



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/00 (2021.02); G01N 33/53 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2020124057, 13.07.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.07.2020

Дата регистрации:
28.06.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.07.2020

(45) Опубликовано: 28.06.2021 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
"Алтайский государственный университет",
ЦРТПТУИС

(72) Автор(ы):

Подлесных Степан Васильевич (RU),
Шаповал Андрей Иванович (RU),
Шойхет Яков Нахманович (RU),
Лазарев Александр Федорович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2504785 C1, 20.01.2014. CHEANG
M.C. et al.: Defining breast cancer intrinsic
subtypes by quantitative receptor expression;
Oncologist, 2015, v. 20, p. 474-482. LACOMBE J.
et al.: Use of autoantibodies to detect the onset of
breast cancer; Journal of Immunology Research,
2014, v. 2014, p. 1-8. ТАМКОВИЧ С.Н. и др.
Современные методы диагностики (см.
прод.)

(54) Набор пептидов со способностью специфически связываться с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов для диагностики заболевания рак молочной железы

(57) Реферат:

Данное изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к набору пептидов, и может быть использовано в медицине. Входящие в состав набора пептиды способны специфически связываться с антителами в плазме крови пациентов с диагнозом «рак молочной железы» (РМЖ), обеспечивая при этом детекцию антител в плазме крови РМЖ-пациентов. По наличию повышенной или сниженной продукции антител к панели из 119 пептидов, представленных в данном изобретении, возможно отличать доноров

с диагнозом РМЖ от доноров без РМЖ. Настоящее изобретение может быть использовано в иммунологии и онкологии для диагностики/скрининга злокачественных опухолей молочной железы. Предлагаемое изобретение также может быть использовано в дополнение к методам диагностики рака молочной железы для улучшения чувствительности и специфичности, а в комбинации с другими аналитическими системами для повышения эффективности диагностики РМЖ. 4 ил., 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

рака молочной железы; Биомедицинская химия, 2014, т. 60, стр. 141-160. ШАПОВАЛ А.И. и др.

Иммуносигнатура - пептидные микроэrray для диагностики рака и других заболеваний; Российский

R U 2 7 5 0 4 6 3 C 1

R U 2 7 5 0 4 6 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/00 (2021.02); G01N 33/53 (2021.02)(21)(22) Application: **2020124057, 13.07.2020**(24) Effective date for property rights:
13.07.2020Registration date:
28.06.2021

Priority:

(22) Date of filing: **13.07.2020**(45) Date of publication: **28.06.2021** Bull. № 19

Mail address:

**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Podlesnykh Stepan Vasilevich (RU),
Shapoval Andrej Ivanovich (RU),
Shojkhet Yakov Nakhmanovich (RU),
Lazarev Aleksandr Fedorovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**(54) **SET OF PEPTIDES CAPABLE OF SPECIFICALLY BONDING WITH CIRCULATING ANTIBODIES OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS FOR DIAGNOSING BREAST CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to a set of peptides, and can be used in medicine. The peptides included in the set are able to specifically bind with antibodies in the blood plasma of patients diagnosed with breast cancer (BC) while ensuring detection of antibodies in the blood plasma of patients with BC. By the presence of increased or reduced production of antibodies to the panel of 119 peptides presented in the invention, donors

diagnosed with BC can be distinguished from donors without BC.

EFFECT: present invention can be used in immunology and oncology for diagnostics/screening of malignant breast tumours; the proposed invention can also be used in addition to methods for diagnostics of breast cancer for improving sensitivity and specificity, and in combination with other analytical systems for improving efficiency of diagnostics of BC.

