

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034232**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.20

(21) Номер заявки
201400117

(22) Дата подачи заявки
2012.07.09

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68** (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОГНОЗА У БОЛЬНЫХ РАКОМ

(31) **61/505,919**

(32) **2011.07.08**

(33) **US**

(43) **2014.06.30**

(86) **PCT/EP2012/063436**

(87) **WO 2013/007702 2013.01.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭПИГЕНОМИКС АГ (DE)

(72) Изобретатель:
Левин Йёрн, Криспин Мануэль (DE)

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A2-2005040421**

DEVOS Theo et al. Circulating Methylated SEPT9 DNA in Plasma Is a Biomarker for colorectal Cancer., Clinical Chemistry, v. 55, n. 7, p. 1337-1346, с. 1337-1342, фиг. 2, табл. 2

US-A1-2010143929

HOFFMANN Andreas-Claudius et al. Methylated DAPK and APC promoter DNA detection in peripheral blood is significantly associated with apparent residual tumor and outcome. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, v. 135, n. 9, p. 1231-1237, с. 1232-1235, табл. 2

WO-A1-2008009479

US-A1-2011039719

WO-A2-2005040421

US-A1-2010143929

KOLLERMANN JENS ET AL.: "Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer", BMC UROLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 6, no. 1, 27 June 2006 (2006-06-27), page 15, XP021016943, ISSN: 1471-2490, DOI: 10.1186/1471-2490-6-15, page 2; table 1

US-A1-2011027789

WO-A2-2007118704

WO-A1-2008009479

(57) В изобретении предлагаются способы, нуклеиновые кислоты и наборы для определения прогноза у больных раком. Описываются геномные последовательности, профиль метилирования которых можно использовать для выявления указанного заболевания, тем самым обеспечивая возможность повышения эффективности диагностики и лечения больных.

B1**034232****034232****B1**

Область техники, к которой относится данное изобретение

Данное изобретение относится к маркерам геномной ДНК, полезным при определении прогноза для больных раком, при определении лечебных мероприятий для больных раком, при определении указаний на агрессивность опухоли, или на наличие метастатического потенциала, или на сокращение времени жизни больного, при выявлении агрессивной формы ракового заболевания у индивида, при отборе больных раком для лечения рака или при определении опухолевой нагрузки и тяжести заболевания у больного раком. В конкретных воплощениях данного изобретения предлагаются способы, нуклеиновые кислоты, матрицы (чипы) нуклеиновых кислот и аналитические наборы, полезные при определении прогноза у индивидов с раковыми заболеваниями.

Уровень техники

Способы для определения прогноза и, таким образом, способы и агенты для определения лечения больного раком включают определение стадии развития опухоли на основании различных критериев. Часто такое определение включает инвазивные процедуры, сделанные с целью обнаружить гистологические изменения в строении ткани, степень инвазии опухоли в окружающую ткань и метастазирование.

В частности, колоректальный рак является вторым по частоте встречаемости раковым заболеванием в Европе и США (в 2006 г. насчитывалось 412900 и 150000 больных соответственно). В 75% случаев это заболевание лечат хирургическим путем. Однако в 30-40% случаев колоректального рака II-III стадии болезнь рецидивирует по большей части в течение 3-5 лет после установления первоначального диагноза. Притом на момент диагностирования рецидива только у 16-66% больных имеются симптомы и из этих опухолей только 1,7-7% операбельны. Таким образом, в 93-98,3% случаев заболевание идентифицируется позже того момента, когда иссечения опухоли достаточно, чтобы удалить ее полностью или все опухолевые клетки (см. Fakhri, M.G. MD, CEA Monitoring in Colorectal Cancer, What You Should Know, Volume 20: Number 6: 2006).

Принятые в настоящее время правила послеоперационного наблюдения за больными, имевшими опухоли II или последующих стадий, включают определение ракового эмбрионального антигена (СЕА) раз в 3-6 месяцев на протяжении 2 лет, затем раз в 6 месяцев на протяжении в сумме 5 лет и/или колоноскопию через 1 год после операции, затем при необходимости раз в два года. При колоректальном раке I и II стадии и наличии положительной реакции на СЕА до операции только в 3-32% случаев возможен послеоперационный мониторинг СЕА, а у остальных 68-97% больных с колоректальным раком I и II стадии наблюдение по СЕА невозможно. Кроме того, чувствительность определения СЕА зависит от локализации рецидива, так что из тех 3-32% больных, у которых мониторинг по СЕА возможен, он окажется информативен далеко не у всех.

