

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201501004 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2017.02.28

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2015.08.03

---

(54) СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

---

(96) 2015000072 (RU) 2015.08.03

(71) Заявитель:  
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"ДЖИНЭКСТ" (RU)

(72) Изобретатель:  
Тороповский Андрей Николаевич,  
Никитин Алексей Георгиевич,  
Викторов Денис Александрович,  
Жмырко Екатерина Викторовна,  
Гордиев Марат Гордиевич (RU)

(74) Представитель:  
Михайлов А.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины, точнее - к средствам для выявления онкологических заболеваний простаты. Предложен способ получения ДНК-праймеров и зондов для неинвазивной диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена РСА3 по генетическому материалу из образца мочи пациента. Также предложен набор праймеров и зондов для неинвазивной диагностики рака предстательной железы и способ неинвазивной диагностики рака предстательной железы с использованием этого набора.

201501004 A1

201501004

A1

# **СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Изобретение относится к медицине, в особенности к молекулярно-биологическим исследованиям в области выявления онкологических заболеваний и может быть использовано для неинвазивной диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена РСА3 в образце мочи пациента.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Рак предстательной железы - злокачественное новообразование, возникающее из эпителия альвеолярно-клеточных элементов предстательной железы.

Рак простаты – лидер онкологических заболеваний у мужчин: в России наблюдаются около 14 тысяч случаев в год. Рак предстательной железы является причиной почти 10 % смертей от рака у мужчин и одной из главных причин смерти у пожилых мужчин. В США рак предстательной железы является третьей по частоте причиной смерти от злокачественных опухолей.

В настоящее время методами диагностики рака предстательной железы являются:

- исследование уровня простатического специфического антигена (ПСА) крови
- трансректальная эхография (трансректальное ультразвуковое исследование простаты)
- ректальное пальцевое обследование простаты
- биопсия предстательной железы
- магнитно-резонансная томография
- радиоизотопные исследования
- рентгенологические обследования
- компьютерная томография
- ультразвуковое исследование брюшной полости
- урофлоуметрия.

Биопсия предстательной железы является весьма точным методом. Однако, поскольку биопсия является инвазивным методом, имеющим определённую травматичность и риск для пациента, её назначают только после получения положительного или сомнительного результата одного или нескольких из следующих исследований:

- трансректальная эхография,
- магнитно-резонансная томография,
- радиоизотопные исследования,
- рентгенологические обследования,
- компьютерная томография,
- ультразвуковое исследование брюшной полости.

Вместе с тем, остальные методы исследований, в том числе определение уровня простатического специфического антигена (ПСА) крови не являются высокоспецифичными и могут давать положительный результат при патологиях предстательной железы незлокачественной этиологии.

Таким образом, в настоящее время сохраняется актуальность в создании метода диагностики рака предстательной железы, обладающего преимуществами перед инвазивными, неинвазивными и малоинвазивными способами по вышеупомянутым критериям, а также по надежности результатов диагностики.

## **РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем тексте использованы следующие сокращения:

ПСА – простатический специфический антиген.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

РНК – рибонуклеиновая кислота.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ЭДТА – этелендиаминтетраацетат натрия.

PSA3 – prostate cancer antigen 3.

KLK3 – kallikrein-related peptidase 3.

COMT – catechol-O-methyl transferase.

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота.

dNTP – Deoxyribonucleotide triphosphate.

Задача настоящего изобретения состоит в создании способа определения уровня экспрессии гена PSA3 в образце мочи пациента и диагностического набора для его осуществления, позволяющего проводить неинвазивную диагностику рака предстательной железы по образцу мочи пациента.

Определение уровня экспрессии гена PSA3 предполагает проведение количественного анализа на транскрипт названного гена, то есть его РНК. Из-за низкой воспроизводимости результатов выделения нуклеиновых кислот, необходимо проводить

выравнивание результатов по транскрипту (РНК) другого гена, экспрессия которого относительно стабильна. В качестве такого гена нами выбран KLK3.

Для количественного ПЦР-анализа на определение уровня представленности транскриптов необходима предварительная постановка реакции обратной транскрипции для синтеза первой цепи кДНК, являющейся матрицей для дальнейшей реакции амплификации.

При разработке методик детекции количества копий кДНК с помощью разрушаемых олигонуклеотидных зондов основной проблемой является неспецифичный отжиг праймеров и зондов, в том числе на геномной ДНК, что может приводить к значительным систематическим ошибкам измерения. Для устранения этого явления необходимо выбирать наиболее специфичные по отношению к кДНК комбинации праймеров и зондов и тщательно оптимизировать концентрацию олигонуклеотидов в смеси. С учетом этого для выбранных регионов был проведен дизайн праймеров и зондов, позволивший увеличить специфичность *in silico*.

Отбор праймеров и зондов согласно способу, описанному ниже, позволяет избежать вышеуказанных проблем и создать диагностический набор для неинвазивной ПЦР-диагностики рака предстательной железы на основе определения уровня экспрессии гена PCA3 в генетическом материале из образца мочи пациента.

Поставленная задача решена благодаря применению способа получения ДНК-праймеров и зондов для неинвазивной диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена PCA3 по генетическому материалу из образца мочи пациента, в котором используют:

- (а) образец кДНК, соответствующей РНК гена PCA3;
- (б) образец кДНК, соответствующей РНК гена KLK3;
- (в) образец кДНК, соответствующей РНК гена COMT;
- (г) образец геномной ДНК человека;

характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии:

(1) синтезируют прямой и обратный праймеры, удовлетворяющие одному или сразу обоим из следующих требований:

(i) один или оба праймера комплементарны экзон-экзонным переходам, длина участка экзона, комплементарного 3'-концу праймера от 10 до 3 нуклеотидов, 3'-конец межэкзонного праймера не комплементарен соответствующему интрону в геномной ДНК одним или более нуклеотидом, и обязательно последним нуклеотидом 3'-конца,

(ii) между внутриэкзонными или межэкзонными участками кДНК, комплементарными праймерам, в геномной ДНК присутствует интрон длиной не менее 1000 пар нуклеотидов;

(2) проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) образца (г) с вышеуказанными праймерами;

(3) отбирают пары праймеров и зонды, обеспечивающие отсутствие реакции на образце геномной ДНК;

(4) проводят полимеразную цепную реакцию с сериями, по меньшей мере, из четырёх 10-кратных разведений образцов (а), (б) и (в);

(5) отбирают пары праймеров и зонды, обеспечивающие эффективность полимеразной цепной реакции выше 65 % и линейность при изменении относительной концентрации образцов (а) (б), (в) выше 0,9.

Поставленная задача решена благодаря тому, что набор для неинвазивной ПЦР-диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена PCA3 по генетическому материалу из образца мочи пациента, содержит для каждого из трёх генов PCA3, KLK3 и COMT, по меньшей мере, одну пару из прямого и обратного праймеров, и, по меньшей мере, один соответствующий им зонд, при этом упомянутые праймеры и зонд отвечают тем же требованиям, что и праймеры и зонд, синтезированные и отобранные способом по п.1.

В одном из предпочтительных вариантов вышеописанного набора, размер ампликона, соответствующий парным (прямому и обратному) праймерам, составляет целое число в диапазоне от 60 до 300 пар нуклеотидов, предпочтительно, целое число в диапазоне от 100 до 250 пар нуклеотидов.

Прямой праймер, обратный праймер и зонд для COMT предпочтительно выбраны из группы олигонуклеотидов включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым – обратный праймер, третьим - зонд):

SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 13,

SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и

гомологичные им, по меньшей мере, на 95 % олигонуклеотиды.

Прямой праймер, обратный праймер и зонд для KLK3 предпочтительно выбраны из группы олигонуклеотидов включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым – обратный праймер, третьим - зонд):

SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43,

SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 43,  
SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 43,  
SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73,  
SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и

гомологичные им, по меньшей мере, на 95 % олигонуклеотиды.