1 cl, 4 dwg, 1 tbl, 1 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к группе пептидов со случайной аминокислотной последовательностью, с которыми специфически связываются циркулирующие антитела плазмы крови пациентов с диагнозом «рак молочной железы». Пептиды по изобретению представляют собой принципиально новую стратегию оценки репертуара циркулирующих антител, что позволяет определять наличие рака молочной железы. В частности, изобретение - набор (панель) из 119 пептидов, в любой комбинации, можно использовать при разработке тест-систем или средств для диагностики и скрининга, рака молочной железы на ранних стадиях.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В структуре причин заболеваемости и смертности населения стран мира, по данным ВОЗ за 2015-2019 г. онкологические заболевания за последние годы вышли на лидирующие позиции [1, 2]. Вновь диагностированные случаи рака увеличились с 14,1 млн в 2012 году до 18,1 млн в 2018 году, а смертность от рака - с 8,2 млн в 2012 году до 9,6 млн в 2018 году [2, 3]. Наиболее часто выявляемые онкологические заболевания это - рак легких, молочной железы, предстательной железы и колоректальный рак. По статистике 2018 г. в России зарегистрировано 624709 случаев злокачественных новообразований, из них числе 285949 у пациентов мужского пола и 338760 женского пола. Установлено, что прирост этого показателя в сравнении с 2017 г. составил 1,2% [4]. Средний показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями на 100000 населения России равен 425,4 случаев, что на 1,2% выше уровня 2017 г. (на 23,1% выше уровня 2008 г.). Основной объем больных формируется из пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы (18,4%). Таким образом, в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения России ведущей онкологической патологией остается рак молочной железы (РМЖ) [4, 5]. Около 60% случаев РМЖ диагностируется на ранних стадиях, но приблизительно 20% диагнозов являются ложноотрицательными [6]. Пятилетняя выживаемость у пациентов с I стадией РМЖ составляет 93% и только 7% у пациентов с IV стадией [7]. Таким образом, в настоящее время наиболее актуальной является диагностика онкологических заболеваний на ранних стадиях т.е. до манифестации клинических симптомов болезни [8-11]. Анализ показателей активной диагностики злокачественных новообразований свидетельствует, что в ряде регионов почти отсутствует система профилактических и скрининговых обследований всех категорий населения [12]. Развитие ранней диагностики онкологических заболеваний, имеет большое значение при подборе эффективной терапевтической стратегии, для снижения инвалидности и смертности населения.

Бессимптомное развитие онкологических заболеваний может происходить в течение нескольких лет. Современные методы (способы) клинической диагностики онкологических заболеваний, направлены, в большей мере, на определение циркулирующих белковых маркеров, которые в сыворотке крови практически невозможно выявить. Сегодня общепризнанными биомаркерами в клинической диагностике РМЖ являются - РЭА (CEA/CD66e), СА 15.3 (Mucin-1), p53, ER, PR, HER2, Ki 67, VEGF, ТПА, СА 27.29, СА 125 [9, 13-19]. Однако, эти маркеры, можно обнаружить только, при сформировавшейся опухоли (до 2,5 см), доступной для биопсии или способной к продукции высоких концентраций белков [9, 13]. К тому же некоторые из этих биомаркеров, не обеспечивают достаточной чувствительности и специфичности диагностических методов, что приводит к некоторой доле ложноположительных и ложноотрицательных диагнозов [8, 15, 20]. Другие циркулирующие маркеры, которые

представлены: циркулирующими онкологическими клетками (ЦОК), ДНК, РНК, экзосомы, нуклеосомы имеют потенциал применения в диагностике РМЖ [21-23]. Однако все эти маркеры, используются либо как единичные, либо как набор из ограниченного (малого) количества маркеров, что отражается на чувствительности и специфичности. Технологии обнаружения злокачественных новообразований, на основе этих маркеров, имеют некоторые недостатки, касающиеся чувствительности и специфичности, ограничения в определении ранних стадий заболевания, себестоимости, быстрая деградация маркера, сложности пробоподготовки и большого объема биологического материала.

По данным полученным в последнее десятилетие, в онкоиммунологии, стало известно, что особое значение в противоопухолевой защите имеет иммунный ответ, а ранние стадии онкогенеза сопровождаются продукцией антител, против антигенов, ассоциированных с опухолями ОАА (или ТАА - tumor associated antigens) [10, 24-27]. Антитела, в отличие от существующих биомаркеров рака, более стабильны и специфичны, при этом характеризуются ранней продукцией в ответ на малое количество антигена. Таким образом, в качестве альтернативы существующим биомаркерам, было предложено использовать антитела (АТ) против ТАА [10, 24, 28, 29].

