



УДК 577.27;57.021

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕНОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ OX40L С ПРИМЕНЕНИЕМ НЕВИРУСНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ В ОБОГАЩЕННЫХ ФИБРОБЛАСТАМИ МЫШИНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЯХ

© 2025 г. В. В. Плешкан*, **, #, М. В. Зиновьева*, Д. А. Дидыч*, И. В. Алексеенко*, **

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** КК НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ “Курчатовский институт”,
Россия, 123182 Москва, пл. Ак. Курчатова, 2

Поступила в редакцию 07.04.2025 г.

После доработки 13.04.2025 г.

Принята к публикации 14.04.2025 г.

Злокачественные опухоли при развитии способны формировать перmissive микроокружение, влияющее на их дальнейший рост и развитие. Существенную роль в этом процессе играют опухоль-ассоциированные фибробласты. В настоящем исследовании мы использовали для создания подкожной мышечной опухоли инокуляцию совместной культуры раковых клеток и фибробластов для формирования опухолей, обогащенных клетками микроокружения. После формирования опухолевого узла проводили внутриопухолевое введение препарата, содержащего плазмиду с геном лиганда активирующих рецепторов иммунных контрольных точек OX40L под контролем промотора CMV. Для доставки в клетки плазмиду инкапсулировали в полимерную оболочку на основе ПЭГ-ПЭИ-ТАТ. Мы оценивали влияние комплекса плазмиды, кодирующей OX40L, в поликатионной оболочке на рост опухолей. В предлагаемой модели мы искусственно обеспечивали присутствие фибробластов в опухоли, которые в определенной степени могут выполнять функцию развитого микроокружения. Опухоли, обогащенные фибробластами, как правило, обладали повышенной скоростью пролиферации. Однако при внутриопухолевом введении невирусного препарата, кодирующего OX40L, в такие опухоли мы наблюдали значительное увеличение количества животных с полностью регрессирующими опухолями, достигающего 25%. Предполагается, что введенные фибробласты могут выполнять антиген-презентирующую роль и/или служить дополнительным источником сигналов для активации иммунной системы.

Ключевые слова: OX40L, генная терапия, опухоль, микроокружение, невирусная доставка

DOI: 10.31857/S0132342325050091

ВВЕДЕНИЕ

Опухоль представляет собой сложную систему, состоящую из взаимодействующих раковых клеток и клеток микроокружения опухоли (МО), которые играют ключевую роль в прогрессии опухоли, мета-

стазировании и вносят значительный вклад в развитие устойчивости опухоли к традиционным методам лечения [1–3]. Микроокружение опухоли представлено разнообразными клетками – опухоль-ассоциированными фибробластами (ОАФ), иммунными клетками, эндотелиальными и ме-

Сокращения: CT26gfp – раковые клетки CT26, окрашенные зеленым флуоресцентным белком; EGFP – зеленый флуоресцентный белок; OX40L/ППТ – комплекс плазмиды CMV-OX40L-pGL3 с блок-сополимером ПЭГ-ПЭИ-ТАТ; апОАФ – антигенпрезентирующие раковые фибробласты; МО – клетки микроокружения опухоли; НФ – нормальные фибробласты; НФК – нормальные фибробласты кожи; ОАФ – опухоль-ассоциированные фибробласты; ПЭГ-ПЭИ-ТАТ (ППТ) – полимерный носитель полиэтиленгликоль-полиэтиленмин-ТАТ-пептид.

Автор для связи: (эл. почта: vpleshkan@gmail.com).

зехимальными стволовыми клетками, а также неклочным компонентом. Исследования взаимодействий раковых клеток с МО для обеспечения иммуносупрессии, способствующей усилению опухолевого роста, привели к разработке современной революционной иммунотерапии рака, так называемой терапии иммунных контрольных точек, которая позволяет у ряда пациентов достигать полной или длительной ремиссии [4–6]. Эти достижения обосновывают новую парадигму терапии рака, ставящую во главу угла воздействие на опухоль и ее микроокружение, и определяют необходимость дальнейших исследований взаимодействий раковых клеток с клетками МО [7].

Одни из основных клеток МО, встречающихся в строме многих солидных опухолей, – это опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), представляющие собой клетки с фибробластоподобным фенотипом. ОАФ участвуют во множестве процессов, включая ангиогенез, подвижность опухолевых клеток, иммуногенные свойства опухоли, способствуют пролиферации и инвазии опухолевых клеток, формируя внеклеточный матрикс, стимулируя фиброз и повышая жесткость опухолевой ткани, что нарушает передачу сигналов пролиферации и дифференцировки [8–10].

Однако из-за их высокой гетерогенности и пластичности различия внутри популяций ОАФ значительны. Поэтому разница между ОАФ и нормальными фибробластами (НФ) в опухолевом микроокружении часто рассматривается как функциональная, а не основанная на конкретных биомаркерах [11, 12]. Так, ОАФ демонстрируют более высокие темпы роста и подвижность по сравнению с НФ, а также, создавая микроокружение, они обладают большей способностью к стимулированию развития злокачественности клеток, опухолевого роста и метастазирования [13, 14].