На сегодняшний день единственный надежный метод прогнозирования исхода у больных колоректальным раком - это система классификация стадий развития раковых опухолей TNM (от англ. tumor-node-metastasis). Параметры этой системы в основном качественные и они не информативны для дальнейшей дифференциации степени риска у больных группы обычного риска, которые составляют большинство случаев рака толстой кишки II стадии. Приблизительно у 30% больных раком толстой кишки имеется II стадия этого заболевания. Современные рекомендации Общенациональной сети по борьбе против рака США (NCCN) не предполагают применения адъювантной химиотерапии в обычной клинической практике для всех больных со второй стадией рака толстой кишки - этот метод рекомендуется при высоком риске рецидива. В целом для больных со второй стадией пятилетнее выживание оценивается в 75-80%. Несмотря на такой относительно высокий процент излечения только хирургическим путем у значительной части больных раком второй стадии наблюдается рецидив. Идентификация маркеров, отличающих больных с низким риском рецидива ракового заболевания от пациентов с высоким риском такового, помогла бы выявить тех больных, которым нужна адъювантная химиотерапия. До сих пор биологические маркеры второй стадии рака толстой кишки ограничивались клинической диагностикой, но не использовались при прогнозировании или определении клинического исхода.

В попытках усовершенствовать прогностическую информацию и предсказывать результат системного лечения предлагалось использовать ряд белков и генетических маркеров. Но, в отличие от других раковых заболеваний, за исключением мутаций KRAS, пока ни один из изученных маркеров не применяется в клиническом ведении больных колоректальным раком.

Метилирование CpG-островков.

Показано, что aberrantное метилирование CpG-островков ведет к выключению на уровне транскрипции определенных генов, которые, как было установлено ранее, связаны с патогенезом различных расстройств, обусловленных нарушением пролиферации клеток, включая рак. CpG-островки - это нуклеотидные последовательности, в которых много динуклеотидов CpG; они обычно имеются в 5'-области приблизительно 50% всех человеческих генов. Метилирование цитозина в CpG-островках приводит к исчезновению генной экспрессии; сообщалось, что это происходит при инактивации X-хромосомы и геномном импринтинге.

Метилирование ДНК и прогнозирование заболевания.

В ряде публикаций, например в EP 1692316 и WO 2007/085497, показано, что метилирование ДНК ассоциировано с прогнозом состояния больного.

Существует настоятельная потребность в более совершенных средствах определения прогноза состояния больных раком, клинического исхода, опухолевой нагрузки, тяжести заболевания и/или необходимости включения в группу лечения на любом этапе, начиная с первоначального диагноза и в ходе лечения, включая возможность определения вероятности обострения, ремиссии или рецидива с использованием минимально инвазивных тестовых процедур.

Раскрытие изобретения

Данным изобретением предлагается способ для определения прогноза у больного раком, включающий следующие стадии: определение уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного до лечения; определение уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного после лечения; при этом увеличенное или такое же количество метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, служит показанием к дополнительному лечению рака у данного больного. В одном из воплощений настоящего изобретения увеличенное количество метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, является указанием на агрессивность ракового заболевания или метастатический потенциал или сокращение продолжительности жизни данного пациента. В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения указанный способ предлагается для определения прогноза у больного раком и включает следующие стадии: а) определение до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; б) определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; и с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения, при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на плохой прогноз и, следовательно, необходимость в дополнительном лечении ракового заболевания у данного больного. В одном из предпочтительных воплощений способа по данному изобретению указанный способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения и d) определение прогноза у данного больного на основании результатов указанного сравнения по п.с), при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на плохой прогноз и, следовательно, необходимость в дополнительном лечении ракового заболевания у данного больного.

Неизменные или даже увеличенные уровни метилированной геномной ДНК, как правило, указывают, что выбранное лечение не ликвидировало раковые клетки, содержащие метилированный фрагмент ДНК, или что их число увеличилось несмотря на лечение, то есть раковое заболевание прогрессировало. И напротив, пониженные уровни метилированной геномной ДНК, как правило, указывают, что число раковых клеток сократилось, то есть, что лечение оказалось успешным в смысле уменьшения опухолевой нагрузки у данного больного. В частности, снижение уровней метилированной ДНК ниже предела определения указывает, что у данного больного все раковые клетки ликвидированы, то есть что раковое заболевание излечено. Обычно раковое заболевание, не поддающееся лечению, считается агрессивным.

Если применявшееся лечение было локальным, уменьшение уровня метилированной геномной ДНК ниже предела определения предпочтительно указывает на излечение рака. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в зависимости от результата клинических исследований могут быть другие пороговые уровни для определения "излечения" больного. Установить такие пороговые уровни можно с помощью статистических методов, обычно применяемых в медицинских исследованиях.