Большинство исследований, посвященных разработке диагностических средств на основе антител против ОАА (ТАА), направлены на оценку взаимодействия циркулирующих антител с 6 или менее антигенов, ассоциированных с опухолями. По причинам, ограниченного иммунного ответа на любой конкретный эпитоп у онкологических пациентов и гетерогенности опухолей, требуются стратегии и способы, которые позволяют определить антитела против множества (массива) антигенных эпитопов. Однако, пока, трудно выделить отдельные белки/антигены для исследования изменений в наборе циркулирующих антител у онкологических больных. Использование большого количества эпитопов, в виде коротких пептидов, позволяет более адекватно проанализировать изменения репертуара циркулирующих антител, которые сопровождают развитие опухоли на ранних стадиях.

Набор коротких пептидов (со случайной последовательностью аминокислот) по данному изобретению, полученные на пептидных микрочипах, демонстрируют возможность определения взаимодействия циркулирующих антител с огромным количеством потенциальных эпитопов и представляют диагностическую ценность.

СУЩЕСТВУЮЩИЕ АНАЛОГИ

В ходе информационно-патентного поиска был выявлен патент RU 2504785 (от 20.01.2014), который является близким по смыслу, но технически не прямым аналогом настоящего изобретения. Документ RU 2504785 (от 20.01.2014), содержит описание способа диагностики рака молочной железы, где в качестве эпитопов с которыми взаимодействуют антитела плазмы крови пациентов используются гликаны - полисахариды или олигосахариды. Технология имеет ряд достоинств, однако одним из недостатков этого способа является применение малой панели гликанов (эпитопов). Важно отметить, что применение природных и часто встречающихся гликанов, несколько ограничивают полноту получаемой информации о раннем развитии заболевания и потенциальных внутриозологических подтипах рака молочной железы, а также других особенностях.

Данное изобретение, может быть альтернативным или дополняющим инструментом, поскольку использует множества молекул пептидов (со случайной аминокислотной последовательностью) в качестве частичного или полного подобия эпитопов (мимотопов) антигенов при онкогенезе, для оценки взаимодействия с максимальным

разнообразием антител для характеристики заболевания, в частности - рак молочной железы [10, 30]. Настоящее изобретение направлено, на разработку метода, для диагностики злокачественных новообразований молочной железы, в основе которого лежит оценка антител плазмы крови, с помощью панели состоящей из 119 пептидов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Существующие онкомаркеры РМЖ позволяют выявить уже сформировавшиеся опухоли, доступные для биопсии или способные к продукции высоких концентраций белков (Семиглазов, 2011; Тамкович, 2014) [9, 13]. Антитела, в сравнении с онкомаркерами РМЖ, более стабильны и специфичны, при этом характеризуются ранней продукцией в ответ на малое количество антигена [24, 30, 31]. Таким образом, в качестве альтернативы существующим маркерам рака, можно использовать антитела (АТ) против ОАА. Однако, пока, трудно выделить отдельные белки/антигены для исследования изменений в наборе циркулирующих антител у онкологических больных, при этом использование большого количества эпитопов, в виде коротких пептидов, позволяет более адекватно проанализировать изменения репертуара циркулирующих антител, которые сопровождают развитие опухоли на ранних стадиях.

Задача настоящего изобретения - разработка метода диагностики злокачественных новообразований молочной железы на ранних стадиях. В его основе лежит оценка циркулирующих антител плазмы крови, которые сопровождают развитие опухоли на ранних стадиях, с помощью, предлагаемой в настоящем изобретении, комбинации молекул из большого набора 119 пептидов по изобретению, выбранных из 330034 пептидов со случайной аминокислотной последовательностью, представленных на микрочипах.

Ключевым техническим результатом, данного изобретения, является набор 119 пептидов для специфического и чувствительного определения репертуара циркулирующих антител, на ранних стадиях, присутствующих в плазме и сыворотки крови, индивидуумов со злокачественными новообразованиями молочной железы.

