

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616-006.04-078.33

^{1,5}Шановал А.И., ^{2,5}Легутки Д.Б., ²Стаффорд Ф., ¹Требухов А.В., ²Джонстон С.А., ^{1,3}Шойхет Я.Н., ^{1,4}Лазарев А.Ф.**ИММУНОСИГНАТУРА (IMMUNOSIGNATURE) – ПЕПТИДНЫЕ МИКРОЭРРЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

¹Российско-Американский противораковый Центр, Алтайский государственный университет, 656049, г. Барнаул, Россия; ²Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, 85287, Темпи, Аризона, США; ³ГОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, г. Барнаул, Россия; ⁴Алтайский филиал ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, 656049, г. Барнаул, Россия; ⁵Эти авторы внесли равнозначный вклад в работу

Поиск новых биомаркеров для доклинической диагностики рака может стать ценным инструментом обнаружения злокачественных новообразований на ранних стадиях заболевания в группах онкориска и скрининга здоровых людей, а также рецидивов злокачественных новообразований после лечения. Было показано, что антитела вырабатываются против антигенов, экспрессируемых опухолевыми клетками. Соответственно присутствие специфических антител в сыворотке может служить индикатором развития онкологических заболеваний. Недавно разработанная технология – иммуносигнатура представляет собой высокочувствительный метод обнаружения циркулирующих антител с помощью пептидных микрочипов. В представленном обзоре обсуждаются современные методы определения антител, а также описываются принципы и возможности применения иммуносигнатуры в исследовательской и клинической практике.

Ключевые слова: доклиническая диагностика рака; биомаркеры; антитела; пептидные микроэррей; иммуносигнатура.

IMMUNOSIGNATURE – PEPTIDE MICROARRAY FOR DIAGNOSTIC OF CANCER AND OTHER DISEASES

^{1,5}Chapoval A.I., ^{2,5}Legutki J.B., ²Stafford P., ¹Trebukhov A.V., ²Johnston S.A., ^{1,3}Shoykhet Ya.N., ^{1,4}Lazarev A.F.

¹Russian-American Anti-Cancer Center, Altai State University, 656049, Barnaul, Russian Federation; ²Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ 85287, USA; ³Altai State Medical University, 656049, Barnaul, Russian Federation; ⁴Altai branch of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center under Russian Academy of Medical Science 656049, Barnaul, Russian Federation; ⁵These authors contributed equally to this work

Biomarkers for preclinical diagnosis of cancer is a valuable tool for detection of malignant tumors at early stages in risk groups and screening healthy people, as well as monitoring disease recurrence after treatment of cancer. It is known that antibodies are produced in response to antigens expressed by tumor cells. Accordingly, the presence of specific antibodies in serum can serve as biomarkers of cancer. Recently developed technology - immunosignature is a highly sensitive method of detection of circulating antibodies using peptide microarrays. In the present review we discuss modern methods of antibody detection, as well as describe the principles and applications of immunosignature in research and clinical practice.

Key words: preclinical cancer diagnostics; biomarkers; antibody; peptide microarray; immunosignature.

По данным ВОЗ (2013), во всем мире ежегодно заболевают раком более 14 млн человек. В России ежегодно регистрируется более 0,5 млн новых случаев рака и 0,3 млн случаев смерти, связанных с раком. Согласно последним статистическим данным, в течение последних 10 лет в мире, и в том числе в России, отмечается рост заболеваемости раком. Так, абсолютное число новых случаев заболевания раком (525 931) в 2012 г. было на 8,25% больше по сравнению с 2007 г. [1]. Всего же в России проживает около 3 млн человек – больных онкологическими заболеваниями, которые требуют постоянного наблюдения и мониторинга.

Для корреспонденции: Шановал Андрей Иванович – канд. биол. наук, директор Российско-Американского противоракового центра, проф. каф. физико-химической биологии и биотехнологии Алтайского государственного университета; 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 61, e-mail: andreichapoval@gmail.com.

Correspondence to: Andrei Chapoval – cand. biol. sciences, director of the Russian-American Anti-Cancer Center; e-mail: andreichapoval@gmail.com.

Следует отметить и то, что, несмотря на развитие новых медицинских технологий и терапевтических стратегий, направленных на борьбу с раком, многие страны мира, включая Россию, сталкиваются с увеличением смертности от рака. Одной из причин высокой смертности считается позднее выявление онкологических заболеваний. В связи с этим ранняя диагностика злокачественных новообразований является актуальным и наиболее перспективным подходом для снижения инвалидности и смертности, вызванной раком.