Активные ОАФ продуцируют α -актин гладкой мускулатуры (α -SMA), различные протеазы и фибронектин, а также могут защищать опухолевые клетки от терапии, обеспечивая разные уровни устойчивости к лечению [15]. Фибробласты могут экспрессировать молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II и совместно стимулирующие молекулы, такие как CD80 и CD86, что необходимо для эффективной активации Т-клеток [16]. Это позволяет им активно участвовать в иммунных реакциях, представляя про-

цессированные антигены Т-клеткам. Функция презентации антигенов фибробластами особенно выражена в условиях опухолей, где была выделена подгруппа фибробластов, известная как антигенпрезентирующие раковые фибробласты (апОАФ), которые играют важную роль в модуляции ответов Т-клеток в микроокружении опухоли [17, 18]. Несмотря на преобладание функций, связанных со стимуляцией прогрессии опухоли, ряд исследований указывает на то, что некоторые субпопуляции ОАФ обладают эффектом подавления роста опухолей [19–21].

ОАФ представляют собой перспективные мишени для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии, поскольку они обнаруживаются практически во всех типах опухолей [13, 22].

Для изучения взаимодействия ОАФ и раковых клеток в различных типах опухолей применяют мышинные модели, в которых раковые клетки вводят вместе с фибробластами [23]. Модели, использующие опухолевый материал человека для прививки иммунодефицитным мышам, стали центральной частью исследований в области биологии опухолей и традиционной терапии рака [24]. Например, подкожная совместная инъекция клеток рака молочной железы человека (например, MDA-MB-231 или MCF7) с нормальными фибробластами кожи (НФК) в иммунокомпрометированных мышах демонстрирует, что НФК способствуют росту опухоли, усиливают ангиогенез и увеличивают отложение коллагена [25]. Метод совместной инокуляции обычно включает смешивание раковых клеток с фибробластами и введение их мышам путем подкожной или внутрикожной инъекции. Наличие фибробластов значительно влияет на рост и прогрессию опухоли, поскольку фибробласты создают опухоль-перmissive МО, усиливая рост опухоли, в то время как опухоли, которые не привлекают фибробласты, развиваются медленнее. Сингенные модели, использующие инокуляцию клеточных линий рака в генетически идентичных мышах, способствуют изучению иммунных ответов и взаимодействий в МО [26].

Также такие модели важны для тестирования лекарств, особенно для терапий, нацеленных на опухолевую строму. Исследования таких ОАФ-ассоциированных белковых молекул, как ингибиторы активационного белка фибробластов (FAP) и TGF- β , способствуют механистическим исследо-

ваниям для понимания взаимодействий между фибробластами и раковыми клетками [27].

Целью работы было определить, как присутствие фибробластов влияет на лечение опухоли невирусным препаратом ОХ40L, продуцирующим лиганд активирующих рецепторов иммунных контрольных точек.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одно из отличий опухолей, которые развиваются в организме от искусственно инокулированных раковых клеток, – это хорошо развитое микроокружение, в основном представленное фибробластами. В данной работе мы использовали мышиную модель с увеличенным количеством фибробластов в инокулированной опухоли, для чего проводили совместную инокуляцию раковых клеток и фибробластов, полученных из кожи мыши.

Выбор условий совместного культивирования *in vivo* раковых клеток и фибробластов. В данном исследовании использовали нормальные фибробласты (НФК), выделенные из кожи мыши линии BALB/c в возрасте 4–5 недель. После первого пересева клеточные культуры представляли собой морфологически однородную популяцию фибробластов. Раковые клетки СТ26gfp, меченные зеленым флуоресцентным белком (EGFP), были использованы для визуализации опухолевых клеток в экспериментальных группах мышей.

Для определения уровня стромальных клеток в опухолях использовали антитела к одному из маркеров фибробластов Pdgfr β – CD140b (PDGFRB) – моноклональное антитело, клон APB5, конъюгированное с флуорофором PE (eBioscience). Pdgfr β – маркер нескольких типов клеток, составляющих микроокружение опухоли (стромы), которые играют важную роль в поддержании опухолевого роста, ангиогенеза и фиброза, в том числе фибробластов и опухоль-ассоциированных фибробластов [11, 28]. По наличию этого белка можно судить о содержании стромальных клеток в опухоли. Для создания опухоли, обогащенной по стромальному компоненту, нормальные фибробласты кожи мыши смешивали с раковыми клетками СТ26gfp в соотношениях 1 : 1 или 3 : 1, после чего клетки прививали подкожно мышам линии BALB/c. Для проведения эксперимента были сформированы

три группы мышей: 1) животным инокулировали только клетки СТ26gfp; 2) мышам инокулировали клетки СТ26gfp в сочетании с нормальными фибробластами (НФК) в соотношении 1 : 1; 3) мышам инокулировали клетки СТ26gfp с НФК в соотношении 1 : 3.

