



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(52) СПК

C07K 7/06 (2022.01); A61K 38/08 (2022.01)

(21)(22) Заявка: 2021130576, 19.10.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.10.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.10.2021

(45) Опубликовано: 29.04.2022

(15) Информация о коррекции:

Версия коррекции №1 (W1 C1)

(48) Коррекция опубликована:

07.07.2022 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

Подлесных Степан Васильевич (RU),
Шаповал Андрей Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Алтайский государственный
университет" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: PODLESNYKH S.V. et al., Peptide
Blocking CTLA-4 and B7-1 Interaction,
Molecules, 2021, v. 26, n. 2, p. 253.ПОДЛЕСНЫХ С.В. и др., Молекулярный
докинг и экспериментальная оценка пептида,
взаимодействующего с CTLA-4.
Биомедицинская химия, 2020, т. 66, Н. 2, с. 156-
161. ШАПОВАЛ А.И. и др., Новые точки
контроля иммунного ответа для
иммунотерапии (см. прод.)

(54) Нонапептидный антагонист взаимодействия молекул CTLA-4 и B7-1

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к пептидным антагонистам CTLA-4, и может быть использовано при разработке иммуотропных препаратов, для регуляции механизмов иммуносупрессии, активации и пролиферации Т-лимфоцитов, для оценки экспрессии рецептора CTLA-4 у пациентов, в том числе с ВИЧ, и для контроля качества при производстве

рекомбинантных белков. Синтезирован нонапептид с аминокислотной последовательностью NWRQFRGCG. Изобретение обеспечивает получение нонапептида со способностью специфически связываться с молекулой контроля иммунитета рецептором CTLA-4 (CD 152) человека и блокировать взаимодействие его с лигандом B7-1 (CD80). 5 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

онкологических заболеваний. Российский онкологический журнал, 2017, т. 22, Н. 4, с. 175-179. ПОДЛЕСНЫХ С.В. и др., Разработка стратегии поиска пептидных блокаторов белков в составе молекулярных точек контроля иммунного ответ. Биоорганическая химия, 2018, т. 44, Н. 2, с. 138-14. RU 2356579 C1, 27.05.2009.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(52) CPC

C07K 7/06 (2022.01); A61K 38/08 (2022.01)(21)(22) Application: **2021130576, 19.10.2021**(24) Effective date for property rights:
19.10.2021

Priority:

(22) Date of filing: **19.10.2021**(45) Date of publication: **29.04.2022**

(15) Correction information:

Corrected version no1 (W1 C1)

(48) Corrigendum issued on:

07.07.2022 Bull. № 19

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Podlesnykh Stepan Vasilevich (RU),
Shapoval Andrej Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**(54) **THE NONAPEPTIDE ANTAGONIST OF THE INTERACTION OF CTLA-4 AND B7 -1 MOLECULES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, specifically to peptide antagonists CTLA-4, and can be used in development of immunotropic preparations, for regulation of mechanisms of immunosuppression, activation and proliferation of T-lymphocytes, for assessment of expression of CTLA-4 receptor in patients, including HIV, and for quality control in

production of recombinant proteins. A nona-peptide with an amino acid sequence NWRQFRGCG is synthesized.

EFFECT: the invention provides a nonapeptide with the ability to specifically bind to the immunity control molecule of the human CTLA-4 (CD 152) and block its interaction with the b7 -1 (CD80) ligand.

1 cl, 5 dwg, 3 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к синтетическим пептидам, которые обладают способностью (свойством) специфически связываться с молекулой контроля иммунного ответа CTLA-4 (CD 152). Изобретение может иметь потенциальное применение в иммунотерапии. В частности, изобретение относится к синтетическим пептидам, которые специфически взаимодействуют с белком CTLA-4 (CD 152) и могут регулировать биологическую активность рецептора CTLA-4 (на Т-лимфоцитах и растворимой форме sCTLA-4) путем их прямого связывания с указанным рецепторным белком, препятствуя (блокада) или снижая взаимодействие с лигандом B7-1 (CD80), таким образом, позволяют регулировать активность Т-лимфоцитов при развитии иммунного ответа. Данный пептид по изобретению также можно использовать для оценки экспрессии рецептора CTLA-4 (CD 152) у пациентов и для контроля качества при производстве рекомбинантных белков. Пептид по данному изобретению может быть использован при разработке лекарственных форм пептидного препарата для терапии патологий иммунитета, онкологических и инфекционных заболеваний (ВИЧ, гепатит) и другого, где требуется блокада взаимодействия рецептора CTLA-4 и лиганда B7-1.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Два сигнала требуются для сбалансированного функционирования Т-лимфоцитов. Первый сигнал опосредуется взаимодействием рецептора Т-клеток (TCR) с антигенами в контексте МНС (англ. МНС, «major histocompatibility complex» - главный комплекс гистосовместимости). Второй сигнал зависит от реакции лигандов семейства B7 с рецепторами, которые экспрессируются на поверхности Т-лимфоцитов [1-3]. Рецепторы лигандов семейства B7, представленные на поверхности Т-лимфоцитов, доставляют как стимулирующие, так и ингибирующие сигналы, которые обеспечивают активацию или супрессию иммунного ответа, соответственно поддержание иммунологического гомеостаза [2-5]. К ингибирующим относится «цитотоксичный антиген-4 Т-лимфоцитов» рецептор CTLA-4 (CD 152) и является представителем суперсемейства белков иммуноглобулинов, взаимодействующий с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) лигандами, а также рецептор «программируемой смерти Т-лимфоцита» PD-1 (CD279), взаимодействующий с PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC) лигандами [6]. Данные молекулы относятся к молекулам контроля иммунитета (МКИ) (также известными как иммунологические контрольные точки - «чекпойнты», от англ. immunecheckpoints) [2, 3, 5, 7, 8].

В настоящее время для иммунотерапии рака используют моноклональные антитела, блокирующие взаимодействие рецептора CTLA-4 и его лиганда B7-1, для усиления активности Т-лимфоцитов и активации (усиления) иммунного ответа [3, 5, 6]. Существуют данные о том, что повышение экспрессии рецептора CTLA-4 коррелирует с прогрессией ВИЧ - увеличение вирусной нагрузки и уменьшение количества CD4+ Т-клеток. Попытки направленной регуляции активности CTLA-4, а именно блокирование молекулы CTLA-4, значительно улучшает функционирование ВИЧ-специфичных CD4+ Т-лимфоцитов [9]. В то же время существуют препараты, при аутоиммунных заболеваниях и трансплантации органов, на основе больших белковых молекул для усиления взаимодействия рецептора CTLA-4 и B7-1, для регуляции (ослабления) активности Т-лимфоцитов и ингибирования (снижения) иммунного ответа [10].