Прямой праймер, обратный праймер и зонд для ПСА3 предпочтительно выбраны из группы олигонуклеотидов включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым – обратный праймер, третьим - зонд):

SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и

и гомологичные им, по меньшей мере, на 95 % олигонуклеотиды.

В одном из предпочтительных вариантов вышеописанного набора он дополнительно включает в себя кДНК для осуществления положительного контроля. Положительный контроль позволяет проконтролировать прохождение реакции и снизить вероятность ложноотрицательных результатов.

В еще одном предпочтительном варианте вышеописанного набора он дополнительно включает в себя термостабильную ДНК-полимеразу 10 единиц/мкл.

В другом предпочтительном варианте вышеописанного набора он дополнительно включает в себя водный раствор, содержащий:

приблизительно 67 мМ трис-HCl, pH 8,8 при 25 °C,  
приблизительно 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

приблизительно 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>,

приблизительно 6,7 мкМ ЭДТА,

приблизительно 170 мкг БСА, и

смесь четырех основных dNTP в концентрации приблизительно 0,2 мМ каждого.

В одном из предпочтительных вариантов вышеописанного набора он дополнительно включает в себя деионизированную воду.

Вышеуказанная задача также решена благодаря тому, что в предлагаемом способе диагностики рака предстательной железы, используют:

- (а) образец мочи пациента;
- (б) набор по любому из пп. 2-9;
- (в) набор, включающий рандомные и/или олиго-дТ и/или специфические праймеры, ревертазу, dNTP и буфер для обратной транскрипции.

При этом предлагаемый способ предусматривает следующие стадии:

- (1) выделяют РНК из образца (а);
- (2) проводят обратную транскрипцию РНК, выделенной на стадии (1) набором (в);
- (3) проводят количественную полимеразную цепную реакцию продуктов обратной транскрипции, полученных на стадии (2), посредством праймеров из набора (б), состоящую из начального плавления и ряда циклов из плавления, отжига и синтеза;
- (4) определяют количество продуктов полимеразной цепной реакции, полученных на стадии (3), посредством флуоресцентной спектроскопии в присутствии зондов из набора (б).

Предпочтительно, когда на стадии (3) вышеописанного способа:

начальное плавление проводят в течение 1÷5 минут при температуре 94÷96 °С,

цикл, включающий плавление в течение 10÷30 секунд при температуре 94÷96 °С,

проводят 30÷60 раз,

отжиг и синтез при температуре 58÷66 °С осуществляют в течение 30÷60 мин, а

детекцию продуктов полимеразной цепной реакции проводят во время стадии отжига.

Желательно, когда обратную транскрипцию в вышеописанном способе проводят 50÷150 единицами ревертазы в течение 30÷90 минут при температуре 36÷43 °С.

Предпочтительно, когда концентрация праймеров в реакционной смеси в вышеописанном способе составляет  $400 \pm 100$  нМ, зондов –  $200 \pm 50$  нМ, а температура отжига –  $60 \pm 5$  °С.

Особенно предпочтительно, когда в качестве диагностического показателя в вышеописанном способе используют соотношение между сигналами от зондов для PCA3 и сигналами от зондов KLK3 и/или COMT.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

Фиг. 1. Результаты экспериментальной проверки различных концентраций набора праймеров и зондов для региона KLK3, по оси X – значения концентрации праймеров (форварда и реверса), по оси Y – значения эффективности ПЦР (в данном примере используемая концентрация зонда – в два раза меньше концентрации каждого из праймеров).

Фиг. 2. График накопления флуоресценции для региона PCA3. ДНК контролей в реакционной смеси в разведениях:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ .

Фиг. 3. Пример эффективности ( $E = 72\%$ ) амплификации для региона PCA3 с помощью ПЦР в реальном времени. ДНК контролей в реакционной смеси в разведениях:  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ .

На Фиг. 4-5 представлены результаты экспериментального определения относительного уровня экспрессии гена PCA3 с выравниванием по гену KLK3.

### **ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В соответствии с изобретением в качестве молекулярно-генетического маркера рака предстательной железы выбран РНК-транскрипт гена PCA3.

Для проведения количественного анализа этого транскрипта необходимо выровнять результаты его определения относительно транскрипта какого-либо другого гена, экспрессия которого в клетках предстательной железы достаточно стабильна.

В качестве такого гена выбран KLK3.

Для контроля эффективности выделения РНК и в качестве внутреннего контрольного образца выбрана РНК гена COMT, относящегося к «генам домашнего хозяйства» (housekeeping genes).

Синтезированы праймеры и зонды для амплификации кДНК участков названных генов.

В целях обеспечения специфичности амплификации по отношению к кДНК и отсутствия реакции на геномной ДНК при выборе последовательности праймеров и зондов учитывают следующие требования:



- один или оба праймера комплементарны экзон-экзонным переходам, длина участка экзона, комплементарного 3'-концу праймера, от 10 до 3 нуклеотидов, 3'-конец межэкзонного праймера не должен быть комплементарен соответствующему интрону геномной ДНК одним или более нуклеотидом, и обязательно последним нуклеотидом 3'-конца;

и/или

- между внутриэкзонными (или межэкзонными) участками кДНК, комплементарными праймерам, в геномной ДНК присутствует интрон длиной не менее 1000 пар нуклеотидов.

Для оценки характеристик методов флуоресцентной детекции концентрацию праймеров и зондов варьировали в диапазоне: 50, 100, 200, 400, 800 нМ для праймеров и 25, 50, 100, 200, 400 нМ для зондов.

Оценка эффективности амплификации различных комбинаций концентраций праймеров и зондов проводилась с разведениями плазмидных контролей с лигированной синтетической ДНК в реакционной смеси с количеством копий:  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ . Использовали образцы плазмидных контролей с лигированной синтетической ДНК (исполнитель «Евроген», Москва).

Для определения специфичности подобранных праймеров к кДНК и отсутствия специфичности по отношению к геномной ДНК использовали образцы геномной ДНК клеточных линий Jurkat (производитель «Thermo Scientific», США).

Использовали исходные стоки плазмидных контролей и геномной ДНК клеточных линий человека Jurkat известных концентраций, а также серии их последовательных разведений.

Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoVue («HealthCare BioSciences AB», Швеция).

Амплификацию проводили на термоциклере DPlite (ООО «ДНК-технология», Москва) в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, pH 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01 %-ный Твин-20, 2,0 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 50÷800 нМ праймеров, 25÷400 нМ зондов, 1,0 единиц Taq-ДНК-полимеразы. Условия амплификации фрагмента ДНК: 94 °C/5 мин – первый цикл; 94 °C/10 с, 60 °C/60 с – 50 циклов. Регистрируемое накопление сигнала флуоресценции свидетельствовало о том, что в образце есть кДНК, содержащая последовательность-мишень.

На Фиг. 1 показаны результаты экспериментальной проверки различных концентраций набора праймеров и зондов для региона KLK3, по оси X – значения

концентрации праймеров (форварда и реверса), по оси Y – значения эффективности ПЦР (в данном примере используемая концентрация зонда – в два раза меньше концентрации каждого из праймеров).

Пример результатов экспериментальной проверки характеристик различных концентраций праймеров и зондов приведены в таблице 2 и на Фиг. 1, графики накопления флуоресценции и вычисления эффективности ПЦР для региона PCA3 представлены на фигурах 2, 3.

Аналогичные эксперименты были проведены для всех вариантов праймеров и зондов и их концентраций.

Экспериментальным путем для всех вариантов концентраций праймеров и зондов для всех наборов было установлено, что оптимальной концентрацией праймеров в реакционной смеси является концентрация 400 нМ, зондов – 200 нМ, а температура отжига – 60 °C.