По достижении размера 60–100 мм³ опухоли собирали и диссоциировали с помощью фермента коллагеназы D в течение 1–2 ч при 37°C. Клетки окрашивали антителами к Pdgfr β -PE, полученную клеточную суспензию анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В канале FITC наблюдали окрашенные зеленым флуоресцентным белком (EGFP) раковые клетки СТ26gfp, в то время как клетки МО (преимущественно фибробласты) детектировали в канале PE. Фенотип клеток FITC/EGFP⁺ PE⁺ соответствовал клеткам опухолевой стромы.

Анализ показал, что в первой группе мышей, которым прививали только клетки СТ26gfp, и в группе, где прививали клетки СТ26gfp/НФК в соотношении 1 : 1, отличия были минимальны, т.е. в первых двух группах содержание Pdgfr β ⁺-клеток практически не отличалось и было незначительным, что указывает на отсутствие заметного влияния нормальных фибробластов на развитие стромы в этих условиях. При инокуляции клеток СТ26gfp/НФК в соотношении 1 : 3 в опухолях наблюдали увеличение доли клеток Pdgfr β ⁺EGFP⁺ на ~50% по отношению к первым двум группам.

Таким образом, только в группе мышей при инокуляции клеток с соотношением раковые клетки/фибробласты 1 : 3 наблюдалось значительное увеличение количества клеток Pdgfr β ⁺EGFP⁺ в образовавшихся опухолях. Полученные результаты указывают на то, что совместная инокуляция мышам раковых клеток и нормальных фибробластов кожи приводит к увеличению доли стромальных клеток при дальнейшем росте опухоли. Увеличение доли клеток Pdgfr β ⁺EGFP⁺ в опухоли при совместном введении раковых клеток и нормальных фибробластов в соотношении 1 : 3 подтверждает предположение о том, что добавление фибробластов может способствовать созданию мышинной опухолевой модели, обогащенной стромальным компонентом. При развитии опухоли с использованием такой модели фибробласты могут приобретать свойства опухоль-ассоцииро-

ванных фибробластов (ОАФ), прилежащих к раковым клеткам [29–31], либо обеспечивать усиленный сигналинг в МО. Это позволяет исследовать действие терапевтических препаратов в опухолях с увеличенным содержанием стромы.

Иммунотерапия ОХ40L в модели опухоли с обогащенной стромой. Влияние фибробластов на терапию ОХ40L. Оценку влияния фибробластов кожи мыши, совместно культивируемых *in vivo* с раковыми клетками СТ26gfr, на терапию опухоли проводили с использованием конструкции CMV-OX40L-pGL3 в комплексе с блок-сополимером ПЭГ-ПЭИ-ТАТ (ОХ40L/ППТ).

Эксперимент проводили следующим образом: мышам подкожно прививали раковые клетки линии СТ26gfr (карцинома толстой кишки мыши) или совместную культуру раковых клеток СТ26gfr и нормальных фибробластов кожи мыши в соотношении 1 : 3. Во всех случаях количество инокулированных клеток СТ26gfr составляло 10^5 .

По достижении опухоли размера ~20–60 мм³ животным вводили внутриопухолево конструкцию CMV-OX40L-pGL3 в комплексе с ПЭГ-ПЭИ-ТАТ трижды по следующей схеме: первое введение (день 0), второе введение через 48 ч и третье введение через 96 ч. В качестве контроля использовали введение в опухоль фосфатного буфера (PBS). Сравнивали следующие группы животных: мыши с привитой совместной культурой СТ26gfr/НФК (соотношение 1 : 3), которым вводили ОХ40L/ППТ (А) или PBS (контроль) (В); мыши с привитой монокультурой СТ26gfr, которым вводили ОХ40L/ППТ (Б) или PBS (контроль) (Г). На рис. 1 представлены индивидуальные графики скорости роста опухоли каждой мыши в различных группах.

Результаты экспериментов показали, что добавление НФК при инокуляции опухоли вызывает ее бурную пролиферацию. В наших экспериментах выявлено, что скорость роста совместной культуры СТ26gfr/НФК *in vivo* в ~1.5 раз выше, чем скорость роста опухоли, состоящей только из СТ26gfr. Такой быстрый рост опухоли в некоторых случаях приводит к слишком раннему выходу животного из эксперимента, что не позволяет достоверно оценить торможение роста опухоли (ТРО) в таких моделях – можно только констатировать дихотомический ответ опухолей СТ26gfr/НФК на терапию ОХ40L/ППТ – часть

опухолей отвечали на терапию, в то время как другие из-за высокой неконтролируемой скорости роста никак на нее не реагировали. В обычных мономоделях СТ26gfr скорость роста опухоли ниже, что позволяет осуществлять адекватный контроль развития опухоли при введении ОХ40L/ППТ с достижением ТРО не менее 51%.