СУЩЕСТВУЮЩИЕ АНАЛОГИ

Сегодня в направлении разработки противоопухолевых препаратов отмечается рост количества исследований, в которых применяют рекомбинантные моноклональные антитела. При этом спрос препаратов специфических моноклональных антител (МАТ)

обгоняет спрос на вакцины. По прогнозам к 2022 г. рынок антител превысит 100 млрд долл. За рубежом уже существует большое количество кандидатных терапевтических препаратов противоопухолевых МКА, которые проходят доклинические и клинические испытания.

5 Производимые в России противоопухолевые препараты являются либо дженериками, либо биосимилярами зарубежных препаратов таргетных МАТ, которые способны специфически связывать определенные аминокислотные участки (эпитопы) антигенов/ белков/рецепторов, например CTLA-4 и PD-1 (на Т-лимфоцитах) или PD-L1, PD-L2, на
10 поверхности опухолевых клеток. Результаты клинических исследований показали, что инъекция моноклональных антител (МАТ), блокирующих МКИ (молекулы контроля иммунитета), такие как CTLA-4, PD-1 и PD-L1, усиливает противоопухолевый иммунитет и приводит к отторжению опухолей [4-8]. По результатам патентного поиска, на данный момент, зарегистрированными аналогами данного изобретения, по механизму и специфичности взаимодействия с МКИ являются моноклональные антитела.

15 Так наиболее близким, по техническому результату, аналогом нашего изобретения, являются препараты моноклональных антител - Иппилимумаб (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) и Тремелимумаб (Pfizer, New York, NY). Эти препараты представляют собой, полноценные по структуре, моноклональные антитела, способные через специфическое взаимодействие с рецептором CTLA-4 на Т-клетках, активировать
20 иммунную систему организма и нацеливают ее на опухоль [11]. Патент US 2005/0201994 (от 15.09.2020) от компании «Medarex LLC» демонстрирует несколько антител человека, специфически связывающие CTLA-4 и антитела, которые используют в иммунотерапии - препарат «Ипилимумаб». Другой патент US 6682736 B1 (от 27.01.2004) от компании «Pfizer Inc, Amgen Fremont Inc» демонстрирует несколько молекул МАТ человека к
25 CTLA-4, включая антитело CTLA-4 под названием «Тицилимумаб». Однако исследования данного антитела были прекращены. Другой патент US 5977318A (от 02.11.1999) от компании «Bristol Myers Squibb Co.» демонстрирует антитело к внеклеточному домену рецептора CTLA-4, направлен на блокирование взаимодействия с B7 лигандом. В базе патентов Евразийского союза известен патент №6972 (30.06.2006) от компании «Пфайзер
30 Инк.; Абдженикс, Инк.», который демонстрирует очередное моноклональное антитело (МАТ) человека к CTLA-4. В российской базе известны антитела (патент RU 2356579 (от 27.05.2009)), зарегистрированные компанией «ФАРМАЦИЯ ЭНД АПДЖОН КОМПАНИ ЛЛС (US)».

Однако представленные выше патенты демонстрируют применение одиночных или
35 композиционных моноклональных антител с различными модификациями и, не смотря на общий механизм специфического взаимодействия с рецептором CTLA-4 на Т-клетках, прямыми аналогами пептидов со случайной аминокислотной последовательностью по данному изобретению не являются.

Следует отметить, что химическая и физическая нестабильность, ряд побочных
40 эффектов и стоимость производства МАТ (моноклональных антител) для терапии ограничивает их широкое клиническое применение [12]. Поэтому поиск других ингибиторов молекул контроля иммунитета (МКИ) или их комбинации - актуальная проблема.

Среди наиболее близких (или прямых) аналогов изобретения в патентных базах
45 следует отметить ранее опубликованный нами патент RU 2747793 (от 14.05.2021). В документе описан пептид со способностью специфически связываться с молекулой контроля иммунного ответа CTLA-4. В отличие от пептида по патенту RU 2747793 (от 14.05.2021), пептид по изобретению имеет больший уровень специфичности

взаимодействия и блокирующего эффекта. Оба пептида отличаются по длине, структуре, аминокислотной последовательности, физико-химическим свойствам.

Низкомолекулярные агенты, такие как пептиды, блокирующие МКИ, могут решить некоторые проблемы, связанные с применением МАТ для терапии онкологических заболеваний [6, 12-15]. Мы предлагаем пептиды в качестве альтернативы моноклональным антителам.

В последние годы терапевтические пептиды привлекли больше внимания из-за их высокой стабильности, специфичности, низкой иммуногенности, относительно простого химического синтеза и небольших размеров, которые обеспечивают более эффективное проникновение в ткани или опухоль [16, 17].

В настоящее время около 140 пептидных препаратов (до 60 а.о.) разрешены для терапевтического применения в США [18]. Они используются для лечения кардиологических, инфекционных, метаболических, гематологических и других заболеваний [18-21]. Однако пока в доступных базах патентов нет пептидов, регулирующих (блокирующих) CTLA-4, что является достаточно актуальным направлением.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Известно, что активность Т-лимфоцитов можно временно регулировать с помощью моноклональных антител (МАТ), блокирующих взаимодействие рецептора CTLA-4 и его лиганда В7-1, и тем самым через активность Т-лимфоцитов и восстановление иммунного ответа оказывать влияние на супрессию и деграцию опухолей [2, 3, 5, 7, 8, 22, 23].

Моноклональные антитела (МАТ) имеют ряд недостатков: стоимость производства препаратов МАТ, низкие химическая и физическая стабильности, сниженная специфичность, высокая иммуногенность (молекулярная масса около - 150 кДа), трудности фармакокинетики антитела (плохие показатели экстравазальной диффузии и низкоэффективное проникновение в опухоль (и ткани)), длинная полужизнь АТ. Ряд побочных эффектов в терапии ограничивает их широкое клиническое применение [12].

Задача настоящего изобретения - синтез и оценка использования пептида в качестве альтернативы МАТ для исключения недостатков моноклональных антител.