На основе полученных значений параметров ПЦР можно сделать вывод о том, что все наборы праймеров и зондов подходят для проведения анализа и демонстрируют высокие значения эффективности и близкие к единице значения линейности  $R^2$ , что позволяет использовать данные наборы олигонуклеотидов для измерения количества копий кДНК генов PCA3, KLK3 и COMT (см. таблицу 3).

На фигурах 4-5 представлены результаты экспериментального определения относительного уровня экспрессии гена PCA3 с выравниванием по гену KLK3.

На основе полученных значений можно сделать вывод о том, что особенно предпочтительными для набора по изобретению являются следующие сочетания праймеров и зондов: COMT-6 (III) (COMT-F7; COMT-R12; COMT-Z5); PSA-3 (III) (PSA-F8; PSA-R8; PSA-Z2); PCA3-9 (III) (PCA3-F4; PCA3-RE1; PCA3-Z2); PCA3-3 (II) (PCA3-ex1-F3; PCA3-ex2-R3; PCA3-ex12-FAM3).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров и зондов

| Система         | Праймер |             | Длина | Tm    | gC%   | Последовательность<br>(5'-3')           | Экзон 5'          | Экзон 3'   | Локализация | Продукт | Продукт<br>на<br>геномной<br>ДНК |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-------|-----------------------------------------|-------------------|------------|-------------|---------|----------------------------------|
| COMT-3<br>(III) | 1       | COMT-F5     | 19    | 59.93 | 57.89 | tggcgtgaaggacaaggtc<br>(SEQ ID NO: 11)  | tggcgtgaaggacaag  | gtc        | ex2-3       | 160     | 4804                             |
|                 | 2       | COMT-R5     | 20    | 59.67 | 55.00 | cagggcacattctccaaga<br>(SEQ ID NO: 12)  | cagggcacattc      | ctccaaga   | ex3-4       |         |                                  |
|                 | 3       | COMT-Z5     | 20    | 59.97 | 70.00 | aggaccggtacctgccggac<br>(SEQ ID NO: 13) | -                 | -          | ex3         |         |                                  |
| COMT-6<br>(III) | 4       | COMT-F7     | 19    | 59.93 | 57.89 | ctggcgtgaaggacaaggt<br>(SEQ ID NO: 21)  | ctggcgtgaaggacaag | gt         | ex2-3       | 162     | 4806                             |
|                 | 5       | COMT-R12    | 18    | 59.64 | 61.11 | gcagggcacattctcca<br>(SEQ ID NO: 22)    | gcagggcacattc     | ctcca      | ex3-4       |         |                                  |
|                 | 6       | COMT-Z5     | 20    | 59.97 | 70.00 | aggaccggtacctgccggac<br>(SEQ ID NO: 13) | -                 | -          | ex3         |         |                                  |
| COMT-3<br>(II)  | 7       | COMT-ex4-F3 | 17    | 63.20 |       | ggatggtggatttcgct<br>(SEQ ID NO: 31)    | -                 | -          | ex4         | 172     |                                  |
|                 | 8       | COMT-ex6-   | 18    | 62.20 |       | ccacattctccaagaga                       | ccacattc          | ctccaagaga | ex5-6       |         |                                  |

|                |    |                |    |       |       |                                             |                   |        |       |     |      |
|----------------|----|----------------|----|-------|-------|---------------------------------------------|-------------------|--------|-------|-----|------|
|                |    | R3             |    |       |       | (SEQ ID NO: 32)                             |                   |        |       |     |      |
|                | 9  | COMT-ex46-FAM3 | 25 | 72.00 |       | cacactggacatggtcttctcgac<br>(SEQ ID NO: 33) | -                 | -      | ex5   |     |      |
| PSA-1<br>(III) | 10 | PSA-F4         | 20 | 59.82 | 60.00 | ctgtctcggattgtgggagg<br>(SEQ ID NO: 41)     | -                 | -      | ex2   | 160 | 1789 |
|                | 11 | PSA-R4         | 22 | 60.03 | 45.45 | gcaagatcacgctttgttct<br>(SEQ ID NO: 42)     | gcaagatcacgctttg  | ttct   | ex2-3 |     |      |
|                | 12 | PSA-Z2         | 20 | 59.98 | 65.00 | gcagtctgcggcggtgttct<br>(SEQ ID NO: 43)     | -                 | -      | ex2   |     |      |
| PSA-2<br>(III) | 13 | PSA-F5         | 20 | 59.82 | 60.00 | cctgtctcggattgtgggag<br>(SEQ ID NO: 51)     | -                 | -      | ex2   | 162 | 1791 |
|                | 14 | PSA-R5         | 22 | 60.03 | 45.45 | agcaagatcacgctttgttcc<br>(SEQ ID NO: 52)    | agcaagatcacgctttg | ttcc   | ex2-3 |     |      |
|                | 15 | PSA-Z2         | 20 | 59.98 | 65.00 | gcagtctgcggcggtgttct<br>(SEQ ID NO: 43)     | -                 | -      | ex2   |     |      |
| PSA-3<br>(III) | 16 | PSA-F8         | 20 | 60.39 | 55.00 | ctgggagtgcgagaagcatt<br>(SEQ ID NO: 61)     | -                 | -      | ex2   | 139 | 1768 |
|                | 17 | PSA-R8         | 23 | 59.75 | 43.48 | caagatcacgctttgttctga<br>(SEQ ID NO: 62)    | caagatcacgctttg   | ttctga | ex2-3 |     |      |
|                | 18 | PSA-Z2         | 20 | 59.98 | 65.00 | gcagtctgcggcggtgttct                        | -                 | -      | ex2   |     |      |

|                 |    |               |    |       |       |                                             |                     |               |       |     |       |
|-----------------|----|---------------|----|-------|-------|---------------------------------------------|---------------------|---------------|-------|-----|-------|
|                 |    |               |    |       |       | (SEQ ID NO: 43)                             |                     |               |       |     |       |
| PSA-2<br>(II)   | 19 | PSA-ex1-F2    | 17 | 64.20 |       | gtccgtgacgtggattg<br>(SEQ ID NO: 71)        | -                   | -             | ex1   | 189 |       |
|                 | 20 | PSA-ex3-R2    | 18 | 62.10 |       | atcacgctttgttctg<br>(SEQ ID NO: 72)         | atcacgctttg         | ttctg         | ex2-3 |     |       |
|                 | 21 | PSA-ex13-FAM2 | 20 | 72.50 |       | ccagaacaccgccgcagact<br>(SEQ ID NO: 73)     | -                   | -             | ex2   |     |       |
| PSA (I)         | 22 | PSA-ex2-F     | 18 | 64.70 |       | ggagtgcgagaagcattc<br>(SEQ ID NO: 81)       | -                   | -             | ex2   | 182 |       |
|                 | 23 | PSA-ex3-R     | 18 | 64.30 |       | atacctggcctgtgtctt<br>(SEQ ID NO: 82)       | -                   | -             | ex3   |     |       |
|                 | 24 | PSA-ex23-FAM  | 24 | 69.20 |       | tgcacaggaacaaaagcgtgatc<br>(SEQ ID NO: 83)  | tgcacaggaa          | caaaagcgtgatc | ex2-3 |     |       |
| PCA3-1<br>(III) | 25 | PCA3-F3       | 24 | 59.35 | 45.83 | gacctgatgatacagaggtgagaa<br>(SEQ ID NO: 91) | gacctgatgatacagag   | gtgagaa       | ex1-2 | 218 | 19595 |
|                 | 26 | PCA3-R2       | 20 | 59.15 | 55.00 | ggcatttctcccagggtatc<br>(SEQ ID NO: 92)     | ggcatttctcccagggtat | ct            | ex2-3 |     |       |
|                 | 27 | PCA3-Z2       | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -             | ex2   |     |       |
| PCA3-2          | 28 | PCA3-F3       | 24 | 59.35 | 45.83 | gacctgatgatacagaggtgagaa                    | gacctgatgatacagag   | gtgagaa       | ex1-2 | 210 | 19587 |

