

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2020/071968 A1

(43) Дата международной публикации
09 апреля 2020 (09.04.2020)

(51) Международная патентная классификация :
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)

(21) Номер международной заявки : PCT/RU2019/050167

(22) Дата международной подачи :
03 октября 2019 (03.10.2019)

(25) Язык подачи : Русский

(26) Язык публикации : Русский

(30) Данные о приоритете :
2018134788 03 октября 2018 (03.10.2018) RU

(71) Заявитель : ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) (**FEDERAL STATE AUTONOMOUS EDUCATIONAL INSTITUTION OF HIGHER EDUCATION I.M. SECHENOV FIRST MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY OF THE MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE RUSSIAN FEDERATION (SECHENOVSKIY UNIVERSITY)**) [RU/RU]; ул. Трубецкая, 8, стр. 2 Москва, 119991, Moscow (RU).

(72) Изобретатели : ЗАМЯТНИН, Андрей Александрович (**ZAMYATNIN, Andrey Aleksandrovich**); Ленинский проспект, д. 44, кв. 107 Москва, 119334, Moscow (RU). БАЖИН, Александр Владиславович (**BAZHIN, Aleksandr Vladislavovich**); Валдеслуст, 4 Мюнхен,

81377, Munich (DE). БАЛДИН, Алексей Викторович (**BALDIN, Aleksey Viktorovich**); ул. Литейная, д. 53, кв. 81 Брянск, 241014, Bryansk (RU). ВИНАРОВ, Андрей Зиновьевич (**VINAROV, Andrey Zinovievich**); пр-т Маршала Жукова, д. 37, к. 2, кв. 417 Москва, 123423, Moscow (RU). ГОЛОВАСТОВА, Марина Олеговна (**GOLOVASTOVA, Marina Olegovna**); ул. Лермонтова, д. 46, кв. 1 Звенигород, 143180, Zvenigorod (RU). ГРИШИНА, Алена Николаевна (**GRISHINA, Alena Nikolaevna**); ул. Медынская, д. 5Б, кв. 156 Москва, 117546, Moscow (RU). ЗЕРНИЙ, Евгений Юрьевич (**ZERNIY, Evgeniy Yurievich**); ул. Паустовского, д. 4, кв. 173 Москва, 117463, Moscow (RU). КОРОЛЕВ, Дмитрий Олегович (**KOROLEV, Dmitriy Olegovich**); Московская обл., Наро-Фоминский р-н, ул. Госпитальная, д. 10, кв. 50 Селятино, 143345, Selyatino (RU). САВВАТЕЕВА, Людмила Владимировна (**SAWATEEVA, Liudmila Vladimirovna**); Тагикентская ул., д. 19, кв. 69 Москва, 109444, Moscow (RU). ФИЛИППОВ, Павел Павлович (**FILIPPOV, Pavel Pavlovich**); Мичуринский пр-т, д. 54, к. 3, кв. 152 Москва, 119192, Moscow (RU).

(74) Агент : КУПРИЯНОВА, Ольга Ивановна (КиРШУ **ANOVA, Olga Ivanovna**); ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Технопарк Москва, 119991, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны) : АЕ, АG, АL, АМ, АO, АТ, АU, АZ, ВA, ВВ, ВG, ВН, ВN, ВR, ВW, ВY, ВZ, СA, СH, СL, СN, СO, СR, СU, СZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, Ш, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

(54) Title: METHOD FOR EARLY DIAGNOSIS OF RENAL CELL CARCINOMA

(54) Название изобретения : СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ

(57) Abstract: The invention relates to medicine, and specifically to oncology and clinical biochemistry, and concerns a method for early diagnosis of renal cell carcinoma. The essence of the method consists in determining the presence of antibodies to the protein arrestin 1 in the blood serum of patients in an at-risk group or after a preliminary diagnosis of a kidney tumor, using immunological detection methods (for example, ELISA and western blot). When the presence of antibodies to arrestin 1 is identified in the blood serum of a patient, a preliminary diagnosis of renal cell carcinoma can be made. The proposed method is minimally invasive since only a blood sample from the patient is required. The present method can be used for the early diagnosis of renal cell carcinoma, and significantly increases the likelihood of a positive outcome for the patient when this pathology is detected.

(57) Реферат : Изобретение относится к области медицины, а именно онкологии и клинической биохимии, и касается способа ранней диагностики почечно-клеточной карциномы. Сущность способа заключается в определении наличия антител к белку аррестину 1 в сыворотке крови пациентов из группы риска или после предварительного диагноза опухоли почки с помощью иммунологических методов детекции (например, иммуно-ферментного, вестерн-блот анализа). При выявлении наличия антител к аррестину 1 в сыворотке крови у пациента может быть предварительно диагностирована почечно-клеточная карцинома. Предлагаемый способ малоинвазивен, т.к. требуется только забор крови у пациента. Данный способ может быть использован для ранней диагностики почечно-клеточной карциномы, что значительно повысит вероятность положительного исхода для пациента при обнаружении данной патологии.



