Подлесных Степан Васильевич

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПЕРТУАРА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ И БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕПТИДНЫХ МИКРОЧИПОВ

03.01.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Алтайский государственный университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Шаповал Андрей Иванович

Официальные оппоненты:

Чердынцева Надежда Викторовна, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Миронова Надежда Львовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научноисследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Защита диссертации состоится	_ «» R	20	Г. В _	часов на
заседании диссертационного с	овета Д	001.048.04	на базе	федерального
государственного бюджетного	о научн	ого учреж	кдения	«Федеральный
исследовательский центр фунда	ментально	й и трансля	ционной	медицины» по
адресу: 630117, Новосибирск, ул	ица Тимак	ова, 2.		

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на сайте https://frcftm.ru/

Автореферат разослан «	_>>		2021	года
------------------------	-----	--	------	------

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Традиционные методы молекулярной биологии предоставляют ценную информацию об экспрессии, структуре и функции белков, тем не менее, эти методы не могут обеспечить возможности массового параллельного анализа, который необходим для картирования всего протеома, профилирования репертуара циркулирующих антител или для реализации современных программ по открытию и разработке новых лекарственных препаратов (Wang *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017; Zuo *et al.*, 2016; Atak *et al.*, 2016; Ласточкина $u \partial p$., 2017; Rauf, Anderson, LaBaer, 2020).

Параллельный анализ с использованием матричных (микрочиповых) систем оказался успешным в геномных исследованиях, где ДНК-микрочипы широко используются для крупномасштабного анализа экспрессии генов (Heller et al., 2002: Page et al., 2009; Wang et al., 2016; Behzadi et al., 2019). Однако создание белкового эквивалента ДНК-микрочипов представляет собой более сложную задачу, особенно при исследовании взаимодействия белковых лигандов и рецепторов, которые должны сохранять свою специфичность и функциональную активность после иммобилизации на поверхности микрочипа (Wang et al., 2016; Atak et al., 2016; Ласточкина $u \partial p$., 2017). Синтетические пептиды имеют некоторые очень важные особенности в применении к исследованию белок-белковых взаимодействий в экспериментах с микрочипами, их легко синтезировать и модифицировать, они очень стабильны и недороги. Важно, что пептиды можно смоделировать так, что они будут действовать в качестве сайта связывания практически для любой молекулы, они могут имитировать биологическую активность и структуру белков и обеспечивают прямой анализ различных белков (Fournel, Muller, 2003; Sawyer, Chorev, 2003; Beyer et al., 2007; Legutki et al., 2014; Wang et al., 2016; Mahendru et al., 2017; Stafford et al., 2020). Первоначально пептидные микрочипы использовались в профилировании протеаз и сравнительного скрининга различных ферментов. Пептиды на матрицах могут служить также для исследования взаимодействия антител с разными эпитопами или выступать в качестве низкомолекулярных агентов для потенциальных терапевтических применений или диагностики (Sawyer, Chorev, 2003). Благодаря современным разработкам, наряду с уменьшением стоимости синтеза пептидных библиотек и ростом коммерческой микрочипы становятся просто поддержки, пептидные не инструментом исследования, но также и универсальной платформой, которую можно использовать для поиска новых таргетных лекарств и разработки диагностических инструментов (Andresen et al., 2009; Zhang et al., 2013; Atak et al., 2016; Mahendru et al., 2017). B данной работе мы использовали пептидные микрочипы для выявления изменений репертуара циркулирующих антител, как возможного инструмента ранней диагностики рака молочной железы (РМЖ), а также для поиска пептидов, взаимодействующих с молекулами контроля иммунитета, на примере рецептора CTLA-4, как потенциальных иммунотерапевтических агентов.

В настоящее время, актуальной проблемой остается разработка более точных диагностических инструментов, использующих комбинации множественных биомаркеров, что позволит обеспечить персонализированный подход к терапии злокачественных заболеваний.

Применение пептидов для блокирования функциональной активности СТLА-4 и других молекул, участвующих в контроле иммунного ответа, могут решить некоторые проблемы, связанные с применением мАТ (моноклональных антител) для терапии онкологических заболеваний.

Таким образом, используя одну современную технологическую платформу пептидных микрочипов, мы провели исследования, которые будут способствовать разработке диагностических инструментов и созданию новых лекарственных средств. Данная работа объединяет и дополняет две современные концепции:

- 1. Обнаружение опухолей на ранних стадиях, до появления симптомов, что приводит к вопросу о дальнейшей терапевтической интервенции заболевания, когда расположение опухоли невозможно определить из-за ее малых размеров.
- 2. Стимулирование собственного иммунитета пациента, что позволяет клеткам иммунной системы обнаруживать и уничтожать опухоль, даже если ее локализацию невозможно обнаружить с помощью современных диагностических аппаратов.

Целями данной научной работы являются исследование репертуара циркулирующих антител плазмы крови пациентов с диагнозом рак молочной железы, а также изучение белок-белковых взаимодействий, на примере молекулы СТLA-4, с помощью пептидных микрочипов.

Успешное достижение поставленных целей данного научного исследования определяется следующими *задачами*:

- 1. Провести сравнительный анализ и определить пептиды, с которыми специфически взаимодействуют антитела плазмы крови пациентов с диагнозом рак молочной железы и здоровых доноров;
- 2. Сравнить взаимодействие антител плазмы крови пациентов, имеющих разные молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы, с пептидами представленными на микрочипах;
- 3. Проанализировать мотивы аминокислот в структуре выявленных пептидов и оценить гомологию с белками, участвующими в онкогенезе рака молочной железы и других онкологических заболеваний;
- 4. Провести поиск пептидов на микрочипе, специфически взаимодействующих с рецептором СТLA-4, который ингибирует иммунный ответ;
- 5. Оценить способность синтетических пептидов, взаимодействующих с молекулой CTLA-4, регулировать связывание этого рецептора с его природным лигандом В7-1.

Научная новизна исследования. В настоящей работе, впервые продемонстрированы возможности применения пептидных микрочипов высокой плотности для диагностики онкологических заболеваний и поиска потенциальных соединений с иммуномодулирующими свойствами.

Впервые с помощью пептидных микрочипов (содержащих 330034 пептида), был проведён сравнительный анализ репертуара антител (иммуносигнатур),

циркулирующих в плазме крови человека в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы. Выявлены пептиды, которые показали статистически значимое отличие при реакции с антителами плазмы в образцах крови больных с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) и здоровых доноров. Впервые выявлены и показаны особенности репертуара антител у пациентов с разными молекулярными подтипами РМЖ (I и II стадии) и в зависимости от гормональнорецепторного статуса заболевания. Таким образом, с помощью микрочипов впервые определены последовательности и структура пептидов (мимотопов), которые взаимодействуют с антителами плазмы крови и имеют потенциал практического применения при создании диагностических тест-систем.