Тем не менее в моделях опухолей СТ26gfr/НФК указанное выше дихотомическое действие ОХ40L/ППТ приводило к тому, что часть опухолей отвечала на терапию, причем ответ был более выраженный, чем в случае групп моно-СТ26gfr. В итоге в группе мышей, которым вводили опухолевые клетки совместно с фибробластами, при введении ОХ40L/ППТ достигается наибольшее количество полных ответов (животные, у которых полностью отсутствуют признаки наличия опухолевого образования в месте введения опухоли) – три против одного полного ответа в моногруппе.

Повторная инокуляция опухоли мышам с полным ответом. У трех мышей из группы, которым прививали совместные культуры клеток СТ26gfr/НФК и проводили лечение препаратом ОХ40L, наблюдали полную регрессию опухолей. Для этих трех мышей провели повторную инокуляцию клеток СТ26gfr, чтобы провести оценку стойкости возникшего иммунного ответа (tumor re-challenge).

С этой целью им по истечении 60 сут после регрессии опухоли были привиты подкожно клетки СТ26gfr (10^5 кл./мышь). При этом инокуляцию осуществляли на бок, противоположный тому, куда прививали клетки в начале эксперимента. Это было сделано во избежание ошибки эксперимента, связанного со вторичным развитием опухоли из дормантных раковых клеток, потенциально оставшихся после первого введения и полной регрессии. Одновременно те же клетки СТ26gfr и в том же количестве были привиты трем мышам, которые раньше не участвовали в экспериментах (т.е. опухоль прививали впервые – контрольная группа). Через неделю наблюдали развитие опухоли у контрольных мышей. У ранее выздоровевших мышей развития опухоли не наблюдали на протяжении всего эксперимента и 60 дней после него. Таким образом, мы обнаружили образование стойкого иммунного ответа к раковой линии СТ26gfr у мышей, ранее излеченных от опухолей.

