



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 489 440** (13) **C1**

(51) МПК
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012126721/10, 26.06.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.06.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.06.2012

(45) Опубликовано: 10.08.2013 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: СЕЛЬКОВ С.А., ХОХЛОВ П.П. Новый способ выделения и очистки эстроген-связывающего глобулина из ретроплацентарной сыворотки. Вопросы медицинской химии. 1998, N4, с.399-404. HERBERT I. JACOBSON et al. Inhibition of estrogen-dependent breast cancer growth by a reaction product of α-fetoprotein and estradiol. Cancer reseach. Yan, 1990, 50, (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100 лет Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН, зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Булгаков Александр Александрович (RU),
Петрова Ирина Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭСТРОГЕНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА, АССОЦИИРОВАННОГО СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и медицине (практической онкологии), а именно к разработке способа получения эстроген-связывающего белка эмбриональной природы (ЭСБ). Способ предусматривает следующее. Осадок A_0 (отход, получаемый при промышленном получении гамма-глобулиновой фракции из абортивной крови на первой стадии фракционирования) экстрагируют 0,05 М натрий-ацетатным буфером. Полученный экстракт центрифугируют с получением супернатанта. Полученный супернатант хроматографируют и рехроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе. При

этом балластные белки элюируют 0,05 М натрий-ацетатным буфером с последующей элюцией ЭСБ-содержащей фракции линейным градиентом молярности натрий-ацетатного буфера от 0,05 М до 0,25 М. Сбор фракций, элюируемых в интервале 0,075 М - 0,15 М ацетата натрия с последующим концентрированием, диализом против дистиллированной воды и лиофильной сушки. Высушенную фракцию растворяют в 0,015 М натрий-ацетатном буфере и наносят на КМ-целлюлозу, уравновешенную тем же буфером (0,015 М натрий-ацетатный буфер) с последующим проведением ступенчатой элюции, концентрированием фракции,

содержащей ЭСБ и α -1-кислый гликопротеин (α -1-КГП) и полученной элюцией 0,15 М натрий-ацетатным буфером.

Концентрированием этой фракции. Диализа против 0,01 М трис HCl-буфера, содержащего 0,15 М NaCl с последующим нанесением полученной фракции на колонку с иммуносорбентом IgG анти- α -1-КГП-сефароза. При этом не связывающуюся с иммуносорбентом фракцию диализируют и лиофильно сушат с последующим проведением

гель - проникающей ВЭЖХ на колонке с TSK-гелем в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 М хлористого калия и 5 мМ трилона Б. Фракцию, содержащую высокоочищенный ЭСБ, диализируют против дистиллированной воды и лиофильно сушат. Изобретение позволяет расширить арсенал средств, используемых в диагностике злокачественных новообразований. 1 табл., 1 пр.

(56) (продолжение):

p.415-420. GIORA J. SOMJEN, ALVIN M. KAYE et. al. Oestradiol - 17 β ; binding proteins in the rat uterus: changes during postnatal development. *Molecular and cellular endocrinology*. 1974, 1, p.341-353. RU 2123009 C1, 10.12.1998. SAMUEL O. FREEDMAN. et. al. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 1965, p.467-581. CHIN-HSIANG CHIEN et. al. Transcriptional activation of c-myc protooncogene by estrogen in human ovarian cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 1994, 99, p.11-19.

RU 2 4 8 9 4 4 0 C 1

RU 2 4 8 9 4 4 0 C 1



(51) Int. Cl.
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2012126721/10, 26.06.2012**(24) Effective date for property rights:
26.06.2012

Priority:

(22) Date of filing: **26.06.2012**(45) Date of publication: **10.08.2013 Bull. 22**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let
 Vladivostoku, 159, FGBUN Tikhookeanskij institut
 bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
 Dal'nevostochnogo otdelenija RAN, zav. patentnym
 otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Bulgakov Aleksandr Aleksandrovich (RU),
 Petrova Irina Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
 uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
 bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova
 Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii
 nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)**