Впервые с помощью пептидных микрочипов, содержащих массив из 330034 пептидов (состоящих из случайных последовательностей аминокислот), определены пептиды, специфически взаимодействующие с CTLA-4 молекулой, которая участвует в регуляции иммунитета. Для одного из группы синтетических пептидов показана способность блокировать взаимодействие рецептора CTLA-4 с его природным лигандом В7-1. Данные пептиды могли бы использоваться при разработке лекарственных препаратов для иммунотерапии онкологических и инфекционных заболеваний, с помощью усиления функциональной активности Тлимфоцитов.

Теоретическая и практическая значимость. Данная работа имеет важное фундаментальное и прикладное значение для молекулярной биологии, биохимии, онкологии, иммунологии, нормальной и патологической физиологии, клинической лабораторной диагностики, а также иммунотерапии онкологических и других иммунозависимых заболеваний. Полученные результаты формируют и расширяют представление о возможности использования анализа репертуара циркулирующих антител для диагностики онкологических заболеваний. Использование массива случайных пептидных эпитопов, представленных на микрочипе, позволяет исследовать репертуар антител без предварительного выделения антигена, что является важным для диагностики гетерогенных опухолей и, вероятно, для диагностики новых, ранее не известных науке, инфекционных заболеваний. Применение микрочипов с пептидами расширяет методологию для поиска новых низкомолекулярных соединений, способных модулировать функцию белков, и может способствовать разработке новых препаратов для терапии различных заболеваний. Созданный и оптимизированный алгоритм может быть применён для поиска пептидов, взаимодействующих с молекулами-мишенями, при создании лекарственных препаратов ДЛЯ персонализированного лечения различных заболеваний.

Практическая значимость проведенных исследований состоит в использовании, выявленных с помощью микрочипов пептидов при разработке тестсистем для ранней диагностики (скрининга) рака молочной железы и определения молекулярных подтипов РМЖ неинвазивными методами, для последующего выбора эффективной терапии. Аналогичный подход, может быть применён для выявления опухолей иной этиологии и патогенеза. Пептиды, которые специфически связываются с молекулой СТLА-4 и блокируют ее взаимодействие с лигандом В7-1,

могут приводить к усилению иммунного ответа. Этот феномен может быть использован для разработки лекарственных препаратов, для иммунотерапии онкологических и других иммунозависимых социально значимых заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1. Антитела плазмы крови пациентов с диагнозом рак молочной железы и здоровых доноров взаимодействуют с разными группами пептидов (мимотопов).
- 2. Антитела плазмы крови пациентов с разными молекулярнобиологическими подтипами рака молочной железы, такие как люминальный А и Б, «тройной негативный» (базальный), взаимодействуют со специфическими панелями пептидов (мимотопов).
- 3. Общие аминокислотные мотивы пептидов, взаимодействующих с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов с РМЖ, говорят о наличии специфического иммунного ответа против антигенных эпитопов связанных с молекулярными изменениями при развитии рака молочной железы.
- 4. Синтетические пептиды, специфически взаимодействующие с белкомрецептором CTLA-4, способны блокировать его взаимодействие с природным лигандом B7-1.

Степень достоверности результатов. Для обеспечения и подтверждения высокой степени достоверности в данной работе использован комплекс современных экспериментальных методов исследования, клинической диагностики, статистики. Научные положения, выводы и рекомендации базируются на анализе огромного объема научной литературы и подтверждены данными экспериментальной работы.

Апробация работы. Основные научные положения диссертационной работы и результаты исследования были представлены к обсуждению в рамках: конференции-школы молодых ученых «Перспективные направления физикохимической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020 г.); V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2019 г); II Объединенного научного форума, включающего – VI Съезд биохимиков России / IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» / VI Съезд физиологов СНГ и XII Съезд аллергологов и иммунологов СНГ (Сочи/Дагомыс, 2019 г.); Российскояпонского медицинского симпозиума (Красноярск, 2018 г.); Международного биотехнологического форума «Biotechnology: state of the art and perspectives» (Москва, 2018 г.); III Всероссийского конкурса студенческих научных обществ и конструкторских бюро (Барнаул, 2017 г.); Объединённого научного форума, включающего Международную научную конференцию по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва 2017 г.); Всероссийской конференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2017 г.); І онкологического форума Сибирского федерального округа (Барнаул, 2017 г.); Стартап-конференции «Startup Village 2017» (Москва, 2017 г.); Всероссийской конференции в формате Стартап Тура «Открытые инновации» (Барнаул, 2017 г.); Международной III Молодежной биотехнологической школы «Рекомбинантные белки и вакцины» (Барнаул, 2017 г.); I Международной молодежной научной конференции «Науки о жизни: от исследований к практике» (Барнаул, 2017 г.), XX Всероссийского онкологического конгресса (Москва, 2016 г.); Конкурса программы содействия развитию в научно-технической сфере «УМНИК» (г. Барнаул, 2016 г.); Российской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные подходы в онкологии» (Барнаул, 2015 г.). Результаты работы отмечены наградными дипломами в конкурсах научных работ этих конференций.

Личный вклад автора. Автор самостоятельно провел обзор отечественной, зарубежной литературы по существующим в настоящее время представлениям молекулярной природы и методам диагностики РМЖ, а также особенностям современной иммунотерапии онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний. Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором. Автор самостоятельно готовил презентации, постеры, тезисы, стендовые доклады и представлял результаты исследований, в очной форме на Российских и международных конференциях, по результатам которых награжден дипломами лауреата и призера конкурсов молодых ученых.

Публикации. Результаты работы представлены в **20** публикациях (статьи, тезисы, РИД) – **11** учитываемых ВАК, из них **6** статей в базах научного цитирования Scopus и Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 203 страницах, включает 38 рисунков, 9 таблиц. Список литературы содержит 287 источника. Диссертация имеет следующую структуру «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы». В соответствии с правилами оформления представлены список литературы и приложения.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и искреннюю благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук, профессору Андрею Ивановичу Шаповалу. Отдельно автор благодарит коллектив КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (АКОД). Автор выражает глубокую признательность родным и друзьям за всестороннюю и неоценимую поддержку.

Финансовая поддержка. Выполнение данных НИР было проведено при содействии Российского фонда фундаментальных исследований (№ 17-04-00321 и 17-54-33003), госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 6.3892.2017/4.6 и № FZMW-2020-0007) и научно-инновационного конкурса «УМНИК» (№ 11931ГУ/2017 от 04.07.2017).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выполнение данного исследования вносит вклад в поиск решений двух проблем современной онкологии — ранняя диагностика и поиск новых иммунотерапевтических соединений в разработке лекарственных препаратов.

Для обеспечения высокой степени достоверности, исследование базируется на широком спектре современных методов молекулярной биологии, биохимии, иммунологии, онкологии, клинической диагностики, статистики и биоинформатики.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Данная глава автореферата содержит два раздела. Первая часть посвящена изучению репертуара циркулирующих антител у пациентов с различными молекулярными подтипами злокачественных новообразований молочной железы. Во второй части описаны результаты исследования белок-белковых взаимодействий, на примере молекул контроля иммунного ответа (МКИ), в частности, описана стратегия поиска пептидов, взаимодействующих с молекулой СТLА-4, регулирующей иммунный ответ. Общим для двух частей данной главы является использование микрочипов, содержащих 330 тысяч пептидов (рис. 1).