WO 2020/071968 A1

OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- в черно-белом варианте ; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из *PATENTSCOPE*.

СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ПОЧЕЧНО -КЛЕТОЧНОЙ
КАРЦИНОМЫ

Область техники

Изобретение относится к области медицины , а именно онкологии и
5 клинической биохимии . Изобретение может быть использовано для ранней
диагностики почечно -клеточной карциномы по наличию антител к зрительному
аррестину 1 в сыворотке крови пациентов с применением иммунологических
методов детекции .

Уровень техники

10 Почечно -клеточная карцинома (ПКК) - вторая наиболее встречаемая
злокачественная патология среди уронефрологических онкологических заболеваний
(R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer Statistics, 2017, CA: a cancer journal for
clinicians, 67 (2017) 7-30 DOI: 10.3322/caac.21387). Она характеризуется как
агрессивный и инвазивный рак с высокой частотой метастазирования . Вдобавок , у
15 ПКК нет специфических симптомов , поэтому она обычно диагностируется случайно
на поздней стадии во время диспансеризации или других рутинных исследований по
поводу другой патологии . У порядка 40% пациентов с диагностированной локальной
ПКК в итоге развиваются метастазы (A.J. Wein, L.R. Kavoussi, M.F. Campbell,
Campbell-Walsh urology / editor-in-chief, Alan J. Wein; [editors, Louis R. Kavoussi ... et
20 ah], 10th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, 2012). Смертность при ПКК
довольно высокая : пятилетняя выживаемость при I стадии ПКК 80-95%, примерно
80% при II стадии ПКК , 60 % при III стадии ПКК и менее 10% при IV стадии (E.
Jonasch, J. Gao, W.K. Rathmell, Renal cell carcinoma, Bmj, 349 (2014) g4797 DOI:
10.Н36/bmj.g4797). Более того , опухолевая инвазия на I-II стадиях ПКК
25 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом - пятилетняя выживаемость у таких
пациентов менее 60%. Что касается метастатической ПКК , прогноз практически
всегда фатальный - десятилетняя выживаемость менее 5% (A.J. Wein, L.R. Kavoussi,
M.F. Campbell, Campbell-Walsh urology / editor-in-chief, Alan J. Wein; [editors, Louis R.
Kavoussi ... et ah], 10th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, 2012). В случае ПКК ,
30 местное хирургическое лечение является золотым стандартом . Установленная
практика при данной патологии - циторедуктивная нефрэктомия с последующей
системной медикаментозной терапией .

Как и при других видах онкологических заболеваний, ранняя диагностика и своевременное начало лечения ПМК приводит к благоприятным исходам заболевания. Тем не менее, в настоящее время не существует методов специфической ранней диагностики ПМК. Обнаружение биомаркеров в биологических жидкостях или в самой опухоли может быть достаточно информативным. Несмотря на это, гетерогенность опухоли и сложность процедуры биопсии на ранней стадии заболевания являются ограничивающими факторами. С другой стороны, взятие крови для обнаружения биомаркеров является менее инвазивной процедурой. Однако серологические биомаркеры подвергаются деградации циркулирующими в крови протеазами и нуклеазами, что, таким образом, уменьшает диагностическую ценность данных, получаемых в таких тестах (T.C. Ngo, C.G. Wood, J.A. Karat, Biomarkers of renal cell carcinoma, Urologic oncology, 32 (2014) 243-251 DOI: 10.1016/j.urolonc.2013.07.011).

В настоящее время наиболее часто диагностические мероприятия по поводу ПМК начинают проводить после случайного обнаружения объемного образования в почке рутинными методами УЗИ, КТ, МРТ. Проведенная впоследствии процедура биопсии позволяет поставить диагноз ПМК. Также для диагностики ПМК используются такие биомаркеры как vimentin, CK -7, CK -20, CD 20, MUC1, AMACR и др. (J.R. Srigley, B. Delahunt, J.N. Eble, L. Egevad, J.I. Epstein, D. Grignon, O. Hes, H. Moch, R. Montironi, S.K. Tickoo, M. Zhou, P. Argani, I.R.T. Panel, The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia, The American journal of surgical pathology, 37 (2013) 1469-1489 DOI: 10.1097/PAS.0b013e318299f2d1). Тем не менее, все перечисленные биомаркеры являются диагностическими, т.е. используются для уточнения подтипа уже установленного диагноза почечно-клеточная карцинома. Более того, перечисленные биомаркеры не детектируются поодиночке, но исследуются в панели, т.н. профили экспрессии. Таким образом, в настоящее время не существует биомаркера, подходящего для ранней (скрининговой) диагностики ПМК.