Данное изобретение представляет собой гомомерный нонапептид (антагонист) со способностью специфически связываться с молекулой контроля иммунитета CTLA-4 (CD 152) человека, тем самым регулируя (блокируя) взаимодействие ее с лигандом В7-1 (CD80), и является гидрофильным по индексу GRAVY = -1.378, слабощелочным по изоэлектрической точке ИЭТ = 10.52, представляющий собой молекулу с химической формулой $C_{48}H_{70}N_{18}O_{12}S_1$ (SEQ ID NO: 1), состоящую из следующих 9 аминокислотных остатков NWRQFRGCG (фиг. 1 / SEQ ID NO: 1), имеющую молекулярную изотопную массу 1.12 кДа, суммарный заряд «+2» (при pH 7.0-7.2).

Пептид выявлен с помощью технологической платформы «пептидные микрочипы». Такой подход позволил найти пептиды, которые специфически взаимодействуют с молекулой-мишенью, в данном случае CTLA-4. Далее пептид был синтезирован, и специфичность его связывания с белком CTLA-4 была подтверждена с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Блокирующая способность выявленного синтетического пептида была также подтверждена с помощью ИФА. В изобретении представлен пептид, который специфически взаимодействует с CTLA-4, но не взаимодействует с В7-1. Пептид потенциально может быть использован как основа при разработке лекарственного средства в иммунотерапии заболеваний (например, онкологических).

Ранее было установлено, что активность Т-лимфоцитов можно временно регулировать с помощью моноклональных антител, блокирующих взаимодействие рецептора CTLA-4 и его лиганда В7-1, и тем самым через активность Т-лимфоцитов оказывать влияние на супрессию опухолей.

5 Можно получить аналогичное по механизму действие путем применения пептидов, которые не только способны связываться с CTLA-4, они также способны регулировать его биологическую активность.

Пептид по изобретению способен специфически связываться с CTLA-4, а именно такой пептид со способностью регулировать его биологическую активность
10 потенциально можно применять для лечения патологий, при которых необходимо временное регулирование активности Т-лимфоцитов, например для лечения онкологических или инфекционных заболеваний. Аналогично указанный пептид можно применять как инструмент для изучения биологической роли CTLA-4 для регуляции различных популяций Т-лимфоцитов (например, хелперных, памяти или регуляторных).
15 Таким образом, следует, что данное изобретение относится к пептидам, которые имеют иммунохимическое свойство или способность специфически связываться с CTLA-4 и блокировать его взаимодействие с лигандом В7-1. При этом, вероятно, указанный пептид дополнительно обладает способностью регулировать активность рецептора CTLA-4 для усиления активности Т-лимфоцитов. Таким образом, пептиды могут быть
20 изготовлены для использования в исследованиях, терапии и диагностике.

В одном из аспектов этого изобретения предложен способ выявления пептида, пример 1, описанного в этом документе, причем указанный способ включает протокол использования пептидного микрочипа, описанный в настоящем документе, и методы определения последовательности пептида.

25 В другом аспекте этого изобретения предложен способ, пример 2, который включает приведение образца, содержащего CTLA-4, в контакт с синтетическим пептидом (по изобретению) и детектирование образующихся иммунохимических комплексов синтетического пептида с белком CTLA-4.

В следующем из аспектов этого изобретения предложен способ, пример 3, который
30 включает приведение образца, содержащего CTLA-4 или В7-1, в контакт с синтетическим пептидом (по изобретению) и детектирование специфичности образующихся иммунохимических комплексов.

В другом из аспектов этого изобретения предложен способ, пример 3, который включает инкубацию белка CTLA-4 и синтетического пептида по изобретению, и
35 приведение данного комплекса в контакт с природным лигандом В7-1 для оценки способности блокирования пептидом по изобретению взаимодействия рецептора CTLA-4 и лиганда В7-1.

В целом данное изобретение предполагает потенциальное применение синтетического пептида в качестве активного вещества при производстве фармацевтической композиции
40 или лекарственного препарата для иммунотерапии рака.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1 показывает структурную формулу синтетического пептида по изобретению. Формула отражает аминокислотный состав пептида. N-концевой остаток располагается слева. С-концевой остаток расположен справа. Выполнено с использованием «PepDraw»
45 (<http://www.pepdraw.com/>).

Фиг. 2 представляет собой тепловую карту и результаты начальной идентификации анализа взаимодействия биологических молекул на микрочипе, которое происходит между пептидами и белками CTLA-4, В7-1 и В7-2. График показывает наличие

воспроизводимых положительных сигналов, что подтверждает специфическое связывание с CTLA-4, B7-1 и B7-2 с определенными пептидами на микрочипе. Приведенный результат является репрезентативным. 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).

Фиг. 3 демонстрирует средний уровень флуоресценции пептидов, взаимодействующих с образцами рекомбинантных белков B7-1Fc, B7-2Fc, CTLA-4Fc. Над каждой диаграммой написано количество пептидов, показавших похожие профили взаимодействия с рекомбинантными белками.

Фиг. 4 подтверждает специфичность взаимодействия CTLA-4Fc с синтетическим пептидом по изобретению p345. Синтетические пептиды p345 и p333 (контроль) были сорбированы (иммобилизованы) на 96-луночных планшетах в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный химерный белок CTLA-4Fc в концентрации 5 мкг/мл добавляли в «стартовые» лунки с последующим разведением до 0,156 мкг/мл. Взаимодействие CTLA-4Fc с синтетическими пептидами определяли с помощью МАТ против Fc части (фрагмента) иммуноглобулина человека, конъюгированного пероксидазой хрена.

Фиг. 5 подтверждает блокировку взаимодействия CTLA-4Fc с B7-1 с использованием пептида 345. Рекомбинантный белок CTLA-4Fc (5 мкг/мл) инкубировали с указанным пептидом (8 мкг/мл) в течение 2 ч и добавляли в лунки 96-луночного планшета с сорбированным рекомбинантным белком B7-1 (8 мкг/мл). Взаимодействие CTLA-4Fc с B7-1 определяли с помощью антител против Fc части иммуноглобулина человека, меченных с HRP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терминология

Для пояснения - «пептид», в данном документе, относится к полимеру, образованному 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), гидроксильные аминокислоты (серин и треонин), сульфитированные аминокислоты (цистеин и метионин), дикарбоксильные аминокислоты и их амиды (аспарагиновая кислота, аспарагин, глутаминовая кислота и глутамин), аминокислоты, содержащие две основные 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, которым является CTLA-4.

Применение пептидов данного изобретения

Пептид по изобретению обладает способностью связываться с белком CTLA-4, и, кроме того, потенциально способностью регулировать биологическую активность рецептора CTLA-4, и вероятно регулировать иммуносупрессорную активность Т-лимфоцитов.

