



(19) **RU**<sup>(11)</sup> **2 149 023**<sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 39/395, G 01 N 33/531**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 98106976/14, 20.04.1998  
(24) Дата начала действия патента: 20.04.1998  
(46) Дата публикации: 20.05.2000  
(56) Ссылки: RU 2009502 C1, 15.03.94. RU 2025734 C1, 30.12.94. WO 83/04102 A1, 24.11.83. EP 0335804 A1, 04.10.89. EP 0453082 A1, 23.10.91.  
(98) Адрес для переписки:  
121165, Москва, Г-165, а/я 15, ООО "Юстис"

(71) Заявитель:  
Ерхов Валентин Сергеевич  
(72) Изобретатель: Ерхов В.С.  
(73) Патентообладатель:  
Ерхов Валентин Сергеевич

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АНТИСЫВОРОТКИ К УНИВЕРСАЛЬНОМУ ОПУХОЛЕВОМУ АНТИГЕНУ И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭТОЙ АНТИСЫВОРОТКИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к онкологии, и касается способа получения специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену и способа диагностики злокачественных опухолей с использованием этой антисыворотки. Сущность изобретения включает приготовление клеточной взвеси из эмбриона на стадии fetus генетически однородных животных, многократную иммунизацию животных той же генетической

линии этой взвесью, забор клеток селезенки, выделение лимфоцитов, иммунизацию животных той же генетической линии взвесью этих лимфоцитов и получение антисыворотки, которую добавляют к физиологическим жидкостям обследуемого, и по результатам, достоверно отличающимся от контроля, диагностируют опухоль. Изобретение позволяет повысить чувствительность и универсальность метода диагностики. 2 с. и 2 з. п. ф-лы.

RU 2 149 023 C1

RU 2 149 023 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 149 023** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 39/395, G 01 N 33/531**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 98106976/14, 20.04.1998  
(24) Effective date for property rights: 20.04.1998  
(46) Date of publication: 20.05.2000  
(98) Mail address:  
121165, Moskva, G-165, a/ja 15, OOO "Justis"

(71) Applicant:  
Erkhov Valentin Sergeevich  
(72) Inventor: Erkhov V.S.  
(73) Proprietor:  
Erkhov Valentin Sergeevich

(54) **METHOD FOR PRODUCING SPECIFIC ANTISERUM TO GENERAL TUMOR ANTIGEN AND METHOD FOR DIAGNOSING MALIGNANT TUMORS USING THE ANTISERUM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: method involves producing cell suspension from an embryo taken at fetus stage of development of genetically homogeneous animals, carrying out multiple immunization of animals of the same genetic line using the suspension, taking spleen cells, separating lymphocytes,

immunizing animals of the same genetic line with the lymphocytes suspension and producing the antiserum to be added to physiological fluids of a testee. Results reliably differing from the control being obtained, tumor case is to be diagnosed. EFFECT: enhanced sensitivity and applicability of the method. 4 cl

RU 2 149 023 C1

RU 2 149 023 C1

Изобретение относится к медицине, более точно к онкологии, к ее разделам и к диагностике злокачественных опухолей.

Краткий обзор иммунодиагностики в онкологии показывает следующее.

В 1949 г. Л.А.Зильбер впервые показал, а в 1957 г. Т.Прэн и Дж.Мэйн подтвердили, что клеткам злокачественных опухолей присущи собственные антигены.

Принято выделять 4 группы антигенов (по Абелеву).

1) Антигены вирусных опухолей. Они идентичны для любых вирусных опухолей этого вида.

2) Антигены канцерогенных опухолей. Они строго индивидуальны как для больных, так и для опухоли.

3) Изоантигены трансплантационного типа или ТСТА - опухолеспецифические трансплантационные антигены различны во всех индивидуальных опухолях, индуцированных химическими агентами и тождественны в разных опухолях, вызванных одним вирусом.

4) Эмбриональные антигены.

В процессе канцерогенеза клетки подвергаются дедифференцировке, приобретая эмбриональный тип строения. В них часто обнаруживают эмбриональные антигены, специфичные для эмбриональных стадий развития организма. Эти антигены способны иммунизировать организм против опухоли. Наиболее изучены антигены:  $\alpha$  - фетопротеин и раковоэмбриональный антиген (РЭА). I-й обнаруживают при первичной карциноме печени, II - при аденокарциноме кишечника, желудка, пищевода или поджелудочной железы.