В настоящее время большое внимание уделяется поиску новых потенциальных биомаркеров рака. Так, представляет интерес использование протеомных подходов к идентификации сывороточных биомаркеров, используемых для оценки риска развития рака, а также в доклинической диагностике злокачественных опухолей, выборе индивидуализированной терапии, мониторинге прогрессирования и рецидивов заболевания (рис. 1) [2, 3].

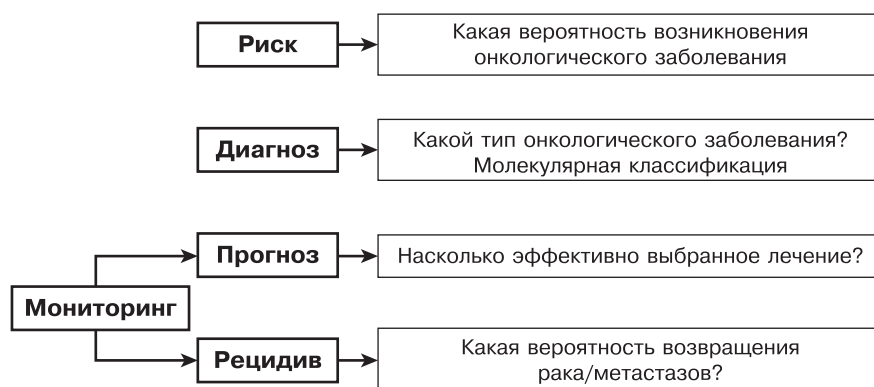


Рис. 1. Для чего нужны биомаркеры?

Известно, что эффективными и практичными для раннего выявления заболеваний являются те биомаркеры, которые могут быть получены с помощью малоинвазивных или неинвазивных методик. Основными характеристиками идеальных биомаркеров являются: стабильность, специфичность и возможность определения с использованием универсальных (так называемых потоковых) методов. Известные современные методы обнаружения белковых биомаркеров включают прямой анализ растворимых или клеточных опухолевых антигенов, таких как p53, PSA, CEA, BRCA1/2 и EGFR, с помощью двухмерного электрофореза, иммуноферментного анализа, методов иммуногистохимии и др. [4].

Несмотря на то что эти методы достаточно специфичные, они требуют сформировавшихся раковых опухолей (> 2,5 см), доступных для биопсии и (или) продукции высоких концентрации белков для обнаружения биомаркера в сыворотке [5]. Однако, как правило, в таких случаях опухоль может быть легко определена специалистом-онкологом в результате простого осмотра. Кроме того, используемые биомаркеры нестабильны, что приводит к противоречивым результатам при мониторинге лечения и рецидива заболевания [6, 7].

Антитела против антигенов, ассоциированных с опухолями (ТАА – «tumor associated antigens»), в настоящее время приобретают все больший интерес в качестве альтернативы циркулирующим биомаркерам, для выявления рака на локализованной и излечимой стадии. Известно, что антитела обеспечивают первую линию защиты организма, обнаруживая, нейтрализуя и удаляя чужеродные белки и микроорганизмы в антиген-специфической манере. С каждым годом набирается все больше доказательств свидетельствующих в пользу того, что в опухолях присутствуют многочисленные типы белков-антигенов как с обычной аминокислотной последовательностью (но с увеличенной экспрессией), так и мутантных (измененные формы существующих белков, или совершенно новые последовательности), которые стимулируют продукцию антиген-специфических антител В-клетками (плазматическими клетками). Изменение количества и специфичности антител в сыворотке указывает на происходящие процессы в организме, которые отражают различные физиологические и патофизиологические состояния, включая развитие онкологических заболеваний. Таким образом, мониторинг качественных изменений циркулирующих антител представляет собой перспек-

тивный способ диагностики и прогноза онкологических заболеваний. Примеры антител против известных ТАА, найденных в сыворотке больных раком, представлены в таблице. Однако наличие антител против ТАА не обязательно говорит о защитных противоопухолевых механизмах, а скорее отражает иммунологическую реакцию на развитие опухоли. На настоящий момент не совсем ясно, как ТАА (часто внутриклеточные) индуцируют продукцию антител. Предполагают, что избыточная экспрессия и посттрансляционные модификации в сочетании с воспалением при аномальной гибели опухолевых клеток могут усиливать иммуногенность ТАА [8, 9]. Независимо от их биологической роли антитела в сыворотке онкологических больных представляют значительный интерес в качестве раннего индикатора развития рака. Практичность антител в качестве биомаркеров онкологических заболеваний особо подчеркивается их стабильностью, специфичностью и ранней продукцией в ответ на антиген.

