

## ЕСТЕСТВЕННЫЕ АНТИТЕЛА – НОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ, ДЕТЕКТИРУЕМЫЕ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЧИПА

Шилова Н.В.<sup>1,2</sup>, Хасбиуллина Н.Р.<sup>1,2</sup>, Полякова С.М.<sup>2</sup>, Ракитько А.С.<sup>2,3</sup>, Нокель А.Ю.<sup>2</sup>, Бовин Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.

<sup>2</sup> ООО «Семiotик», Москва.

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, механико-математический факультет, Москва.

### NATURAL ANTIBODIES ARE NEW BIOMARKERS DETECTED BY MICROCHIP

Shilova N.V.<sup>1,2</sup>, Khasbiullina N.R.<sup>1,2</sup>, Polyakova S.M.<sup>2</sup>, Rakitko A.S.<sup>2,3</sup>, Nokel A.Yu.<sup>2</sup>, Bovin N.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M.M. Shemyakin and Y.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Russian Federation, Moscow.

<sup>2</sup> Semiotik LLC, Moscow.

<sup>3</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Mechanics and Mathematics, Moscow.

Известно, что кровь млекопитающих, в том числе и человека, содержит естественные антитела, т.е. антитела, появление которых не связано с предварительной иммунизацией и их уровень практически не меняется в течение жизни. Они играют важную роль в надзоре за постоянно появляющимися трансформированными клетками, а также являются первой линией обороны против бактерий и вирусов наряду с дендритными клетками, натуральными киллерами и макрофагами. Большой интерес представляют естественные антигликановые антитела (АГАТ). С помощью микрочипа, лигандами которого служат гликаны, был исследован репертуар АГАТ у здоровых доноров [1,2]. Оказалось, что более половины гликанов чипа связывают сывороточные антитела. Большинство из выявленных АГАТ не описаны. Репертуар антител разных людей был похож, т.е. это действительно естественные антитела. Наблюдались и различия, которые отражали индивидуальный иммунный статус человека, что открывает перспективу поиска совершенно новых биомаркеров патологических состояний организма. Гликановый микрочип (ООО «Семiotик», Россия) позволяет фиксировать подобные изменения в уровнях антител с высокой точностью, при этом сотни активностей могут быть протестированы в одном эксперименте, что

очень удобно с технической точки зрения.

**Методы.** При разработке метода диагностики таких сложных с иммунологической точки зрения заболеваний как, например, рак (особенно, когда речь идет о ранней диагностике) использование только одного показателя недостаточно, необходимо использовать комбинацию маркеров – сигнатуру, т.е. комбинацию диагностически значимых антиуглеводных антител. Нами была разработана методология поиска сигнатуры по данным микрочипа, а также математический аппарат, названный «Иммунорулер» [3], который позволяет на основании выбранной сигнатуры дискриминировать «случаи» и «контроли», определять степень риска возникновения заболевания, а также прогнозировать его исход.

**АГАТ в диагностике рака.** В литературе описано множество заболеваний, при которых возникает aberrantное, т.е. неправильное, патологическое гликозилирование, влекущее за собой изменения в профиле АГАТ. Это, в первую очередь, онкология. Хорошо известными являются следующие опухоль-ассоциированные антигены углеводной природы: Томсена-Фриденрайха (TF), Tn и сиалил-Tn, GD2, GD3 и др. Достоверно установлено, что уровень антител к TF и Tn значительно меняется при онкотрансформации [4,5]. Наши исследования последних лет свидетельствуют, что

число подобных антител велико, возможно, многие десятки. Истинная специфичность части из этих антител до сих пор непонятна. Но, несмотря на это, антитела данного класса можно использовать как маркеры заболеваний. Для проведения точной онкодиагностики необходим подход, опирающийся на набор маркеров, то есть диагностическая сигнатура, и большой выбор (см. выше) позволяет это делать. С помощью гликанового микрочипа были найдены сигнатуры для таких видов рака, как мезотелиома [3], рак молочной железы [6] и рак яичника [7], колоректальный рак [8]; при этом чувствительность и специфичность такого мультифакторного подхода заметно превышает показатели стандартных тестов [7,8]. Кроме того, была показана успешная возможность использования микрочипа для предсказания эффективности терапии рака молочной железы сочетанной терапией химиотерапевтиком и герцептином (данные не опубликованы).