У детей с нейробластомой, лимфосаркомой или опухолями мозга обнаруживается  $\alpha_2$  - фетопротеин, при раке желудка - фетальный сульфогликопротеин. Эти антигены локализованы в клеточных мембранах или циркулируют в крови.

Существует специфическая группа антигенов, так называемые гетероспецифические антигены. Их нельзя отнести к чужеродным для данного организма, так как помимо опухоли они присутствуют в других нормальных тканях. К числу их относится почечный антиген, который присутствует в норме в почке и в опухоли печени - гепатоме.

Аденокарцинома почки содержит антиген легких и печени.

Иммунодиагностика злокачественных опухолей основана на индикации в крови больных вышеперечисленных антигенов, антител к ним и выявлении сенсibilизированных к опухолевым антигенам лимфоцитов.

На обнаружении  $\alpha$ -фетопротеина основаны методы диагностики лимфосаркомы, нейробластомы (см. На обнаружении антител к РЭА - способ по патенту РФ N 2077725, кл. G 01 N 33/53, к вирусу лейкоза - способ по авторскому свидетельству N 1641443, G 01 N 33/53).

На обнаружении гетерогенных антигенов патент РФ N 2063768, 1991 г., А 61 К 39/00, патент РФ N 2025734, G 01 N 33/53, авт. свид. СССР N 1589215, G 01 N 33/53, авторское свидетельство N 1704087, G 01 N 33/53, авт. свид. N 170922, авт. свид. N 1589215.

В авт. свид. N 1805392 (G 01 N 33/53) описан способ диагностики рака по антигенам ( $H_{LA-B}$  35) лимфоцитов.

Однако, существующий уровень диагностики таков, что, по сути дела, ни один из тестов не является универсальным. Обнаружение в крови антител является наименее достоверным тестом, т.к. у человека в крови существует очень широкий спектр противоопухолевых и тканевых антител. Не существует методов по выявлению специфического универсального антигена опухолей.

В этом плане перспективно выявление сенсibilизированных лимфоцитов, которые ингибируют рост колоний опухолевых клеток. Однако, они активны только против "своего" вида опухоли.

Таким образом, используемые методы иммунодиагностики опухолей слабо удовлетворяют требованиям первичной диагностики опухолей, совершенно неудовлетворительны в целях скрининга злокачественных новообразований и групп повышенного риска и могут быть применены с известными ограничениями лишь в иммуномониторинге лечения злокачественных опухолей.

Неудачи в существующих методах можно объяснить тем, что используемые в них антисыворотки к опухолевым антигенам, строго говоря, не являются таковыми.

Задачей настоящего изобретения является получение антисыворотки к универсальному опухолевому антигену независимо от вида опухоли и органа.

Прототипом как заявленного способа получения специфической антисыворотки, так и способа диагностики с ее использованием выбран способ по патенту РФ N 2063768, 1991, А 61 К 39/00, который включает выделение тканей опухоли у умерших лиц, замораживание ее, приготовление клеточной взвеси (диспергирование, декантирование клеток), экстракцию антигена из надосадочной жидкости, иммунизацию животных экстрактом, забор крови иммунизированных животных, получение из нее продукта, введение специфической антисыворотки в реакцию с кровью обследуемого, по результатам которой диагностируют опухоль.

Заявленный способ в отличие от известного позволяет получить антисыворотку к идиотопу Т-клеточного рецептора, функционирующего в клетках злокачественных опухолей, то есть антиидиотипическую антиэмбриональную сыворотку, что обеспечивает диагностику всех видов опухолей независимо от их генеза и расположения.

Для осуществления способа получения специфической антисыворотки необходимо провести двухэтапную иммунизацию, выделить эмбрион на стадии Fetus у генетически однородных животных, диспергировать его, подготовить клеточную взвесь. Клеточной взвесью провести иммунизацию животного той же генетической линии. Затем необходимо у иммунизированного животного извлечь клетки селезенки, выделить из них лимфоциты в градиенте плотности фиколл-верографина (1,065-1,079). Этими лимфоцитами следует провести многократную иммунизацию сингенных интактных животных и получить у

них стандартным образом антисыворотку. Эту антисыворотку следует профильтровать через фильтры (например, с диаметром пор около 20 мкм).

Полученная антисыворотка давала реакцию преципитации с различными типами опухолей, полученных от разных людей и в разных органах.