|                 |    |          |    |       |       |                                              |                     |              |       |     |                  |
|-----------------|----|----------|----|-------|-------|----------------------------------------------|---------------------|--------------|-------|-----|------------------|
| (III)           |    |          |    |       |       | (SEQ ID NO: 91)                              |                     |              |       |     | (19349)          |
|                 | 29 | PCA3-R3  | 20 | 60.25 | 55.00 | tcccagggatctctgtgctt<br>(SEQ ID NO: 102)     | tcccagggat          | ctctgtgctt   | ex2-3 |     |                  |
|                 | 30 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgagggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-3<br>(III) | 31 | PCA3-F3  | 24 | 59.35 | 45.83 | gacctgatgatacagaggtgagaa<br>(SEQ ID NO: 91)  | gacctgatgatacagag   | gtgagaa      | ex1-2 | 208 | 19585<br>(19349) |
|                 | 32 | PCA3-RE1 | 20 | 59.82 | 60.00 | ccagggatctctgtgcttcc<br>(SEQ ID NO: 112)     | ccagggat            | ctctgtgcttcc | ex2-3 |     |                  |
|                 | 33 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgagggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-4<br>(III) | 34 | PCA3-F3  | 24 | 59.35 | 45.83 | gacctgatgatacagaggtgagaa<br>(SEQ ID NO: 91)  | gacctgatgatacagag   | gtgagaa      | ex1-2 | 209 | 19586<br>(19349) |
|                 | 35 | PCA3-RE2 | 20 | 59.82 | 60.00 | cccagggatctctgtgcttc<br>(SEQ ID NO: 122)     | cccagggat           | ctctgtgcttc  | ex2-3 |     |                  |
|                 | 36 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgagggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-8<br>(III) | 37 | PCA3-F4  | 23 | 60.05 | 47.83 | aggacctgatgatacagaggtga<br>(SEQ ID NO: 131)  | aggacctgatgatacagag | gtga         | ex1-2 | 212 | 19589<br>(19351) |
|                 | 38 | PCA3-R3  | 20 | 60.25 | 55.00 | tcccagggatctctgtgctt                         | tcccagggat          | ctctgtgctt   | ex2-3 |     |                  |

|                  |    |          |    |       |       |                                             |                     |              |       |     |                  |
|------------------|----|----------|----|-------|-------|---------------------------------------------|---------------------|--------------|-------|-----|------------------|
|                  |    |          |    |       |       | (SEQ ID NO: 102)                            |                     |              |       |     |                  |
|                  | 39 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-9<br>(III)  | 40 | PCA3-F4  | 23 | 60.05 | 47.83 | aggacctgatgatacagaggtga<br>(SEQ ID NO: 31)  | aggacctgatgatacagag | gtga         | ex1-2 | 210 | 19587<br>(19351) |
|                  | 41 | PCA3-RE1 | 20 | 59.82 | 60.00 | ccagggatctctgtgcttcc<br>(SEQ ID NO: 112)    | ccagggat            | ctctgtgcttcc | ex2-3 |     |                  |
|                  | 42 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-10<br>(III) | 43 | PCA3-F4  | 23 | 60.05 | 47.83 | aggacctgatgatacagaggtga<br>(SEQ ID NO: 131) | aggacctgatgatacagag | gtga         | ex1-2 | 211 | 19588<br>(19351) |
|                  | 44 | PCA3-RE2 | 20 | 59.82 | 60.00 | cccagggatctctgtgcttc<br>(SEQ ID NO: 122)    | cccagggat           | ctctgtgcttc  | ex2-3 |     |                  |
|                  | 45 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-11<br>(III) | 46 | PCA3-F4  | 23 | 60.05 | 47.83 | aggacctgatgatacagaggtga<br>(SEQ ID NO: 131) | aggacctgatgatacagag | gtga         | ex1-2 | 158 | 19307            |
|                  | 47 | PCA3-R9  | 21 | 60.20 | 47.62 | ggggctggaaatgtgcaaaaa<br>(SEQ ID NO: 142)   | -                   | -            | ex2   |     |                  |
|                  | 48 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct                    | -                   | -            | ex2   |     |                  |

|                  |    |          |    |       |       |                                             |                     |              |       |     |                  |
|------------------|----|----------|----|-------|-------|---------------------------------------------|---------------------|--------------|-------|-----|------------------|
|                  |    |          |    |       |       | (SEQ ID NO: 93)                             |                     |              |       |     |                  |
| PCA3-12<br>(III) | 49 | PCA3-F4  | 23 | 60.05 | 47.83 | aggacctgatgatacagaggtga<br>(SEQ ID NO: 131) | aggacctgatgatacagag | gtga         | ex1-2 | 164 | 19313            |
|                  | 50 | PCA3-R11 | 22 | 59.70 | 45.45 | tttaaaggggctggaaatgtgc<br>(SEQ ID NO: 152)  | -                   | -            | ex2   |     |                  |
|                  | 51 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-14<br>(III) | 52 | PCA3-F5  | 23 | 59.68 | 52.17 | ggacctgatgatacagaggtgag<br>(SEQ ID NO: 161) | ggacctgatgatacagag  | gtgag        | ex1-2 | 211 | 19588<br>(19350) |
|                  | 53 | PCA3-R3  | 20 | 60.25 | 55.00 | tcccagggatctctgtgctt<br>(SEQ ID NO: 102)    | tcccagggat          | ctctgtgctt   | ex2-3 |     |                  |
|                  | 54 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-15<br>(III) | 55 | PCA3-F5  | 23 | 59.68 | 52.17 | ggacctgatgatacagaggtgag<br>(SEQ ID NO: 161) | ggacctgatgatacagag  | gtgag        | ex1-2 | 209 | 19586<br>(19350) |
|                  | 56 | PCA3-RE1 | 20 | 59.82 | 60.00 | ccagggatctctgtgcttcc<br>(SEQ ID NO: 112)    | ccagggat            | ctctgtgcttcc | ex2-3 |     |                  |
|                  | 57 | PCA3-Z2  | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                   | -            | ex2   |     |                  |
| PCA3-16          | 58 | PCA3-F5  | 23 | 59.68 | 52.17 | ggacctgatgatacagaggtgag                     | ggacctgatgatacagag  | gtgag        | ex1-2 | 210 | 19587            |



|                  |    |             |    |       |       |                                             |                    |             |       |     |         |
|------------------|----|-------------|----|-------|-------|---------------------------------------------|--------------------|-------------|-------|-----|---------|
| (III)            |    |             |    |       |       | (SEQ ID NO: 161)                            |                    |             |       |     | (19350) |
|                  | 59 | PCA3-RE2    | 20 | 59.82 | 60.00 | cccagggatctctgtgcttc<br>(SEQ ID NO: 122)    | cccagggat          | ctctgtgcttc | ex2-3 |     |         |
|                  | 60 | PCA3-Z2     | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                  | -           | ex2   |     |         |
| PCA3-17<br>(III) | 61 | PCA3-F5     | 23 | 59.68 | 52.17 | ggacctgatgatacagaggtgag<br>(SEQ ID NO: 161) | ggacctgatgatacagag | gtgag       | ex1-2 | 157 | 19306   |
|                  | 62 | PCA3-R9     | 21 | 60.20 | 47.62 | ggggctggaaatgtgcaaaaa<br>(SEQ ID NO: 142)   | -                  | -           | ex2   |     |         |
|                  | 63 | PCA3-Z2     | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                  | -           | ex2   |     |         |
| PCA3-18<br>(III) | 64 | PCA3-F5     | 23 | 59.68 | 52.17 | ggacctgatgatacagaggtgag<br>(SEQ ID NO: 161) | ggacctgatgatacagag | gtgag       | ex1-2 | 163 | 19312   |
|                  | 65 | PCA3-R11    | 22 | 59.70 | 45.45 | tttaaaggggctggaaatgtgc<br>(SEQ ID NO: 152)  | -                  | -           | ex2   |     |         |
|                  | 66 | PCA3-Z2     | 24 | 59.94 | 54.17 | accatctgaggccacacatctgct<br>(SEQ ID NO: 93) | -                  | -           | ex2   |     |         |
| PCA3-3<br>(II)   | 67 | PCA3-ex1-F3 | 20 | 63.00 |       | cctgatgatacagaggtgag<br>(SEQ ID NO: 171)    | cctgatgatacagag    | gtgag       | ex1-2 | 103 |         |
|                  | 68 | PCA3-ex2-R3 | 22 | 62.60 |       | cttgctgtttctagtgtgta                        | -                  | -           | ex2   |     |         |