#### Перспективы использования микрочипа.

Аберрантное гликозилирование и следующие за ним изменения в уровнях сывороточных АГАТ, характерны не только для рака, но и для целого ряда аутоиммунных заболеваний [9-11], при нарушениях функций женской репродуктивной системы [12,13] и других системных заболеваний. Поэтому поиск сигнатур не только позволит создать более точные диагностикумы, но и сделать возможным диагностику заболеваний, которые сложно идентифицировать, как, например, преэклампсия.

С помощью микрочипа можно искать терапевтические сигнатуры, в результате чего появится совершенно новый класс лекарств – терапевтические АГАТ, обладающие множеством преимуществ, в первую очередь тем, что они являются нормальными для человека. Например, естественные антитела человека к дисахариду LeC – специфическому антигену клеток рака молочной железы — уже планируется использовать в терапевтических целях [14].

Знание профиля АГАТ необходимо для выявления не нейтрализующих АГАТ, вызывающих антителозависимое усиление инфекции, с целью их специфического удаления [15], при поиске антител, усиливающих иммунитет против опухолевых клеток [16]. Не меньший интерес представляет использование АГАТ в предсказании эффективности/безопасности алло- и ксенотрансплантации, переливания крови, вакцинации.

Таким образом, АГАТ являются отражением состояния нашего здоровья и представляют собой широчайший резервуар потенциальных

маркеров для диагностики и прогностики самых различных заболеваний. Анализ профиля АГАТ, полученного с помощью гликанового микрочипа, позволит предсказывать эффективность назначаемых препаратов, следить за ходом лечения и влиять на его эффективность, а также создавать принципиально новые лекарства.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-14-00579.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Huflejt ME, Vuskovic M, Vasiliu D, Xu H, Obukhova P, Shilova N, Tuzikov A, Galanina O, Arun B, Lu K, Bovin N. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Molecular Immunology* 2009; 46, 3037-3049.
2. Bovin NV. Natural antibodies to glycans. *Biochemistry (Moscow)* 2013, 78, 786-797.
3. Vuskovic M, Xu H, Bovin N, Pass H, Huflejt M. Processing and analysis of serum antibody binding signals from Printed Glycan Arrays for diagnostic and prognostic applications. *Int J Bioinformatics Res Appl* 2011; 7: 402-426.
4. Smorodin JP, Kurtenkov OA, Miljukhina LM, Sergeyev BL, Hint EK, Bovin NV, Lipping AA, Chuzhmarov VJ. Thomsen-Friedenreich antigen-specific IgM antibodies: diagnostic significance for gastric and breast cancer. *Exp Oncol* 1997; 19: 338-342.
5. Smorodin E, Sergeyev B, Klaamas K, Chuzmarov V, Kurtenkov O. The Relation of the Level of Serum Anti-TF, -Tn and -Alpha-Gal IgG to Survival in Gastrointestinal Cancer Patients. *Int J Med Sci* 2013; 10:1674-1682.
6. Huflejt ME, Blixt O, Vuskovic M, Xu H, Shaw L, Reuben JM, Kuerer H, Cristofanilli M. Glycan array identifies specific signatures of anti-glycan autoantibodies in sera of breast cancer patients: diagnostic, prognostic and therapeutic opportunities. (2005) *Br. Cancer Res Treat* 2005; 94(Suppl. 1), S85.
7. Jacob F, Goldstein DR, Bovin NV, Pochechueva T, Spengler M, Caduff R, Fink D, Vuskovic MI, Huflejt ME, Heinzelmann-Schwarz V. Serum antiglycan antibody detection of nonmucinous ovarian cancers by using a printed glycan array. *Int. J. Cancer* 2012; 130, 138-146.
8. Butvilovskaya VI, Popletaeva SB, Chechetkin VR, Zubtsova ZI, Tsybul'skaya MV, Samokhina LO, Vinnitskii LI, Ragimov AA, Pozharitskaya EI, Grigor Eva GA, Meshalkina NY, Golyshcheva SV, Shilova NV, Bovin NV, Zasedatelev AS, Rubina AY. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips. *Cancer Med* 2016; 5(7), 1361-1372.
9. Mavarakis E, Kim K, Shimoda M, Gershwin ME, Patel F, Wilken R, Raychaudhuri S, Ruhaak LR, Lebrilla CB. Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: a critical review. *J Autoimmun* 2015; 57, 1-13.
10. Willison HJ. Glycoconjugates and neuroimmunological diseases. *Adv Neurobiol.* 2014;9:543-66.
11. D'Alessandro M, Mariani P, Lomanto D, Bachetoni A, Speranza V. Alterations in serum anti-alpha-galactosyl antibodies in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2002; 103(1), 63-68.
12. Ziganshina MM, Pavlovich SV, Bovin NV,