Наиболее близким к предлагаемому в настоящей заявке способу является детекция белков Tu M 2-ПК, VEGF, TATI, CA 9 (M.O. Golovastova, D.O. Korolev, L.V. Tsoy, V.A. Varshavsky, W.H. Xu, A.Z. Vinarov, E.Y. Zernii, P.P. Philippov, A.A. Zamyatnin, Jr., Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives, Current urology reports, 18 (2017) 3 DOI: 10.1007/sl 1934-017-0655-1). Тем не менее,

по описанным выше причинам белковые биомаркеры обладают рядом недостатков в сравнении с антителами, что в итоге приводит к низкой чувствительности предлагаемых тестов.

Иным типом биомаркеров, которые могут быть применены при ранней диагностике ПКК, являются антитела к aberrantly экспрессируемым в опухоли белкам. Существует несколько преимуществ использования антител в качестве биомаркеров перед другими их типами. В отличие от опухоли-ассоциированных антигенов (ОАА) и нуклеиновых кислот, антитела намного более стабильны в крови (M.A. Murphy, J.J. O'Leary, D.J. Cahill, Assessment of the humoral immune response to cancer, *Journal of proteomics*, 75 (2012) 4573-4579 DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.021). Более того, гуморальный иммунный ответ усиливается со временем и продолжителен. Причиной возникновения противоопухолевого гуморального иммунного ответа является aberrantная экспрессия ОАА. Однако в случае с ПКК редко наблюдается экспрессия хорошо изученных сегодня раково-зародышевых антигенов, таких как RAGE-1, MAGE-A4, SAGE, NY-ESO-1 (M.J. Scanlan, A.O. Gure, A.A. Jungbluth, L.J. Old, Y.T. Chen, Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy, *Immunological reviews*, 188 (2002) 22-32; N. Soga, Y. Hori, K. Yamakado, H. Ikeda, N. Imai, S. Kageyama, K. Nakase, A. Yuta, N. Hayashi, H. Shiku, Y. Sugimura, Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients, *Molecular and clinical oncology*, 1 (2013) 326-330 DOI: 10.3892/mco.2012.40). Тем не менее, существуют другие белки, экспрессирующиеся в норме в иммунопривилегированных тканях, таких как центральная нервная система и сетчатка глаза, которые могут так же aberrantly экспрессироваться в опухолевых клетках вследствие злокачественной трансформации. Такие белки классифицируются в две группы в зависимости от их происхождения: онконевральные и раково-сетчаточные антигены (PCA).

Несколько PCA были классифицированы как ОАА (A.V. Bazhin, D. Schadendorf, N. Willner, C. De Smet, A. Heinzemann, N.K. Tikhomirova, V. Umansky, P.P. Philippov, S.B. Eichmuller, Photoreceptor proteins as cancer-retina antigens, *International journal of cancer*, 120 (2007) 1268-1276 DOI: 10.1002/ijc.22458). Многие из них экспрессируются в нейронах сетчатки глаза, где они участвуют в зрительной трансдукции. Возможность продукции антител к сетчаточным белкам у пациентов с паранеопластическим синдромом, таким как меланома-ассоциированная

ретинопатия (МАР), показывает возможность aberrантной экспрессии сетчаточных белков в соответствующей опухоли (A.H. Milam, J.C. Saari, S.G. Jacobson, W.P. Lubinski, L.G. Feun, K.R. Alexander, Autoantibodies against retinal bipolar cells in cutaneous melanoma-associated retinopathy, *Investigative ophthalmology & visual science*, 34 (1993) 91-100; M.J. Potter, C.E. Thirkill, O.M. Dam, A.S. Lee, A.H. Milam, Clinical and immunocytochemical findings in a case of melanoma-associated retinopathy, *Ophthalmology*, 106 (1999) 2121-2125 DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90493-1). Было показано, что клетки меланомы могут экспрессировать такие PCA как родопсин, трансдуцин, cGMP-фосфодиэстеразу β , родопсин киназу, реCOVERин и аррестин 1 (A.V. Bazhin, D. Schadendorf, N. Willner, C. De Smet, A. Heinzelmann, N.K. Tikhomirova, V. Umansky, P.P. Philippov, S.B. Eichmuller, Photoreceptor proteins as cancer-retina antigens, *International journal of cancer*, 120 (2007) 1268-1276 DOI: 10.1002/ijc.22458). Таким образом, по аналогии с меланомо-ассоциированной ретинопатией, экспрессия PCA в клетках опухоли при ПКК может запустить продукцию антител к PCA. Это может быть использовано для ранней диагностики ПКК. При этом в уровне техники отсутствуют сведения, раскрывающие возможность использования аутоантител против зрительного аррестина - аррестина 1, как одного из PCA, в качестве биомаркера для ранней диагностики ПКК. Известно, что в состав всех белков-аррестинов, включенных в так называемый аррестинный клан, входит аррестинный домен, который является уникальным предком всех аррестинов. Клан состоит из двух семейств: семейство аррестинов и так называемое семейство У р826-родственных белков, которые так же называются а-аррестины, или arrestin-domain-containing proteins (ARRDCs; белки, содержащие аррестинный домен) для обозначения соответствующих белков у млекопитающих (C.E. Alvarez, On the origins of arrestin and rhodopsin, *BMC evolutionary biology*, 8 (2008) 222 DOI: 10.1186/1471-2148-8-222). Семейство аррестинов состоит из 4 белков, которые в свою очередь подразделяются еще на 2 группы: зрительные аррестины, которые включают в себя аррестин 1 (S-antigen, SAG, S-arrestin, аррестин палочек, зрительный аррестин) и аррестин 4 (X-arrestin, ARR3, аррестин колбочек), и β -аррестины, которые включают в себя аррестин 2 (β -аррестин или β -аррестин -, ARRB1) и аррестин 3 (β -аррестин -2, ARRB2) (E.V. Gurevich, V.V. Gurevich, Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways, *Genome biology*, 7 (2006) 236 DOI: 10.1186/gb-2006-7-9-236). В свою очередь, семейство У р826-родственных белков или