|  |    |                    |    |       |  |                                              |   |   |     |  |  |
|--|----|--------------------|----|-------|--|----------------------------------------------|---|---|-----|--|--|
|  |    |                    |    |       |  | (SEQ ID NO: 172)                             |   |   |     |  |  |
|  | 69 | PCA3-ex12-<br>FAM3 | 24 | 72.30 |  | cctcagatggtaaagtcagcagcc<br>(SEQ ID NO: 173) | - | - | ex2 |  |  |

Таблица 2. Эффективность ПЦР при различных концентрация праймеров для мишени KLK3, концентрация зонда в два раза меньше концентрации каждого из праймеров

|                                          |      | Концентрация обратного праймера, нМ/мкл |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|------------------------------------------|------|-----------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| Концентрация прямого праймера,<br>нМ/мкл |      | 100                                     | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 |
|                                          | 100  | 60                                      | 63  | 64  | 66  | 65  | 64  | 63  | 60  | 58  | 55   |
|                                          | 200  | 62                                      | 70  | 73  | 75  | 83  | 82  | 75  | 73  | 75  | 68   |
|                                          | 300  | 64                                      | 74  | 83  | 84  | 90  | 84  | 81  | 76  | 73  | 69   |
|                                          | 400  | 65                                      | 79  | 85  | 91  | 91  | 88  | 86  | 84  | 85  | 78   |
|                                          | 500  | 64                                      | 80  | 89  | 91  | 91  | 87  | 84  | 82  | 81  | 80   |
|                                          | 600  | 63                                      | 76  | 88  | 90  | 90  | 85  | 82  | 79  | 78  | 77   |
|                                          | 700  | 62                                      | 70  | 86  | 89  | 90  | 82  | 80  | 76  | 75  | 74   |
|                                          | 800  | 61                                      | 70  | 85  | 87  | 89  | 80  | 78  | 75  | 74  | 73   |
|                                          | 900  | 57                                      | 69  | 79  | 85  | 85  | 79  | 74  | 74  | 73  | 72   |
|                                          | 1000 | 56                                      | 66  | 60  | 83  | 80  | 76  | 70  | 69  | 68  | 67   |

Таблица 3. Метрологические характеристики пар праймеров и зондов, характеризующие их пригодность для определения уровня экспрессии гена PCA3

| Регион        | Эффективность ( $E$ ) | Линейность ( $R^2$ ) |
|---------------|-----------------------|----------------------|
| COMT-3(III)   | 93%                   | 0,9786               |
| COMT-6(III)   | 80%                   | 0,9936               |
| COMT-3(II)    | 89%                   | 0,9858               |
| PSA-1 (III)   | 115%                  | 0,9746               |
| PSA-2 (III)   | 89%                   | 0,9732               |
| PSA-3 (III)   | 91%                   | 0,9778               |
| PSA-2 (II)    | 82%                   | 0,9919               |
| PSA (I)       | 86%                   | 0,9908               |
| PCA3-1 (III)  | 72%                   | 0,9988               |
| PCA3-2 (III)  | 72%                   | 0,994                |
| PCA3-3 (III)  | 97%                   | 0,9825               |
| PCA3-4 (III)  | 79%                   | 0,9964               |
| PCA3-8 (III)  | 74%                   | 0,9949               |
| PCA3-9 (III)  | 78%                   | 0,9904               |
| PCA3-10 (III) | 80%                   | 0,9956               |
| PCA3-11 (III) | 71%                   | 0,9698               |
| PCA3-12 (III) | 75%                   | 0,9789               |
| PCA3-14 (III) | 75%                   | 0,9869               |
| PCA3-15 (III) | 65%                   | 0,9753               |
| PCA3-16 (III) | 66%                   | 0,9814               |
| PCA3-17 (III) | 65%                   | 0,9729               |
| PCA3-18 (III) | 68%                   | 0,9825               |
| PCA3-3 (II)   | 69%                   | 0,9884               |

# SEQUENCE LISTING

<110> Общество с ограниченной ответственностью "Джинэкст"  
 <120> СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
 <130> 201501004/26  
 <140> 201501004/26  
 <141> 2015-03-08  
 <160> 69  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
 tggcgtgaag gacaaggctc 19  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 caggccacat tcctccaaga 20  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 aggaccggtgta cctgccggac 20  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 ctggcgtgaa ggacaaggct 19  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 gcaggccaca ttctcca 18  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| <400> 6                     |    |
| aggaccggta cctgccggac       | 20 |
| <210> 7                     |    |
| <211> 17                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 7                     |    |
| ggatggtgga tttcgct          | 17 |
| <210> 8                     |    |
| <211> 18                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 8                     |    |
| ccacattcct ccaagaga         | 18 |
| <210> 9                     |    |
| <211> 25                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 9                     |    |
| cacactggac atggtcttcc tcgac | 25 |
| <210> 10                    |    |
| <211> 20                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 10                    |    |
| ctgtctcgga ttgtgggagg       | 20 |
| <210> 11                    |    |
| <211> 22                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 11                    |    |
| gcaagatcac gcttttggtc ct    | 22 |
| <210> 12                    |    |
| <211> 20                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 12                    |    |
| gcagtctgcg gcggtgttct       | 20 |
| <210> 13                    |    |
| <211> 20                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| <400> 13<br>cctgtctcgg attgtgggag                       | 20 |
| <210> 14<br><211> 22<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 14<br>agcaagatca cgctttttgtt cc                   | 22 |
| <210> 15<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 15<br>gcagtctgcg gcggtgttct                       | 20 |
| <210> 16<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 16<br>ctgggagtgc gagaagcatt                       | 20 |
| <210> 17<br><211> 23<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 17<br>caagatcacg cttttgttcc tga                   | 23 |
| <210> 18<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 18<br>gcagtctgcg gcggtgttct                       | 20 |
| <210> 19<br><211> 17<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 19<br>gtccgtgacg tggattg                          | 17 |
| <210> 20<br><211> 18<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 20                                                |    |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| atcacgcttt tgttcctg         | 18 |
|                             |    |
| <210> 21                    |    |
| <211> 20                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 21                    |    |
| ccagaacacc gccgcagact       | 20 |
|                             |    |
| <210> 22                    |    |
| <211> 18                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 22                    |    |
| ggagtgcgag aagcattc         | 18 |
|                             |    |
| <210> 23                    |    |
| <211> 18                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 23                    |    |
| atacctggcc tgtgtctt         | 18 |
|                             |    |
| <210> 24                    |    |
| <211> 24                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 24                    |    |
| tgcatacagga acaaaagcgt gatc | 24 |
|                             |    |
| <210> 25                    |    |
| <211> 24                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 25                    |    |
| gacctgatga tacagaggtg agaa  | 24 |
|                             |    |
| <210> 26                    |    |
| <211> 20                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 26                    |    |
| ggcatttctc ccagggatct       | 20 |
|                             |    |
| <210> 27                    |    |
| <211> 24                    |    |
| <212> DNA                   |    |
| <213> Homo sapiens          |    |
| <400> 27                    |    |
| accatctgag gccacacatc tgct  | 24 |



|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <210> | 28                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 28                         |    |
|       | gacctgatga tacagaggtg agaa | 24 |
| <210> | 29                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 29                         |    |
|       | tcccagggat ctctgtgctt      | 20 |
| <210> | 30                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 30                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 31                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 31                         |    |
|       | gacctgatga tacagaggtg agaa | 24 |
| <210> | 32                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 32                         |    |
|       | ccagggatct ctgtgcttcc      | 20 |
| <210> | 33                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 33                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 34                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 34                         |    |
|       | gacctgatga tacagaggtg agaa | 24 |