В целом, данный пептид по изобретению возможно использовать при разработке препаратов для лечения заболеваний, при которых актуальна активация или

ингибирование иммунного ответа. Применение пептида по изобретению вместо антител обладает множеством преимуществ, так как пептиды представляют собой низкомолекулярные соединения и обладают более высокой способностью к диффузии и более коротким временем полужизни. Поскольку пептиды по изобретению обладают

5 высокой аффинностью к CTLA-4, но разрушаются быстрее антител, возможные неблагоприятные побочные эффекты можно контролировать посредством надлежащего дозирования пептидов по изобретению. Учитывая более продолжительный эффект применения препаратов моноклональных антител, вероятность усиления аутоиммунных заболеваний от их использования повышается. Применение коротких пептидов имеет

10 преимущества, поскольку они легко проникают в ткани и опухоль, что выгодно позволяет регулировать активности рецептора CTLA-4.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Выявление пептидов со способностью связываться с CTLA-4

Отбор пептидов со способностью связываться с CTLA-4 осуществляли с помощью

15 технологии пептидных микрочипов, содержащих 330034 пептида (со случайной аминокислотной последовательностью).

Начальная идентификация пептидов с помощью микрочипов

Для начальной идентификации пептидов, со способностью связываться с CTLA-4, использовали способ поиска, основанный на технологии пептидных микрочипов. Этот

20 способ позволяет идентифицировать пептиды, которые с высокой специфичностью связываются с белком CTLA-4.

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

25 микрочипа методом фотолитографии [24].

Аминокислотная последовательность и месторасположение каждого пептида на микроэррей известны. 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.

30 Все микрочипы на 60 мин помещали в индивидуальные чашки Петри, в которые добавлена дистиллированная вода. Далее в фосфатно-солевой буфер (ФСБ, Биолот) в течение 30 мин, инкубация при низких скоростях Biosan OS-20 (Biosan) орбитального шейкера. Затем пептидные микрочипы фиксировались в штативах кюветы EasyDip и промывали полосканием в 3 свежих растворах ФСБТ (ФСБ + 0,25% Твин 20, «Helicon») и дистиллированной воде. После предподготовки центрифугированием в течение 5 мин при 800 об/мин микрочипы высушивали и далее размещали в гибридизационную кассету («Arrait Corporation») с силиконовой прокладкой-разделителем, отделяющую между собой все 24 микроэррей на микрочипе. Во все лунки (24) кассеты, соответствующей микроэррей (24) микрочипа, добавляли по 150 мкл инкубационного раствора,

35 и содержащего ФСБТ и 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА, «Amresco»).

40 Поверхность кассеты закрывали пленкой, и микрочипы инкубировали в течение 1 ч. Перед началом следующего этапа содержимое каждой лунки удалялось. Далее вносили 75 мкл инкубационного раствора. Образцы анализируемых рекомбинантных химерных белков CTLA-4Fc, B7-1Fc, B7-2Fc (R&D Systems) готовили в концентрации 125 нМ с инкубационным раствором. Готовые растворы белков добавляли, в 3 повторях, в лунки кассеты для гибридизации в объеме 75 мкл, поверхность кассеты и лунки покрывали пленкой и накрывали крышкой, инкубировали в течение 60 мин (22-24°C) на орбитальном шейкере при 250 об/мин. Завершая инкубацию и применяя промыватель

для микропланшета BioTek ELx50 (BioTek Instruments), микрочип промывался 3 повторностями свежеприготовленного ФСБТ и раствором для промывки (ФСБТ + 1% БСА).

Разбор кассет и извлечение микрочипов проводилось в контейнерах с дистиллированной водой, избегая пересушивания. Микрочип укладывали в планшеты из четырех лунок, и залитые растворы «вторичных» антител против IgG человека (5 мл/лунку) с флюорофором Alexa Flour 647 («Life Technologies»)) 75 пг/мл в инкубационном растворе. Планшеты с микрочипами и «вторичными» антителами закрывали темной крышкой, инкубировали при температуре 22-24°C в течение 60 мин на низкой скорости орбитального шейкера. Затем микрочипы, находящиеся в кювете EasyDip, промыли полосканием через 3 свежим раствором ФСБТ, в дистиллированной воде и в течение 5 мин высушивали центрифугированием (800 об/мин).

Высушенные микрочипы были сканированы в двухлазерном сканере высокого разрешения InnoScan 900 AL (Innopsys) на длинах волн 632 и 535 нм. Процесс оцифровывания осуществляли с помощью программы Marix (v. 7.3.1), оценивали размер, положение и интенсивность флуоресценции по каждому пептиду. Оцифрованные данные анализировали методами математической (статистической) обработки.

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. Адресация пептидов производилась для анализа флуоресценции и определения аминокислотной последовательности пептидов, таким образом для каждой сканированной микроматрицы был установлен GAL-файл (сетка). В ходе анализа, из массива данных получаемых в результате сканирования и оцифровывания 1-го микроэрей (микроматрицы) пептидного микрочипа, были определены пептиды, для которых был отмечен максимальный уровень флуоресценции. Такие пептиды считались взаимодействующими с рекомбинантным белком CTLA-4. Далее эти пептиды 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 микроэрей анализировали с использованием фильтров интенсивности флуоресценции. Нормализацию полученных данных интенсивности флуоресценции проводили с помощью алгоритма квантильной нормализации [25-27]. 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 [26-29]. 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 $p < 0,001$.

Выявление пептидов, взаимодействующих с молекулами белков CTLA-4Fc, B7-1Fc

B7-2Fc на пептидных микрочипах

Методами, описанными выше, из 330 тыс. пептидов, представленных на микрочипе, были выбраны до 350 пептидов, которые специфически взаимодействуют с рекомбинантными химерными белками B7-1Fc, B7-2Fc, CTLA-4Fc. Фиг. 2 отражает результаты иерархической кластеризации интенсивностей флуоресценций пептидов, взаимодействующих с определенными молекулами, указанными внизу рисунка.

Результаты трех экспериментальных повторов для каждой молекулы, формируют один кластер. Это свидетельствует о высокой воспроизводимости данных, между отдельными микрочипами и подтверждает специфичность взаимодействия пептидов с рекомбинантными белками. Имеются некоторые пептиды, которые взаимодействуют сразу с двумя различными белками. Эти результаты свидетельствуют о присутствии пептидов, выявленных среди множества других, представленных на микрочипе и взаимодействующих с высокой аффинностью и строгой специфичностью с определенными белками. Фиг. 3. демонстрирует средние значения интенсивности флуоресценции, обусловленной взаимодействием пептидов на микрочипе с рекомбинантными белками B7-1 и B7-2. Эти костимуляторные молекулы в естественных условиях представлены на антигенпрезентирующих клетках и являются лигандами для ингибирующего рецептора CTLA-4 и активирующего рецептора CD28 [6, 22, 30].