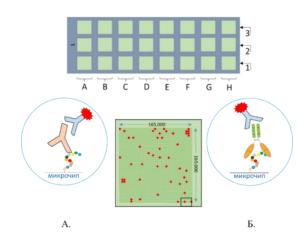


Рисунок 1. Схема выявления пептидов, взаимодействующих с циркулирующими антителами (A) и рекомбинантными белками (Б), с помощью микрочипа. Микрочип представляет собой предметное стекло, на котором расположены 24 микроматрицы, содержащие более 330 тысяч пептидов (общий вид верхний рисунок). Увеличенная схема микроматрицы (микроэррей) показана в центре рисунка, каждая точка представляет пептид с известной аминокислотной последовательностью. Красные точки представляют пептиды, взаимодействующие с исследуемыми образцами. Взаимодействие образцов с пептидами определяли с помощью вторичных антител с флуоресцентной меткой, которые распознают Fc фрагменты иммуноглобулинов человека, присутствующие у антител пациентов (A) и рекомбинантных белках (Б).

1. Результаты исследования образцов плазмы крови на пептидных микрочипах

Для выявления пептидов, взаимодействующих с циркулирующими антителами, использовались образцы плазмы крови, полученные от 41 здорового донора женского пола (возраст 47.1 ± 8.5) и 40 пациентов женского пола с диагнозом РМЖ (возраст 56.4 ± 12.2) из Алтайского краевого онкологического диспансера (АКОД). В группе с диагнозом РМЖ — у 40 % пациентов выявлена I стадия заболевания, у 60 % — II стадия, без метастатического поражения лимфатических узлов и отдаленных метастазов. На основе клинико-патологических признаков, было определено, что в исследуемой группе у 17% пациентов выявлен подтип РМЖ — люминальный A, из всей группы 35 % пациентов имеют — люминальный B (HER-2

отрицательный) подтип РМЖ и для 25 % — базальноподобый («тройной негативный»), 23% — подтип не определён, нет данных.

В данной работе представлены исследования на микрочипах нового поколения, где пептиды (330034 пептида) синтезировались на поверхности микрочипа с помощью метода фотолитографии (Legutki, 2014). На первом этапе проведён визуальный анализ микрочипов, обработанных с разными образцами плазмы крови.

На рис. 2 представлены идентичные участки сканированных микроэррей после инкубации с плазмой крови и вторичными антителами. Видно, что образцы, полученные от двух различных доноров, взаимодействуют с разными группами пептидов на микрочипах (рис. 2, левые и правые фрагменты). Анализ аналогичных участков микроэррей, инкубированных с плазмой крови одного донора (рис. 2, верхний и нижний фрагмент), свидетельствует о взаимодействии плазмы одного аналогичным набором пептидов, донора что говорит хорошей воспроизводимости результатов при использовании разных микрочипов. Следует отметить некоторое количество неизбежных погрешностей, которые возникают во время производства или обработки микрочипа, однако эти артефакты не снижают информативность теста.

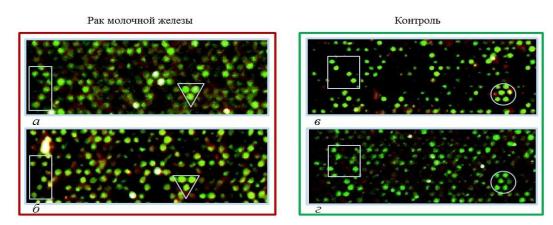


Рисунок 2. Взаимодействие антител с пептидами на микрочипе. Фрагмент сканированного изображения пептидного микрочипа, инкубированного с плазмой крови РМЖ-пациента и здорового донора (два повтора для каждого образца): a, δ – рак молочной железы; a, c – контроль; зеленые точки представляют пептиды, с которыми взаимодействуют сывороточные антитела, линиями выделены группы пептидов, отражающие воспроизводимость тестирования образцов плазмы крови на разных микрочипах.

Следующим этапом работы стал выбор пептидов, взаимодействие с которыми у контрольных и РМЖ-образцов плазмы крови показывает статистически значимые отличия. Для этого сканированные изображения микрочипов оцифровывались, и оценивалась интенсивность флуоресценции (ИФ) каждого пептида. Уровень ИФ соответствует количеству циркулирующих антител, взаимодействующих с отдельным пептидом.

Медианные уровни интенсивности флуоресценции каждого из анализируемых микрочипов имели незначительные отличия. Для выравнивания медианы всех

микрочипов был применён алгоритм квантильной нормализации, позволяющий сглаживать различия между микроэррей.

Распределение нормализованных интенсивностей флуоресценции пептидов, взаимодействующих с сыворотками больных РМЖ и здоровых доноров показано на рис. 3. С помощью статистического анализа данных выявлены пептиды, которые поразному взаимодействуют с антителами плазмы контрольных и образцов РМЖ. На рис. 3 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 заболеванием рак молочной железы.

В результате оценки циркулирующих антител у здоровых доноров и больных РМЖ с помощью пептидных микрочипов (общее количество 330034 пептидов), нами выявлены 119 пептидов, с которыми связывание антител плазмы крови (IgG) показало статистически значимые межгрупповые различия (p < 0.001).

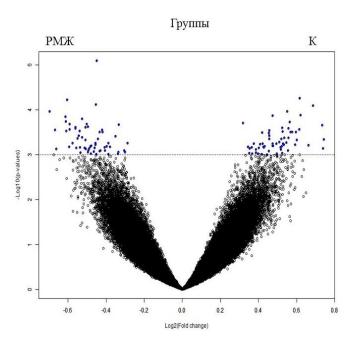


Рисунок 3. Диаграмма распределения интенсивности свечения пептидов (Volcano plot). Левый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми сильнее с плазмой пациентов РМЖ. Правый массив содержит пептиды, взаимодействие с которыми снижено у пациентов с РМЖ. Точки выше пунктирной линии представляют пептиды, разница, в интенсивности флуоресценции которых, в группах больных РМЖ и здоровых доноров статистически значима (p < 0.001)

Иерархический кластерный анализ образцов плазмы крови с использованием выявленных 119 пептидов представлен на рис. 4. График демонстрирует чёткое 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 (рис. 4). Это может свидетельствовать об иммунном ответе, связанном с определенной молекулярной гетерогенностью опухолей.

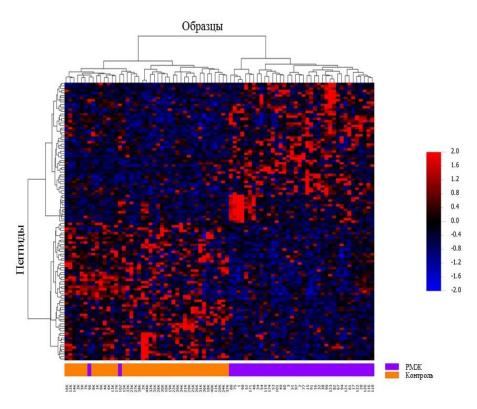


Рисунок 4. Кластерный анализ и тепловая карта (heatmap) образцов плазмы крови больных РМЖ и здоровых доноров. Индивидуальные пептиды (119) представлены в горизонтальных рядах, образцы плазмы крови от больных (40) и здоровых (41) представлены в вертикальных колонках. Красные сигналы (точки) показывают высокое взаимодействие антител с определённым пептидом, синие или тёмные показывают низкое взаимодействие. Кластеризация пептидов представлена на левой стороне рисунка. Кластеризация образцов плазмы представлена в верхней части рисунка. Порядковые номера образцов обозначены (под диаграммой).