Для определения антител против ТАА в настоящее время используют методы: кДНК экспрессии, библиотеки фагового дисплея, двухмерный вестерн-блоттинг, двухмерную иммуноаффинную хроматографию и белковые микрочипы [21–23]. Несмотря на множество интересных и обнадеживающих результатов, полученных с помощью этих методов, они занимают много времени и не могут быть легко автоматизированы для клинической диагностики рака. Плюсы и минусы этих методов обсуждаются ниже.

Опухолевые антигены, распознаваемые циркулирующими антителами

Белок	Функция	Опухоль	Ссылка
HSP60	Клеточный стресс	Молочной железы	10
p53	Онкосупрессор	Молочной железы, поджелудочной железы, легкого	11, 12, 13, 14
NY-ESO-1	Дифференцировка	Легкого, предстательной железы	15, 16
CAGE	Геликаза	Легкого	13
EGFR	Рецептор	Молочной железы, кишечника	17, 18
p62	Регуляция РНК	Предстательной железы, поджелудочной железы, легкого	12, 14, 19
BRCA-1/2	Деление клеток	Молочной железы	20

SEREX (Serological analysis of tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning – серологический анализ опухолевых антигенов с помощью клонирования рекомбинантной кДНК). Первоначально методы клонирования рекомбинантной кДНК, или фаговый дисплей, использовались для идентификации новых ТАА путем скрининга библиотек кДНК, полученных из опухолевых тканей и сыворотки от онкологических пациентов [24]. Для сравнения антител против ТАА, контрольные сыворотки и сыворотки от пациентов проверяют на связывание с продуктами кДНК, которые обычно экспрессируют в прокариотических клетках. Используя такой подход, были проанализированы профили антител в сыворотках пациентов с глиомой, раком предстательной железы и раком легкого [25–27]. Одним из недостатков этого метода является то, что кДНК, как правило, получают из образца опухоли одного пациента. Учитывая неоднородность экспрессии генов в различных опухолях, этого не достаточно, чтобы сравнить антитела разнообразной специфичности. Кроме того, при использовании кДНК в основном экспрессируются белки, которые часто встречаются в опухолевой ткани, а минорные белки остаются незамеченными.

Еще одним часто используемым методом для скрининга антител является SERPA (serological proteome analysis – серологический анализ протеома), который использует достаточно трудоемкую технику двухмерного электрофореза для разделения лизатов опухолевых клеток с последующим блоттингом и зондированием с сыворотками от здоровых людей или онкологических пациентов [28]. В дополнение перед электрофорезом из лизатов опухолевых клеток белки, реагирующие с иммуноглобулинами из сывороток здоровых людей, могут быть удалены на иммуноаффинных колонках, этот метод называется MAPPING (multiple affinity protein profiling – многоаффинное профилирование белков) [29, 30]. Эти методы применялись для изучения многих видов рака, таких как меланома, рак предстательной железы, почек и кишечника [25, 31–33]. Среди недостатков этих методов можно перечислить ограничения, присущие двухмерному электрофорезу, такие как невозможность анализа некоторых классов белков (например, мембранных) и трудности в получении воспроизводимых двухмерных гелей [21, 22]. Кроме того, эти процедуры занимают много времени, дорогостоящие и плохо поддаются стандартизации.

Методами, которые подходят для анализа большого количества образцов и имеют высокую пропускную способность, являются микрочипы. В настоящее время используются два вида микрочипов. Первые включают белковые микрочипы, покрытые известными опухолевыми антигенами, на которых можно сравнивать профиль связывающих антител в различных сыворотках [34]. Другие микрочипы используют стратегию обратного захвата, когда на микрочипах иммобилизованы моноклональные антитела против ТАА, которые захватывают белки из экстрактов опухолевых клеток и могут быть зондированы с мечеными IgG из контрольных или онкологических сывороток [35].

Понятно, что микрочипы, использующие коммерческие антитела или антигены, не могут обнаружить взаимодействия с неизвестными белками [36]. Не-

смотря на определенные ограничения, исследования показали, что микрочипы, содержащие множество белков, имеют более высокую диагностическую ценность, чем единичный маркер [37].