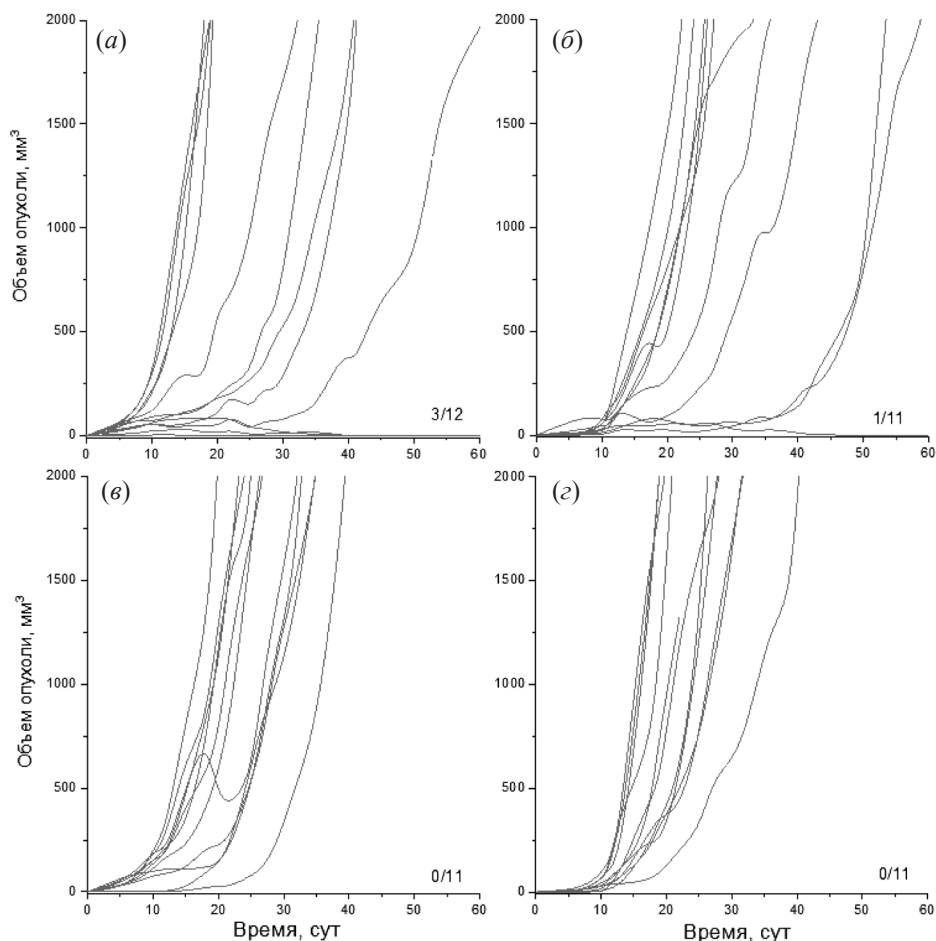


Рис. 1. Индивидуальные графики роста опухоли. (а, в) – Влияние внутриопухолевого введения мышам с привитой совместной культурой СТ26gfp/НФК; (а) – результаты введения конструкции ОХ40L/ППТ, (в) – контрольная группа, введение PBS; (б, г) – влияние внутриопухолевого введения мышам с привитой карциномой СТ26gfp; (б) – результаты введения конструкции ОХ40L/ППТ, (г) – контрольная группа, введение PBS. В нижнем правом углу каждого графика приведено количество животных с полным ответом относительно общего количества животных в группе эксперимента. По оси ординат указаны размеры опухоли в мм³, по оси абсцисс – сутки от момента инокуляции опухоли.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Клетки карциномы толстой кишки СТ26gfp, меченные зеленым флуоресцентным белком (EGFP), любезно предоставленные Е.О. Серебровской [32], культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) в присутствии 12.5%-ной эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед./мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мг/мл амфотерицина (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Клетки выращивали при 5% CO₂, 37°C и влажности 90% в клеточном инкубаторе. Клетки пересевали каждые 3–4 сут, в работе использовали клетки 3–4-го пассажей. Для подсчета количества клеток их открепляли с помощью трипсин-ЭДТА (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), окраши-

вали трипановым синим (Bio-Rad, США) и подсчитывали с помощью счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Invitrogen, США).

Конструкция. Плазмида CMV-OX40L-pGL3, кодирующая ген мыши ОХ40L под промотором CMV, ранее была получена в нашей лаборатории [33].

Полиплекс ППТ. Катионный сополимер ППТ был получен при использовании полиэтиленимина (ПЭИ) (кат. № 23966, Polysciences, Warrington, PA, США), полиэтиленгликоля (ПЭГ) (кат. № 10314, Quanta BioDesign, Powell, OH, США) и ТАТ-пептида (GRKKKRRQRC, синтезированного RusBiolink, Москва, Россия), как описано ранее [34]. Для экспериментов *in vivo* использовали соотношение N/P = 30, которое было определено

как оптимальное. Комплекс ДНК/ППТ готовили, как описано ранее [35], результирующий раствор содержал 12.5 мкМ ППТ, 80 нг/мл плазмидной ДНК.

Мыши. Мыши – самки линии BALB/c (4–5 и 6–8 недель) – были получены из питомника “Пушино” ФГБУН ФИБХ РАН и содержались в виварии ИБХ РАН (Москва, Россия). Корм и чистую воду животные получали без ограничения.

Получение мышинных фибробластов (НФК). В исследовании использовали нормальные фибробласты (НФК), выделенные из кожи мыши линии BALB/c. Для этого мышей возраста 4–5 недель эвтаназировали методом цервикальной дислокации, после чего собирали фрагменты кожи с боков мыши. Далее фрагменты кожи разрезали на мелкие кусочки ножницами (2–3 мм³), после чего диссоциировали с помощью фермента коллагеназы D (Collagenase D from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich, США) при концентрации 1 мг/мл в среде DMEM/F12 с 1%-ной фетальной телячьей сывороткой, в течение 1–2 ч при 37°C. Полученную клеточную суспензию ресуспендировали и культивировали в среде DMEM/F12, обогащенной 10%-ной фетальной телячьей сывороткой и антибиотиками (пенициллин и стрептомицин), до достижения 90%-ной конfluence, после чего клетки открепляли трипсином-ЭДТА для пересева. После первого пересева клеточные культуры представляли собой морфологически однородную популяцию фибробластов. Для дальнейших экспериментов получали и замораживали фибробласты кожи, культивированные в течение 2–3 пассажей.

Эксперименты *in vivo*. Для образования опухолей готовили суспензии клеток в фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащие 10⁶ клеток CT26gfr в 1 мл для получения моноопухолей CT26gfr или содержащие 10⁶ клеток CT26gfr и 3 × 10⁶ клеток фибробластов в 1 мл для получения опухолей, обогащенных фибробластами. Проводили подкожную инокуляцию на правую сторону (боковой) части тела мыши. Для инокуляции опухолей использовали самок возраста 6–8 недель, до 12 голов на одну экспериментальную группу. Суммарный объем вводимой суспензии клеток – 100 мкл (10⁵ клеток). Эффект воздействия препаратом ОХ-40L/ППТ оценивали по торможению скорости роста опухоли (ТРО) и полному ответу на

терапию. Объем опухоли определяли по следующей формуле:

$$\text{Объем опухоли} = \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times 0.52.$$

Сополимер ПЭГ-ПЭИ-ТАТ (ППТ) использовали для получения комплекса с плазмидной ДНК. Комплекс пДНК/ППТ, содержащий плазмиду CMV-ОХ40L-pGL3, вводили в опухоль в дозе 0.08 мкг ДНК/мм³. Внутриопухолевое введение начинали при достижении размеров опухоли 20–60 мм³ (день 0), мышам проводили внутриопухолевые инъекции комплекса ОХ40L/ППТ или PBS, объем введения составлял половину объема опухоли. Далее внутриопухолевое введение препарата повторяли еще дважды, во 2-й и 6-й дни после начала введения препарата.

