшения контакта между металлическими пластинами и кожей.

Биолюминесцентная визуализация в условиях *in vivo* и локализация электропереноса.

Через два дня после электропереноса rCMV-luc мышам C57BL/6J инъецировали интраперитонеально 0,15 мг люциферина жука (Promega, Lyon, Франция) на 1 г массы тела. Через 20 мин после инъекции животных анестезировали с использованием смеси газов для анестезии 2% изофлуран/кислород и управляемую люциферазой биолюминесцентную реакцию детектировали с использованием системы визуализации In Vivo Imaging System IVIS 50 (Xenogen, Waltham, США). Для подтверждения электропереноса в кожу трех мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков через 20 мин после инъекции люциферина и у животных удаляли электропермеабилizованный участок кожи. Интенсивности биолюминесценции оценивали в кожном лоскуте и в подлежащих мышцах.

Приготовление спленоцитов.

Через 14 дней после ID инъекции INVAC-1 и электропереноса мышей умерщвляли путем смещения шейных позвонков и извлекали селезенки. В стерильных условиях каждую селезенку продавливали через нейлоновую сетку с отверстиями 70 мкм (клеточный фильтр, BD Falcon Franklin Lakes, США) и промывали культуральной полной средой RPMI (Roswell Park Memorial Institute, среда, дополненная 10% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки (FCS), 1% пирувата натрия, 1% пенициллина-стрептомицина и 0,1% β-меркаптоэтанола). Все компоненты получали от фирмы Life technologies SAS (Saint-Aubin, Франция). Спленоциты очищали на градиенте плотности фиколла (Lymphocyte Separation Medium, Eurobio, Courtaboeuf, Франция), промывали и подсчитывали с использованием счетчика Cellometer® Auto T4 Plus counter (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, Франция) и доводили до 2 миллионов клеток/мл в полной среде RPMI перед использованием в анализе IFNγ ELISpot.

Пептиды, рестриктированные по HLA-B7 и H2.

Пептиды TERT (hTERT) человека, рестриктированные по молекуле класса I HLA-B*0702, ранее были описаны (Adotevi et al., 2006; Cortez-Gonzalez et al., 2006). Другие пептиды были предсказаны с помощью предсказания эпитопов *in-silico* для связывания мышинных H2K^b, H2D^b МНС класса I с использованием четырех алгоритмов, доступных в Интернете: Syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de/>), Bimas (<http://www-bimas.cit.nih.gov>), NetMHCpan and SMM (<http://tools.immuneepitope.org/main/>). Все синтетические пептиды получали лиофилизированными (чистота >90%) от фирмы Proimmune (Oxford, UK). Лиофилизированные пептиды растворяли в стерильной воде при 2 мг/мл и хранили в аликвотах по 35 мкл при -20°C до использования. Подробная информация о пептидных последовательностях согласно рестрикции по B7 или H2 представлена ниже.

Пептиды hTERT, рестриктированные по H2:

H2D^b: RPIVNM DYV (p660),

H2K^b: HAQCPYGV L (p429).

Пептиды hTERT, рестриктированные по HLA-B7:

HLA-B7: RPSLTGARR L (p351),

HLA-B7: RPAEEATSL (p277),

HLA-B7: LPSDFKTI L (p1123).

Анализ IFNγ ELISpot.

Вкратце, микропланшеты из поливинилиденфторида (набор для анализа IFNγ ELISpot, 10×96 тестов, Diaclone, Eurobio) покрывали в течение ночи захватывающим антителом (антимышиный

IFN γ) и блокировали стерильным 2% молоком в PBS в течение 2 ч. Планшеты ELISpot промывали и суспензии спленоцитов высевали в трех повторах при концентрации 2×10^5 клеток/лунку. Затем клетки стимулировали 5 мкг/мл соответствующих пептидов H2 или B7 или 10 мкг/мл форбол-12-мирикат-13-ацетата (PMA)-иономицина или ложно стимулировали бессывороточной культуральной средой. Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO $_2$. Через 19 ч пятна выявляли с помощью антитела, конъюгированного с биотином, для детекции IFN γ , затем использовали стрептавидин-щелочную фосфатазу и раствор субстрата 5-бром-4-хлор-3'-индолилфосфат п-толуидиновая соль/нитросиний тетразолий (BCIP/NBT). Пятна подсчитывали с использованием счетчика Immunospot ELISpot counter и программного обеспечения (Cellular Technology Limited, Bonn, Германия).