Данное изобретение представляет собой набор пептидов со способностью специфически связываться с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов с диагнозом «рак молочной железы», представляющий комбинацию из 119 пептидов аминокислотного состава

ADSGVYVEGSG, QEGLKPRSQFEGSG, EGYLGDDGSG,
 VGGYEVGSG, EGLKRQFEGSG, EPPGRYSG, LEGVKSG, KEHNRPWHEGSG,
 KNKRRLFEFEGSG, HDALLEFEYSG, NGVGVPGSG, NLPRGDKWGS,
 5 ALPVFKWGS, QELNRGNEGSG, GRPVGDYSG, KHDAEVLDFFYSG,
 NGPGVYERGS, EGLNRPSGGSG, GDNWGYQGS, LNGDGS, GASEVQDFKGS,
 NLKQLGS, QARKWQEWEGSG, NLVPGEWGLGNKGS, QALPRFVPDGS,
 10 EEQYEFFSGSG, ASDYFEYSG, NLSGQERWGS, HADVGLWRQRGS, ANRVDGGSG,
 EAPYGEVWKGSG, ALPVGQFFKEGSG, QRPRGVEEEDKGSG, EGRVKEYQRGS,
 HHHGSG, GVGELDRKGS, GHKRDYSG, QYLNRWDGGSG, QGDRSSWYYHYSG,
 EADLYFGSG, GPSLWGS, NGDYSG, GPSGEYLGGSG, ASNRRGYKDGSG,
 15 QGLVEYVGS, NKQEALLNHSWYEGSG, ALPGWVYEPSGS, QAPSGGRWGS,
 EADSLPRYQGS, EGLKYSG, EYGVKGS, AARLGEGKGS, EGRKVGS,
 YKPQDNDGS, AGDGFGSG, DRSRPDGPGS, NEDALEFVDGS, EAVVGYGS,
 QYRNRHVEYEDGS, QYSPEVD RDGS, EEGVKGS, KGNRDERYVGS,
 20 SVGGDRKWGS, QHLPQEGNQGS, KERNHGS, QYKGYQDEGEYSG, PEEFYSG,
 EGLKHRSQGS, EDPVRPYQFGSG, ALLQEVYSG, EGNKRLDYGS,
 YAAWVYQGF EWGS, EGNKVFGSG, ANHGEVKLGSG, NASHEWGPGSG,
 SVEGFRLDGS, NVYQEPHGS, LPRWGS, QALHEGS, NEGRKRHEDEVVGS,
 25 KQEPQLDFKGS, NKDANSVGGSG, EALKHWGS, LRPGEWYQVGS,
 QEALNHEYKDENQGS, GLPVPGLNQVYGS, GVRGGGYEGSG, NEALSVEYRLGS,
 KEGYALSGGFVGS, QALKWGEGS, SLKVPELHGS, KGHYRHGKEKGS,
 NKHLSPSVYPYGS, QAASHGWEGSG, QALLDYFPDGS, NRPGQPDGS,
 30 NYNVDPDYEDGS, NRPGWHGS, EGYLRVWELGS, LPLKEFDLGS,
 EGHRVLKGGSG, EDSGYERRGS, KEDARVYEGSG, SHPPRQGS,
 EHLNPSGKFWGS, NALGYQPGSG, NQEYAAYS, QEGAHRKDYLDGS,
 35 QALLEVGS, ASGWRFRGS, NSGEYYS, NKQSHHGKEWDGS,
 QEKRPWVG DQDGS, EDLLRQDYEGSG, QALPGFFHGS, GKVSLQWLGS,
 NDLLRQEGSG, NRVRVDGS, ELKPEWYEGSG.

Данный набор позволяет отличать образцы плазмы крови пациентов с диагнозом
 40 РМЖ, от доноров без РМЖ.

Таким образом, из набора в любой комбинации из 119 пептидов указанного
 аминокислотного состава, могут быть изготовлены для применения в исследованиях,
 скрининге или диагностике РМЖ.

В одном из аспектов этого изобретения, пример 1, предложен способ, который
 45 включает инкубацию антител плазмы крови с синтетическими пептидами (по
 изобретению) и детектирование образующихся комплексов, причем указанный способ
 включает протокол использования для этого пептидного микрочипа.