Такая специфическая реакция взаимодействия циркулирующих антител с пептидами 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 пептидов недостаточен для выявления всех молекулярных подтипов РМЖ.

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

Оценка чувствительности и специфичности классификации контрольных и РМЖ-образцов плазмы крови с помощью пептидного микрочипа при использовании классификатора «k-Nearest Neighbors»

Группа	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
РМЖ	0,951	0,854	0,867	0,946
Здоровые	0,854	0,951	0,946	0,867

Примечание.

PPV – positive predictive values (предсказательная ценность положительных результатов);

NPV – negative predictive values (предсказательная ценность отрицательных результатов).

Для оценки достоверности выбранных классификаторов и полученных результатов по разделению исследуемых групп был проведён ROC-анализ с учётом показателя AUC, результаты представлены на рисунке 5 (англ. area under ROC curve, площадь под ROC-кривой).

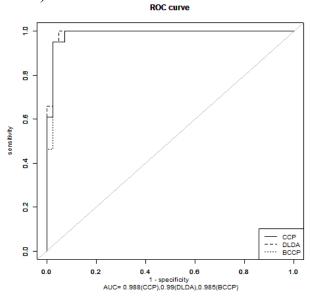


Рисунок 5. Оценка диагностическая значимости теста (*ROC-кривая*). Представлены варианты с классификаторами: CCP – Compound Covariate Predictor; DLDA – Diagonal Linear Discriminant Analysis; BCCP – Bayesian Compound Covariate Predictor

Полученные данные демонстрируют высокую прогностическую способность применённых классификаторов и могут свидетельствовать о высокой диагностической ценности, выявленной панели пептидов в анализе репертуара циркулирующих антител у РМЖ пациентов.

1.1. Анализ взаимодействия циркулирующих антител пациентов с различными молекулярными подтипами с пептидами на микрочипах

Используя методы статистического анализа, было проведено сравнение взаимодействия антител плазмы крови пациентов с различными молекулярными подтипами РМЖ, с пептидами на микрочипе.

В результате данного анализа были выявлены 634 пептида, которые могут классифицировать молекулярные подтипы РМЖ. Используя выявленные информативные пептиды, был произведён дополнительный иерархический кластерный анализ. Результат анализа представлен на рис. 6.

График демонстрирует разделение групп на кластеры — подтипы рака молочной железы. Представленные данные показывают, что три подтипа рака молочной железы — люминальный А, люминальный В и базальноподобный («тройной негативный»), имеют четкие профили (иммуносигнатуры), которые представлены на рисунке 6. При внимательном рассмотрении тепловой карты (heatmap), среди чётких отличий между профилями пептидов в кластерах подтипов РМЖ существуют профили (иммуносигнатуры) и смешанных подтипов РМЖ у пациентов под номерами 1, 15, 98, 99, 123 и 61.

Таким образом, было выявлено 634 информативных пептида классифицирующие все 3 молекулярные подтипа РМЖ в данном исследовании. Следует отметить, что существует четвертый подтип РМЖ (HER2-положительный), однако в данной выборке оказалось только 2 пациента с HER2-положительной опухолью, что недостаточно для проведения статистического анализа.

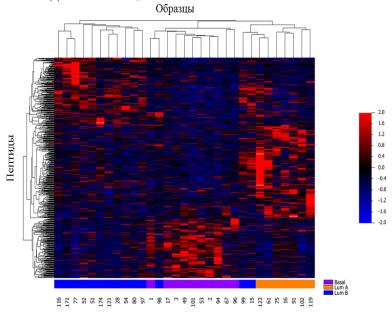


Рисунок 6. Кластерный анализ и тепловая карта (heatmap) подтипов РМЖ исследуемой группы. Для анализа использована плазма крови пациентов с люминальным А (оранжевый), люминальным В (синий) и базальноподобным (пурпурный) подтипом РМЖ. На графике, по горизонтали показан каждый пептид (выявлены 634), по вертикали образцы плазмы пациентов. Кластеризация пептидов представлена для каждого образца плазмы крови. Пептиды, взаимодействующие с образцами плазмы пациента, отмечены красным цветом. Индивидуальный номер пациента обозначен под диаграммой.

1.2. Биоинформационный анализ пептидов, взаимодействующих с циркулирующими антителами плазмы крови РМЖ-пациентов

При более детальном прямом анализе уровня взаимодействия пептидов, на микрочипе, с антителами плазмы крови каждого из пациентов, были выявлены некоторые особенности, имеющие групповое значение, которые представлены на

рис. 7. Анализ профиля взаимодействия антител плазмы крови с пептидами показал наличие кластеров, объединяющих пациентов в группы. Данный факт был отмечен выше (рис. 4 и 6). Анализ структуры пептидов из кластеров, выявил общие мотивы.

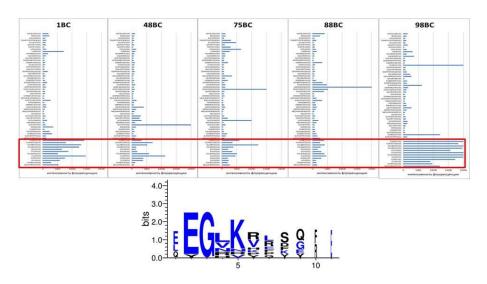


Рисунок 7. Общий кластер и мотивы пептидов в группе рак молочной железы. Представлены образцы 5 пациентов РМЖ. Показаны пептиды, которые формируют общие кластеры в группе пациентов. На нижнем рисунке представлен общий мотив пептидов кластера в группе РМЖ.

Для того, чтобы выявить потенциальные антигены, которые вызывают иммунный ответ у онкологических пациентов, приводящий к продукции антител, взаимодействующих с аминокислотным мотивом пептидов (рис. 7), представленных микрочипе, был проведен поиск В базах данных аминокислотных последовательностей белков. Поиск гомологов был произведен с помощью мировой базы данных Protein BLAST «Basic Local Alignment Search Tool» (NCBI, США), по алгоритмам «blastp (protein-protein BLAST)» а также ограничением поиска для группы объектов – «**human** (taxid:9606)». Таким образом, были выявлены гомологичные участки белка и номера расположение, таких аминокислотных последовательностей в установленной молекуле. В таблице 2 представлены взаимодействующие с плазмой крови некоторые пептиды, заболеванием рак молочной железы, которые имеют высокий уровень гомологии с природными белками, представленными в базах данных. Многие белки, имеющие гомологию с этими пептидами, связаны с онкогенезом различных опухолей, и их экспрессия увеличена в опухолях. Например, пептид с мотивом EGLK (рис. 7) имеет частичную (полную) гомологию с участками белков, обнаруженных в клетках рака молочной железы, кишечника и печени Данные результаты, демонстрируют потенциальную взаимосвязь изменения репертуара циркулирующих антител с экспрессий определенных белков в тканях опухоли. Однако необходимо проверить реактивность циркулирующих антител РМЖ пациентов с белками, перечисленными в таблице 2.