Статистический анализ и обработка данных.

Программное обеспечение Prism-5 использовали для обработки данных, анализа и графического представления. Для статистических анализов биолюминесценции и ELISpot использовали тест Манна-Уитни-Уилкоксона или тест Крускала-Уоллиса с критерием Данна для множественных сравнений в зависимости от эксперимента. Значимость устанавливали при p -величине $<0,05$.

Результаты.

Электроперенос обеспечил достижение оптимальной трансгенной экспрессии *in vivo* и индукцию антигенспецифических CD8 Т-клеток.

Плазмиды pCMV-luc или INVAC-1 интрадермально инъецировали в бритые бока мышей C57BL/6J с последующим применением или без последующего применения EP (1 импульс HV при 1000 В/см длительностью 100 мкс, с последующим импульсом LV при 140 В/см длительностью 400 мс через 1000 мс). Раздражения после бритья или во время и после процедуры электропереноса не наблюдалось. После электропереноса генов измеряли два параметра: экспрессию люциферазы после ID электропереноса pCMV-luc и частоту IFN γ -секретирующих hTERT-специфических CD8 Т-клеток после ID электропереноса INVAC-1. Экспрессия люциферазы (фиг. 2А) и частота IFN γ -секретирующих hTERT-специфических CD8 Т-клеток (фиг. 2В) значительно увеличились, когда EP прилагали непосредственно после инъекции ДНК ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно) по сравнению с животными, которые получали инъекцию ДНК без электропереноса. Таким образом, электроперенос индуцирует значительные уровни hTERT-специфических CD8 Т-клеточных ответов после ID вакцинации INVAC-1 и значительные уровни экспрессии люциферазы после ID инъекции pCMV-luc.

Выбор наилучших электродов для оптимального переноса генов и генерирования интенсивных клеточных иммунных ответов.

Различные типы электродов могут быть использованы для электропереноса *in vivo* в кожу (Gothelf & Gehl, 2010). Таким образом, три различных типа электродов (пластинчатые электроды, пальцеобразные электроды и игольчатые электроды, описанные в разделе "Материалы и методы") испытывали для определения, какой из них лучше всего подходит для эффективного переноса генов и генерирования интенсивных специфических клеточных иммунных ответов у мышей. Результаты показали, что три типа электродов значительно усиливали электроперенос плазмиды pCMV-luc у мышей C57BL/6J по сравнению с животными, которые получали плазмиду без EP (фиг. 3А). Однако наблюдалась более высокая однородность ответа для группы мышей, подвергнутых электропереносу с использованием пластинчатых электродов ($p < 0,001$). Животные, подвергнутые электропереносу с использованием игольчатых электродов, также продемонстрировали, но в меньшей степени, значительные уровни экспрессии люциферазы ($p < 0,05$).

Сходные результаты были получены в исследованиях иммуногенности у мышей HLA-B7. Когда мышей интрадермально вакцинировали INVAC-1 с последующим электропереносом в кожу, самую высокую среднюю частоту IFN γ -специфических CD8 Т-клеток детектировали при использовании пластинчатых электродов, и это различие было статистически значимым по сравнению с контрольной группой PBS ($p < 0,05$) (фиг. 3В).

Таким образом, пластинчатые электроды показали самую высокую способность к электропереносу pCMV-luc и генерированию значительных уровней hTERT-специфических CD8 Т-клеток.

Локализация люциферазы после ID инъекции с последующим электропереносом генов

Известно, что электроперенос генов является очень эффективным в мышцах (Andre et al., 2008). Для гарантирования того, что после ID инъекции pCMV-luc ген люциферазы был подвергнут электропереносу только в кожу, лоскут кожи открывали на боку мышей C57BL/6J на участке обработки и биолюминесценцию лоскута кожи и подлежащих мышц измеряли через четыре дня после электропереноса генов. Для этого исследования электропереноса генов использовали пластинчатые электроды. Авторы подтвердили, что экспрессия трансгена происходила только в коже и не была обнаружена в подлежащих мышцах (фиг. 4).