В другом из аспектов этого изобретения, пример 1, предложен способ выявления
 пептидов, с которыми специфически связываются антитела плазмы крови пациентов

при диагнозе «рак молочной железы» и здоровых доноров, описанных в этом документе, причем указанный способ включает протокол использования пептидного микрочипа и методы определения последовательности пептида.

В следующем из аспектов этого изобретения, пример 1, предложен подход в оценки профиля выявленных пептидов для группы пациентов с диагнозом «рак молочной железы» и группы здоровых доноров в сравнении.

В другом из аспектов этого изобретения, пример 1, предложен способ получения и синтеза коротких пептидов со случайной аминокислотной последовательностью, описанный в этом документе.

В следующем из аспектов этого изобретения, пример 1, предложены наборы информативных пептидов, которые позволяют отличать пациентов с диагнозом «рак молочной железы» от здоровых доноров.

В другом из аспектов этого изобретения, пример 1, предложено применение набора из 119 пептидов, в любой комбинации, в качестве диагностической панели при разработке тест-систем для диагностики рака молочной железы.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1 Показывает распределение интенсивности свечения пептидов (Volcano plot). Левый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми выше с плазмой пациентов РМЖ. Правый массив содержит пептиды, с которыми плазма крови больных РМЖ имеет более сильное взаимодействие, а также другой набор пептидов, взаимодействие с которыми снижено у пациентов с РМЖ. Точки выше пунктирной линии представляют пептиды, разница в интенсивности свечения которых в группах больных РМЖ и здоровых доноров статистически значима ($p < 0,001$)

Фиг. 2 Представляет кластерный анализ и тепловая карта (Heatmap) плазмы крови больных РМЖ и здоровых доноров. Индивидуальные пептиды (119) представлены в горизонтальных рядах, образцы плазмы крови от больных (41) и здоровых (40) представлены в вертикальных колонках. Серые сигналы (точки) показывают высокое взаимодействие антител с определенным пептидом, черные показывают низкое взаимодействие. Кластеризация пептидов представлена на левой стороне рисунка. Кластеризация образцов плазмы представлена в верхней части рисунка. Порядковые номера образцов обозначены (под диаграммой).

Фиг. 3 Отражает результаты классификации образцов плазмы крови пациентов РМЖ и здоровых доноров методом главных компонент (МГК) после отбора 119 информативных пептидов, с использованием t-критерия. Пациенты с диагнозом РМЖ - черный цвет; группа контроля серый цвет. Уровень достоверности данных анализа при 0,95.

Фиг. 4 Демонстрирует результаты ROC-анализа эффективности классификаторов ССР - Compound Covariate Predictor; DLDA - Diagonal Linear Discriminant Analysis; ВССР - Bayesian Compound Covariate Predictor для анализа данных по раку молочной железы, основанной на использовании иммуносигнатуры из 119 пептидов. Рядом с кривой приведена величина порогового значения с соответствующими показателями специфичности и чувствительности, а также величина AUC с доверительными интервалами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терминология

Для пояснения - «пептид», в данном документе, относится к полимеру, образованному α -аминокислотами, связанными по определенному порядку благодаря пептидной связи. Аминокислоты в пептиде по изобретению, в зависимости от положения аминокислотной группы

при α -атоме углерода, принадлежат к L-ряду. Аминокислоты, представленные на микрочипах, представляют собой природные аминокислоты в том числе редкие аминокислоты.

Природные аминокислоты включают алифатические аминокислоты (глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин), гидроксильированные аминокислоты (серин и треонин), сульфитированные аминокислоты (цистеин и метионин), дикарбоксильные аминокислоты и их амиды (аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота и глутамин), аминокислоты, содержащие две основных группы (лизин, аргинин и гистидин), ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) и циклические аминокислоты (пролин).

Термин «Специфичность» в тексте описания данного изобретения отражает способность избирательно связывать «родственный» антиген (мимотоп), которыми являются пептиды из набора 119 шт.