(54) METHOD TO PRODUCE ESTROGEN-BINDING PROTEIN ASSOCIATED WITH MALIGNANT TUMORS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: residue A_0 (waste produced during industrial production of a gamma-globulin fraction from abortive blood at the first stage of fractioning) is extracted by 0.05 M sodium-acetate buffer. The produced extract is centrifuged to produce a supernatant. The produced supernatant is chromatographed, and rechromatography is carried out on DEAE cellulose. At the same time the ballast proteins are eluted with 0.05 M sodium-acetate buffer with the following elution of ESB-containing fraction with a linear gradient of molarity of sodium-acetate buffer from 0.05 M to 0.25 M. Collection of fractions eluted in the range of 0.075 M - 0.15 M of sodium acetate with further concentration, dialysis against distilled water and lyophilisation. The dried fraction is dissolved in 0.015 M sodium-acetate buffer and applied onto KM-cellulose balanced with the same buffer (0.015 M sodium-acetate buffer) with

the following performance of the stepped elution, concentration of the fraction, containing ESB and α -1-acid glycoprotein (α -1-AGP) and produced with elution of 0.15 M sodium-acetate buffer. Concentration of this fraction. Dialysis against 0.01 M tris HCl-buffer containing 0.15 M NaCl with subsequent application of the produced fraction onto a column with an immunosorbent IgG anti - α -1-AGP-sepharose. At the same time the fraction, which is not bound with immunosorbent, is dialysed and lyophilised with subsequent performance of gel-penetrant HPLC on the column with T8K-gel in 0.1 M potassium-phosphate buffer, containing 0.1 M potassium chloride and 5 mM of trilon B. The fraction containing highly pure ESB is dialysed against distilled water and lyophilised.

EFFECT: invention makes it possible to expand arsenal of facilities used in diagnostics of malignant tumors.

1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к биотехнологии и медицине (практической онкологии), а именно к разработке способа получения эстроген-связывающего белка эмбриональной природы, который может найти применение в диагностике злокачественных новообразований - рака молочной железы и яичника.

5 Ранняя и дифференциальная иммунодиагностика злокачественных опухолей, оценка эффективности лечения онкологических больных, мониторинг их состояния в стадии ремиссии и выявление рецидивов роста опухолей относятся к числу основных проблем практической онкологии. В связи с этим становится очевидной
10 целесообразность и перспективность исследований, ведущих к решению этих проблем.

По ряду признаков раковая клетка схожа с эмбриональной, в частности, для нее характерна способность синтезировать эмбриональные антигены, получившие название раково-эмбриональных (РЭА) или онкофетальных (ОФА). Биосинтез этих
15 антигенов происходит, как при развитии плода, так и при эмбрионализации опухолевых клеток [Damianov I., Knowles B.V. Biology of disease. Monoclonal antibody and tumor-associated antigens. Lab. Invest. 1983. 48. 5. 510-525].

ОФА относятся к одной из наиболее универсальных для опухолевого роста групп антигенов, ассоциированных с опухолями. Предполагается, что ОФА тесно связаны с
20 факторами регуляции молекулярных механизмов эмбрионального и злокачественного роста [Abelev G.I. Alpha-fetoprotein: the genesis. Oncodevelop. Biol. Med. 1983. 4. 2. 371-381]. В настоящий момент некоторые ОФА нашли широкое применение в практической онкологии для мониторинга злокачественных новообразований, дифференциальной
25 диагностики и иммунолокализации опухолей [Fritsche H.A. Clinical application of tumor markers. Bull. Mol. Biol. Med. 1985. 10. 1. 9-23. Bellet D., Bidart J.M., Bohnon C. Recent advances in clinical applications of onco-markers. Pathol. Biol. 1989. 37. 2. 122-124]. Необходимо отметить, что зачастую функции таких маркеров остаются малоизученными.

30 К числу наиболее известных и детально исследованных маркеров злокачественных опухолей эмбриональной природы относятся раково-эмбриональный антиген, α -фетопротейн, трофобласт-специфический β -1 глобулин [Nishi S Isolation and characterization of human fetal α -globulin from the sera of fetuses and hepatoma patient. Cancer Res. 1970. 30. 6. 2507-2513; Gold P., Freedman S.O. Demonstration of tumor-specific antigens in
35 human colonic carcinomabu immunological toleranceand absorption techniques. J. Exp. Med. 1965. 121. 3. 439-462; Gold P., Freedman S.O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. J. Exp.Med. 1965. 122. 3. 467-581; Абелев Г.И. Принципы иммунодиагностики опухолей. 1982. 4. 5-12. Татаринев Ю.С. Трофобластический
40 бета-1-гликопротеин. Успехи соврем, биол. 1983. 95. 1. 57-64]. Они не являются органоспецифическими маркерами, но находят широкое применение для оценки эффективности лечения, мониторинга болезни, в частности, выявления рецидивов, требующих своевременного повторения курса лечения.