α -аррестинов у млекопитающих состоит их 6 белков : ARRDC1, ARRDC2, ARRDC3/TLIMP, ARRDC4, ARRDC5 и TXNIP/TBP-2 (L. Риса, С. Врои, Alpha-arrestins - new players in Notch and GPCR signaling pathways in mammals, Journal of cell science, 127 (2014) 1359-1367 DOI: 10.1242/jcs.142539). Полная классификация аррестинового клана для млекопитающих приведена в табл. 1.

Таблица 1. Семейства аррестинов млекопитающих .

Зрительные и β-аррестины (семейство аррестинов)		α-аррестины (Vps26-родственные белки)
Зрительные аррестины	β-аррестины	
Аррестин 1 (S-antigen, SAG, S-arrestin, rod arrestin)	Аррестин 2 (β -аррестин или β -аррестин-1, ARRB1)	ARRDC1
		ARRDC2
		ARRDC3/TLIMP
Аррестин 4 (X-arrestin, ARR3, cone arrestin)	Аррестин 3 (β -аррестин-2, ARRB2)	ARRDC4
		ARRDC5
		TXNIP/TBP-2

Несмотря на то, что открытый первым аррестин 1 был обнаружен в клетках сетчатки глаза, впоследствии выяснилось, что белки аррестинового семейства встречаются повсеместно. Любая животная клетка экспрессирует как минимум один тип аррестина (E.V. Gurevich, V.V. Gurevich, Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways, Genome biology, 7 (2006) 236 DOI: 10.1186/gb-2006-7-9-236). Однако существует два исключения - это зрительные аррестины. Хотя те или иные β - и α -аррестины постоянно присутствуют в протеоме всех живых клеток, аррестин 1 и аррестин 4 имеют строго специфическую локализацию в организме человека - клетки сетчатки глаза и шишковидной железы. Таким образом, из-за наличия гематоэнцефалического и гематоретинального барьера, аррестины зрительной группы являются «чужеродными» антигенами для нашего организма, и, соответственно, иммуногенны. Действительно, была показана иммуногенная активность аррестина 1 в экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний сетчатки глаза. Более того, как указано ранее, экспрессия аррестина 1 была обнаружена в клетках меланомы у пациентов с MAP, что позволяет отнести аррестин 1 к PCA.

Авторами настоящего изобретения было выявлено, что помимо повсеместно встречаемых аррестинов, в опухолях почки с высокой частотой встречается экспрессия зрительного аррестина 1. Учитывая его иммуногенность, были также проведены исследования по проверке способности обнаруженного вне иммуно -

привилегированной ткани аррестина 1 индуцировать продукцию антител . В результате проведенных исследований показано , что экспрессирующийся при ПКК аррестин 1 способен активировать выработку анти -аррестин 1 антител с частотой примерно 75%. Следует отметить , что аррестины β - и α - подгрупп , несмотря на

5 повсеместный характер экспрессии в клетках организма , не могут быть использованы в качестве диагностических биомаркеров вследствие их невозможности вызвать иммунный ответ , в том числе выработку антител . Таким образом , предложено использовать феномен развития гуморальной реакции в ответ на aberrантную экспрессию аррестина 1 при ранней диагностике ПКК .

10 Раскрытие изобретения

Технической проблемой , решаемой настоящим изобретением , является разработка малоинвазивного способа ранней диагностики ПКК .

Техническим результатом заявляемого изобретения является возможность определения наличия антител к аррестину 1 в сыворотке крови пациентов с

15 предполагаемой патологией иммунологическими методами детекции .

Поставленная задача решается способом определения наличия в сыворотке крови пациентов антител к аррестину 1, способному aberrантно экспрессироваться в клетках опухоли почки пациентов с ПКК , с помощью иммунологических (иммунометрических) методов . К таким методам могут быть отнесены

20 иммуноблотинг , иммуноферментный анализ , иммунофлюоресцентный анализ и т.п .