Применение пептидов данного изобретения

Предлагаемое изобретение, может быть использовано в дополнение к методам клинической диагностики рака молочной железы для улучшения чувствительности и специфичности. Набор пептидов по изобретению может быть применена в формате самостоятельной тест-системы, а также в комбинации с другими аналитическими системами для повышения эффективности диагностики РМЖ.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Оценка репертуара циркулирующих антител в плазме пациентов с диагнозом РМЖ на пептидных микрочипах.

Получения пептидов по изобретению

Пептиды синтезированы на подложке микрочипа методом фотолитографии [10, 30]. Структурный синтез пептидов с использованием масок проводили на 200-миллиметровых кремниевых пластинах с термическим оксидным покрытием, начиная с монослоя аminosилан-глицина и строительных пептидов посредством циклов образования структурированных кислот в фоторезисторе, удаляющем группы Вос из N-конца амины возникающих пептидов и связывание следующей аминокислоты. Нарезаются прямоугольными пластинами под микроувеличением размер (75×25 мм), каждая из которых содержит 24 массива с размерами 300 и 30000, 8 мкм.

Фотолитографический метод синтеза пептидов [10, 30]. Первая аминокислота (А) ковалентно присоединена к подложке микрочипа; шаг 1 - чип облучают светом определенной длины волны через шаблон (или маску), в результате чего светочувствительная защита снимается в определенных точках на чипе; шаг 2 - раствор, содержащий аминокислоту (Е) добавляют на чип; шаг 3 - аминокислоты присоединяются только в точках с удаленной защитной; шаги 4-10 иллюстрируют использование различных шаблонов, которые открывают другие позиции на чипе для присоединения следующей аминокислоты. После того когда все предполагаемые аминокислоты первого слоя связались, цикл повторяется. Всего требуется до 20 циклов (в зависимости от количества аминокислот, используемых для синтеза) с применением соответствующих шаблонов для снятия светочувствительной защиты с последующим добавлением одной из 20 аминокислот [10]. Все циклы повторяются до тех пор все пептиды не достигли желаемой длины и аминокислотной последовательности. Аминокислотная последовательность и место расположение каждого пептида на микроэррей известно [30].

Начальная идентификация пептидов по изобретению

Для начальной идентификации пептидов по изобретению, использовали способ

поиска, основанный на технологии «пептидные микрочипы». Этот способ позволяет идентифицировать пептиды, с которыми с высокой специфичностью связываются циркулирующие антитела плазмы крови пациентов и доноров

Микрочип - представляет собой кремниевую пластину (25×75×1 мм), которая содержит 24 идентичных микроэррей, каждый по 330034 пептидов со "случайными" аминокислотными последовательностями. Пептиды синтезированы на подложке микрочипа методом фотолитографии.

Аминокислотная последовательность и месторасположение каждого пептида на микроэррей известно. Таким образом, каждый микроэррей имеет площадь 0,5 см², размер точки каждого пептида около 8 мкм в диаметре, расстояние между соседними пептидами приблизительно 1 нм.

Для экспериментальной работы проводили предварительную подготовку микрочипов. Каждый микрочип на 60 мин отдельно помещали в чашку Петри с дистиллированной водой, затем в фосфатно-солевой буфер (ФСБ, «Биолот») на 30 мин, инкубировали при малой скорости орбитального шейкера Biosan OS 20 («Biosan»). После этого микрочипы фиксировали в штативе кюветы EasyDip и промывали полосканием в трех свежих растворах ФСБТ (ФСБ+0,25% Твин 20, «Helicon») и дистиллированной воде.

После предварительной подготовки высушенные центрифугированием в течение 5 мин при 800 об/мин микрочипы помещали в гибридизационную кассету («Arrait Sorporation») с силиконовыми прокладками, обеспечивающими разделение всех 24 микроэрреев на микрочипе. В каждую лунку кассеты, соответствующей микроэррею микрочипа, добавляли по 150 мкл инкубационного раствора, содержащего ФСБТ и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Amresco»). Поверхность кассеты покрывали пленкой, инкубировали микрочипы в течение 18 ч при 4°C.