На фиг. 3 (а) представлены данные по 329 пептидам, которые взаимодействуют как с B7-1, так и с B7-2. Мы предполагаем, что некоторые из этих пептидов способны регулировать функциональную активность обоих лигандов. На фиг. 3 (б) показаны результаты, свидетельствующие о том, что есть пептиды, взаимодействующие только с B7-1, а фиг. 3 (в) представлены пептиды, специфически реагирующие только с B7-2. Таким образом, с помощью пептидных микрочипов могут быть выбраны пептиды, которые потенциально являются универсальными блокаторами B7-1- и B7-2-лигандов, и пептиды, специфически взаимодействующие и регулирующие один из лигандов, на выбор. Кроме терапевтического применения этих пептидов для регуляции иммунного ответа, такие молекулы могут быть полезными для ответа на ряд неразрешенных вопросов. Для чего существуют лиганды с дублирующими функциями? Есть ли у этих лигандов уникальные функции? До сих пор не известно, существуют ли уникальные функции у лигандов B7-1 и B7-2 при связывании с различными рецепторами - CD28 (активация) и CTLA-4 (ингибирование). Пептидные микрочипы и пептиды могут помочь ответить на этот фундаментальный вопрос.

Фиг. 3 (г) показывает пептиды, которые специфически взаимодействуют только с белком CTLA-4Fc. В этой группе мы обнаружили 19 пептидов из 330 тыс., представленных на микрочипе. Мы предполагаем, что некоторые из этих аминокислотных последовательностей могут быть использованы для прямого регулирования, вероятно, блокирования ингибиторных функций CTLA-4. Тот факт, что для любого из тестируемых рекомбинантных белков 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 костимуляторными белками или так называемыми молекулами контроля иммунитета. Мы определили 19 кандидатов, взаимодействующих с ингибирующей молекулой рецептора CTLA-4. В ходе анализа выявлены 19 пептидов для CTLA-4 из них были синтезированы 8 пептидов.

Для оценки иммунохимических свойств и подтверждения специфичности

взаимодействия, методом иммуноферментного анализа, были отобраны 2 синтетических пептида, в частности пептид по изобретению и «контрольный» пептид. Получение пептидов

Пептид по изобретению можно получать стандартными способами синтеза, например, с помощью способов твердофазного синтеза или синтеза пептидов в растворе. 5 Степень чистоты можно определять, например, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Пептид по изобретению можно получить, с помощью пептидного синтеза, в рамках стандартных протоколов, например, с использованием способа Атертона с Fmoc.

Исследуемые пептиды изготавливали с использованием методов классического химического синтеза пептидов в растворе. Синтез каждого пептида проводили на 2,4 10 г 4-гидрокси-метилфенилоксиметил полистирола (полимер Ванга) с нагрузкой OH-групп 0,5 ммоль/г с использованием 3-кратных избытков аминокислот с ацетилированием непрореагировавших аминогрупп. Присоединение первой аминокислоты к полимеру проводили в ручном режиме, наращивание пептидной цепи 15 проводили в 24 реакторном синтезаторе Syro XR (Швеция). Степень чистоты пептидов определяли методом ВЭЖХ. ВЭЖХ пептидов осуществляли с помощью хроматографической системы HPLC Gilson 811 на колонке Waters Symmetry C18 3.5 мкм (4.6×75 мм) скорость потока элюента 1 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 226 нм. Перед началом процедуры хроматографическую колонку уравнивали 20 посредством пропускания элюента (80% растворителя А, 20% растворителя Б) до постоянного значения оптической плотности элюата. Растворитель А: 0.1% раствор TFA в воде. Растворитель Б: 0.1% раствор TFA в ацетонитриле. Полученные лиофилизированные пептиды хранили при -20°C. Для проведения экспериментальной работы, пептиды готовили с использованием растворителя в формате фосфатно-солевого 25 буфера PBS (pH 7.3-7.5), оставшиеся образцы хранили при 4°C. Пептид, полученный путем химического синтеза, представляет собой молекулу, общей формулой $C_{48}H_{70}N_{18}O_{12}S_1$ (SEQ ID NO: 1), состоящую из следующих 9 аминокислотных остатков NWRQFRGCG.

ПРИМЕР 2. Оценка и подтверждение специфичности пептида по изобретению
Иммуноферментный анализ 30

Специфичность связывания выявленного пептида по изобретению с молекулами CTLA-4, определяли методом прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). С целью детекции образуемых «белок-пептидных» комплексов, использовали рекомбинантные белки CTLA-4Fc, B7-1/CD80Fc («R&D Systems», США) содержащие 35 Fc-фрагменты иммуноглобулинов человека. Для определения связывания рекомбинантного белка использовали конъюгат вторичных моноклональных антител против IgG1 человека (Fc-специфические) с пероксидазой хрена («Invitrogen», США). Перед началом работы 96-луночные планшеты Costar («Corning», США), для надежной сорбции пептидов, были обработаны глутаровым альдегидом (0.125%) в объеме 200 40 мкл/лунка, инкубация составляла 2 ч при комнатной температуре. После инкубации, планшет промывали водой, остатки воды вытряхивали, просушивали планшет. Далее в лунках этих 96-луночных планшетов, были сорбированы синтетические пептиды (100 мл/лунка) с концентрацией 1 мкг/мл в сорбционном фосфатно-солевом буфере при 4°C в течение ночи. После этого производилась блокировка планшетов в течении 2-х ч при 45 комнатной температуре с раствором PBS, содержащим 2% бычий сывороточный альбумин (БСА) и 0,05% Tween 20, в каждую лунку планшета добавляли 200 мкл раствора. Затем вносили разные концентрации исследуемых образцов CTLA4Fc и B7-1/CD80Fc (начальная концентрация 5 мкг/мл), в объеме 100 мкл на лунку (две лунки на

каждый образец).

Разведения образцов рекомбинантного белка готовили в блокирующем растворе, содержащем 1% BSA. 96-луночные планшеты с образцами инкубировали 1 час при 37°C. По окончании инкубации проводили трехкратную отмывку (250 мкл/лунка) в автоматическом вошере («BioTek», Россия) с PBST, т.е. раствором PBS, содержащим 0,05% Tween 20. Затем в лунки планшета, вносили 100 мкл/лунку раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена (1:10000). После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз раствором PBST и добавляли (50 мкл/лунку) раствор тетрамethylбензидина (ТМВ) субстрата. Планшеты выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1-5 мин. Остановку реакции проводили внесением во все лунки планшета 50 мкл 1М H₂SO₄. Оптическую плотность реакции фиксировали стандартно на фотометре для планшетов, модель iMark («Bio-Rad», США).