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведен иммуноблот образцов сывороток от пациентов с ПКК . Контрольные образцы : рекомбинантный зрительный аррестин 1 (1 мкг на дорожку) окрашенный с помощью козьих моноклональных антител к зрительному аррестину 1

25 (дорожка 1), или с помощью сыворотки пациента (разведение 1:20) с уролитиазом (дорожка 2); типичные блоты рекомбинантного зрительного аррестина 1 (1 мкг на дорожку) , окрашенные с помощью сывороток пациентов (титр 1:20) с ПКК с наличием дорожки 3-5) антител к зрительному аррестину 1. Два независимых эксперимента были выполнены для каждого образца сыворотки .

30 Осуществление изобретения

В рамках проведенных в Институте молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

исследований было показано, что PCA аррестин 1 довольно часто может aberrантно экспрессироваться в клетках опухоли почки пациентов с ПКК. Для определения наличия экспрессии аррестина 1 проводилась иммуногистохимия образцов опухоли почки пациентов с диагностированной ПКК. В результате, в 17 образцах из 29, что соответствует 58.6%, была обнаружена aberrантная экспрессия аррестина 1 при ПКК. В табл. 2 представлены данные проведенного исследования.

Таблица 2. Экспрессия аррестина 1 при ПКК.

	Почечно-клеточная карцинома								P	Тест
	Светло-клеточная		Хромофобная		Папиллярная		Всего			
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
Всего	17	100	6	100	6	100	29	100	>0.05	χ^2
Наличие аррестина 1	8	47	5	83.4	4	66.7	17	58.7		
Отсутствие аррестина 1	9	53	1	16.6	2	33.3	12	41.3		

Настоящее изобретение поясняется конкретным примером выполнения, который наглядно демонстрирует возможность достижения требуемого технического результата, но при этом не ограничивает заявленный объем притязаний.

Наличие антител к аррестину 1 в сыворотке крови определялось с помощью метода Вестерн-блоттинг. При положительном результате теста у пациента из группы риска по ПКК или с предварительным диагнозом опухоль почки ставился диагноз ПКК. По итогам проведенных исследований была показана высокая частота наличия антител к аррестину 1 в сыворотке крови пациентов с ПКК. Среди протестированных 33 пациентов с ПКК, у 25 были обнаружены антитела к аррестину 1, что соответствует 75.7%. В табл. 3 представлены данные проведенного исследования.

Таблица 3. Наличие антител к аррестину 1 при ПКК.

	Почечно-клеточная карцинома								P	Тест
	Светло-клеточная		Хромофобная		Папиллярная		Всего			
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
Всего	24	100	4	100	5	100	33	100	>0.05	χ^2
Наличие антител	18	75	3	75	4	80	25	75.7		
Отсутствие антител	6	25	1	25	1	20	8	24.3		

Заявляемый способ ранней диагностики ПКК может быть осуществлен следующим образом. У пациента производят забор венозной крови натощак с утра. Далее, после сворачивания цельную кровь центрифугируют, отбирают сыворотку, которую в дальнейшем используют для анализа. Возможно замораживание образцов сыворотки при -80°C для хранения и дальнейшего использования. Для детекции анти-аррестиновых антител в полученных образцах сыворотки производят SDS-PAGE электрофорез аррестина 1 (2 мкг на дорожку) в 14% геле. Далее аррестин 1 переносят из геля на мембранные фильтры на поливинилидендифториде (PVDF) или нитроцеллюлозную мембрану в Towbin буфере с SDS (25 mM Tris, 192 mM глицин, 20% этанол, 0.05% SDS), pH 8.3. Неспецифические сайты мембраны блокируют с помощью 10% раствора нежирного сухого молока в отмывочном буфере (PBS, 0.1% Tween-20), pH 7.4, в течение 1.5 ч с последующей отмывкой тем же буфером, без молока (отмывка 3 раза по 10 мин; та же последовательность для всех следующих процедур отмывки мембраны). Далее мембрану инкубируют с полученной ранее от пациентов сывороткой в титре 1:20 в течение 1 ч с последующей отмывкой. Далее мембрану инкубируют со вторичными антителами, которые представляют собой конъюгат козьих anti-human IgG антител с пероксидазой в разведении 1:1000 в отмывочном буфере, с последующей отмывкой мембраны от несвязавшихся антител. Иммунореактивные полосы на мембране визуализируют с помощью Enhanced Chemiluminescence Detection System (BioRad, USA). Далее, по результатам детекции иммунореактивных полос делают вывод о наличии или отсутствии антител к аррестину 1 в сыворотке пациента: образец классифицируют как положительный, если иммунореактивная полоса, формирующаяся на мембране с перенесенным на нее аррестином 1 после инкубации с тестируемым образцом сыворотки, соответствует молекулярной массе аррестина 1. Соответственно, в случае отсутствия полосы соответствующей молекулярной массе аррестина 1 образец сыворотки классифицируют как отрицательный, делают вывод об отсутствии антител к аррестину 1 в сыворотке пациента.