Гомология пептидов с опухолеассоциированными белками [Homo sapiens]*

Гомология	Название белка	ID	Онкологические заболевания	Ссылка		
LEGVK						
LEGVK	F-box and leucine-rich	EAW98266.1	Активатор биогенеза рибосом в эпителиальных	Galbiati A., 2017		
503 LEGVK 507	repeat protein 10, isoform		клетках молочной железы.	Zhao X., 2018		
	CRA_a (KDM2B)		В-клеточная лимфома			
		EGLI	KHRSQ			
E+LKHR+Q	trichoplein keratin	NP_00113732	Карцинома молочной железы. Регулятор	Vecchione A.,2009		
400 ESLKHREQ 407	filament-binding protein -	4.1	опухолево-клеточной митофагии и ангиостаза.	Neill T., 2014		
	«tumor suppressor		Предполагаемый супрессор опухолей.			
	protein» (mitostatin)					
		EGL	KRQFE			
GLKRQF	neuroblastoma apoptosis-	AAY84832.1	Участвует в различных аспектах развития рака.	Sjöblom T., 2006;		
398 GLKRQF 403	related protease		Рак молочной железы. Колоректальный рак.	Poirson J., 2017		
EGLKY						
EGLKY	BCLAF1 protein, partial "	AAH63846.1	Ангиогенез. Гепатоцеллюлярная карцинома.	Wen Y., 2019		
434 EGLKY 438	BCL2 associated		Рак прямой кишки.	Brown G.T., 2016		
	transcription factor 1					
QEGLKPRSQFE						
EGLKPR	PR domain zinc finger	NP_036363.2	Хронический миелоидный лейкоз. Связь с	Mir R., 2017;		
1108 EGLKPR 1113	protein 2 isoform a		рецепторами эстрогена. Эффектор действия	Abbondanza C., 2012;		
			эстрогена. Ретинобластома. Менингиома. Liu Z.Y., 2013;			
			Супрессор глиомы и почечно-клеточного рака.	Zhang C., 2015		

^{*}Примечание: поиск произведен с использованием белковых последовательностей в базе данных BLAST

Таким образом, пептидные микрочипы имеют огромный потенциал для молекулярной диагностики. Пептиды на микрочипе представляют случайную комбинацию всех аминокислот и являются мимотопами (подобие эпитопов) антигенов. С помощью этих комбинаторных аминокислотных последовательностей можно определять связывающую структуру для многих антител, даже в случае несовпадения с природными эпитопами. Это, в свою очередь, даёт возможность наиболее адекватно оценить репертуар циркулирующих антител и установить информативные пептиды даже в тех случаях, когда антиген неизвестен. Проведённый нами анализ демонстрирует отличия в репертуаре сывороточных антител у больных с диагнозом РМЖ и здоровых доноров. Микрочипы с пептидами со случайными аминокислотными последовательностями могут быть использованы для анализа репертуара антител при классификации здоровых и больных с диагнозом рак молочной железы. В работе показаны групповые и индивидуальные (персонифицированные) иммуносигнатуры молекулярных подтипов РМЖ.

2. Поиск пептидов, взаимодействующих с молекулами контроля иммунитета

Микрочипы, описанные выше (330 тыс. пептидов), для диагностики рака молочной железы, также были использованы для определения пептидов, взаимодействующих с белками, участвующими в регуляции иммунного ответа. В этих экспериментах мы использовали рекомбинантные химерные белки, содержащие внеклеточные домены молекул В7-1, В7-2, СТLА-4, и Fc домен иммуноглобулина класса 1 человека (hIgG1). Были выявлены 350 пептидов, которые специфически взаимодействуют с В7-1Fc, В7-2Fc, СТLА-4Fc. На рис. 8 представлены результаты иерархической кластеризации интенсивностей флуоресценций пептидов, взаимодействующих с указанными выше молекулами.

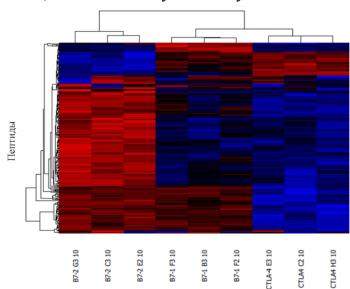


Рисунок 8. Кластерный анализ и тепловая карта (heatmap) пептидов, взаимодействующих с рекомбинантными белками B7-1Fc, B7-2Fc, CTLA-4Fc. Индивидуальные пептиды представлены в горизонтальных рядах, образцы рекомбинантных белков (B7-1Fc, B7-2Fc, CTLA-4Fc) в вертикальных колонках. Кластеризация пептидов представлена для каждого образца рекомбинантного белка (красный цвет). Рекомбинантные белки молекул контроля иммунитета обозначены под диаграммой.

Из данных представленных на рис. 8 видно, что результаты трех экспериментальных повторов для каждой рекомбинантной молекулы формируют один кластер, что демонстрирует высокую воспроизводимость результатов, полученных с использованием индивидуальных микрочипов. Эти результаты также свидетельствуют о высокой аффинности и специфичности пептидов, представленных на микрочипе, которые взаимодействуют с белками В7-1Fc, В7-2Fc, СТLА-4Fc.

На рис. 9 показаны средние значения интенсивности флуоресценции, обусловленной взаимодействием пептидов на микрочипе с рекомбинантными белками B7-1Fc, B7-2Fc и CTLA-4Fc.

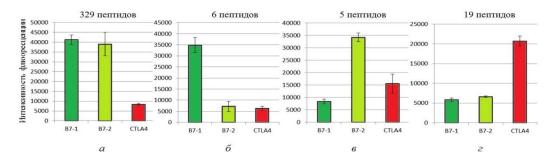


Рисунок 9. Уровень флуоресценции пептидов, взаимодействующих с образцами рекомбинантных белков B7-1Fc, B7-2Fc, CTLA-4Fc. Пептиды, взаимодействующие с B7-1Fc и B7-2Fc (*a*), B7-1Fc (*б*), B7-2Fc (*в*) или CTLA-4Fc (*г*). Над каждой диаграммой указано количество пептидов.