Мышей выводили из эксперимента после достижения размера опухоли 2000 мм³ или при наличии одного из критериев, установленных в одобренном протоколе IACUC, гуманных критериев вывода животных из эксперимента (контрольные точки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В некоторых типах опухолей с развитым микроокружением опухоль-ассоциированные фибробласты выступают его основным компонентом и во многом отвечают за низкую эффективность терапии таких опухолей. С помощью генной терапии можно преобразовать ОАФ в локальный источник терапевтических молекул прямо внутри опухоли. Совместная инъекция фибробластов и раковых клеток в мышинных моделях – мощный подход для исследования МО и разработки новых терапевтических стратегий, нацеленных на стромальные компоненты. Эти модели важны для прояснения сложных взаимодействий между ОАФ и раковыми клетками для углубления нашего понимания биологии опухолей и формирования новых терапевтических стратегий. Нормальные фибробласты, находящиеся в непосредственной близости к ОАФ, становятся измененными и, по-видимому, выступают источником различных сигналов, которые в сочетании с активностью ОХ40L способствуют достижению полного терапевтического ответа. Ранее было показано, что опухоли, состоящие из раковых клеток и фибробластов, развиваются стабильно с сохранением интродуцированных в опухоль фибробластов [36]. При локальном введении может

происходить трансдукция всех клеток опухоли, в том числе фибробластов.

В данной работе мы продемонстрировали значение НФК при применении генотерапевтических препаратов, в частности ОХ40L/ППТ. Полный ответ на терапию в случае использования СТ26gfp/НФК был сильнее выражен. Было продемонстрировано, что комплекс ОХ40L/ППТ значительно влияет на возможность полной регрессии опухоли в группе СТ26gfp/НФК, способствуя выживаемости 25%, тогда как для моноопухоли доля таких животных составляет 9–10%. Возможно, данный эффект связан с экспрессией ОХ40L самими фибробластами или с индукцией иммунного ответа в связи с массовой гибелью нормальных фибробластов в опухоли. Это предположение требует дальнейшего тщательного исследования. По результатам повторной инокуляции клеток СТ26gfp (tumor re-challenge) можно говорить также об образовании у вылеченных животных стойкого иммунного ответа.

Таким образом, наша работа подтверждает данные о том, что фибробласты способствуют значительному ускорению роста опухоли, в том числе если это искусственно интродуцированные фибробласты. Предположительно это достигается за счет создания пермиссивного микроокружения и/или благодаря продуцированию факторов, способствующих развитию МО. Так, опухоли СТ26gfp/НФК прогрессировали значительно быстрее опухолей с моно-СТ26gfp. Часть опухолей с повышенным стромальным компонентом демонстрировала неконтролируемый опухолевый рост, при этом часть таких опухолей реагировала на терапию, причем в данной группе наблюдалась наибольшая доля полного ответа на лечение по сравнению с моноопухолями (25% против 9–10%). Мы полагаем, что гибель НФК может дополнительно активировать иммунную систему, выступая в роли молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями (DAMP), либо в качестве антигенпрезентирующих апОАФ, играя роль в модуляции ответов Т-клеток. При этом обязательное условие – наличие фактора ОХ40L, активирующего лиганда Т-клеток; опухоли СТ26gfp/НФК контрольной группы быстро пролиферировали, приводя к гибели животных. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение наблюдаемых эффектов в моделях с обогащенным стромальным компонентом

для распознавания механизмов влияния фибробластов на увеличение полного ответа на терапию для возможности использования полученных знаний в противоопухолевой терапии.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00476 (<https://rscf.ru/project/24-24-00476/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов. Информированное согласие не требовалось.

Эксперименты с животными проводили в соответствии с протоколом, одобренным комиссией ГНЦ ИБХ РАН (IACUC, Протокол № 286 от 23.10.2023). Все манипуляции с животными проводили согласно рекомендациям Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей Council of Europe (ETS 123).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ВВП, ИВА; экспериментальные работы – ВВП, МВЗ, ДАД, ИВА; написание статьи – ВВП, МВЗ; анализ данных – ВВП, ДАД, ИВА; администрирование проекта – ВВП, ИВА.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hinshaw D.C., Shevde L.A.* // *Cancer Res.* 2019. V. 79. P. 4557–4566.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>
2. *Neophytou C.M., Panagi M., Stylianopoulos T., Papageorgis P.* // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. P. 2053.
<https://doi.org/10.3390/cancers13092053>
3. *Wang Q., Shao X., Zhang Y., Zhu M., Wang F.X.C., Mu J., Li J., Yao H., Chen K.* // *Cancer Med.* 2023. V. 12. P. 11149–11165.
<https://doi.org/10.1002/cam4.5698>