Для детекции антител против аррестина 1 в образцах сыворотки можно использовать иммуно-ферментный анализ. В предполагаемой тест-системе в качестве антигена используют рекомбинантный аррестин 1 (V.V. Gurevich, J.L. Benovic, Arrestin: mutagenesis, expression, purification, and functional characterization, Methods in enzymology, 315 (2000) 422-437), при этом другие компоненты могут

варьироваться . Например , в качестве улавливающих антител может быть использована специфическая гипериммунная поликлональная сыворотка кролика , положительным контролем могут служить специфические моноклональные козы антитела против аррестина 1, отрицательным контролем - сыворотка пациента с уролитиазом . В качестве антивидовых конъюгатов могут быть использованы иммуноглобулины против IgG козы , конъюгированные с пероксидазой хрена (конъюгат 1) и иммуноглобулины против IgG человека , конъюгированные с пероксидазой хрена (конъюгат 2). В качестве буферных растворов могут быть использованы : 0,05М карбонат -бикарбонатный буфер (рН 9,5-9,6) для разведения антигена (1,59 г NaCO_3 , 2,93 г NaHCO_3 на 1000 см³ воды - хранить при 4-8°С не более недели). Трис -буферный раствор (ТБР) (рН 7,4-7,6) (8,7 г 0,15 М NaCl , 1,2 г 0,01 М трис HCl на 1000 см³ воды - хранить при 4-8°С не более недели). Промывочный буферный раствор ТБР с твином -20 (ТБР -Т) - 1000 см³ ТБР, 1 см³ Твин -20 (0,1%-ный раствор). Блокирующий буферный раствор (рН 7,4-7,6), содержащий 10 см³ ТБР, 1 г сухого молока (10%-ный раствор). Буфер для разведений проб и конъюгата , содержащий 100 см³ ТБР -Т, 1 г сухого молока (1%-ный раствор). Раствор АБТС (2,2-азино -ди-(3-этилбензоаминосульфонат). Раствор , останавливающий окраску - 1%-ный раствор ДСН (додецилсульфат натрия).

Пример 1. Для сенсibilизации планшета использовали специфическую сыворотку крови кролика (улавливающие антитела) в рабочем разведении (1:4000) на карбонатно -бикарбонатном буфере . В каждую лунку вносили по 100 мкл . Планшет инкубировали при температуре 4-8°С в течение 18-20 ч. Не отмывая планшета вносили блокирующий трис -буферный раствор с 10% сухим молоком , инкубировали 1 ч при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. После отмывки лунок ТБР -Т, вносили антиген - рекомбинантный аррестин 1 в разведении 1:1000 по 100 мкл на лунку . Разведения готовили на ТБР -Т с добавлением 1% сухого молока и инкубировали 1 ч при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. После промывки планшета в ряд лунок с положительным контролем вносили специфические моноклональные козы антитела против аррестина 1 в разведениях от 1:2 до 1:256. В ряд лунок с отрицательным контролем вносили сыворотку пациента с уролитиазом в разведениях от 1:2 до 1:256. Далее в каждый оставшийся ряд лунок вносили испытуемые образцы сывороток крови пациентов - один образец на один ряд лунок - в разведениях от 1:2 до 1:256. Разведения готовили на ТБР -Т с добавлением 1% сухого молока и вносили по 100

мкл на лунку , инкубировали 1 ч при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$. После промывания планшета наносили антивидовой конъюгат - против IgG козы для положительного контроля , против IgG человека в остальные лунки - в рабочем разведении 1:500 по 100 мкл . Планшет инкубировали 1 ч при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$. Промывку лунок проводили 3-5 раз после каждого инкубирования . Внесение субстрата . Раствор АБТС вносили по 100 мкл во все лунки планшета . Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 мин до полного окрашивания контролей . Остановку реакции проводили путем внесения 1%-ного раствора ДСН по 100 мкл в каждую лунку . Результат учитывали , регистрируя оптическую плотность (ОП) при длине волны 405 нм. По полученным результатам ИФА определяли наличие или отсутствие антител к аррестину -1 и титр антител при их наличии в образцах сыворотки крови пациента . Для этого , полученные значения ОП в лунках каждого ряда , соответствующего разведениям от 1:2 до 1:256 сыворотки одного пациента , сравнивались со значениями ОП , полученными из соответствующих лунок в рядах отрицательного и положительного контроля . Титр антител определяли как последнее полученное значение ОП в ряду разведения сыворотки пациента , равное или большее удвоенному среднему значению ОП отрицательного контроля в лунке соответствующего разведения . В случае определения значения ОП в каждой лунке ряда разведений сыворотки одного пациента меньше удвоенного среднего значения ОП соответствующей лунки отрицательного контроля , делался вывод об отсутствии антител к аррестину -1 в сыворотке крови соответствующего пациента . Таким образом , при получении значений ОП , соответствующих наличию антител в пробе , делался вывод о наличии антител в сыворотке крови пациента , а также о титре антител .