Это позволило на основе полученной антисыворотки разработать метод диагностики злокачественных опухолей. Известные аналогичные способы диагностики опухолей имеют недостаточно высокую чувствительность и даже у наиболее эффективных из них она не превышает 40-60%. Такая низкая чувствительность известных онкологических иммунодиагностических тестов объясняется тем, что используемые в этих реакциях онкомаркеры, строго говоря, таковыми не являются и представляют собой органоспецифические или онкофетальные антигены, присущие в норме отдельным органам или системам органов. Это приводит к тому, что ожидаемое универсальное иммунологическое выражение особенностей единого механизма опухолеобразования подменяется частным, присущим не опухолевым состояниям (воспаление, коллагенозы).

Известно, что органоспецифические антигены не являются обязательными для опухолевой трансформации клеток, что и дает такой высокий процент ложноположительных результатов при диагностике злокачественных опухолей.

Предлагаемый метод обнаружения онкомаркера принципиально отличается от ныне используемых тем, что определяет универсальный, высоко специфический антигенный маркер опухолевого роста, сохраняющийся на всех этапах опухолевой прогрессии.

Метод основан на результатах общетеоретических и экспериментальных работ автора, в которых установлено, что в любых гистологических различных клетках злокачественных опухолей функционирует устойчивый в опухолевой прогрессии процесс Т-клеточного иммунологического распознавания поверхностных эмбриоспецифических антигенов и что указанный механизм лежит в основе феноменов опухолеобразования (иммортализация и прогрессия).

Для осуществления способа диагностики опухолей необходимо приготовить специфическую антисыворотку предложенным способом ее получения, ввести антисыворотку к универсальному опухолевому антигену в иммунологическую реакцию с тканями или физиологическими жидкостями обследуемого, а затем по реакции иммунофлуоресценции или реакции СОЭ диагностировать опухоль. В качестве тканей могут быть использованы ткани опухолей в реакции иммунофлуоресценции или кровь больного в реакции СОЭ.

Диагноз опухоли устанавливают при статистически достоверных различиях результатов реакций между опытной и контрольной пробами.

При этом в случае проведения реакции СОЭ для вычисления различий между опытной и контрольной пробами используют

следующую расчетную формулу

$$\alpha = \frac{\left| \left( A - \frac{B_1 + B_2}{2} \right) \right| \times X}{50}$$

где  $\alpha$  - диагностический коэффициент, который при наличии опухоли составляет  $\geq 1,5$ ;

A - величина СОЭ в опытной пробе (к цитратной крови обследуемого добавлена антисыворотка к антигену опухоли);

$B_1$  и  $B_2$  - величина СОЭ в контрольных пробах (к цитратной крови обследуемого добавлена сыворотка того же вида животного, который использовался для получения антисыворотки);

X - наибольшее значение СОЭ в анализе (или в пробе A или среднее  $B_1$  и  $B_2$ , т.е.  $(B_1 + B_2)/2$ ).

Пример осуществления способов получения антисыворотки и диагностики злокачественных опухолей.

У крыс линии Wistar весом 300-500 г извлечен эмбрион на стадии Fetus. Ткани его диспергированы в среде 199 в соотношении объемов ткань:среда 199 1: 5. Полученной взвесью осуществлялась еженедельная иммунизация интактных крыс линии Wistar. Через 1,5 месяца у забитых крыс извлечена селезенка, диспергирована и в градиенте фиколл-верографина 1,065-1,079 получены лимфоциты.

Из них приготовили взвесь лимфоциты:среда 199 в соотношении 1:1, которую вводили еженедельно другим интактным крысам. После 5 иммунизаций крысы забиты, у них взята кровь, "осветлена", получена из нее антисыворотка, профильтрована, с указанной антисывороткой поставлена реакция СОЭ у нижеприведенных групп больных. При постановке реакции СОЭ использовали стандартный капилляр с внутренним диаметром около 0,8 мм. К 200 мкл 5% забуференного раствора цитрата натрия добавляют 800 мкл цельной свежей венозной крови, взятой в момент проведения анализа, не позже чем через 20 с после забора. От момента смешивания крови с консервантом до проведения анализа не должно пройти более 1 ч. При наличии гемолиза или свертывания анализ ставить нельзя. Из этой крови берут 3 порции по 70 мкл каждая в 3 отдельные пробирки. В одну из них добавляют рабочую (с антителами) в 2 другие - контрольные (без антител) сыворотки по 20 мкл каждая. Сыворотки вводят непосредственно в кровь с консервантом, а не на стенки. Капилляры должны быть одного размера. Смеси перемешивают и заполняют ими капилляры до отметки 5/0. Выдерживают 1 ч. Через 1 ч снимают показатели и обсчитывают их по вышеприведенной математической формуле.