45 Источниками выделения маркеров злокачественных опухолей могут служить экстракты этих опухолей, а также экстракты плаценты, амниотическая жидкость, пуповинная кровь и абортивный материал [Абелев Г.И. Изучение антигенной структуры опухолей. Труды VIII Междунар. противоракового конгр. М. 1963. 3Б. 224-227; Татаринев Ю.С. Фетальный α -глобулин в сыворотке больных первичным раком
50 печени. Тез. докл. I-го Всесоюзного биохим. съезда Л. 1963. 2. 274; Al-Awgati M.A., Gordon Y.B., Chard T. A simple and reliable method for the purification of human alpha-fetoprotein (AFP) from amniotic fluid and fetal livers. Clin. Chim. Acta 1978. 89. 2. 173-182; Khall F.K., Stephon E., Guiband S. Purification of placental alphafetoprotein. Clin. Chim. Acta

1978. 85. 1. 167-172].

Так, например, известен способ выделения α -фетопротейна (АФП) из пуповинной крови. Сыворотку крови, отдиализованную против 0.1 М Трис-НСl буфера, рН 7.0 наносили на колонку с QAE-Sephadex A-50, уравновешенную тем же буфером. Элюцию белковых фракций осуществляли увеличивающимся градиентом NaCl. Фракцию, содержащую АФП, дилизовали против 0.05 М Трис-НСl НСl буфера, рН 7.9 и смешивали с Celite 545. Смесь отмывали дважды 60% насыщенным раствором сульфата аммония, уравновешивали 80% насыщенным раствором сульфата аммония и переносили на колонку. Далее проводили градиентную элюцию уменьшающейся концентрацией сульфата аммония. Фракцию, содержащую АФП, обессоливали на Sephadex G-25 и лиофилизировали. Далее проводили гель-проникающую хроматографию на Sephadex G-200, после чего АФП-обогащенную фракцию пропускали через колонку с аффинным сорбентом, полученным конъюгированием кроличьих иммуноглобулинов против нормальной сыворотки человека. Выход очищенного препарата составил 39% от исходного содержания в источнике выделения АФП.

Известно, что гормоны, являясь биологически активными регуляторами эндогенного происхождения, играют важную роль на всех этапах развития, старения и гибели живых организмов. К группе женских стероидных гормонов относятся эстрогены. Функции эстрогенов, определяющие их значение на биологическом уровне, разнообразны, т.к. они регулируют процесс метаболизма и транспорта Сахаров и аминокислот, включение йода тиреоидными тканями [Tata J.R. Regulation of protein synthesis by growth and developmental hormones. Biochemical Action of Hormones, ed. LitWack G. 1970. 1. 107, Academic Press, New York]. Эстрогены способны регулировать качественные и количественные изменения в синтезе РНК, стимулировать или подавлять процесс биосинтеза белков, что, в свою очередь, определяет такие процессы, как дифференцировка, развитие, пролиферация и смерть эстроген-зависимых клеток [Chief S.H., Wang F.F., Hamilton T.L. Transcriptional activation of C-myc protooncogenesis by estrogen in human ovarian-cancer cell. Mol. and Cell. Endocrinol. 1994. 99. 1. 11-19; Somjen G.L., Kaye A.M., binder H.R. Oestradiol-17 β binding protein in the rat uterus changes during postnatal development. Mol. Cell. Endocrinol. 1974. 1. 341-353].

Эстрогены циркулируют в кровотоке в связанной и не связанной с белками плазмы формах. Изменения в соотношении этих форм наблюдается при ряде онкологических заболеваний, в частности, при эстроген-зависимых формах рака. Усиление продукции гормон-связывающих белков и снижение концентрации несвязанной формы эстрогенов приводит к подавлению пролиферации злокачественных клеток и наоборот [Jacobson H.I., Bennett J.A., Mizejewski G.J. Inhibition of estrogen-dependent breast cancer growth by a reaction product of α -fetoprotein and estradiol. Cancer Res. 1989. 50. 415-420].

Наиболее близким к заявляемому способу является способ получения эстроген-связывающего глобулина (ЭСГ), являющийся наиболее известным белком, связывающим у женщин эстроген, а у мужчин тестостерон [С.А. Сельков, П.П. Хохлов. Новый способ выделения и очистки эстроген-связывающего глобулина из ретроплацентарной сыворотки. Вопросы медицинской химии. 1999, Том 44, Вып.4, N.6, С.399-404]. Данный белок известен в литературе под названием «тестостерон-связывающий глобулин» или «секс-гормон связывающий глобулин» («sex hormone-binding globulin»).