Выбор импульса HV.

Первая оптимизация электрических параметров состояла в определении наиболее эффективной амплитуды импульса HV (длительностью 100 мкс) из следующих амплитуд полей: 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 В/см. Интенсивность импульса LV (длительностью 400 мс) сохраняли постоянной при

140 В/см и интервал между импульсами HV и LV устанавливали равным 1000 мс. Эту оценку выполняли с использованием репортерного гена люциферазы и мышей C57BL/6J.

Мыши C57BL/6J, подвергнутые электропереносу при 1200, 1400 и 1600 В/см, показали самое значительное усиление экспрессии люциферазы по сравнению с контрольными мышами ($p < 0,001$) (фиг. 5). В частности, самая высокая средняя биоломинесценция была получена в группе, обработанной при 1400 В/см, и наблюдалась также более высокая однородность результатов для этой группы по сравнению с другими группами. Однако отсутствовало статистически значимое различие между ответами, полученными у этих трех групп, т.е. 1200, 1400 и 1600 В/см.

Выбор наилучшей комбинации импульсов HV-LV.

Влияние комбинаций HV-LV оценивали по электропереносу pCMV-luc и по индуцированным INVAC-1 специфическим клеточным иммунным ответам после ID инъекции в кожу мышей C57BL/6J. Что касается импульса HV, 1000 или 1400 В/см были выбраны для комбинирования с различными импульсами LV. Непосредственно после ID инъекции pCMV-luc или INVAC-1 прилагали один импульс HV (длительностью 100 мкс) при 1000 или 1400 В/см с последующим одним импульсом LV (длительностью 400 мс) при 60, 100, 140, 180 или 220 В/см. Десять комбинаций импульсов HV-LV назывались от "P1" до "P10" (см. таблицу).

Комбинации импульсов HV-LV, оцененные в анализах биоломинесценции и ELISpot

(В/см)	LV = 60	LV = 100	LV = 140	LV = 180	LV = 220
HV = 1000	P1	P2	P3	P4	P5
HV = 1400	P6	P7	P8	P9	P10

Из-за технических ограничений Cliniporator® не мог доставлять постоянно 220 В/см в течение 400 мс. Таким образом, полученные при использовании условий P5 и P10 результаты оказались ненадежными и были исключены из анализа данных.

Три комбинации импульсов HV-LV, которые генерировали самые высокие средние значения интенсивности биоломинесценции, представляли собой P4, P8 и P9 (фиг. 6A). Все из этих трех комбинаций показали высокие статистические различия по сравнению с инъекцией pCMV-luc без EP ($p < 0,001$). В частности, P9 показала наилучшую среднюю интенсивность биоломинесценции, самое высокое значение минимальной интенсивности биоломинесценции и самую низкую точку дисперсии.

Затем комбинации импульсов HV-LV P4, P8 и P9 тестировали в отношении ID вакцинации INVAC-1. Значения интенсивности hTERT-специфических CD8 Т-клеточных ответов у этих групп были сравнимыми с комбинацией P3, ранее описанной в отношении электропереноса ДНК в подкожные ткани (Andre et al., 2008). Анализ данных, полученных в результате анализа иммуногенности, показал, что наилучшими являются комбинации P8 и P9, которые обеспечили генерирование значительных частот IFN γ -специфических CD8 Т-клеток по сравнению с контрольными мышами ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно) (фиг. 6B). Даже несмотря на то, что различие между группами P8 и P9 не было статистически значимым, P9 показала более высокую среднюю частоту hTERT-специфических CD8 Т-клеток.

Учитывая данные анализов биоломинесценции и иммуногенности, лучшей комбинацией импульсов HV-LV оказалась комбинация P9, т.е. один импульс HV (длительностью 100 мкс) при 1400 В/см с последующим импульсом LV (длительностью 400 мс) при 180 В/см.

Заключение.