4. Rabinovich G.A., Gabrilovich D., Sotomayor E.M. // *Annu. Rev. Immunol.* 2007. V. 25. P. 267–296.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>
5. Heinhuis K.M., Ros W., Kok M., Steeghs N., Beijnen J.H., Schellens J.H.M. // *Ann. Oncol.* 2019. V. 30. P. 219–235.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy551>
6. Sharma P., Goswami S., Raychaudhuri D., Siddiqui B.A., Singh P., Nagarajan A., Liu J., Subudhi S.K., Poon C., Gant K.L., Herbrich S.M., Anandhan S., Islam S., Amit M., Anandappa G., Allison J.P. // *Cell.* 2023. V. 186. P. 1652–1669.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.006>
7. Barrett R.L., Pure E. // *eLife.* 2020. V. 9. P. e57243.
<https://doi.org/10.7554/eLife.57243>
8. Ohlund D., Elyada E., Tuveson D. // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211. P. 1503–1523.
<https://doi.org/10.1084/jem.20140692>
9. Erdogan B., Webb D.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2017. V. 45. P. 229–236.
<https://doi.org/10.1042/BST20160387>
10. Saw P.E., Chen J., Song E. // *Trends Cancer.* 2022. V. 8. P. 527–555.
<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.03.001>
11. Nurmik M., Ullmann P., Rodriguez F., Haan S., Letellier E. // *Int. J. Cancer.* 2020. V. 146. P. 895–905.
<https://doi.org/10.1002/ijc.32193>
12. Kanzaki R., Pietras K. // *Cancer Sci.* 2020. V. 111. P. 2708–2717.
<https://doi.org/10.1111/cas.14537>
13. Плешкан В.В., Алексеенко И.В., Тюлькина Д.В., Кузьмич А.И., Зиновьева М.В., Свердлов Е.Д. // *Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.* 2016. Т. 34. С. 90–97.
14. Hu D., Zhuo W., Gong P., Ji F., Zhang X., Chen Y., Mao M., Ju S., Pan Y., Shen J. // *Heliyon.* 2023. V. 9. P. e19803.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19803>
15. Paunescu V., Bojin F.M., Tatu C.A., Gavriluc O.I., Rosca A., Gruia A.T., Tanasie G., Bunu C., Crisnic D., Gherghiceanu M., Tatu F.R., Tatu C.S., Vermesan S. // *J. Cell. Mol. Med.* 2011. V. 15. P. 635–646.
<https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01044.x>
16. Chen J., Chen R., Huang J. // *Front. Immunol.* 2024. V. 15. P. 1372432.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1372432>
17. Kerdidani D., Aerakis E., Verrou K.M., Angelidis I., Douka K., Maniou M.A., Stamoulis P., Goudevenou K., Prados A., Tzaferis C., Ntafis V., Vamvakaris I., Kaniaris E., Vachlas K., Sepsas E., Koutsopoulos A., Potaris K., Tsoumakidou M. // *J. Exp. Med.* 2022. V. 219. P. e20210815.
<https://doi.org/10.1084/jem.20210815>
18. Chen X., Chen F., Jia S., Lu Q., Zhao M. // *Theranostics.* 2025. V. 15. P. 3332–3344.
<https://doi.org/10.7150/thno.104900>
19. Bhattacharjee S., Hamberger F., Ravichandra A., Miller M., Nair A., Affo S., Filliol A., Chin L., Savage T.M., Yin D., Wirsik N.M., Mehal A., Arpaia N., Seki E., Mack M., Zhu D., Sims P.A., Kalluri R., Stanger B.Z., Olive K.P., Schmidt T., Wells R.G., Mederacke I., Schwabe R.F. // *J. Clin. Invest.* 2021. V. 131. P. e146987.
<https://doi.org/10.1172/JCI146987>
20. Zhang H., Yue X., Chen Z., Liu C., Wu W., Zhang N., Liu Z., Yang L., Jiang Q., Cheng Q., Luo P., Liu G. // *Mol. Cancer.* 2023. V. 22. P. 159.
<https://doi.org/10.1186/s12943-023-01860-5>
21. Remsing Rix L.L., Sumi N.J., Hu Q., Desai B., Bryant A.T., Li X., Welsh E.A., Fang B., Kinose F., Kuenzi B.M., Chen Y.A., Antonia S.J., Lovly C.M., Koomen J.M., Haura E.B., Marusyk A., Rix U. // *Sci. Signal.* 2022. V. 15. P. eabj5879.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.abj5879>
22. Peltier A., Seban R.D., Buvat I., Bidard F.C., Mehta-Grigoriou F. // *Semin. Cancer Biol.* 2022. V. 86. P. 262–272.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.04.008>
23. Jelinek D., Zhang E.R., Ambrus A., Haley E., Guinn E., Vo A., Le P., Kesaf A.E., Nguyen J., Guo L., Frederick D., Sun Z., Guo N., Sevier P., Bilotta E., Atai K., Voisin L., Collier H.A. // *J. Vis. Exp.* 2020. V. 166. P. e61883.
<https://doi.org/10.3791/61883>
24. Li Q.X., Feuer G., Ouyang X., An X. // *Pharmacol. Ther.* 2017. V. 173. P. 34–46.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.002>
25. Noel A., De Pauw-Gillet M.C., Purnell G., Nussgens B., Lapiere C.M., Foidart J.M. // *Br. J. Cancer.* 1993. V. 68. P. 909–915.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1993.453>
26. Carretta M., Thorseth M.L., Schina A., Agardy D.A., Johansen A.Z., Baker K.J., Khan S., Romer A.M.A., Fjaestad K.Y., Linder H., Kuczek D.E., Donia M., Grontved L., Madsen D.H. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1320614.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1320614>
27. Pleshkan V.V., Zinovyeva M.V., Antonova D.V., Alekseenko I.V. // *Biomedicines.* 2023. V. 11. P. 2017.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11072017>
28. Nishishita R., Morohashi S., Seino H., Wu Y., Yoshizawa T., Haga T., Saito K., Hakamada K., Fukuda S., Kijima H. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 15. P. 6195–6202.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8097>