На рис. 9а представлены данные, свидетельствующие о том, что 329 пептидов, представленных на микрочипе, показали статистически значимые различия при взаимодействии с рекомбинантными белками B7-1Fc и B7-2Fc по сравнению с рекомбинантным белком CTLA-4Fc. Мы предполагаем, что некоторые из этих пептидов способны блокировать функциональную активность обоих лигандов, что может обеспечить разработку пептидных агентов, которые потенциально могут изменять функциональную активность сразу двух мишеней. На рис. 96 показаны результаты, свидетельствующие о том, что 6 пептидов взаимодействуют только с В7-1, 5 пептидов могут специфически связываться с В7-2 (рис. 96). Таким образом, с помощью пептидных микрочипов могут быть выбраны пептиды, которые потенциально являются универсальными блокаторами В7-1 и В7-2-лигандов, и пептиды, специфически блокирующие один из лигандов, однако это требует дополнительных экспериментальных доказательств. Кроме терапевтического применения этих пептидов для регуляции иммунного ответа, такие молекулы могут быть полезными для ответа на вопросы о функциональной активности различных лигандов. До сих пор не известно, существуют ли уникальные функции у лигандов B7-1 и B7-2 при связывании с реципрокными рецепторами – CD28 и CTLA-4. Пептидные реагенты могут помочь ответить на этот фундаментальный вопрос. Данные представленные на рис. 9г показывают, что на микрочипе есть 19 пептидов, которые специфически взаимодействуют с CTLA4-Fc. Мы предполагаем, что некоторые из этих пептидов могут быть использованы для прямого блокирования CTLA-4, что может способствовать усилению иммунного ответа *in vivo*. Пептиды,

взаимодействующие с CTLA-4, являются нашими основными кандидатами при разработке препаратов для стимуляции иммунного ответа и иммунотерапии онкологических заболеваний. Тот факт, что для любого из тестируемых рекомбинантных белков, содержащих Fc фрагмент иммуноглобулина человека, мы обнаружили уникальный набор пептидов, говорит о том, что в этих экспериментах пептиды специфически связываются с внеклеточной частью B7-1, B7-2 и CTLA-4, а не с Fc частью рекомбинантных химерных белков.

Таким образом, с помощью пептидных микрочипов были выявлены группы пептидов, взаимодействующих с рекомбинантными белками МКИ. Для дальнейшего анализа из 19 выявленных пептидов, взаимодействующих с СТLА-4Fc, были синтезированы 8 пептидов, показавших максимальную интенсивность флуоресценции при взаимодействии с СТLА-4Fc.

Нами был проведен иммуноферментный анализ (ИФА) взаимодействия 8-ми синтезированных пептидов с белком СТLА-4 для сравнения экспериментальных результатов с математическими моделями взаимодействия выявленных пептидов с рецептором СТLА-4 и его лигандом В7-1 (рис. 10).

Данные представленные на рис. 10 говорят о том, что пептиды р339, р344, р345, р346, показали сильное связывание с СТLА-4Fc в ИФА экспериментах (рис. 10б), что соответствует количеству расчетных аминокислот, препятствующих (clash) связыванию СТLА-4Fc и В7-1 (рис. 10а). Корреляционный анализ отражает высокий уровень (r = 0.75) сходства результатов моделирования и экспериментальной оценки взаимодействия пептидов с белком СТLА-4Fc.

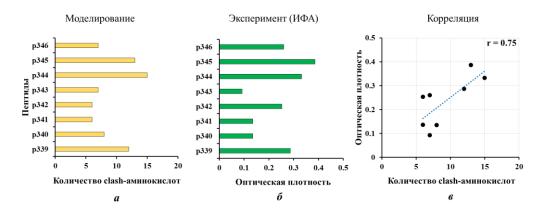


Рисунок 10. Корреляционный анализ результатов моделируемого и экспериментального взаимодействия белка CTLA-4Fc с синтетическими пептидами. (а) Результаты моделирования основаны на расчетных данных количества аминокислот, взаимодействующих с петлей ⁹⁹МҮРРРҮ¹⁰⁴ рецептора CTLA-4Fc и препятствующих (clash) взаимодействию с лигандом В7-1. (б) В ИФА образцы пептидов в концентрации 1 мкг/мл сорбированы в лунках 96-луночных планшетов. 5 мкг/мл CTLA-4Fc были добавлены в лунки. Взаимодействие CTLA-4Fc с пептидами определяли с помощью мАТ против иммуноглобулина человека. (в) Представлен уровень корреляции результатов 2-х видов анализа 0,75.

Среди всех пептидов был отобран гомомерный додекапептид р346 [YDPEYRNFWGCG], который показал наиболее воспроизводимые результаты в серии экспериментов, а и его химическая активность была наиболее стабильной, на

всём протяжении исследований. С помощью инструментов «PepDraw» была создана структурная формула пептида p346, взаимодействующего с CTLA-4, результат представлен в тексте диссертации. Данный синтетический пептид (1,5 кДа) содержит 12 аминокислотных остатков, расчетные значения индекса GRAVY (-1,30) характеризуют этот пептид как гидрофильный. Контрольный пептид с номером p333, не взаимодействующий с CTLA-4Fc, имеет аналогичные физико-химические свойства. В тексте диссертации приведены результаты оценки расчетной степени взаимодействия пептидов p346 (экспериментальный) и p333 (контрольный) с молекулой CTLA-4, а также 3D-моделирования взаимодействия пептида с CTLA-4

Полученные модельные результаты свидетельствуют в пользу специфичности взаимодействия р346 с петлей ⁹⁹МҮРРРҮ¹⁰⁴, играющей ключевую роль в связывании СТLА-4 и В7-1 и проявлении биологического эффекта (Peach *et al.*, 1994). Значит, данный пептид может блокировать контакт рецептора СТLА-4 и лиганда В7-1.

Определение специфичности взаимодействия синтетического пептида р346 показано с помощью следующего эксперимента, выполненного методом ИФА (рис. 11). Исследуемый пептид был сорбирован в лунках 96-луночного планшета, куда добавлялись рекомбинантные химерные белки СТLА-4Fc, B7-IFc и B7-2Fc, эти белки содержат внеклеточные домены соответствующих молекул и Fc-фрагменты иммуноглобулина человека. Из данных, представленных на рис. 11 следует, что СТLА-4Fc взаимодействует с р346 пептидом. В тоже время B7-1Fc и B7-2Fc белки не связываются с р346 пептидом. Таким образом, результаты, представленные на рис. 11 свидетельствуют о специфичном взаимодействии СТLА-4 с р346.

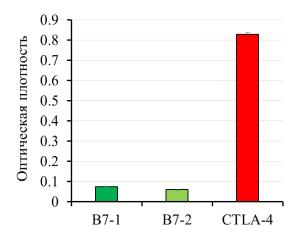


Рисунок 11. Взаимодействие СТLА-4Fc, B7-1Fc и B7-2Fc с синтетическим пептидом р346. Пептид р346 был сорбирован (иммобилизован) в лунках 96-луночных планшетов в концентрации 1 мкг/мл. Далее были внесены образцы рекомбинантных белков B7-1Fc, B7-2Fc и СТLА-4Fc (в концентрации 5 мкг/мл). Взаимодействие рекомбинантных белков с р346 определяли с помощью мАТ против Fc-фрагмента иммуноглобулина человека, конъюгированными с пероксидазой хрена.

Следующим шагом, данного исследования было сравнение взаимодействия СТLА-4Fc и B7-1Fc с синтетическими пептидами для определения специфичности, проведено методом ИФА. Для данных экспериментов были использованы 2 ранее синтезированных пептида: «экспериментальный» р346, который взаимодействовал с СТLА-4Fc при тестировании микрочипов (Подлесных, 2018) и «контрольный»

р333 пептид, который не взаимодействовал с CTLA-4Fc в предыдущих экспериментах.