Предварительно удалив содержимое лунок кассеты, вносили 75 мкл инкубационного раствора. Образцы исследуемой плазмы крови разводили (1:250) в инкубационном растворе и добавляли в лунки гибридизационной кассеты в объеме 75 мкл, поверхность кассеты покрывали пленкой и накрывали крышкой, инкубировали в течение 60 мин (22-24°C) на орбитальном шейкере при 250 об/мин. После инкубации с помощью промывателя микропланшетов BioTek ELx50 («BioTek Instruments») микрочипы промывали тремя повторами свежего ФСБТ и промывочным раствором (ФСБТ+1% БСА).

Разборку кассет и извлечение микрочипов проводили в контейнере с дистиллированной водой, не допуская высушивания. Микрочипы помещали в четырехлуночные планшеты, наполненные раствором «вторичных» антител против IgG человека (5 мл/лунку) с флюоресцентной меткой Alexa Flour 647 («Life Technologies») 75 пг/мл в инкубационном растворе.

Планшеты с микрочипами в растворе «вторичных» антител накрывали не пропускающей свет крышкой, инкубировали при температуре 22-24°C в течение 60 мин на малой скорости орбитального шейкера. После этого микрочипы, фиксированные в кюветах EasyDip, промывали полосканием в трех свежих растворах ФСБТ, дистиллированной воде и в течение 5 мин высушивали центрифугированием (800 об/мин).

Высушенные микрочипы сканировали с использованием двухлазерного сканера высокого разрешения «InnoScan 900 AL» («Innopsys») при длине волн 632 и 535 нм. Положение, размер и интенсивность флюоресценции для каждого пептида оценивались с помощью программного обеспечения Marix (v. 7.3.1). Оцифрованные результаты использовали в математической и статистической обработке.

Процесс оцифровывания

Получение цифровых данных с пептидного микрочипа, производилась, с помощью ПО Marix (v. 7.3.1), учитывались уровни флуоресценции всех комплексов «пептид-белок» на микрочипе. Данные из сканируемого массива 330034 пептидов, были переведены в 16-битные изображения TIFF. Для анализа флуоресценции и определения аминокислотной последовательности пептидов для каждой сканированной микроматрицы (изображения) был установлен GAL-файл (сетка). В ходе анализа, из массива данных получаемых в результате сканирования и оцифровывания 1-го микроэррей (микроматрицы) пептидного микрочипа, были определены пептиды, для которых был отмечен максимальный уровень флуоресценции. Такие пептиды считались взаимодействующими с антителами плазмы крови пациентов. Оцифрованные результаты были перенесены в Excel, их использовали в математической, статистической обработке с последующим биоинформатическим анализом.

Математический анализ и статистическая обработка

Анализ полученных данных проводили с помощью алгоритмов анализа программного обеспечения BRB-Array Tools v4.4.0 (<https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>). Каждый оцифрованный микроэррей анализировали с использованием фильтров интенсивности флуоресценции. Нормализацию полученных данных интенсивности флуоресценции проводили с помощью алгоритма квантильной нормализации [32-33]. Дополнительно применяли алгоритм качества. Уровни интенсивности по каждому образцу логарифмировали с последующим усреднением для сравнения классов.

Пептиды, разница взаимодействия с которыми в двух группах плазмы крови пациентов статистически значима, были выбраны с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок с последующим иерархическим кластерным анализом [24, 33-35]. Для построения дендрограмм применен метод Уорда (Ward's method) с использованием квадрата евклидова расстояния в качестве меры сходства объектов. Для анализа пептидов использованы классификаторы «Compound Covariate Predictor», «Diagonal Linear Discriminant Analysis», «Bayesian Compound Covariate», классификатор «k-Nearest Neighbors» с евклидовой метрикой и алгоритм перекрестной проверки с исключением (leave-one-out cross validation). Различия считали статически значимыми если $p < 0,001$. Был проведен анализ предсказательных способностей классификаторов - ROC-кривая, и была рассчитана площадь под кривой (AUC).

Все полученные в ходе анализа результаты были представлены графически - в формате гистограмм, тепловых карт, графиков и др.

Оценка репертуара антител у пациентов и доноров.