Sukhikh GT. Hyaluronic Acid in Vascular and Immune Homeostasis during Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Acta Naturae* 2016; 8(3), 59-71.

13. Sukhikh GT, Ziganshina MM, Nizyaeva NV, Kulikova GV, Volkova JS, Yarotskaya EL, Kan NE, Shchyogolev AI, Tyutyunnik VL. Differences of glycocalyx composition in the structural elements of placenta in preeclampsia. *Placenta* 2016; 43, 69-76.

14. Tupitsyn NN, Udalova YA, Galanina OE, Kadagidze ZG, Borovkova NB, Obukhova P, Shilova NV,

Bovin NV. Tumor-associated glycan LewisC in breast cancer. *Hematopoiesis immunology* 2009; 2, 45-54.

15. Bello-Gil D, Manez R. Exploiting natural anti-carbohydrate antibodies for therapeutic purposes. *Biochemistry (Mosc)* 2015; 80(7), 836-845.

16. Whalen GF, Sullivan M, Piperdi B, Wasseff W, Galili U. Cancer immunotherapy by intratumoral injection of  $\alpha$ -gal glycolipids. *Anticancer Res* 2012; 32(9), 3861-3868.

## КОМПЛЕКС КАТИОННОГО ПЕПТИДА И МОЛЕКУЛ МИРНК ПРОТИВ ИЛ-4 ЭФФЕКТИВНО СНИЖАЮТ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬ БРОНХОВ И АЛЛЕРГИЧЕСКОЕ ВОСПАЛЕНИЕ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Зарецкая М.А., Камышников О.Ю. Хаитов М.Р.

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

### CELL PENETRATING PEPTIDE COMPLEXED WITH SIRNA TARGETED TO IL-4 DECREASE AIRWAY INFLAMMATION AND AIRWAY HYPER RESPONSIVENESS IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC ASTHMA

Shilovskiy I.P., Sundukova M.S, Gaisina A.R., Zaretskaya V.A., Kamyshnikov O.Y., Khaitov M.R.

National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow

**Б**ронхиальная астма (БА) является одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей, от которого страдают как взрослые, так и дети. Данное заболевание распространено среди разных слоев населения, имеет высокий уровень смертности, а при отсутствии квалифицированной помощи приводит к ухудшению качества жизни населения и экономическим потерям для государства [1]. В виду продолжающегося роста заболеваемости БА остается актуальной задача поиска значимых биологических мишеней с целью разработки новых способов терапии.

Недавние успехи в области молекулярной иммунологии, генетики и биоинформатики позволили выявить гены, вовлеченные в патогенез БА. Исследования на нокаутных животных, а также с применением моноклональных антител, установили ключевую роль ИЛ-4 в патогенезе данного заболевания. В частности, ИЛ-4 способствует синтезу В-клетками специфических IgE-антител,

миграции эозинофилов в участок воспаления и гиперреактивности бронхов [2–5]. Данные исследования создали предпосылки для появления лекарственных препаратов нового типа, способных регулировать активность патогенетически-значимых генов.

К настоящему моменту известен ряд технологий для сиквенс-специфической регуляции генов (АСО, Рибозимы, ДНКзимы, EGS, ДНК-ловушки, U1-адапторы), однако использование феномена интерференции РНК является наиболее перспективным с точки зрения эффективности и экономической целесообразности [6]. Под интерференцией РНК понимают естественный механизм регуляции экспрессии генов в клетке с участием фермента Dicer и молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Однако одна из главных проблем на пути внедрения миРНК-содержащих препаратов в медицинскую практику является низкая эффективность их проникновения в клетки-мишени. Поэтому для доставки