Для выделения ЭСГ использовали осаждение белковой фракции сульфатом

аммония из ретроплацентарной сыворотки, полученной при срочных родах, с последующим проведением ионообменной хроматографии на колонке Q-Sepharose FF, осаждением полиэтиленгликолем ПЭГ-5000, гель-проникающей хроматографии на колонке с Sephacryl S-400, металл-хелатной хроматографии на колонке с сорбентом Chelating Sepharose. Полученный препарат ЭСГ имеет молекулярную массу 110 кДа в ПААГ электрофорезе при не денатурирующих условиях и около 50 кДа при восстанавливающих условиях, т.е. он является гомодимером.

Количественное определение ЭСГ в сыворотке крови беременных имеет значение в пренатальной диагностике.

В доступной литературе не обнаружено сведений о специфичности известного глобулина в отношении каких-либо онкологических заболеваний.

Задача изобретения - разработка способа получения эстроген-связывающего белка, ассоциированного со злокачественными новообразованиями, из отхода при промышленном получении гамма-глобулиновой фракции из абортивной крови, с целью расширения арсенала средств, используемых в диагностике злокачественных новообразований - рака молочной железы и яичника.

Поставленная задача решена способом получения эстроген-связывающего белка, ассоциированного со злокачественными новообразованиями (ЭСБ), согласно которому осадок A_0 , являющийся отходом при промышленном получении гамма-глобулиновой фракции из абортивной крови на первой стадии фракционирования, экстрагируют 0.05 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.65. Супернатант, полученный центрифугированием экстракта, хроматографируют и рехроматографируют на ДЕАЕ-целлюлозе. Балластные белки элюируют 0.05 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.65, затем фракцию, содержащую ЭСБ, элюируют линейным градиентом молярности натрий-ацетатного буфера от 0.05 М до 0.25 М, pH 4.65; собирают фракции, элюируемые в интервале 0.075-0.15 М ацетата натрия, концентрируют, диализуют против дистиллированной воды и лиофильно сушат.

Высушенную фракцию растворяют в 0.015 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.0 и наносят на КМ-целлюлозу, уравновешенную тем же буфером, после чего проводят ступенчатую элюцию. Фракцию, элюируемую 0.15 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.0, содержащую ЭСБ и α -1-кислый гликопротеин (α -1-КГП), являющийся основным примесным компонентом, концентрируют, диализуют против 0.01М трис-НСl буфера, содержащего 0.15М NaCl, pH 8.0.

Затем полученную фракцию наносят на колонку с иммуносорбентом IgG анти- α -1-КГП-сефароза для удаления α -1-КГП. Несвязавшуюся с иммуносорбентом фракцию, содержащую ЭСБ, диализуют и лиофильно сушат. На заключительном этапе проводят гель-проникающую ВЭЖХ на колонке с TSK-гелем типа «G-3000 SW», уравновешенную 0.1 М калий-фосфатным буфером, содержащим 0.1М хлористого калия и 5 мМ трилона Б, pH 4.5. Фракцию, содержащую высокоочищенный ЭСБ, диализуют против дистиллированной воды и лиофильно сушат.

В доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено сведений о способах получения онкофетальных антигенов из отхода при промышленном получении гамма-глобулиновой фракции из абортивной крови на первой стадии фракционирования - осадка A_0 .

Изучение физико-химических и иммунохимических свойств белка, получаемого заявляемым способом, показало, что он является гомогенным белком с молекулярной массой 34 кДа по данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ электрофорез). ЭСБ состоит из 314 остатков

аминокислот с высоким содержанием пролина, глицина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. В иммуноэлектрофорезе он образует одну дугу преципитации с относительной электрофоретической подвижностью 0.8. Изоэлектрическая точка ЭСБ находится в интервале PI 3.2-3.6. Анализ полученных нами данных позволяет сделать вывод о том, что ЭСБ относится к группе гормон-связывающих белков. Таким образом, ЭСБ можно охарактеризовать как белок онкофетальной природы, связывающий женские половые гормоны.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в получении нового высокоочищенного эстроген-связывающего белка из осадка A_0 , являющегося отходом при промышленном получении гамма-глобулиновой фракции из abortивной крови на первой стадии фракционирования. Таким образом, предлагаемый способ расширяет спектр экономичных сырьевых источников, используемых для получения онкофетальных антигенов.