Группы представлены - 41 здоровый донор и 40 пациентов до начала терапии, с подтвержденным диагнозом рак молочной железы. В группе с диагнозом РМЖ, у 40% пациентов выявлена - I стадия заболевания, у 60% - II стадия. Все пациенты были без метастатического поражения лимфатических узлов и отдаленных метастазов. Средний возраст группы пациентов и контрольной группы были близкими по значению. Образцы плазмы крови получали от пациентов до начала терапии. Исследование одобрено этическим комитетом, все участники исследования (пациенты и доноры) выразили добровольное согласие.

Забор капиллярной крови из пальца производили в конические пробирки типа Микровет («Фирма Синтакон»), содержащих K_3 ЭДТА. Пробирки с образцами центрифугировали с частотой вращения 1500 об/мин при 4°C в течение 10 мин. Образцы полученной плазмы замораживали для хранения при -20°C и использовали для исследования.

Оценка репертуара антител проведена с помощью микрочипов нового поколения, которые содержат 330034 пептидов, состоящие из случайной аминокислотной последовательности.

5 Сканированные изображения микрочипов оцифровывались, и оценивалась интенсивность флюоресценции каждого пептида. Интенсивность флюоресценции соответствует количеству циркулирующих антител, взаимодействующих с отдельными пептидами. Медианные уровни интенсивности флюоресценции каждого из анализируемых микрочипов имели некоторые отличия. Для выравнивания медианы всех микрочипов, нами применен алгоритм квантильной нормализации, позволяющий
10 сглаживать различия между микрочипами.

Распределение нормализованных интенсивностей флюоресценции пептидов, взаимодействующих с антителами плазмы пациентов РМЖ и здоровых доноров, показано на фиг. 2. С помощью статистического анализа данных выявлены пептиды, которые по-разному взаимодействуют с АТ плазмы крови контрольной группы и РМЖ-
15 пациентов. На фиг. 2 отмечены синтетические пептиды, с которыми плазма крови больных РМЖ имеет более сильное взаимодействие, а также другой набор пептидов, взаимодействие с которыми снижено у пациентов с РМЖ.

В результате оценки циркулирующих антител у здоровых доноров и больных РМЖ с помощью пептидных микрочипов (общее количество 330034 пептидов) нами выявлено
20 119 пептидов, связывание с которыми с антител (IgG) плазмы показало статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,001$).

Иерархический кластерный анализ образцов плазмы крови, с использованием выявленных 119 пептидов представлен на фиг. 3. График демонстрирует четкое
25 разделение двух групп на кластеры в зависимости от наличия или отсутствия диагноза рак молочной железы. При внимательном рассмотрении тепловой карты (heatmap) можно заметить внутригрупповые кластеры среди больных с диагнозом РМЖ (фиг. 3). Это может свидетельствовать об иммунном ответе, связанном с определенной молекулярной гетерогенностью опухолей.

Такая специфическая реакция взаимодействия циркулирующих антител с пептидами
30 внутри одной группы, возможно, характеризует молекулярные подтипы этого заболевания, однако это требует дополнительного изучения. Интересно отметить, что 2 из 40 больных с диагнозом РМЖ были отнесены к группе контроля, с достаточно близким профилем к здоровым донорам, возможно эти пациенты имеют начальные этапы онкогенеза. Однако, это может свидетельствовать и о том, что набор из 119
35 пептидов недостаточен для выявления всех молекулярных подтипов РМЖ.

Для оценки и визуализации разделения исследуемых групп с диагнозом РМЖ и условно здоровых пациентов, дополнительно был применен метод главных компонент. На фиг. 4, по результатам взаимодействия антител плазмы с комбинаторными пептидами, представлено четкое разделение на две группы.

40 Для анализа аккуратности классификации групп контроля и РМЖ-больных использовали классификатор ближайших соседей (k-Nearest Neighbors) с евклидовой метрикой и алгоритм перекрестной проверки с исключением (leave-one-out cross validation). Данные в приведенной ниже в таблице 1 показывают, что с помощью набора выявленных 119 пептидов возможно отделить контрольные образцы от образцов
45 пациентов с диагнозом РМЖ с высокой чувствительностью (0,951) и специфичностью (0,854).