Основной проблемой для использования известных антигенов при оценке опухоль-специфических антител является крайняя нехватка кандидатов. Наши знания о процессе развития опухоли еще недостаточны, чтобы предугадать, какие антигены являются наиболее важными для широкого скрининга антител. Многие антигены, описанные в литературе, являются индивидуальными для одного пациента; найти те, которые присутствуют и характеризуют опухоли у разных пациентов, требует долгих и дорогостоящих исследований.

Что можно сделать, не зная специфических антигенов? Представьте себе липкую ленту, на которую наносятся все сывороточные антитела. Если бы эта липкая лента могла отсортировать миллиарды антител, было бы относительно просто выделить группы, например соответствующие индивидуальным особенностям пациента антитела, общие для всех людей и общие только для людей с определенным заболеванием. Именно этот, несколько стохастический метод, мог бы предложить диагностику, которая обладает высокой чувствительностью, достаточной специфичностью и простотой для клинического использования.

Метод, названный «иммуносигнатурой» (immunosignature), использующий именно такой (стохастический) подход, был недавно описан [38]. Данный метод основан на применении микрочипов, где пептиды со случайными аминокислотными последовательностями, ковалентно связанные с предметным стеклом, используются для обнаружения болезней в зависимости от изменения в профиле циркулирующих антител [39].

В иммуносигнатуре пептиды служат частичным или полным подобием эпитопов антигена (миметоп). Использование множества пептидов, представляющих вероятные аминокислотные последовательности белков, делает возможным определение связывающего партнера для многих антител, даже если точное совпадение для эпитопа отсутствует. Использование нескольких пептидов значительно увеличивает диагностическую и прогностическую ценность этого анализа, так как это имитирует панель потенциальных ТАА, необходимых для оптимальной чувствительности и специфичности.

Первое поколение микрочипов для определения иммуносигнатуры производится методом прямой печати (нанесения) синтезированных пептидов (всего 10 000 пептидов, длиной в 20 аминокислот) на предметные стекла [40]. Микрочипы второго поколения, находящиеся в стадии разработки, содержат 350 000 пептидов в среднем 11 аминокислот. Принципы технологии фотолитографического производства пептидных микрочипов второго поколения представлены на рис. 2. Алгоритм для синтеза пептидов на микрочипах рассчитан на то, чтобы представить максимально возможное количество комбинаторных аминокислотных последовательностей белков, а не фокусируется на конкретном патогене или организме, позволяя использование тех же микрочипов для диагностики любого заболевания и инфекций у мышей, собак, людей и других животных. Используя