29. Monteran L., Erez N. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1835.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>
30. Ando R., Sakai A., Iida T., Kataoka K., Mizutani Y., Enomoto A. // *Cancers.* 2022. V. 14. P. 3315.
<https://doi.org/10.3390/cancers14143315>
31. Niu N., Shen X., Wang Z., Chen Y., Weng Y., Yu F., Tang Y., Lu P., Liu M., Wang L., Sun Y., Yang M., Shen B., Jin J., Lu Z., Jiang K., Shi Y., Xue J. // *Cancer Cell.* 2024. V. 42. P. 869–884.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.03.005>
32. Serebrovskaya E.O., Yuzhakova D.V., Ryumina A.P., Druzhkova I.N., Sharonov G.V., Kotlobay A.A., Zagaynova E.V., Lukyanov S.A., Shirmanova M.V. // *Cytokine.* 2016. V. 84. P. 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.05.005>
33. Алексеенко И.В., Костина М.Б., Серебровская Е.О., Потапов В.К., Свердлов Е.Д. // *Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.* 2018. Т. 36. С. 14–18.
34. Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. P. 103–112.
<https://doi.org/10.1038/mt.2010.233>
35. Rakitina O.A., Kuzmich A.I., Bezborodova O.A., Kondratieva S.A., Pleshkan V.V., Zinovyeva M.V., Didych D.A., Sass A.V., Snezhkov E.V., Kostina M.B., Koksharov M.O., Alekseenko I.V. // *Front. Immunol.* 2024. V. 15. P. 1410564.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1410564>
36. Antonova D.V., Alekseenko I.V., Siniushina A.K., Kuzmich A.I., Pleshkan V.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 6098.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176098>

Improved Efficiency of OX40L-Based Gene Therapy Using a Non-Viral Delivery System in Fibroblast-Enriched Mouse Tumor Models

V. V. Pleshkan^{*, **}, #, M. V. Zinovyeva^{*}, D. A. Didych^{*}, and I. V. Alekseenko^{*, **}

[#]E-mail: vpleshkan@gmail.com

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} KC NBICS-nature-like technologies, NRC “Kurchatov Institute”,
pl. Ak. Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

Malignant tumors, during their progression, are capable of forming a permissive microenvironment that influences their further growth and development. Tumor-associated fibroblasts (TAFs) play a significant role in this process. In the present study, we generated subcutaneous murine tumors by inoculating a co-culture of cancer cells and fibroblasts to create tumors enriched with microenvironmental cells. Once the tumor nodule had formed, an intratumoral injection was performed using a formulation containing a plasmid encoding the ligand for immune checkpoint receptors –OX40L – under the control of a CMV promoter. For efficient cellular delivery, the plasmid was encapsulated in a polymer shell based on PEG-PEI-TAT. We evaluated the impact of this treatment on tumor growth. In this experimental model, fibroblasts were artificially introduced into the tumor to partially simulate a developed tumor microenvironment. These tumors demonstrated an increased proliferation rate. However, intratumoral administration of the non-viral OX40L-encoding agent into fibroblast-enriched tumors resulted in a notable increase in the rate of complete tumor regression, reaching up to 25%. It is hypothesized that introduced fibroblasts may perform antigen-presenting functions and/or serve as an additional source of signals that activate the immune system.

Keywords: OX40L, gene therapy, tumor, microenvironment, non-viral delivery