Из данных, представленных на рис. 12, видно, что пептиды р346 и р333 не взаимодействуют с рекомбинантным белком-лигандом В7-1Fc. Однако отмечается дозозависимое связывание СТLА-4Fc с пептидом р346, но не с контрольным р333 пептидом. Важно отметить, что Fc часть рекомбинантного СТLА-4Fc не участвует во взаимодействии с р346 пептидом, так как В7-1Fc молекула содержащая идентичный Fc домен не связывается с данным пептидом.

Таким образом, результаты данных экспериментов подтверждают специфическое взаимодействие p346 пептида с внеклеточной частью CTLA-4 молекулы.

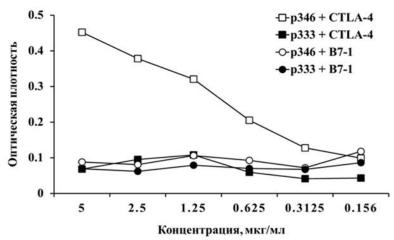


Рисунок 12. Взаимодействие СТLА-4Fc с синтетическим пептидом p346. Синтетические пептиды p346 и p333 (контроль) были сорбированы (иммобилизованы) на 96-луночных планшетах в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный химерный белок СТLА-4Fc в концентрации 5 мкг/мл добавляли в «стартовые» лунки, с последующим pазведением до 0,156 мкг/мл. Взаимодействие СТLА-4Fc с синтетическими пептидами определяли с помощью мАТ против Fc части (фрагмента) иммуноглобулина человека, конъюгированными пероксидазой хрена. Аналогично для белка B7-1Fc.

Следующим шагом данного исследования было определение методом ИФА, возможности использования синтетических пептидов блокировать взаимодействие CTLA-4 с природным лигандом B7-1 (рис. 13). Для данных экспериментов были использованы 2 синтетических пептида, описанные выше «экспериментальный» р346, который специфически взаимодействовал с CTLA-4Fc и «контрольный» р333 пептид, который не взаимодействовал с белками CTLA-4Fc и B7-1Fc (рис. 12). Для CTLA-4Fc пептиды инкубировали c добавляли И иммобилизированным рекомбинантным белком В7-1 (без Fc фрагмента). Данные представленные на рис. 13, говорят о том, что инкубирование CTLA-4Fc в присутствии р346, но не р333 пептида снижает связывание СТLА-4 с В7-1, на 20%. Таким образом, данные результаты показывают, что пептид р346, который специфически взаимодействует CTLA-4 может частично блокировать c взаимодействие CTLA-4 с B7-1.

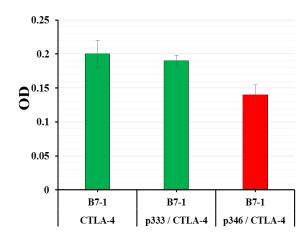


Рисунок 13. Блокирование взаимодействия СТLА-4 с B7-1 с использованием пептида p346. Рекомбинантный белок СТLА-4Fc (5 мкг/мл) инкубировали с пептидом p346 (8 мкг/мл) или с контрольным пептидом p333, в течении 2 ч и добавляли в лунки 96-луночного планшета с сорбированным рекомбинантным белком B7-1 (8 мкг/мл). Взаимодействие СТLА-4Fc с B7-1 (без Fc фрагмента) определяли с помощью антител (мАТ) против Fc части (фрагмента) иммуноглобулина человека, конъюгированными пероксидазой хрена HRP.

Вероятно, для более адекватного определения эффекта р346 пептида на блокаду взаимодействия СТLА-4 с B7-1 требуются более чувствительные, современные методы, такие как нанокалориметрия, поверхностный плазмонный резонанс или технологии биослойной интерферометрии ForteBIO. Также необходимо исследовать физиологический эффект блокады взаимодействия рецептора СТLА-4 с B7-1, с помощью пептидов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, в ходе данной работы были выявлены взаимодействующие с CTLA-4 молекулой. C помощью математического моделирования было показано, что пептид p346 взаимодействует с ⁹⁹МҮРРРҮ¹⁰⁴ петлей CTLA-4, которая отвечает за связывание CTLA-4 с B7-1 лигандом. Экспериментальные данные, полученные с помощью ИФА, подтверждают данные математического моделирования по специфичности взаимодействия CTLA-4 с p346 пептидом. Более того, p346 частично блокирует взаимодействие CTLA-4 с B7-1, что вероятно, обеспечит регулируемый эффект в модуляции иммунного ответа (терапии). Представленный пептид р346, является лидерной молекулой для разработки иммунотропных препаратов, для усиления иммунного ответа. Однако иммуномодулирующие свойства p346 пептида требуют подтверждения *in vitro* и *in* vivo, что будет являться продолжением работы автора по теме диссертации. Синтетические пептиды-блокаторы точек контроля иммунного ответа, могут быть мАТ иммунотерапии аутоиммунных альтернативой В И онкологических заболеваний. Они в сравнении с мАТ, имеют преимущества: малые размеры, для более эффективного проникновения в ткани/опухоли, низкую иммуногенность, что позволяет проводить не ограниченное количество инъекций, относительной простотой химического синтеза, что снижает стоимость препарата и обеспечит доступность для пациентов. Описанная стратегия актуальна и для поиска пептидов, взаимодействующих с другими молекулами, регулирующими иммунный ответ, например, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, B7-H5 и другие.

ВЫВОДЫ

- 1. Выявлены 119 пептидов из 330 тыс. пептидов, представленных на микрочипах, с которыми взаимодействие циркулирующих антител показало статистически значимое отличие (p<0.001) при сравнительном анализе плазмы крови пациентов с заболеванием рак молочной железы и здоровых доноров. Выявленные пептиды обеспечивают 95,1% чувствительности и 85,4% специфичности при классификации групп пациентов с диагнозом РМЖ и здоровых доноров.
- 2. Циркулирующие антитела плазмы крови пациентов с люминальным А, люминальным Б и базально-подобным («тройным негативным») молекулярно-биологическим подтипом рака молочной железы, имеют разный профиль взаимодействия с 634 пептидами, представленными на микрочипе.
- 3. С помощью методов биоинформатики определены общие аминокислотные мотивы пептидов, взаимодействующих с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов с заболеванием рак молочной железы и установлены гомологии этих пептидов с белками, участвующими в онкогенезе. Это может свидетельствовать, что изменение репертуара циркулирующих антител вызвано экспрессий определенных белков в тканях опухоли.
- 4. Определены с помощью микрочипов 19 пептидов и синтезированы 8 пептидов, специфически связывающиеся с молекулой СТLА-4, участвующей в регуляции иммунного ответа. С помощью математического моделирования показано энергетически оптимальное взаимодействие синтезированных пептидов с петлей МҮРРРҮ в структуре аминокислотной последовательности молекулы СТLА-4, которая обеспечивает связывание с лигандом В7-1.
- 5. Показано, что исследуемый синтетический пептид (p346) с аминокислотной последовательностью (YDPEYRNFWGCG), специфически связываясь с молекулой CTLA-4, блокирует взаимодействие рецептора CTLA-4 с лигандом B7-1.

ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты диссертационной работы могут быть использованы в разработке тест-систем для неинвазивной ранней диагностики злокачественных новообразований молочной железы и определения молекулярных подтипов данного заболевания, что будет способствовать развитию персонализированной медицины, подбору терапии и высокотехнологичному здравоохранению.

Полученные ходе исследования пептиды, специфически взаимодействующие с рецептором Т-лимфоцитов СТLA-4 (CD152) могли бы быть альтернативных лекарственных использованы при создании средств онкологических, иммунозависимых заболеваний, ВИЧ иммунотерапии адьювантов усиливающих иммуногенность вакцин.

Синтетические пептиды, с высокой специфичностью реагирующие с белкомрецептором CTLA-4, могут применяться для контроля качества при производстве рекомбинантных белков CTLA-4.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из списка BAK, Web of Science / Scopus

- 1. **Podlesnykh S.V.,** Abramova, K.E., Gordeeva, A., Khlebnikov, A.I., Chapoval, A.I. Peptide Blocking CTLA-4 and B7-1 Interaction // Molecules. 2021. V. 26. N. 2. E253.
- 2. **Подлесных С.В.,** Лампатов В.В., Хлебников А.И., Шаповал А.И. Молекулярный докинг и оценка пептидов, взаимодействующих с CTLA-4 // Биомедицинская химия. -2020. T. 66. № 2. C. 156-161.
- 3. **Подлесных С.В.,** Шаньшин Д.В., Колосова Е.А., Мурашкин Д.Е., Шапрова О.Н., Щербаков Д.Н., Шаповал А.И. Разработка стратегии поиска пептидных блокаторов белков в составе молекулярных точек контроля иммунного ответа // Биоорганическая химия. -2018. -44. N 2. C. 138-145.
- 4. **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Анисимов Д.С., Щербаков Д.Н., Рязанов М.А., Петрова В.Д., Johnston S.A., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Высокоспецифичный и чувствительный анализ репертуара сывороточных антител с помощью пептидных микрочипов у пациентов с диагнозом рак молочной железы // Клиническая лабораторная диагностика. -2017.-T.62.-N 9.-C.557-563.
- 5. Анисимов Д.С., **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Щербаков Д.Н., Петрова В.Д., Джонстон С.А., Лазарев А.Ф., Оскорбин Н.М., Шаповал А.И., Рязанов М.А. Анализ многомерных данных пептидных микрочипов с использованием метода проекции на латентные структуры // Математическая биология и биоинформатика. -2017. T. 12. N 2. C. 435-445.
- 6. Шаповал А.И., **Подлесных С.В.,** Колосова Е.С., Щербаков Д.Н. Новые точки контроля иммунного ответа для иммунотерапии онкологических заболеваний // Российский онкологический журнал. -2017. -T. 22. -№ 4. -C. 175-179.
- 7. **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Щербаков Д.Н., Шайдуров А.А., Анисимов Д.С., Рязанов М.А., Johnston S.A., Шойхет Я.Н., Петрова В.Д., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Взаимодействие антител сыворотки крови пациентов при раке молочной железы с синтетическими пептидами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2016. T. 161. No 6. C. 775-779.
- 8. Шаповал А.И., **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Требухов А.В., Щербаков Д.Н., Джонстон С.А., Петрова В.Д., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф. Анализ репертуара антител (иммуносигнатур) с помощью пептидных микрочипов для диагностики онкологических заболеваний // Российский онкологический журнал. 2015. Т. 20. \mathbb{N}_2 4. С. 53-54.
- 9. Chapoval A.I., **Podlesnykh S.V.,** Kolosova E.A., Shcherbakov D.N., Shoikhet J.N., Lazarev A.F., Vikhlyanov I.V., Sinkina T.V., Johnston S.A., Ilyichev A.A. Repertoire of circulating antibodies corresponding to molecular subtypes of breast cancer $/\!/$ J. Immunol. 2020. 204 (1 Supplement). P. 243.21.
- 10. Pisarev V.M., Shapoval A.I., Petrova M.V., **Podlesnykh S.V.,** Mitiashin A., Kalov A. Toward detecting the antibody signature(s) to predict life-threatening sepsis in chronic critical illness // Shock. -2020. T.53. N S1. C.96-97.

- 11. **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Щербаков Д.Н., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Вихлянов И.В., Синкина Т.В., Джонстон С.А., Ильичев А.А., Шаповал А.И. Определение молекулярных подтипов рака молочной железы на основе анализа репертуара циркулирующих антител с помощью пептидных микрочипов // Успехи молекулярной онкологии. -2019. T. 6. № 4. C. 106.
- 12. **Подлесных С.В.,** Шаньшин Д.В., Колосова Е.А., Мурашкин Д.Е., Щербаков Д.Н., Джонстон С.А., Ильичев А.А., Шаповал А.И. Использование пептидных микрочипов и библиотек фагового дисплея для создания иммунодиагностических средств на основе анализа репертуара антител. // ActaNaturae [спецвыпуск]. 2019. Т. 2. С. 74-75.
- 13. **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Анисимов Д.С., Щербаков Д.Н., Рязанов М.А., Johnston S.A., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Разработка блокаторов точек контроля иммунного ответа на основе синтетических пептидов для терапии онкологических заболеваний // ActaNaturae [спецвыпуск]. 2017. С. 162.
- 14. Chapoval A.I., **Podlesknykh S.,** Kolosova E., Anisimov D., Ryzanov M., Petrova V., Shcherbakov D., Johnston S., Lazarev A. Antibody repertoire analysis in sera of breast cancer patients using a random peptide microarray differentiates cases from controls with high specificity and sensitivity // J. Immunol. -2017.-198 (1 Supplement). -P. 76.19

Публикации в прочих научных изданиях

- 1. Шаповал А.И., **Подлесных С.В.,** Курчанова Е.А. Молекулярный подход к диагностике и лечению злокачественных новообразований до их визуализации // Проблемы клинической медицины. -2014. -№ 3. C. 14-20.
- 2. **Подлесных С.В.** Шаньшин Д.В., Колосова Е.А., Мурашкин Д.Е., Шапрова О.Н., Щербаков Д.Н., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Новая исследовательская платформа для создания иммунодиагностических и иммунотропных средств // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2018. С. 373.
- 3. **Подлесных С.В.,** Колосова Е.А., Анисимов Д.С., Щербаков Д.Н., Рязанов М.А., Петрова В.Д., Джонстон С.А., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Шаповал А.И. Микрочипы с пептидами со случайными аминокислотными последовательностями для определения иммуносигнатур и диагностики рака молочной железы // Материалы конференции «Биотехнология медицине будущего». 2017. С. 87.

РИД

1. Шаповал А. И., Лазарев А. Ф., Петрова В. Д., **Подлесных С.В.,** Рязанов М.А. «База данных клинико-патологических и морфологических параметров больных раком молочной железы для обнаружения биомаркеров при ранней диагностики заболевания»: RU 2017621486 / Алтайский государственный университет, Алтайский краевой онкологический диспансер. — № 2017621205; заявл. 26.10.2017; опубл. 14.12.2017