Пример 2. Результат теста на наличие аутоантител против аррестина 1 с помощью методики Вестерн -блоттинг представлен на фиг. 1, представляющую собой иллюстрацию PVDF мембраны с перенесенным на нее рекомбинантным зрительным аррестином 1 и обработанную различными образцами . Цифрой 1 обозначена мембрана с положительным контролем , в качестве которого мембрану с рекомбинантным аррестином 1 инкубировали с коммерческими моноклональными антителами к аррестину 1 (Santa Cruz Biotechnology, USA). Цифрой 2 обозначен типичный результат с отрицательным контролем - мембрана с рекомбинантным аррестином 1, проинкубированная с сывороткой от одного из пациентов с

диагностированным уролитиазом , без признаков онкологической патологии . Цифрами 3-5 обозначены типичные положительные опытные результаты , соответствующие наличию аутоантител к аррестину 1 в сыворотке - мембрана с рекомбинантным аррестином 1, проинкубированная с сыворотками пациентов с 5 диагностированной ПКК . Цифрой 4 обозначен отрицательный опытный результат , соответствующий отсутствию аутоантител к аррестину 1 в сыворотке - мембрана с рекомбинантным аррестином 1, проинкубированная с сывороткой от одного из пациентов с диагностированной ПКК . Количество протестированных образцов сывороток от пациентов с установленным диагнозом ПКК и частота встречаемости 10 наличия аутоантител против аррестина 1 в сыворотке крови у пациентов с каждым типом ПКК отражены в табл .3.

Пример 3. Пациент К -в, 53 лет . Проходил обследование в клинике Урологии Сеченовского Университета с предварительным диагнозом опухоль почки . После 15 оперативного вмешательства был проведен гистологический и цитологический анализ послеоперационного материала от пациента : опухоли почки , паранефритической жировой ткани и лимфоузлов . Пациенту был поставлен диагноз светлоклеточной ПКК (ТЗЬ, NO, M O). После операции у пациента был произведен забор венозной крови . После сворачивания кровь центрифугировалась , сыворотка 20 отбиралась и замораживалась для дальнейшего анализа , в частности , на наличие аутоантител к аррестину 1 в Вестерн -блоте . На фиг . 1 (дорожка 3) представлен положительный результат иммунодетекции антител против аррестина 1 в сыворотке крови , собранной у пациента К -ва, в результате чего был сделан вывод о наличии антител против аррестина 1 в крови пациента и наличию ПКК , что согласуется с 25 поставленным ранее диагнозом .

Пример 4. Пациент П -в, 58 лет . Проходил обследование в клинике Урологии Сеченовского Университета с предварительным диагнозом опухоль почки . После 30 оперативного вмешательства был проведен гистологический и цитологический анализ послеоперационного материала от пациента : опухоли почки , паранефритической жировой ткани и лимфоузлов . Пациенту был поставлен диагноз папиллярной ПКК (Т3а , NO, M O). После операции у пациента был произведен забор венозной крови . После сворачивания кровь центрифугировалась , сыворотка отбиралась и замораживалась для дальнейшего анализа , в частности , на наличие аутоантител к аррестину 1 в Вестерн -блоте . На фиг . 1 (дорожка 4) представлен

положительный результат иммунодетекции антител против аррестина 1 в сыворотке крови, собранной у пациента И-ва, в результате чего был сделан вывод о наличии антител против аррестина 1 в крови пациента и наличию ПКК, что согласуется с поставленным ранее диагнозом.

- 5 Пример 5. Пациент П-в, 68 лет. Проходил обследование в клинике Урологии Сеченовского Университета с предварительным диагнозом опухоль почки. После оперативного вмешательства был проведен гистологический и цитологический анализ послеоперационного материала от пациента: опухоли почки, паранефритической жировой ткани и лимфоузлов. Пациенту был поставлен диагноз
- 10 хромофобной ПКК (T1b, NO, M0). После операции у пациента был произведен забор венозной крови. После сворачивания кровь центрифугировалась, сыворотка отбиралась и замораживалась для дальнейшего анализа, в частности, на наличие аутоантител к аррестину 1 в Вестерн-блоте. На фиг. 1 (дорожка 5) представлен
- 15 положительный результат иммунодетекции антител против аррестина 1 в сыворотке крови, собранной у пациента П-ва, в результате чего был сделан вывод о наличии антител против аррестина 1 в крови пациента и наличию ПКК, что согласуется с поставленным ранее диагнозом.