Указанным способом была получена на крысах линии Wistar антисыворотка, которая использовалась в диагностике заболеваний у конкретных больных.

В анализе с кровью больной К-овой, 1942 г. рождения, d-s: рак прямой кишки получены следующие результаты:

$$A = 25, B_1 = 28, B_2 = 28$$

По математической формуле найден коэффициент  $\alpha$ .

$$\alpha = \frac{\left| \left[ 25 - \frac{28+28}{2} \right] \right| \times 28}{50} = 1,7$$

1,7 > 1,5, т.е. диагноз - злокачественная опухоль подтверждается.

В анализе крови больного с фибромой мочки уха получены следующие результаты: A = 10, B<sub>1</sub> = 12, B<sub>2</sub> = 12

По математической формуле найден коэффициент α

$$\alpha = \frac{\left| \left[ 10 - \frac{12+12}{2} \right] \right| \times 12}{50} = 0,48$$

α < 1,5, т.е. диагноз - незлокачественная опухоль подтверждается.

Ниже даны результаты исследований на группе больных злокачественными опухолями.

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ - 125 больных, чувствительность - 83,2%

РАК ЛЕГКОГО - 247 больных, чувствительность - 98,1%

РАК ЖЕЛУДКА - 156 больных, чувствительность - 85,2%

РАК ОБОДОЧНОЙ КИШКИ - 23 больных, чувствительность - 82,5%

РАК ПРЯМОЙ КИШКИ - 27 больных, чувствительность - 92,5%

РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ - 58 больных, чувствительность - 79,5%

РАК ПОЧКИ - 38 больных, чувствительность - 78,6%

РАК ТЕЛА МАТКИ - 412 больных, чувствительность - 75,0%

РАК ШЕЙКИ МАТКИ - 41 больной, чувствительность - 81,8%

КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА - Практически здоровые - 400 человек, чувствительность - 5,1%

Кистозно-фиброзная мастопатия - 221 человек, чувствительность - 8,3%

Гастрит - 120 человек, чувствительность - 6,2%

Язвенная болезнь желудка - 62 человека, чувствительность - 8,3%

Коллагенозы - 40 человек, чувствительность - 6,5%

Воспаление легких (остр. и хрон.) - 60 человек, чувствительность - 7,2%

Простатиты - 18 человек, чувствительность - 2,1%

Хронические колиты - 115 человек, чувствительность - 4,2%

Заключение: предлагаемый метод имеет чувствительность не менее 85,9% и специфичность не менее 92,4%, то есть является высокоэффективным

диагностическим тестом.

Специфическая антисыворотка к универсальному опухолевому антигену в заявке является основным составным

компонентом диагностического препарата, реализуемого в России и за рубежом под торговой маркой TURTEST<sup>®</sup>.

### Формула изобретения:

1. Способ получения специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену, включающий выделение тканей, приготовление клеточной взвеси, иммунизацию животных, забор крови иммунизированных животных, получение из нее целевого продукта, отличающийся тем, что в качестве тканей на I этапе у генетически однородных животных используют эмбрион на стадии fetus, готовят клеточную взвесь, проводят многократную иммунизацию этой взвесью, производят забор клеток селезенки, выделяют из них лимфоциты, проводят последующие иммунизации животных той же генетической линии взвесью этих лимфоцитов, получают антисыворотку и фильтруют ее.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что фильтрацию осуществляют через пористые фильтры.

3. Способ диагностики злокачественных опухолей с использованием специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену, отличающийся тем, что добавляют антисыворотку по п.1 или 2 к тканям, крови или другим физиологическим жидкостям обследуемого с последующим учетом результатов по иммунофлуоресценции, в реакциях СОЭ или других известных методов иммунодетекции и при величинах, достоверно отличающихся от контрольных значений, диагностируют опухоль.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что результаты реакции СОЭ рассчитывают по формуле

$$\alpha = \frac{\left| \left[ A - \frac{B_1 + B_2}{2} \right] \right| \cdot X}{50}$$

где α - диагностический коэффициент, который при наличии опухоли составляет ≥ 1,5;

A - величина СОЭ в опытной пробе (к цитратной крови обследуемого добавлена антисыворотка к антигену опухоли);

B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub> - величина СОЭ в контрольных пробах (к цитратной крови обследуемого добавлена сыворотка того же вида животного, который использовался для получения антисыворотки);

X - наибольшее значение СОЭ в анализе (или в пробе A или среднее B<sub>1</sub> и B<sub>2</sub>, т.е.

$$\frac{B_1 + B_2}{2})$$

55

60