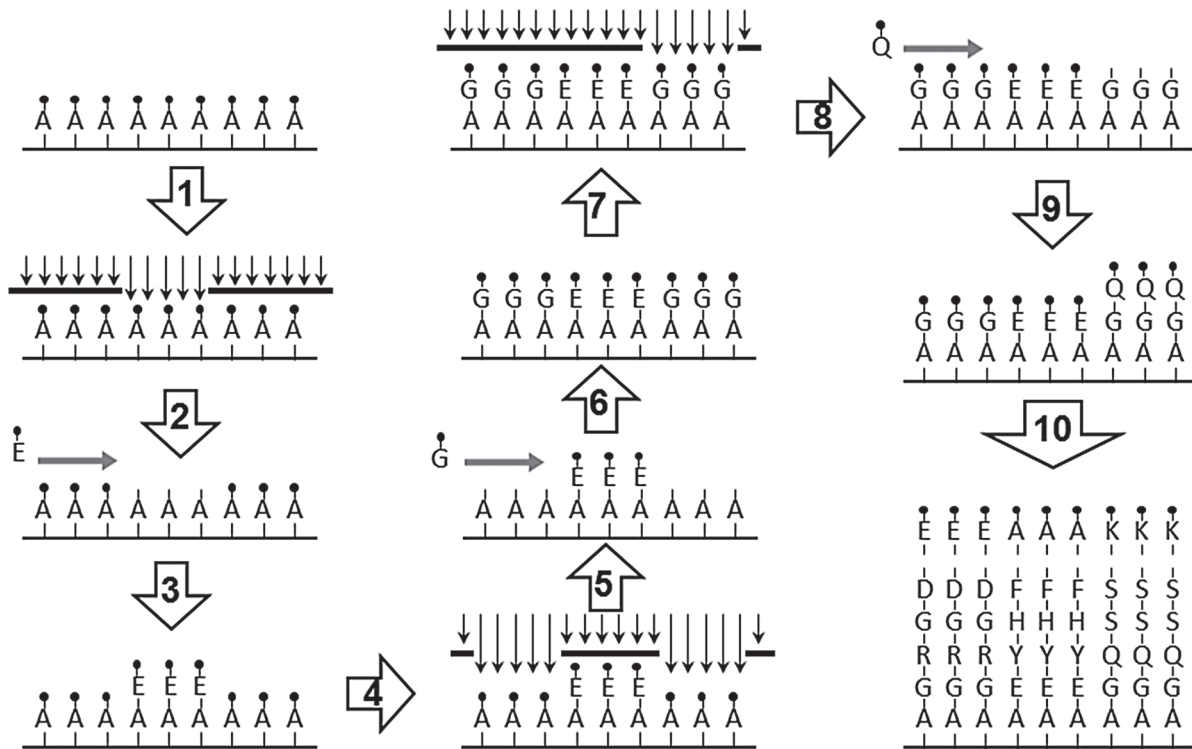


Рис. 2. Фотолитографический метод синтеза пептидов.

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

набор комбинаторных пептидов-лигандов, с которыми могут связываться сывороточные антитела, нет необходимости знать специфический антиген, чтобы поставить диагноз. Измененные белки, которые возникают из-за геномных или транскрипционных модификаций в опухолевых клетках, не должны быть представлены на микрочипе. Антитела против таких неканонических белков будут связываться с пептидами, представленными на микрочипах иммуносигнатуры [36]. Информативные пептиды (мимеотопы) не должны совпадать с аминокислотной последовательностью белков, для того чтобы обнаружить взаимодействующие антитела. Моноклональные антитела, полученные против линейных, конформационных и углеводных эпитопов, показали совершенно определенные иммуносигнатуры на микрочипах [38]. Следует отметить, что чем больше число пептидных последовательностей на микрочипе, тем выше вероятность нахождения естественного линейного эпитопа. 10 000 пептидов для этого слишком мало, но 330 000 пептидов (в каждом 11 аминокислот) содержат большую часть линейных эпитопов (обычно 4 и 5 аминокислот), распознаваемых сывороточными антителами. Хотя это необязательно для клинической диагностики, наличие мимеотопов на микрочипе может быть полезным инструментом для исследования и создания новых терапевтических средств.

Принцип экспериментального анализа пептидных микрочипов прост и напоминает протокол

иммуноферментного анализа (рис. 3, см. 3-ю полосу обложки). Микрочипы изготавливаются на стандартных предметных стеклах, что позволяет использование стандартного лабораторного оборудования. Пептидные микрочипы сначала инкубируют с разведенной сывороткой (1:20 000) пациента или животного. После трехкратной промывки добавляются вторичные флуоресцентные антитела, распознающие определенные изоформы иммуноглобулинов. После отмывки несвязанных вторичных антител микрочипы сканируют с использованием высокоскоростного конфокального двухлазерного сканера и фиксируют уровень флуоресценции для каждой точки, представляющей определенный пептид. Анализ данных и статистическая оценка результатов – наиболее важная и сложная часть каждого эксперимента с использованием микрочипов (рис. 4, см. 3-ю полосу обложки). Первоначально интенсивность флуоресценции нормализуется и микрочипы проверяют с использованием алгоритма контроля качества. Этот алгоритм определяет микрочипы с артефактами сканированных изображений без необходимости просматривать каждое изображение вручную. Числовые значения флуоресценции повторов изображений без артефактов усредняются и используются для определения иммуносигнатуры. Информативные пептиды, представляющие иммуносигнатуру заболевания, выбираются с помощью Т-теста (обычно $p < 10^{-7}$) с по-

следующей выборкой максимально отличающихся значений и кластерным анализом образцов, чтобы усилить контраст между контролем и экспериментом. Перекрестную проверку иммуносигнатуры проводят с использованием алгоритма машинного обучения, обычно с помощью метода опорных векторов (Support vector machine; SVM), на небольшой выборке пациентов. Аккуратность прогноза, специфичность и чувствительность иммуносигнатуры определяются с помощью обучающего алгоритма, используя группу доноров, не включенных в отбор, и перекрестную проверку иммуносигнатуры. Когда набор пептидов, которые обнаруживают и классифицируют определенное заболевание, установлен, дальнейший выбор иммуносигнатуры не нужен. Если, однако, дополнительные заболевания добавляются к диагностической панели иммуносигнатур, необходимо обеспечить, чтобы эти пептиды могли определить новые болезни. Без экспериментального анализа сывороток пациентов, никто не может знать *a priori*, имеет ли новая болезнь перекрывающиеся иммуносигнатуры с другими заболеваниями.