Белок, получаемый заявляемым способом, отличается от известного ЭСГ тем, что он связывается с эстрадиолом и эстриолом, но не взаимодействует с тестостероном, и участвует в регуляции гормонального уровня при неопластической трансформации. Он может быть использован для диагностики, мониторинга рака молочной железы и яичника, и оценки эффективности курса терапии этих заболеваний.

Изобретение иллюстрируется примером конкретного выполнения.

Пример. 3 кг осадка A_0 экстрагируют 12 л 0.5 М натрий-ацетатного буфера, pH 4.65. Затем супернатант, полученный центрифугированием экстракта при 3000 g в течение 40 мин, хроматографируют на ДЕАЕ-целлюлозе на фильтре Шотта №4 под вакуумом водоструйного насоса. После тщательной отмывки сорбента стартовым буфером, ЭСБ-содержащую фракцию элюируют 5 л 0.25М натрий-ацетатного буфера, pH 4.65. Элюат концентрируют ультрафильтрацией на мембранных фильтрах «Рипор» №3 до объема 500 мл, диализуют против сменяемой дважды в сутки дистиллированной воды в течение 3 суток и сутки против 0.05 М натрий-ацетатного буфера, pH 4.65 при +4°C.

ЭСБ-содержащую фракцию центрифугируют при 3000 g в течение 30 мин. Осадок отбрасывают, а супернатант используют для рехроматографии на колонке 5x40 см с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенной 0.05 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.65. После нанесения супернатанта на колонку сорбент отмывают стартовым буфером до прекращения поглощения при 280 нм. Элюцию ЭСБ-содержащей фракции с сорбента проводят линейным градиентом молярности натрий-ацетатного буфера, pH 4.65 от 0.05М до 0.25М (по 2 л каждого). Собирают фракции, элюируемые в интервале 0.075-0.15М ацетата натрия, концентрируют, диализуют против дистиллированной воды, как описано выше, и лиофильно сушат. Выход ЭСБ-содержащей фракции 2 г.

Хроматография на КМ-целлюлозе.

2 г ЭСБ-содержащей фракции растворяют в 100 мл 0.015М натрий-ацетатного буфера, pH 4.5 и диализуют в течение ночи при +4°C против этого же буфера. Раствор осветляют центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин и наносят на колонку 10x20 см с КМ-целлюлозой, предварительно уравновешенную 0.015 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.0. Далее проводят ступенчатую элюцию 0.015М натрий-ацетатным буфером, pH 4.0; 0.06 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.0; 0.09М натрий-ацетатным буфером; 0.15 М натрий-ацетатным буфером, pH 4.0. Фракцию, элюируемую четвертой ступенькой градиента, содержащую ЭСБ и α -1-кислый гликопротеин (α -1-КГП), концентрируют, диализуют против 0.01М трис-HCl буфера,

содержащего 0.15М NaCl, рН 8.0, и используют для негативной аффинной хроматографии. Выход ЭСБ-содержащей фракции 50 мг.

Негативная аффинная хроматография.

Негативную аффинную хроматографию проводят на иммуносорбенте IgG анти- α -1-КГП-сефароза. Отдиализованный против стартового буфера раствор четвертой фракции, полученный после деления на КМ-целлюлозе, приливают к 50 мл иммуносорбента, уравновешенного тем же буфером. Далее в течение часа при комнатной температуре проводят неинтенсивное встряхивание. Взвесь аккуратно переносят на колонку соответствующего объема и собирают не связавшуюся с иммуносорбентом фракцию, используя для отмывки стартовый буфер. Ее диализуют, лиофильно сушат и используют для дальнейшего выделения ЭСБ без примеси α -1-КГП. Выход ЭСБ-содержащей фракции 30 мг.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Гель-проникающую ВЭЖХ проводят на колонке с TSK-гелем типа 2G-3000 SW2 размером 2.5×700 мм, используя хроматографическую систему для аналитического и полупрепаративного деления «Gilson», в 0.1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0.1 М хлористого калия и 5 мМ трилона Б, рН 4.5 в рабочем режиме 23 бара, со скоростью 1 мл в мин.