Специфичность взаимодействия пептида по изобретению с белком CTLA-4

Таким образом, используя иммуноферментный анализ, были протестированы 2 синтетических пептида, пептид по изобретению (NWRQFRGCG), для удобства здесь назван «р345», который взаимодействовал с CTLA-4Fc при тестировании микрочипов (пример 1) и «контрольный» пептид EGLNRPSGGCG, с номером р333, не взаимодействующий с CTLA-4Fc.

На фиг. 4 показаны результаты многократного серийного тестирования, методом иммуноферментного анализа, из рисунка видно, что пептиды р345 и р333 (контроль) не взаимодействуют с рекомбинантным белком-лигандом B7-1Fc. Однако отмечается высокий уровень специфического взаимодействия белка CTLA-4Fc с пептидом р345, при этом CTLA-4Fc не взаимодействует с контрольным пептидом. Следует отметить, взаимодействие CTLA-4 Fc с пептидом р345 имеет дозозависимый характер.

Важно заметить, что Fc часть рекомбинантного CTLA-4Fc, не участвует во взаимодействии с пептидом по изобретению р345, так как B7-1Fc молекула содержащая, такую же аминокислотную последовательность Fc, и эта Fc-часть тоже не связывается с данным пептидом.

Таким образом, в ходе данной работы было показано, что полученный синтетический пептид по изобретению может, взаимодействует с рекомбинантным белком костимуляторной молекулы CTLA-4, которая отвечает за связывание CTLA-4 рецептора с B7-1 лигандом. Экспериментальные данные, полученные с помощью ИФА, демонстрируют и подтверждают специфичность взаимодействия молекул CTLA-4 и пептида по изобретению.

ПРИМЕР 3. Оценка и подтверждение способности пептида р345 блокировать взаимодействие CTLA-4Fc с B7-1.

Иммуноферментный анализ

Определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). С целью детекции образуемых «белок-пептидных» комплексов, использовали рекомбинантные белки CTLA-4Fc, B7-1/CD80Fc («R&D Systems», США), содержащие Fc-фрагменты иммуноглобулинов человека. Для определения связывания рекомбинантного белка, использовали конъюгат вторичных моноклональных антител против IgG1 человека (Fc-специфические) с пероксидазой хрена («Invitrogen», США). Перед началом работы 96-луночные планшеты Costar («Corning», США), для надежной сорбции пептидов (контроль взаимодействия с CTLA-4), были обработаны глутаровым альдегидом (0,125%) в объеме 200 мкл/лунка, инкубация составляла 2 ч при комнатной температуре. После инкубации, планшет промывали водой, остатки воды вытряхивали, просушивали планшет. Далее в лунках этих 96-луночных планшетов, были сорбированы B7-1/CD80Fc

(100 мл /лунка) с концентрацией 8 мкг/мл в сорбционном фосфатно-солевом буфере при 4°C в течение ночи. После этого производилась блокировка планшетов в течение 2-х ч при комнатной температуре с раствором PBS, содержащим 2% бычий сывороточный альбумин (BSA) и 0,05% Tween 20, в каждую лунку планшета добавляли 200 мкл раствора. Затем вносили разные концентрации исследуемых образцов CTLA4Fc (концентрация 5 мкг/мл), в комплексе с пептидом p345 (концентрация 8 мкг/мл), в объеме 100 мкл на лунку (две лунки на каждый образец). Разведения образцов рекомбинантного белка (с пептидом p345), готовили в блокирующем растворе, содержащем 1% BSA. 96-луночные планшеты с образцами инкубировали 1 час при 37°C. По окончании инкубации проводили трехкратную отмывку (250 мкл/лунка) в автоматическом вошере («BioTek», Россия) с PBST, т.е. раствором PBS, содержащим 0,05% Tween 20. Затем в лунки планшета, вносили 100 мкл/лунку раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена (1:10000). После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз раствором PBST и добавляли (50 мкл/лунку) раствор тетраметилбензидина (ТМБ) субстрата. Планшеты выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 1-5 мин. Остановку реакции проводили внесением во все лунки планшета 50 мкл 1М H₂SO₄. Оптическую плотность реакции фиксировали стандартно на фотометре для планшетов, модель iMark («Bio-Rad», США).

Способность пептидар345 блокировать взаимодействие CTLA-4Fc с природным лигандом B7-1.

Для данных экспериментов были использованы 2 синтетических пептида, описанные выше, пептид по изобретению NWRQFRGCG (p345), который специфически взаимодействовал с CTLA-4Fc и «контрольный» p333 пептид, который не взаимодействовал с белками CTLA-4Fc и B7-1Fc (фиг.4).

Для этого пептид по изобретению и контрольный пептид инкубировали с CTLA-4Fc и добавляли в лунки с иммобилизованным рекомбинантным белком B7-1 (без Fc фрагмента). Данные представленные на фиг.5 говорят о том, что инкубирование CTLA-4Fc в присутствии пептида по изобретению (p345) снижает (блокирует) на 45% связывание CTLA-4 с лигандом B7-1, что не выявлено для «контрольного» (p333) пептида.

Таким образом, данные результаты отражают, способность пептида по изобретению (p345), который специфически взаимодействовал с CTLA-4, частично блокировать взаимодействие рецептора CTLA-4 с его природным лигандом B7-1. Данный факт позволяет предположить, что пептиды в качестве лекарственных препаратов, потенциально, могут иметь более щадящие (регулируемые) эффекты в терапии заболеваний, сопровождающихся нарушением иммунного ответа. Однако для этого требуется проведение доклинических и клинических исследований.

Источники информации

1. Podlesnykh S.V., Shanshin D.V., Kolosova E.A., Murashkin D.E., Shaprova O.N., Shcherbakov D.N., Chapoval A.I. Development of Search Strategy for Peptide Inhibitors of Immune Checkpoints // Russ. J. Bioorgan. Chem. - 2018. - V. 44. - P. 150-157.

2. Шаповал А.И., Шаповал С.П., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н. Молекулы контроля иммунитета семейства B7. Часть 1. Общая характеристика и первые представители: B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2 и B7-DC // Биоорганическая химия. - 2019. - Т. 45. - № 4. - С. 348-364.

3. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммуноterapia опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов») // Медицинская иммунология. - 2015. - Т. 17. - № 5. - С. 395-406.

4. Sharma P, Allison J.P. The future of immune checkpoint therapy // *Science*. - 2015. V. 348. - P. 56-61.

5. Zhang H., Dutta P, Liu J., Sabri N., Song Y., Li W.X., Li J. Tumour cell-intrinsic CTLA4 regulates PD-L1 expression in non-small cell lung cancer // *J. Cell. Mol. Med.* - 2019. - V. 23. - P. 535-542.

6. Шаповал А.М., Подлесных С.В., Колосова Е.А. Щербаков Д.Н. Новые точки контроля иммунного ответа для иммунотерапии онкологических заболеваний // *Российский онкологический журнал*. - 2017. - Т. 22. - № 4. - С. 175-179.

7. Абелев Г.И. Основы иммунитета // *Соросовский образовательный журнал*. - 1996. - № 5. - С. 4-10.

8. Xu F., Jin T., Zhu Y., Immune checkpoint therapy in liver cancer // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* - 2018. - V. 37. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0777-4>

9. Wykes M.N., Lewin S.R. Immune checkpoint blockade in infectious diseases // *Nature Reviews Immunology*. - 2018. - V. 18. - № 2. P. 91-104. doi: 10.1038/nri.2017.112.

10. Кривошапов Л.Г. Использование генно-инженерных иммуномодуляторов для супрессии иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях // *Медицинская иммунология*. - 2003. - Т. 5. - № 1-2. - С. 29-38.

11. Callahan M.K., Wolchok J.D., Allison J.P. Anti-CTLA-4 Antibody Therapy: Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy // *Seminars in Oncology*. - 2010. - V. 37. - № 5. - P. 473-484.

12. Моисеенко В.М. Моноклональные антитела в лечении злокачественных опухолей // *Практическая онкология*. - 2003. - Т. 4. - № 3. - С. 148-156.

13. Wolchok J.D., Hoos A., O'Day S., Weber J.S., Hamid O., Lebbe C, Maio M., Binder M., Bohnsack O., Nichol G., Humphrey R., Hodi F.S. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria // *Clin. Cancer Res.* - 2009. - V. 15. - P. 7412-7420.

14. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation // *Immunity*. - 1994. - V. 1. - P. 405-413.

15. Topalian S.L., Hodi F.S., Brahmer J.R. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer // *N. Engl. J. Med.* - 2012. - V. 366. - P. 2443-2454.

16. Vlieghe P, Lisowski V., Martinez J., Khrestchatisky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market // *Drug Discov Today*. - 2010. - V. 15. - № 1-2. - P. 40-56.

17. Schmidt T.G., Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins // *Nat Protoc.* - 2007. - V. 2. № 6. P. 1528-1535.

18. Fosgerau K., Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions // *Drug discovery today*. - 2015. - V. 20. - № 1. - P. 122-128.

19. Volpe M. Natriuretic peptides and cardio-renal disease // *International Journal of Cardiology*. - 2014. - V. 176. - P. 630-639.

20. Brandt C.R. Peptide Therapeutics for Treating Ocular Surface Infections // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* - 2014. - V. 30. - P. 691-699.

21. Schluter N., De Sterke A., Willmes D.M., Spranger J., Jordan J., Birkenfeld A.L. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome // *Pharmacol. Ther.* - 2014. - V. 144. - P. 12-27.

22. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Славина Е.Г., Борунова А.А. Новые возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа // *Злокачественные опухоли*. - 2015. - № 1. - С. 26-34.

23. Stamper C.C., Zhang Y., Tobin J.F., Erbe D.V., Ikemizu S., Davis S.J., Stahl M.L., Sehra

J., Somers W.S., Mosyak L. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses // Nature. - 2001. - V. 410. - P. 608-611.

24. Legutki J.B., Zhao Z.G., Greving M., Woodbury N., Johnston S.A., Stafford P. Scalable high-density peptide arrays for comprehensive health monitoring // Nat. Commun. - 2014. - V. 5. - P. 4785. doi: 10.1038/ncomms5785.

25. Steinhoff C., Vingron M. Normalization and quantification of differential expression in gene expression microarrays // Briefings in Bioinformatics. - 2006. - V. 7. - № 2. - P. 166-177.

26. Simon R., Lam A.P., Li M.C., Ngan M., Menenzes S., Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-Array Tools // Cancer Informatics. - 2007. - V. 2. - P. 11-17.

27. Brown J.R., Stafford P., Johnston S.A., Dinu V. Statistical methods for analyzing immunosignatures // BMC Bioinformatics. - 2011. - V. 12. - № 349. - P. 2-15.

28. Hughes A.K., Cichacz Z., Scheck A., Stephen W.C., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer // PLoS One. - 2012. - V. 7. - № 7. - P. 1-7.

29. Kukreja M., Johnston S.A., Stafford P. Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data // BMC Bioinformatics. - 2012. - V. 13. - № 139. - P. 2-15.

30. Shengdian W., Gefeng Z., Koji T., Lieping C., Jürgen B. Ligand Binding Sites of Inducible Costimulator and High Avidity Mutants with Improved Function // J. Exp. Med. - 2002. - V. 195. - № 8. - P. 1033-1041.

Перечень последовательностей

<110> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Алтайский государственный университет» (ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»)

<120> Нонапептидный антагонист взаимодействия молекул CTLA-4 и B7-1

<210> SEQ ID NO: 1

<211> 9

<212> Peptide

<213> Synthetic construct

<223> Аминокислотная последовательность синтетического нонапептида, способного специфически связываться с рекомбинантным белком CTLA-4 (рецептором), регулируя (блокируя) его взаимодействие с молекулой B7-1 (лигандом).