На сегодняшний день иммуносигнатуры были использованы для классификации более 40 различных заболеваний у людей и животных (собак). Точность прогнозирования и диагностики обычно превышает 94% [41]. Опубликованные результаты указывают, что иммуносигнатура может различить различные виды опухолей головного мозга, в том числе агрессивные формы глиобластомы [41]. У пациентов с глиобластомой метилирование промотора O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы (MGMT) коррелирует с увеличенной выживаемостью после лечения с темозоломидом [42, 43].

Это эпигенетическое изменение имеет четкое отражение в иммуносигнатуре, иллюстрирующее, что гуморальный иммунный ответ может не только имитировать существующие молекулярные биомаркеры, но также расширяет их диагностические возможности [41]. С помощью иммуносигнатур можно также определить, в каком органе развивается онкологическое заболевание; иммуносигнатуры рака молочной железы и опухоли мозга хорошо различимы [41]. Более того, даже в одном органе различные заболевания могут приводить к развитию характерных иммуносигнатур. Ранние стадии рака поджелудочной железы – PanIN (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) хорошо отличимы от диабета, панкреатита, аденокарциномы протоков поджелудочной железы с помощью иммуносигнатуры [44]. Возможность обнаружения PanIN показывает, что иммуносигнатуру можно использовать в диагностике рака на начальных стадиях, еще до метастазирования, когда лечение может быть эффективным. Болезнь Альцгеймера (БА) является еще одним хроническим заболеванием, которое развивается и прогрессирует в течение многих лет. В работах L. Restrepo и соавт. [45] было показано, что иммуносигнатура пациентов с БА отличается от иммуносигнатуры здоровых доноров соответствующей возрастной группы и пациентов с деменцией, не обусловленной БА. Также примером раннего выявления БА может служить и «мышинная» модель болезни Альцгеймера – используя иммуносигнатуру, можно отличить трансгенных мышей, которые экспрессируют человеческий пресенилин I и химерный предшественник β -амилоида (A _{β}), от обычных мышей

еще до развития амилоидных бляшек и снижения когнитивных функций [45]. Кроме того, в «мышинной» модели гриппа было показано, что с помощью иммуносигнатуры можно обнаружить инфекцию на 3 дня раньше, чем используя стандартные методы, такие как иммуноферментный анализ [39].

Так как онкологи продолжают требовать все более чувствительные методы для ранней диагностики, это обуславливает снижение интереса к ДНК- и белковым биомаркерам. Масс-спектрометрия когда-то была очевидным методом для обнаружения биомаркеров, однако сегодня интерес к этому методу снижается из-за разброса результатов между лабораториями, технологических ошибок и чувствительности [5, 7].

Для того чтобы улучшить мониторинг здоровья среди населения, а это как раз то, что требуется для раннего выявления рака, нужен надежный, недорогой и простой тест, который можно воспроизвести в любой лаборатории. Именно микрочипы с синтетическими пептидами обладают такими качествами. В отличие от ДНК-чипов, где методы выделения РНК из опухолевых клеток серьезно влияют на качество теста, циркулирующие антитела очень стабильны и не требуют длительной подготовки проб. Использование пептидов со случайными аминокислотными последовательностями также дает возможность избежать ошибок, связанных с дизайном диагностического теста и выбором онкомаркеров, которые меняются с развитием наших знаний о патофизиологии опухолей. Это также позволяет создать наборы диагностических характеристик (иммуносигнатур) для многих заболеваний простым сравнением групп пациентов с подходящими контрольными группами. Онкологическое сообщество обещало системы раннего обнаружения рака в течение многих десятилетий. Наконец, мы имеем технологии, чтобы выполнить это обещание.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Комбинаторная биология как платформа для создания медико-биологических препаратов». Шифр: 303.