10 мг очищенного на предыдущей стадии ЭСБ в 100 мкл вышеуказанного буфера центрифугируют 5 мин при 14000 g и наносят на колонку с сорбентом. Оптическую плотность детектируют при 280 нм. ЭСБ соответствует пик со временем удерживания 40 мин. Фракцию, содержащую высокоочищенный ЭСБ, диализуют против дистиллированной воды и лиофильно сушат. Выход высокоочищенного ЭСБ 2 мг. Для трех последовательных хроматографии конечный выход составляет 6 мг.

Стадии выделения, степень чистоты и выход ЭСБ представлены в таблице.

Таблица					
Стадии выделения, степень чистоты и выход ЭСБ					
№ п/п	Стадия	Вес, мг	Степень очистки	Содержание ЭСБ, мг	Степень чистоты, %
1.	Осадок A ₀	3·10 ⁶	-	-	-
2.	Экстракт	75·10 ⁴	-	6,0	-
3.	Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	2·10 ³	375	60	3
4.	Ионообменная хроматография на КМ-целлюлозе	50	40	35	70
5.	Негативная аффинная хроматография на IgG анти- α -1-КГП-сефарозе	30	17	27	90
6.	Высокоэффективная гель-проникающая хроматография	6	5	6	100

Гомогенность полученного препарата подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и иммунохимическими методами после получения антисыворотки против него.

Авторы провели исследование по способности ЭСБ связываться со стероидными женскими и мужскими половыми гормонами, а также провели оценку перспектив определения концентрации этого антигена в сыворотках крови онкологических пациентов иммуноферментным методом анализа с целью диагностики, мониторинга онкологических заболеваний и оценки эффективности курса терапии.

Установлено, что ЭСБ образует комплексы с двумя представителями этой группы гормонов - эстрадиолом и эстриолом, но не взаимодействует с тестостероном. Эти результаты позволяют сделать вывод, что получаемый заявляемым способом белок

является эстроген-связывающим белком, и участвует в регуляции гормонального уровня при неопластической трансформации.

Иммуноферментным методом анализа показано, что в сыворотке крови здоровых доноров уровень ЭСБ не превышает 12 нг/мл. Значительное увеличение уровня ЭСБ
5 наблюдалось в сыворотках крови онкологических пациентов и пациентов с доброкачественными опухолями. В случае рака молочной железы концентрация ЭСБ достигает 500 нг/мл и 135 нг/мл при доброкачественных новообразованиях. Аналогичная закономерность наблюдается при опухолях яичника (550 нг/мл и 160
10 нг/мл соответственно).

Формула изобретения

Способ получения эстрогенсвязывающего белка, ассоциированного со злокачественными новообразованиями (ЭСБ), характеризующийся тем, что осадок A_0 ,
15 являющийся отходом при промышленном получении гамма-глобулиновой фракции из абортивной крови на первой стадии фракционирования, экстрагируют 0,05М натрий-ацетатным буфером, рН 4,65, затем супернатант, полученный центрифугированием экстракта, хроматографируют и рехроматографируют на ДЕАЕ-целлюлозе, при этом
20 балластные белки элюируют 0,05 М натрий-ацетатным буфером, рН 4,65, а ЭСБ-содержащую фракцию элюируют линейным градиентом молярности натрий-ацетатного буфера от 0,05 М до 0,25 М, рН 4,65; собирают фракции, элюируемые в интервале 0,075-0,15 М ацетата натрия, концентрируют, диализуют против
25 дистиллированной воды и лиофильно сушат; затем высушенную фракцию растворяют в 0,015 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,0 и наносят на КМ-целлюлозу, уравновешенную тем же буфером, далее проводят ступенчатую элюцию и фракцию, элюируемую 0,15 М натрий-ацетатным буфером, рН 4,0, содержащую ЭСБ и α -1-кислый гликопротеин (α -1-КГП), концентрируют, диализуют против 0,01М трис-НСI
30 буфера, содержащего 0,15М NaCl, рН 8,0; далее полученную фракцию наносят на колонку с иммуносорбентом IgG анти- α -1-КГП-сефароза, затем не связавшуюся с иммуносорбентом фракцию, диализуют и лиофильно сушат; далее проводят гель-проникающую ВЭЖХ на колонке с TSK-гелем в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,1 М хлористого калия и 5 мМ трилона Б, рН 4,5, затем фракцию,
35 содержащую высокоочищенный ЭСБ, диализуют против дистиллированной воды и лиофильно сушат.

40

45

50