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <210> | 35                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 35                         |    |
|       | cccagggatc tctgtgcttc      | 20 |
| <210> | 36                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 36                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 37                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 37                         |    |
|       | aggacctgat gatacagagg tga  | 23 |
| <210> | 38                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 38                         |    |
|       | tcccagggat ctctgtgctt      | 20 |
| <210> | 39                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 39                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 40                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 40                         |    |
|       | aggacctgat gatacagagg tga  | 23 |
| <210> | 41                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 41                         |    |
|       | ccagggatct ctgtgcttcc      | 20 |

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <210> | 42                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 42                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 43                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 43                         |    |
|       | aggacctgat gatacagagg tga  | 23 |
| <210> | 44                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 44                         |    |
|       | cccagggatc tctgtgcttc      | 20 |
| <210> | 45                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 45                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 46                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 46                         |    |
|       | aggacctgat gatacagagg tga  | 23 |
| <210> | 47                         |    |
| <211> | 21                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 47                         |    |
|       | ggggctggaa atgtgcaaaa a    | 21 |
| <210> | 48                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 48                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 49                         |    |

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 49                         |    |
|       | aggacctgat gatacagagg tga  | 23 |
| <210> | 50                         |    |
| <211> | 22                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 50                         |    |
|       | tttaaagggg ctggaaatgt gc   | 22 |
| <210> | 51                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 51                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 52                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 52                         |    |
|       | ggacctgatg atacagaggt gag  | 23 |
| <210> | 53                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 53                         |    |
|       | tcccagggat ctctgtgctt      | 20 |
| <210> | 54                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 54                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 55                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 55                         |    |
|       | ggacctgatg atacagaggt gag  | 23 |
| <210> | 56                         |    |
| <211> | 20                         |    |

|       |                            |    |
|-------|----------------------------|----|
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 56                         |    |
|       | ccagggatct ctgtgcttcc      | 20 |
| <210> | 57                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 57                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 58                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 58                         |    |
|       | ggacctgatg atacagaggt gag  | 23 |
| <210> | 59                         |    |
| <211> | 20                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 59                         |    |
|       | cccagggatc tctgtgcttc      | 20 |
| <210> | 60                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 60                         |    |
|       | accatctgag gccacacatc tgct | 24 |
| <210> | 61                         |    |
| <211> | 23                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 61                         |    |
|       | ggacctgatg atacagaggt gag  | 23 |
| <210> | 62                         |    |
| <211> | 21                         |    |
| <212> | DNA                        |    |
| <213> | Homo sapiens               |    |
| <400> | 62                         |    |
|       | ggggctggaa atgtgcaaaa a    | 21 |
| <210> | 63                         |    |
| <211> | 24                         |    |
| <212> | DNA                        |    |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| <213> Homo sapiens                                      |    |
| <400> 63<br>accatctgag gccacacatc tgct                  | 24 |
| <210> 64<br><211> 23<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 64<br>ggacctgatg atacagaggt gag                   | 23 |
| <210> 65<br><211> 22<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 65<br>tttaaagggg ctggaaatgt gc                    | 22 |
| <210> 66<br><211> 24<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 66<br>accatctgag gccacacatc tgct                  | 24 |
| <210> 67<br><211> 20<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 67<br>cctgatgata cagaggtgag                       | 20 |
| <210> 68<br><211> 22<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 68<br>cttgctgttt ctagtgatgt ta                    | 22 |
| <210> 69<br><211> 24<br><212> DNA<br><213> Homo sapiens |    |
| <400> 69<br>cctcagatgg taaagtcagc agcc                  | 24 |

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ДНК-праймеров и зондов для неинвазивной диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена PCA3 по генетическому материалу из образца мочи пациента, в котором используют:

- (а) образец кДНК, соответствующей РНК гена PCA3;
- (б) образец кДНК, соответствующей РНК гена KLK3;
- (в) образец кДНК, соответствующей РНК гена COMT;
- (г) образец геномной ДНК человека;

характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии:

(1) синтезируют прямой и обратный праймеры, удовлетворяющие одному или сразу обоим из следующих требований:

(i) один или оба праймера комплементарны экзон-экзонным переходам, длина участка экзона, комплементарного 3'-концу праймера от 10 до 3 нуклеотидов, 3'-конец межэкзонного праймера не комплементарен соответствующему интрону в геномной ДНК одним ли более нуклеотидом, и обязательно последним нуклеотидом 3'-конца,

(ii) между внутриэкзонными или межэкзонными участками кДНК, комплементарными праймерам, в геномной ДНК присутствует интрон длиной не менее 1000 пар нуклеотидов;

(2) проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) образца (г) с вышеуказанными праймерами;

(3) отбирают пары праймеров и зонды, обеспечивающие отсутствие реакции на образце геномной ДНК;

(4) проводят полимеразную цепную реакцию с сериями, по меньшей мере, из четырёх 10-кратных разведений образцов (а), (б) и (в);

(5) отбирают пары праймеров и зонды, обеспечивающие эффективность полимеразной цепной реакции выше 65 % и линейность при изменении относительной концентрации образцов (а) (б), (в) выше 0,9.

2. Набор для неинвазивной ПЦР-диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена PCA3 по генетическому материалу из образца мочи пациента, содержащий для каждого из трёх генов PCA3, KLK3 и COMT, по меньшей мере, одну пару из прямого и обратного праймеров, и, по меньшей мере, один соответствующий им зонд, при этом упомянутые праймеры и зонд отвечают тем же требованиям, что и праймеры и зонд, синтезированные и отобранные способом по п.1.

3. Набор по п.2, характеризующийся тем, что размер ампликона, соответствующий парным (прямому и обратному) праймерам, составляет целое число в диапазоне от 60 до 300 пар нуклеотидов, предпочтительно, целое число в диапазоне от 100 до 250 пар нуклеотидов.

4. Набор по п.2, характеризующийся тем, что в нем прямой праймер, обратный праймер и зонд для COMT выбраны из группы олигонуклеотидов включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым – обратный праймер, третьим - зонд):

SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13,

SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 13,

SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и

гомологичные им, по меньшей мере, на 95 % олигонуклеотиды.

5. Набор по п.2, характеризующийся тем, что в нем прямой праймер, обратный праймер и зонд для KLK3 выбраны из группы олигонуклеотидов включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым – обратный праймер, третьим - зонд):

SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43,

SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 43,

SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 43,

SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73,

SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и

гомологичные им, по меньшей мере, на 95 % олигонуклеотиды.

6. Набор по п.2, характеризующийся тем, что в нем прямой праймер, обратный праймер и зонд для PCA3 выбраны из группы олигонуклеотидов включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым – обратный праймер, третьим - зонд):

SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 93,



SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 93,  
SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и

и гомологичные им, по меньшей мере, на 95 % олигонуклеотиды.

7. Набор по любому из пп.2-6, характеризующийся тем, что он дополнительно включает в себя кДНК для осуществления положительного контроля.