<400> 1

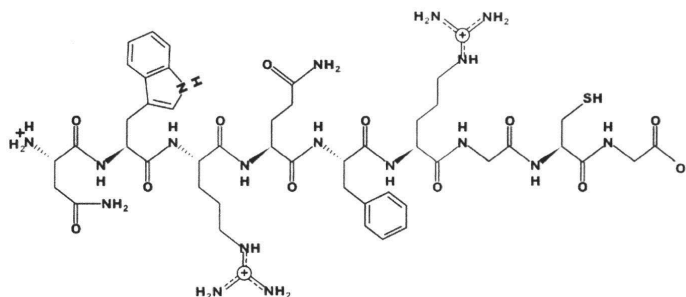
NWRQFRGCG

(57) Формула изобретения

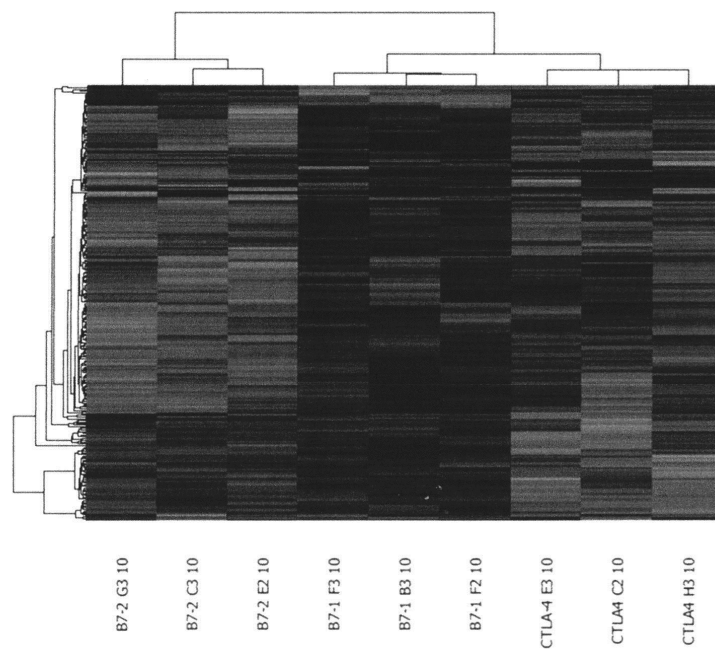
Нонапептид со способностью специфически связываться с молекулой контроля иммунитета рецептором CTLA-4 (CD 152) человека и блокировать взаимодействие его с лигандом B7-1 (CD80), состоящий из 9 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

1

Нонапептидный антагонист взаимодействия молекул CTLA-4 и B7-1

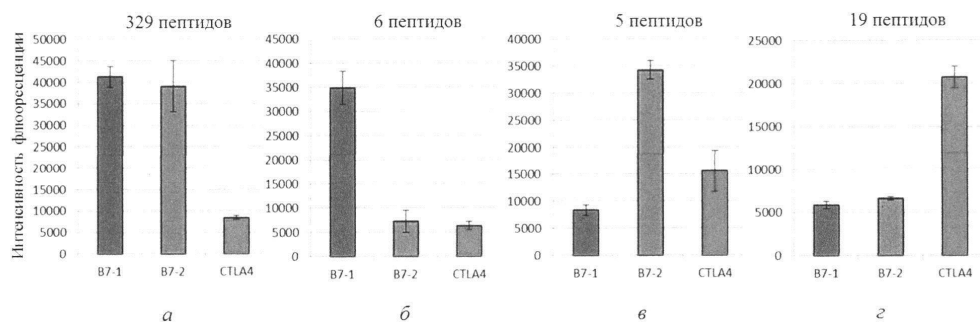


ФИГ. 1. Показывает структурную формулу синтетического пептида по изобретению. Формула отражает аминокислотный состав пептида

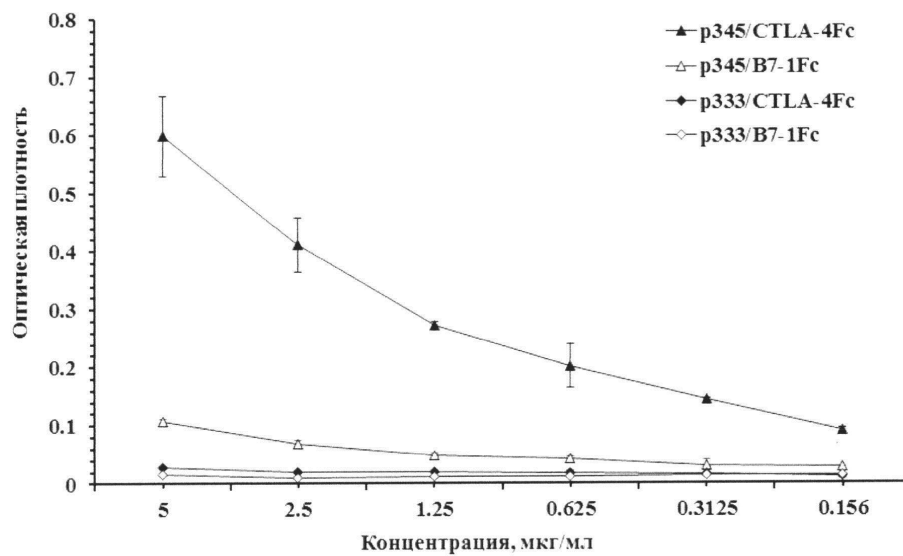


ФИГ. 2. Представляет собой тепловую карту и результаты начальной идентификации анализа взаимодействия биологических молекул на микрочипе, которое происходит между пептидами и белками CTLA-4, B7-1 и B7-2

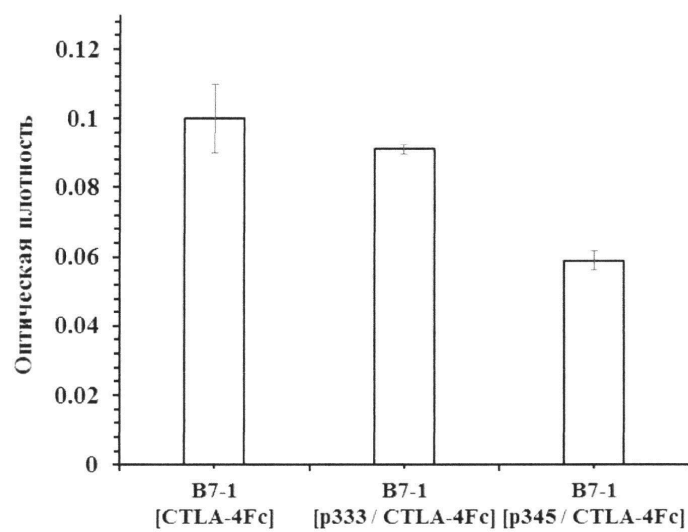
2



ФИГ. 3. Демонстрирует средний уровень флуоресценции пептидов, взаимодействующих с образцами рекомбинантных белков B7-1Fc, B7-2Fc, CTLA-4Fc



ФИГ. 4. Подтверждает специфичность взаимодействия CTLA-4Fc с синтетическим пептидом по изобретению p345



ФИГ. 5. Подтверждает блокировку взаимодействия CTLA-4Fc с B7-1 с использованием пептида p345