В этом исследовании была оптимизирована процедура для электропереноса гена люциферазы *in vivo* в дерму и ID вакцинации, основанной на теломеразе. Неинвазивные пластинчатые электроды, доставляющие один импульс высокого напряжения длительностью 100 мкс с последующим одним импульсом низкого напряжения длительностью 400 мс, проявили самые высокие уровни экспрессии люциферазы и самое высокое число специфических к теломеразе CD8 Т-клеток. Результаты, полученные с использованием этой ДНК-вакцины на основе теломеразы, могут помочь разработать процедуру глобальной ДНК-вакцинации с использованием технологии электропереноса независимо от антигена, будь то опухолевый антиген или вирусный или бактериальный антиген.

Список литературы

- Adotevi O, Mollier K, Neuveut C, Cardinaud S, Boulanger E, et al. (2006) Immunogenic HLA-B*0702-restricted epitopes derived from human telomerase reverse transcriptase that elicit antitumor cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 12: 3158-3167.
- Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug SC, LaPatra S, Shepherd J, et al. (1996) Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 114-122.
- Andre FM, Gehl J, Sersa G, Preat V, Hojman P, et al. (2008) Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther* 19: 1261-1271.
- Andre FM, Mir LM (2010) Nucleic Acids Electrotransfer In Vivo: Mechanisms and Practical Aspects. *Current Gene Therapy* 10: 267-280.
- Barry MA, Lai WC, Johnston SA (1995) Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 377: 632-635.
- Bei R, Scardino A (2010) TAA polyepitope DNA-based vaccines: a potential tool for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2010: 102758.
- Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, et al. (2003) Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. *Clin Cancer Res* 9: 1284-1290.
- Breton M, Mir LM (2011) Microsecond and nanosecond electric pulses in cancer treatments. *Bioelectromagnetics*.
- Cortez-Gonzalez X, Sidney J, Adotevi O, Sette A, Millard F, et al. (2006) Immunogenic HLA-B7-restricted peptides of hTERT. *Int Immunol* 18: 1707-1718.
- Dolter KE, Evans CF, Ellefsen B, Song J, Boente-Carrera M, et al. (2011) Immunogenicity, safety, biodistribution and persistence of ADVAX, a prophylactic DNA vaccine for HIV-1, delivered by in vivo electroporation. *Vaccine* 29: 795-803.
- Escoffre JM, Portet T, Wasungu L, Teissie J, Dean D, et al. (2009) What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol* 41: 286-295.
- Favard C, Dean DS, Rols MP (2007) Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Current Gene Therapy* 7: 67-77.
- Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M (2013) In vivo DNA electrotransfer for

immunotherapy of cancer and neurodegenerative diseases. *Curr Drug Metab* 14: 279-290.

Gothelf A, Gehl J (2010) Gene electrotransfer to skin; review of existing literature and clinical perspectives. *Curr Gene Ther* 10: 287-299.

Gothelf A, Gehl J (2012) What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 8: 1694-1702.

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704.

Kirman JR, Seder RA (2003) DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? *Curr Opin Immunol* 15: 471-476.

Kolar P, Knieke K, Hegel JKE, Quandt D, Burmester GR, et al. (2009) CTLA-4 (CD152) Controls Homeostasis and Suppressive Capacity of Regulatory T Cells in Mice. *Arthritis and Rheumatism* 60: 123-132.

Lee AH, Suh YS, Sung JH, Yang SH, Sung YC (1997) Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization. *Mol Cells* 7: 495-501.

Li L, Saade F, Petrovsky N (2012) The future of human DNA vaccines. *J Biotechnol* 162: 171-182.

Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ (2013) The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* 138: 105-115.

Liu MA (2011) DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev* 239: 62-84.

Mir LM, Belehradec M, Domenge C, Orłowski S, Poddevin B, et al. (1991) [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III* 313: 613-618.

Mir LM, Moller PH, Andre F, Gehl J (2005) Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv Genet* 54: 83-114.

Mir LM (2006) Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Ejc Supplements* 4: 38-44.

Rochard A, Scherman D, Bigey P (2011) Genetic immunization with plasmid DNA mediated by electrotransfer. *Hum Gene Ther* 22: 789-798.

Rodriguez F, Zhang J, Whitton JL (1997) DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction. *J Virol* 71: 8497-8503.

Rohrlich PS, Cardinaud S, Firat H, Lamari M, Briand P, et al. (2003) HLA-B*0702

transgenic, H-2KbDb double-knockout mice: phenotypical and functional characterization in response to influenza virus. *Int Immunol* 15: 765-772.

Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, et al. (2002) Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: Respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Molecular Therapy* 5: 133-140.

Satkauskas S, Andre F, Bureau MF, Scherman D, Miklavcic D, et al. (2005) Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of In Vivo DNA electrotransfer. *Human Gene Therapy* 16: 1194-1201.

Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.

Stevenson FK, Palucka K (2010) Understanding and activating immunity against human cancer. *Curr Opin Immunol* 22: 212-214.

Tang DC, DeVit M, Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.

Villemejeane J, Mir LM (2009) Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British Journal of Pharmacology* 157: 207-219.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29: 235-271.

Wang Q, Lei C, Wan H, Liu Q (2012) Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA Cell Biol* 31: 489-495.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, et al. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ предотвращения, подавления или уменьшения опухоли у субъекта *in vivo*, включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей опухолевый антиген и индуцирующей клеточный иммунный ответ, путем интрадермальной инъекции и электрической пермеабилзации клеток кожи с помощью единичного импульса электрического поля высокого напряжения в пределах от 1100 до 1400 В/см и длительностью от 10 до 1000 мкс;

последующего единичного импульса электрического поля низкого напряжения в пределах от 100 до 200 В/см и длительностью от 300 до 800 мс.

2. Способ по п.1, где единичный импульс низкого напряжения имеет напряженность электрического поля 180 В/см.

3. Способ по любому из пп.1 или 2, где единичный импульс высокого напряжения имеет напряженность электрического поля 1250 В/см.

4. Способ по любому из пп.1-3, где единичный импульс низкого напряжения имеет длительность от 350 до 600 мс.

5. Способ по п.4, где единичный импульс низкого напряжения имеет длительность 400 мс.

6. Способ по любому из пп.1-5, где единичный импульс высокого напряжения имеет длительность от 50 до 150 мкс.

7. Способ по п.6, где единичный импульс высокого напряжения имеет длительность 100 мкс.

8. Способ по любому из пп.1-7, где электроды, подлежащие использованию, представляют собой неинвазивные пластинчатые электроды.

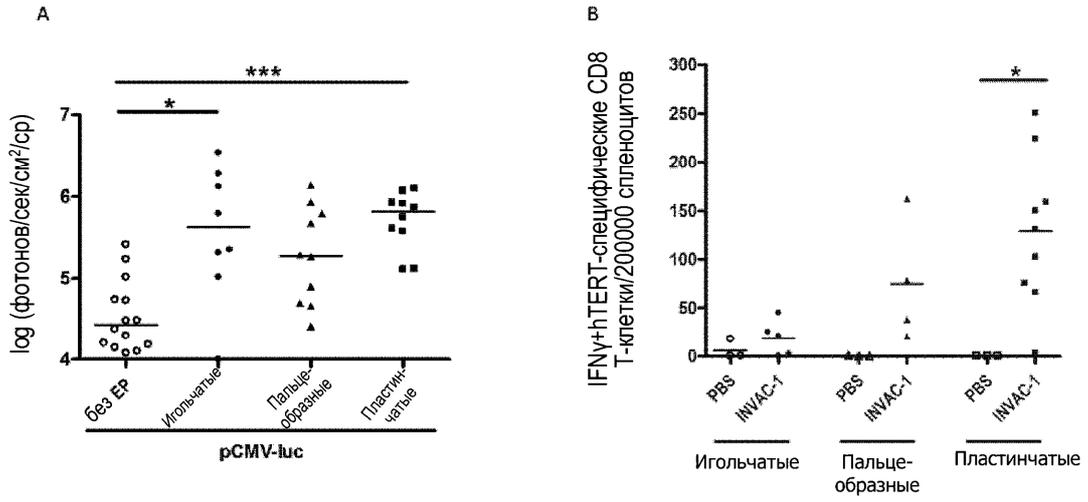
9. Способ по любому из пп.1-8, где импульс высокого напряжения и импульс низкого напряжения отделены друг от друга интервалом времени, составляющим от 300 до 3000 мс.

10. Способ по п.9, где интервал времени составляет от 500 до 1200 мс.