8. Набор по любому из пп.2-7, характеризующийся тем, что он дополнительно включает в себя термостабильную ДНК-полимеразу 10 единиц/мкл.

9. Набор по любому из пп.2-8, характеризующийся тем, что он дополнительно включает в себя водный раствор, содержащий:

приблизительно 67 мМ трис-НСl, pH 8,8 при 25 °C,

приблизительно 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

приблизительно 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>,

приблизительно 6,7 мкМ ЭДТА,

приблизительно 170 мкг БСА, и

смесь четырех основных dNTP в концентрации приблизительно 0,2 мМ каждого.

10. Набор по любому из пп.2-9, характеризующийся тем, что он дополнительно включает в себя деионизированную воду.

11. Способ диагностики рака предстательной железы, в котором используют:

(а) образец мочи пациента;

(б) набор по любому из пп. 2-9;

(в) набор, включающий рандомные и/или олиго-дТ и/или специфические праймеры, ревертазу, dNTP и буфер для обратной транскрипции,

характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии:

(1) выделяют РНК из образца (а);

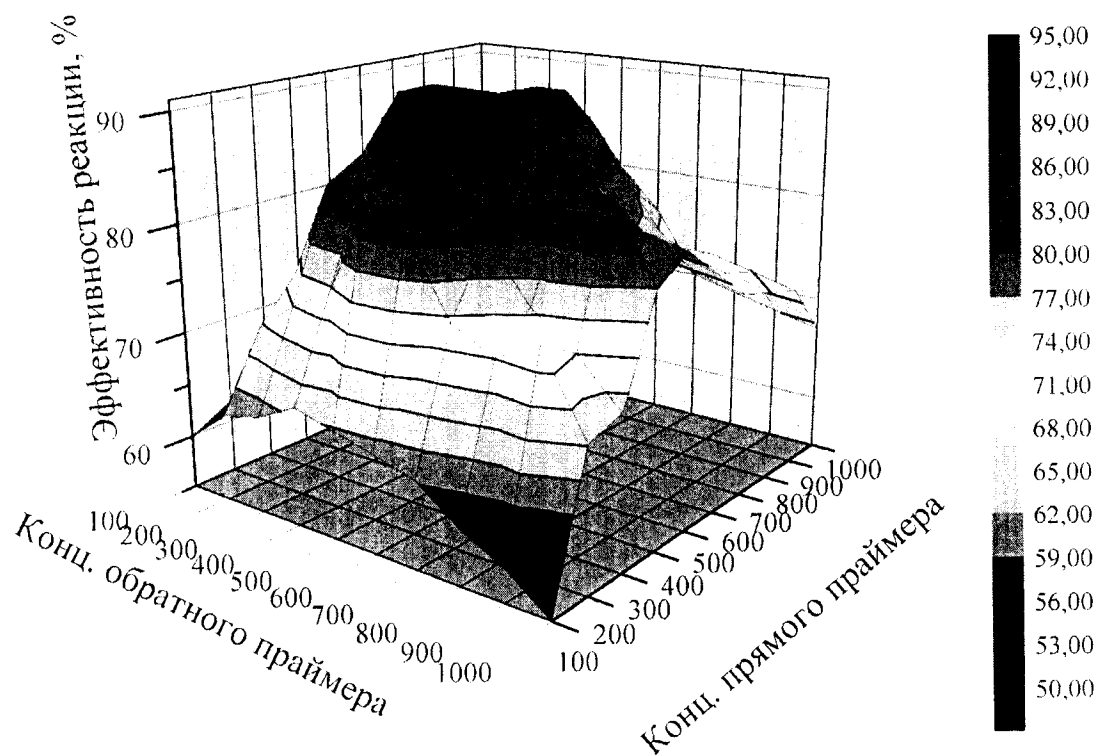
(2) проводят обратную транскрипцию РНК, выделенной на стадии (1) набором

(в);

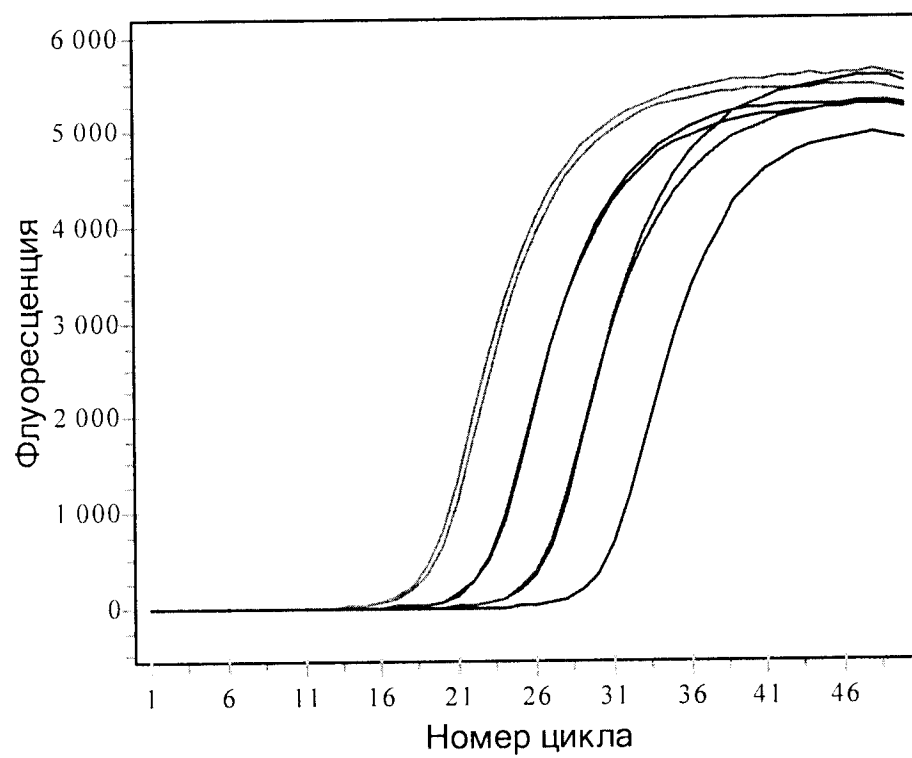
(3) проводят количественную полимеразную цепную реакцию продуктов обратной транскрипции, полученных на стадии (2), посредством праймеров из набора (б), состоящую из начального плавления и ряда циклов из плавления, отжига и синтеза;

(4) определяют количество продуктов полимеразной цепной реакции, полученных на стадии (3), посредством флуоресцентной спектрометрии в присутствии зондов из набора (б).

12. Способ по п.11, характеризующийся тем, что на стадии (3) начальное плавление проводят в течение  $1\div 5$  минут при температуре  $94\div 96\text{ }^{\circ}\text{C}$ , цикл, включающий плавление в течение  $10\div 30$  секунд при температуре  $94\div 96\text{ }^{\circ}\text{C}$ , проводят  $30\div 60$  раз, отжиг и синтез при температуре  $58\div 66\text{ }^{\circ}\text{C}$  осуществляют в течение  $30\div 60$  мин, а детекцию продуктов полимеразной цепной реакции проводят во время стадии отжига.
13. Способ по любому из пп.11 или 12, характеризующийся тем, что в нем обратную транскрипцию проводят  $50\div 150$  единицами ревертазы в течение  $30\div 90$  минут при температуре  $36\div 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
14. Способ по любому из пп.11-13, характеризующийся тем, что в нем концентрация праймеров в реакционной смеси составляет  $400 \pm 100\text{ нМ}$ , зондов –  $200 \pm 50\text{ нМ}$ , а температура отжига –  $60 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
15. Способ по любому из пп.11-14, характеризующийся тем, что в нем в качестве диагностического показателя используют соотношение между сигналами от зондов для РСАЗ и сигналами от зондов KLK3 и/или COMT.

