

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043142**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.26

(21) Номер заявки
202100134

(22) Дата подачи заявки
2019.10.03

(51) Int. Cl. **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

(54) **СПОСОБ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ**

(31) **2018134788**

(32) **2018.10.03**

(33) **RU**

(43) **2021.10.14**

(86) **PCT/RU2019/050167**

(87) **WO 2020/071968 2020.04.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)
(RU)**

(72) Изобретатель:

**Замятнин Андрей Александрович,
Бажин Александр Владиславович,
Балдин Алексей Викторович,
Винаров Андрей Зиновьевич,
Головастова Марина Олеговна,
Гришина Алена Николаевна, Зерний
Евгений Юрьевич, Королев Дмитрий
Олегович, Савватеева Людмила
Викторовна, Филиппов Павел
Павлович (RU)**

(74) Представитель:

Куприянова О.И. (RU)

(56) **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
RU-C1-2612021
RU-C2-2217761
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**

(57) 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 опухоль почки с помощью иммунологических методов детекции (например, иммуноферментного, 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.

B1**043142****043142****B1**

Область техники

Изобретение относится к области медицины, а именно онкологии и 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

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 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 al.], 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: 10.1136/bmj.g4797). Более того, опухолевая инвазия на I-II стадиях ПКК 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 al.], 10th ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, 2012). В случае ПКК, 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 ПКК приводит к благоприятным исходам заболевания. Тем не менее, в настоящее время не существует методов специфической ранней диагностики ПКК. 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. Karam, *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 ПКК начинают проводить после случайного обнаружения объемного образования в почке рутинными методами УЗИ, КТ, МРТ. Проведенная впоследствии процедура биопсии позволяет поставить диагноз ПКК. Также для диагностики ПКК 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 ПКК.

Наиболее близким к предлагаемому в настоящей заявке способу является детекция белков Tu M2-PK, VEGF, TATI, CA9 (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/s11934-017-0655-1). 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 опухолеассоциированных 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 aberrантно экспрессироваться в опухолевых клетках вследствие злокачественной трансформации. Такие белки классифицируются в две группы в зависимости от их происхождения: онкогенные и раково-сетчаточные антигены (РСА).

Несколько РСА были классифицированы как ОАА (A.V. Bazhin, D. Schadendorf, N. Winner, 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). 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 РСА как родопсин, трансдуцин, cGMP-фосфодиэстеразу 6, родопсин киназу, ревертин и аррестин 1 (A.V. Bazhin, D. Schadendorf, N. Winner, 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 меланома-ассоциированной ретинопатией, экспрессия РСА в клетках опухоли при ПКК может запустить продукцию антител к РСА. 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 РСА, 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 Vps26-родственных белков, которые так же называются α -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-1, 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 Vps26-родственных белков или α -аррестинов у млекопитающих состоит из 6 белков: ARRDC1, ARRDC2, ARRDC3/TLIMP, ARRDC4, ARRDC5 и TXNIP/TBP-2 (L. Puca, C. Brou, 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 аррестинного 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 аррестинного 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. Действи-

тельно, 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 МАР, что позволяет отнести аррестин 1 к РСА.

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

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 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 иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ, иммунофлюоресцентный анализ и т.п.

Краткое описание чертежей

На чертеже 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 (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.

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 РСА 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-аррестинных 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 иммуноферментный 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: 0,05M карбонат-бикарбонатный буфер (pH 9,5-9,6) для разведения антигена (1,59 г NaCO_3 , 2,93 г NaHCO_3 на 1000 cm^3 воды - хранить при $4-8^{\circ}\text{C}$ не более недели). Трис-буферный раствор (ТБР) (pH 7,4-7,6) (8,7 г 0,15 M NaCl, 1,2 г 0,01 M трис HCl на 1000 cm^3 воды - хранить при $4-8^{\circ}\text{C}$ не более недели). Промывочный буферный раствор ТБР с твином-20 (ТБР-Т) - 1000 cm^3 ТБР, 1 cm^3 Твин-20 (0,1%-ный раствор). Блокирующий буферный раствор (pH 7,4-7,6), содержащий 10 cm^3 ТБР, 1 г сухого молока (10%-ный раствор). Буфер для разведений проб и конъюгата, содержащий 100 cm^3 ТБР-Т, 1 г сухого молока (1%-ный раствор). Раствор АБТС (2,2-азино-ди-(3-этилбензоаминосальфонат). 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 $4-8^{\circ}\text{C}$ 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 ($37\pm 0,5$)°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 ($37\pm 0,5$)°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 чертеже, представляющем 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 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 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 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 (T3b, N0, 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 чертеже (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 наличии ПКК, что согласуется с поставленным ранее диагнозом.

Пример 4. Пациент И-в, 58 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 папиллярной ПКК (T3a, N0, 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 чертеже 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 наличии ПКК, что согласуется с поставленным ранее диагнозом.

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 хромофобной ПКК (T1b, N0, 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 чертеже (дорожка 5) представлен 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 наличии ПКК, что согласуется с поставленным ранее диагнозом.

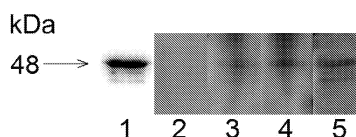
Преимуществом заявленного технического решения является именно использование антител к ОАА, а не сам ОАА, в частности зрительный аррестин 1. Ранняя диагностика ПКК с помощью антител становится возможной благодаря тому, что гуморальный иммунный ответ на ОАА развивается вскоре после начала их aberrантной 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 быстрой деградации присутствующими в сыворотке крови протеазами и нуклеазами. Даже после прекращения aberrантной 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 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 иммуноферментный и вестерн-блот анализ.

3. Применение антител к аррестину 1 в качестве биомаркера для диагностики почечно-клеточной карциномы.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2