REFERENCES (ЛИТЕРАТУРА)

1. Davydov M.I., Axel E.M., eds. *Statistics of malignant tumors in Russia and CIS countries in 2012. [Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2012 g.]*. Moscow, Publishing group of RONTs; 2014. ISBN: 5-95340-183-3. (in Russian) (Давыдов М.И., Аксель Е.М., ред. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г. М.: Издательская группа РОНЦ; 2014. ISBN: 5-95340-183-3).
2. Sawyers C.L. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008; 452 (7187): 548–52.
3. Kulasingam V., Diamandis E.P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clin. Pract. Oncol.* 2008; 5 (10): 588–99.
4. Fuzery A.K., Levin J., Chan M.M., Chan D.W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin. Proteom.* 2013; 10 (1): 13–25.
5. Hori S.S., Gambhir S.S. Mathematical model identifies blood biomarker-based early cancer detection strategies and limitations. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3 (109): 109–116.
6. Fushiki T., Fujisawa H., Eguchi S. Identification of biomarkers from mass spectrometry data using a “common” peak approach. *BMC Bioinform.* 2006; 7: 358–68.
7. Anderson N.L., Ptolemy A.S., Rifai N. The riddle of protein diagnostics: future bleak or bright? *Clin. Chem.* 2013; 59 (1): 194–7.
8. Wu X., Molinaro C., Johnson N., Casiano C.A. Secondary ne-