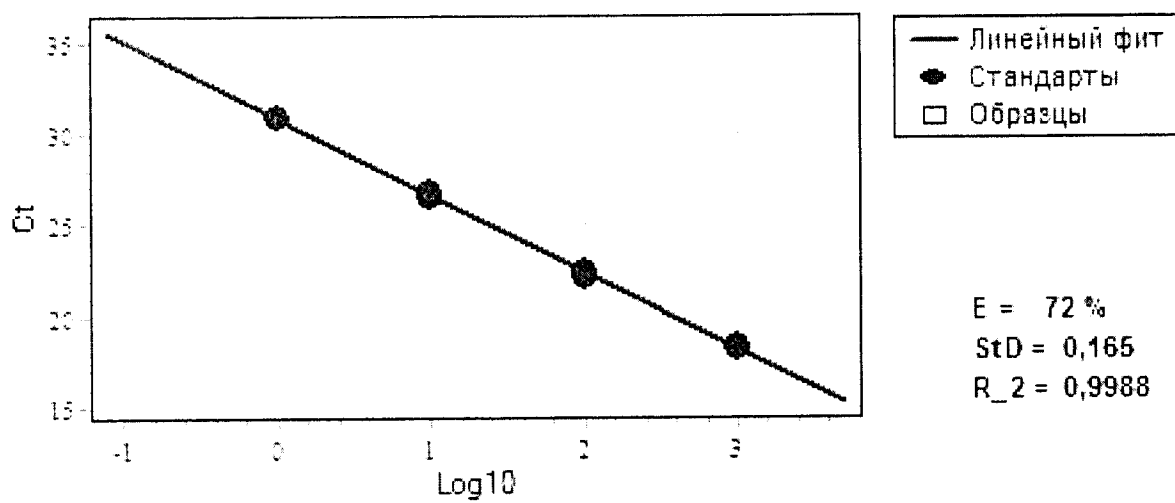


Фиг. 1

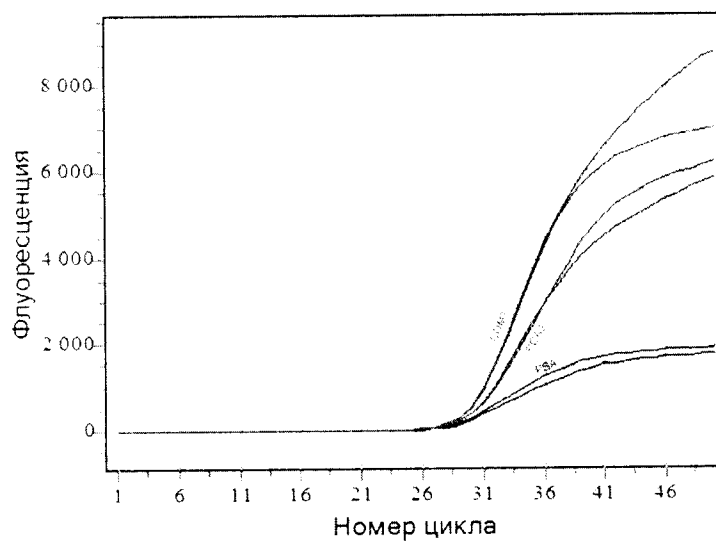


Фиг. 2

$$Y = 30,887 - 4,244 \cdot X$$

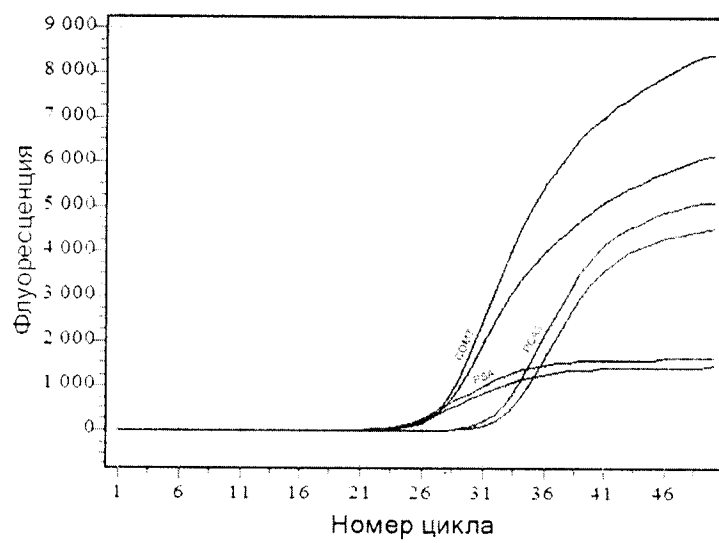


Фиг. 3



| Пороговый цикл |       |       | Относит. уровень<br>PCA3/KLK3 | Результат |
|----------------|-------|-------|-------------------------------|-----------|
| COMT           | KLK3  | PCA3  |                               |           |
| 29,50          | 28,30 | 29,60 | 406,126198                    | +         |

Фиг. 4



| Пороговый цикл |       |       | Относит. уровень<br>PCA3/KLK3 | Результат |
|----------------|-------|-------|-------------------------------|-----------|
| COMT           | KLK3  | PCA3  |                               |           |
| 27,00          | 24,20 | 32,00 | 4,487103                      | -         |

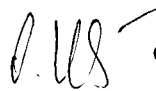
Фиг. 5

## ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ  
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42  
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201501004

|                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Дата подачи: 03 августа 2015 (03.08.2015)                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                               | Дата испрашиваемого приоритета:                                                                                                                           |                      |
| Название изобретения: Способ неинвазивной диагностики рака предстательной железы                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| Заявитель:<br>ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ДЖИНЭКСТ"                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| <input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)<br><input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)                 |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               | <i>C12Q 1/68 (2006.01)</i><br><i>C12N 15/11 (2006.01)</i>                                                                                                 |                      |
| Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)<br>C12Q 1/68, C12N 15/11                                                                                                                             |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| Категория*                                                                                                                                                                                                                    | Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей                                                                                                         |                                                                                                                                                           | Относится к пункту № |
| Y                                                                                                                                                                                                                             | VAANANEN Riina-Minna. Quantitative analysis of novel prostate cancer markers in tissue. Painosalama Oy - Turku, Finland 2014, p.1-98, especially pp. 32-55, table 6           |                                                                                                                                                           | 1-3, 7-15            |
| A                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           | 4-5                  |
| Y                                                                                                                                                                                                                             | YE Jian et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 2012, 13, 134, doi:10.1186/1471-2105-13-14, pp. 1-11 |                                                                                                                                                           | 1-3, 7-15            |
| Y                                                                                                                                                                                                                             | SARAMAKI Outi R. et al. Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. Int. J. Cancer, 2006, 119, pp. 1322-1329                                               |                                                                                                                                                           | 1-3, 7-15            |
| A                                                                                                                                                                                                                             | GROSKOPF Jack et al. APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. Clinical Chemistry, 2006, 52, 6, pp. 1089-1095     |                                                                                                                                                           | 1-15                 |
| <input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении                                                                         |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| * Особые категории ссылочных документов:                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                           |                      |
| "А" документ, определяющий общий уровень техники                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                               | "Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения                                                  |                      |
| "Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                               | "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности                  |                      |
| "О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                               | "У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории |                      |
| "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета                                                                                                                       |                                                                                                                                                                               | "&" документ, являющийся патентом-аналогом                                                                                                                |                      |
| "D" документ, приведенный в евразийской заявке                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                               | "L" документ, приведенный в других целях                                                                                                                  |                      |
| Дата действительного завершения патентного поиска:                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                               | 20 мая 2016 (20.05.2016)                                                                                                                                  |                      |
| Наименование и адрес Международного поискового органа:<br>Федеральный институт<br>промышленной собственности<br>РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб.,<br>д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА |                                                                                                                                                                               | Уполномоченное лицо :<br> О. Н. Шанова<br>Телефон № (499) 240-25-91   |                      |