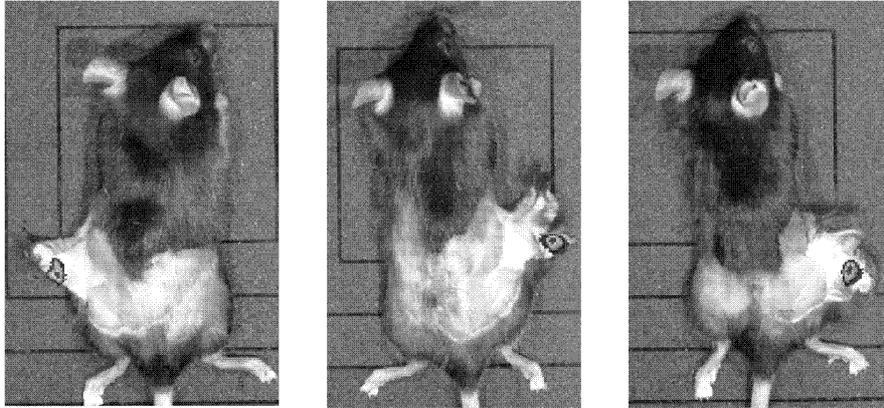
11. Способ по п.10, где интервал времени составляет 1000 мс.

12. Способ по любому из пп.1-11, где нуклеиновая кислота кодирует белок TERT.

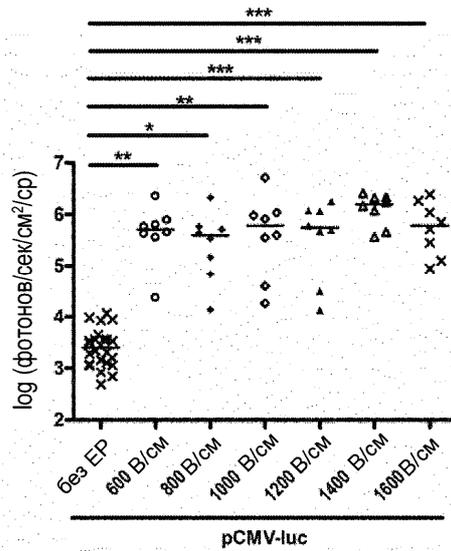
13. Способ противоопухолевой вакцинации или генной терапии субъекта *in vivo*, включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей опухолевый антиген и индуцирующей клеточный иммунный ответ, путем интрадермальной инъекции и электрической пермеабилзации клеток кожи с помощью единичного импульса электрического поля высокого напряжения в пределах от 1100 до 1400 В/см и длительностью от 10 до 1000 мкс;



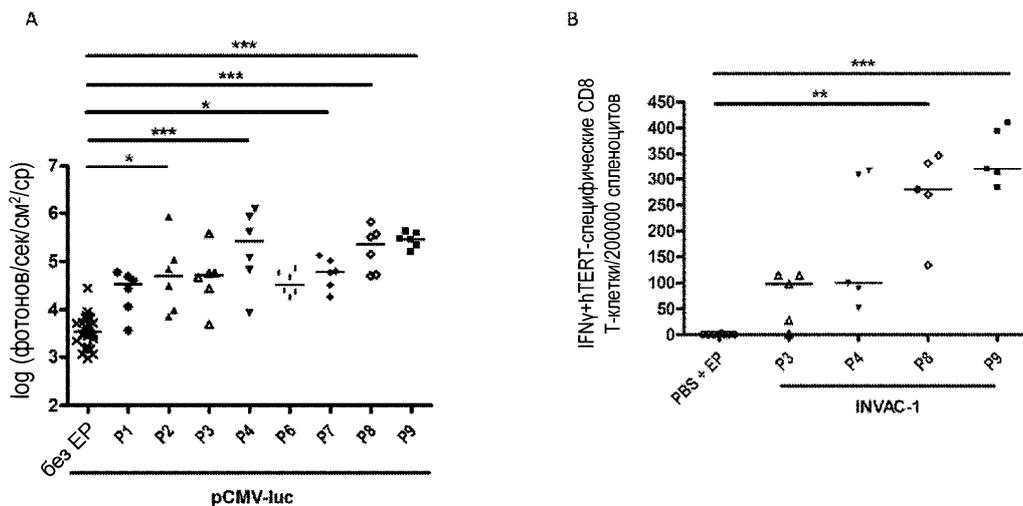
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