- crisis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthr. and Rheum.* 2001; 44 (11): 2642–52.
9. Fernandez Madrid F. Autoantibodies in breast cancer sera: candidate biomarkers and reporters of tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2005; 230 (2): 187–98.
 10. Desmetz C., Bascoul-Mollevi C., Rochaix P., Lamy P.J., Kramar A., Rouanet P. et al. Identification of a new panel of serum autoantibodies associated with the presence of in situ carcinoma of the breast in younger women. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (14): 4733–41.
 11. Zhang J.Y., Casiano C.A., Peng X.X., Koziol J.A., Chan E.K., Tan E.M. Enhancement of antibody detection in cancer using panel of recombinant tumor-associated antigens. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003; 12 (2): 136–43.
 12. Zhang J.Y. Tumor-associated antigen arrays to enhance antibody detection for cancer diagnosis. *Cancer Detect. Prev.* 2004; 28 (2): 114–8.
 13. Chapman C.J., Healey G.F., Murray A., Boyle P., Robertson C., Peek L.J. et al. EarlyCDT®-Lung test: improved clinical utility through additional autoantibody assays. *Tumour Biol.* 2012; 33 (5): 1319–26.
 14. Li J., Wang L.J., Ying X., Han S.X., Bai E., Zhang Y., Zhu Q. Immunodiagnostic value of combined detection of autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in pancreatic cancer. *Scand. J. Immunol.* 2012; 75 (3): 342–9.
 15. Shan Q., Lou X., Xiao T., Zhang J., Sun H., Gao Y. et al. A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2013; 328 (1): 160–7.
 16. Xie C., Kim H.J., Haw J.G., Kalbasi A., Gardner B.K., Li G. et al. A novel multiplex assay combining autoantibodies plus PSA has potential implications for classification of prostate cancer from non-malignant cases. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 43.
 17. Chapman C.J., Murray A., McElveen J.E., Sahin U., Luxemburger U., Türeci O. et al. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure. *Thorax.* 2008; 63 (3): 228–33.
 18. Boyle P., Chapman C.J., Holdenrieder S., Murray A., Robertson C., Wood W.C. et al. Clinical validation of an autoantibody test for lung cancer. *Ann. Oncol.* 2011; 22 (2): 383–9.
 19. Shi F.D., Zhang J.Y., Liu D., Rearden A., Elliot M., Nachtsheim D. et al. Preferential humoral immune response in prostate cancer to cellular proteins p90 and p62 in a panel of tumor-associated antigens. *Prostate.* 2005; 63 (3): 252–8.
 20. Piura E., Piura B. Autoantibodies Tailor – Made Panels of to tumor-associated antigens in breast carcinoma. *J. Oncol.* 2011: 2425.
 21. Heo C.K., Bahk Y.Y., Cho E.W. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. *BMB Rep.* 2012; 45 (12): 677–85.
 22. Tan H.T., Low J., Lim S.G., Chung M.C. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection. *FEBS J.* 2009; 276 (23): 6880–904.
 23. Casiano C.A., Mediavilla-Varela M., Tan E.M. Tumor-associated antigen arrays for the serological diagnosis of cancer. *Mol. Cell Proteom.* 2006; 5 (10): 1745–59.
 24. Sahin U., Türeci O., Schmitt H., Cochlovius B., Johannes T., Schmits R. et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92 (25): 11 810–3.
 25. Wang X., Yu J., Sreekumar A., Varambally S., Shen R., Giacherio D. et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353 (12): 1224–35.
 26. Matsutani T., Hiwasa T., Takiguchi M., Oide T., Kunimatsu M., Saeki N. et al. Autologous antibody to src-homology 3-domain GRB2-like 1 specifically increases in the sera of patients with low-grade gliomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2012; 31: 85.
 27. Gnjatic S., Wheeler C., Ebner M., Ritter E., Murray A., Altorki N.K. et al. Seromic analysis of antibody responses in non-small cell lung cancer patients and healthy donors using conformational protein arrays. *J. Immunol. Meth.* 2009; 341 (1–2): 50–8.
 28. Kellner R., Lichtenfels R., Atkins D., Bukur J., Ackermann A., Beck J. et al. Targeting of tumor associated antigens in renal cell carcinoma using proteome-based analysis and their clinical significance. *Proteomics.* 2002; 2 (12): 1743–51.
 29. Caron M., Choquet-Kastylevsky G., Joubert-Caron R. Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery. *Mol. Cell Proteom.* 2007; 6 (7): 1115–22.
 30. Grandjean M., Dieu M., Raes M., Feron O. A new method combining sequential immunoaffinity depletion and differential in gel electrophoresis to identify autoantibodies as cancer biomarkers. *J. Immunol. Meth.* 2013; 396 (1–2): 23–32.
 31. Klade C.S., Voss T., Krystek E., Ahorn H., Zatloukal K., Pummer K. et al. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics.* 2001; 1 (7): 890–8.
 32. Hardouin J., Lasserre J.P., Sylvius L., Joubert-Caron R., Caron M. Cancer immunomics: from serological proteome analysis to multiple affinity protein profiling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1107: 223–30.
 33. Suzuki A., Iizuka A., Komiyama M., Takikawa M., Kume A., Tai S. et al. Identification of melanoma antigens using a Serological Proteome Approach (SERPA). *Cancer Genom. Proteom.* 2010; 7 (1): 17–23.
 34. Scanlan M.J., Welt S., Gordon C.M., Chen Y.T., Gure A.O., Stockert E. et al. Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets. *Cancer Res.* 2002; 62 (14): 4041–7.
 35. Hoheisel J.D., Alhamdani M.S., Schröder C. Affinity-based microarrays for proteomic analysis of cancer tissues. *Proteom. Clin. Appl.* 2013; 7 (1–2): 8–15.
 36. Kroening K., Johnston S.A., Legutki J.B. Autoreactive antibodies raised by self derived de novo peptides can identify unrelated antigens on protein microarrays. Are autoantibodies really autoantibodies? *Exp. Mol. Pathol.* 2012; 92 (3): 304–11.
 37. Zhong L., Peng X., Hidalgo G.E., Doherty D.E., Stromberg A.J., Hirschowitz E.A. Identification of circulating antibodies to tumor-associated proteins for combined use as markers of non-small cell lung cancer. *Proteomics.* 2004; 4 (4): 1216–25.
 38. Stafford P., Halperin R., Legutki J.B., Magee D.M., Galgiani J., Johnston S.A. Physical characterization of the «immunosignaturing effect». *Mol. Cell Proteom.* 2012; 11 (4): M111.
 39. Sykes K.F., Legutki J.B., Stafford P. Immunosignaturing: a critical review. *Trends Biotechnol.* 2013; 31 (1): 45–51.
 40. Legutki J.B., Magee D.M., Stafford P., Johnston S.A. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. *Vaccine.* 2010; 28 (28): 4529–37.
 41. Hughes A.K., Cichacz Z., Scheck A., Coons S.W., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. *PLoS One.* 2012; 7 (7): e40201.
 42. Gutenber A., Bock H.C., Brück W., Doerner L., Mehdorn H.M., Roggendorf W. et al. MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. *Br. J. Neurosurg.* 2013; 27 (6): 772–8.
 43. Rankeillor K.L., Cairns D.A., Loughrey C., Short S.C., Chumas P., Ismail A. et al. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification identifies promoter methylation events associated with survival in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 2014; 117 (2): 243–51.
 44. Kukreja M., Johnston S.A., Stafford P. Immunosignaturing microarrays distinguish antibody profiles of related pancreatic diseases. *J. Proteomics Bioinform.* 2012: S6.
 45. Restrepo L., Stafford P., Johnston S.A. Feasibility of an early Alzheimer's disease immunosignature diagnostic test. *J. Neuroimmunol.* 2013; 254 (1–2): 154–60.

Поступила 22.05.14
Received 22.05.14