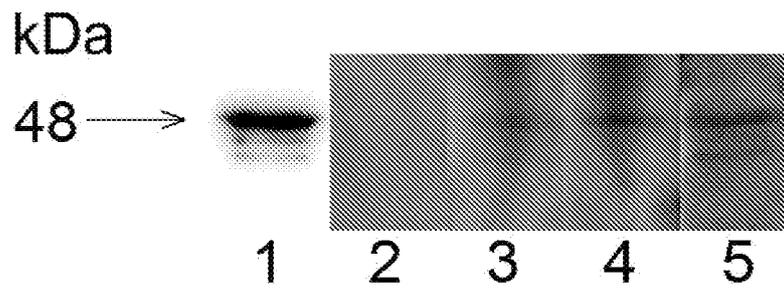
- Преимуществом заявленного технического решения является именно использование антител к ОАА, а не сам ОАА, в частности зрительный аррестин 1.
- 20 Ранняя диагностика ПКК с помощью антител становится возможной благодаря тому, что гуморальный иммунный ответ на ОАА развивается вскоре после начала их аберрантной экспрессии, усиливается со временем и продолжителен. Более того, антитела намного более стабильны в крови, в отличие от других, используемых в качестве биомаркеров, белков и нуклеиновых кислот, которые подвергаются
- 25 быстрой деградации присутствующими в сыворотке крови протеазами и нуклеазами. Даже после прекращения аберрантной экспрессии ОАА (например, вследствие эрадикации опухоли при оперативном вмешательстве) антитела к ОАА продолжают циркулировать некоторое дополнительное время. Другим преимуществом использования антител к ОАА в качестве биомаркеров при ПКК является то, что
- 30 даже низкий уровень экспрессии ОАА на ранней стадии опухолевой прогрессии достаточен для того, чтобы развился сильный гуморальный ответ. Тогда как этот же низкий уровень экспрессии ОАА и биопсия на ранней стадии заболевания становятся проблемой при использовании ОАА в качестве биомаркеров как таковых.

Таким образом, раннее обнаружение наличия антител к ОАА зрительному аррестину 1 в крови пациента может являться предупреждающим сигналом для врача, чтобы назначить более тщательные обследования почек пациента и добиться скорейшего положительного исхода.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики почечно -клеточной карциномы путем определения наличия в сыворотке крови антител к зрительному аррестину - аррестину 1.
2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что антитела определяют иммунологическими методами детекции , в качестве которых используют иммуно -ферментный и вестерн -блот анализ .
3. Применение антител к аррестину 1 в качестве биомаркера для диагностики почечно -клеточной карциномы .

1/1



Фиг. 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2019/050167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER *G01N 33/53 (2006.01)* *G01N 33/574 (2006.01)*
G01N 33/49 (2006.01) *G01N 33/573 (2006.01)*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/48, G01N 33/49, G01N 33/53, G01N 33/573, G01N 33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EAPATIS, ESPACENET, PatSearch (RUPTO internal), Information Retrieval System of FIPS, USPTO, PATENTSCOPE, E- Library, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, D	GOLOVASTOVA Marina O. et al. Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives. Curr Urol Rep. Jan; 18(1): 3, pages 11, doi: 10.1007/s1 1934-017-0655-1	1-3
A	RU 2612021 C1 (FEDERALNOE GOSUDARSTVENNOE BJUDZHETNOE OBRAZOVATELNOE UCHREZHDENIE VYSSHEGO OBRAZOVANIA «SARATOVSKY NATSIONALNY ISSLEDOVATELSKY GOSUDARSTVENNY UNIVERSITET IM. N.G. CHERNYSHEVSKOGO») 01.03.2017	1-3
A	RU 2217761 C2 (FON KNEBEL DEBERITTS MAGNUS et al.) 27.11.2003	1-3
A	US 2006/0029985 A1 (HYPATIA LTD.) 09.02.2006	1-3
A	CAO Y.-J. et al. Overexpression of β -arrestin2 induces G1 -phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017 Apr; 21(8): 1729-1737	1-3

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 2020 (11.02.2020)

Date of mailing of the international search report

20 February 2020 (20.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2019/050167

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации МПК

B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)
 G01N 33/48, G01N 33/49, G01N 33/53, G01N 33/573, G01N 33/574

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
 EAPATIS, ESPACENET, PatSearch (RUPTO internal), Information Retrieval System of FIPS, USPTO, PATENTSCOPE, E-Library, PubMed

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A, D	GOLOVASTOVA Marina O. et al. Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives. Curr Urol Rep. Jan; 18(1): 3, pages 11, doi: 10.1007/s11934-017-0655-1	1-3
A	RU 2612021 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО») 01.03.2017	1-3
A	RU 2217761 C2 (ФОН КНЕБЕЛЬ ДЁБЕРИТЦ МАГНУС и др.) 27.11.2003	1-3
A	US 2006/0029985 A1 (HYPATIA LTD.) 09.02.2006	1-3

последующие документы указаны в продолжении графы C.

данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	

Дата действительного завершения международного поиска 03 февраля 2020 (03.02.2020)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 20 февраля 2020 (20.02.2020)
---	--

Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37	Уполномоченное лицо: Скандари О. Телефон № +7 (495) 531-64-81
---	---

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	CAO Y.-J. et al. Overexpression of β -arrestin2 induces G1-phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017 Apr; 21(8): 1729-1737	1-3