Если уровень метилированной геномной ДНК, измеренный после локального лечения, выше предела определения, это предпочтительно указывает на то, что локальное лечение недостаточно для достижения полного излечения. Обычно такова ситуация, когда рак уже распространился за границы области, испытывавшей локальное воздействие. Следовательно, даже если уровень метилированной геномной ДНК понизился, но остается выявляемым, ее наличие указывает на плохой прогноз, поскольку рак, распространяющийся из места своего возникновения, лечить гораздо труднее.

Выбор дальнейшего лечения больного раком зависит от индивидуального прогноза. При благоприятной перспективе не требуется такого же агрессивного лечения, как при плохом прогнозе. Поскольку индивидуальный прогноз важен для выбора дальнейшего лечения больного раком, данное изобретение предлагает способ для определения лечебных мероприятий в отношении больного раком, включающий следующие стадии: определение до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; при этом увеличенное или такое же количество метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, служит показанием к дополнительному лечению рака у данного больного. В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения также предлагается способ определения, какого рода лечебные мероприятия подходят для данного больного раком, включающий следующие стадии: а) определение до лечения уровня мети-

лированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; б) определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; и с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения, при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на необходимость в дополнительном лечении ракового заболевания у данного больного. В одном из предпочтительных воплощений указанного способа этот способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения и d) на основании результатов указанного сравнения по п.с) определение, какого рода лечебные мероприятия подходят для данного больного раком; при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на необходимость в дополнительном лечении ракового заболевания у данного больного.

Предпочтительно уровень метилированной геномной ДНК после лечения ниже предела определения за состоянием пациента на предмет обострения заболевания. Однако если после лечения уровень метилированной геномной ДНК не снижается или даже возрастает, то необходимы дополнительные лечебные мероприятия. Поскольку увеличение уровня метилированной геномной ДНК указывает на неэффективность предпринятого лечения, то такая ситуация предпочтительно указывает на необходимость иного лечения.

Специалистам в данной области техники понятно, что выбор подходящего для данного больного лечения не может основываться на результатах только одного лабораторного исследования. Выбор лечения предпочтительно основывается на результатах медицинского обследования и врачебной оценке состояния пациента. Такое обследование предпочтительно включает обычно применяемые диагностические методы, например методы визуализации, а также оценку общего состояния здоровья данного больного, что дополняет результаты, полученные путем применения способа по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением предлагается способ, позволяющий определять, указывает ли взятая у больного раком опухолевая ткань на агрессивность опухоли, или на метастатический потенциал, или на сокращение продолжительности жизни данного пациента; этот способ включает: определение до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; при этом увеличенное или такое же количество метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, является указанием на агрессивность ракового заболевания, или на метастатический потенциал, или на сокращение продолжительности жизни данного пациента. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагается способ, позволяющий определить, указывает ли взятая у больного раком опухолевая ткань на агрессивность опухоли, или на метастатический потенциал, или на сокращение продолжительности жизни данного пациента; этот способ включает: а) определение до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; б) определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; и с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения, при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на агрессивность опухоли, или на метастатический потенциал, или на сокращение продолжительности жизни данного больного. В одном из предпочтительных воплощений указанного способа этот способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения и d) на основании результатов указанного сравнения по п.с) определение, указывает ли взятая у больного раком опухолевая ткань на агрессивность опухоли, или на метастатический потенциал, или на сокращение продолжительности жизни данного больного; при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на агрессивность опухоли, или на метастатический потенциал, или на сокращение продолжительности жизни данного больного.

Также настоящим изобретением предлагается способ, позволяющий определять, является ли опухоль у данного больного раком агрессивной и/или обладает метастатическим потенциалом; этот способ включает стадии: а) определения до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; б) определения после лечения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; с) сравнения измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения, при этом увеличенный или такой же уровень метилированной геномной ДНК или ее фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на агрессивность опухоли и/или на метастатический потенциал. В одном из предпочтительных воплощений указанного способа этот способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения и d) на основании результатов указанного сравнения по п.с) определение, является ли взятая опухоль у

Предпочтительно лечение считается успешным, если достигнут по меньшей мере один из следующих эффектов: ремиссия рака, увеличение периода до рецидива заболевания, увеличение продолжительности прогрессирования опухоли, ослабление симптомов ракового заболевания, сокращение массы опухоли и уменьшение числа опухолей. Более предпочтительно "успешное лечение" означает излечение рака, то есть полное исчезновение выявляемых и не выявляемых опухолевых клеток. Предпочтительным показателем излечения рака является по меньшей мере 5-летний период без рецидивов или более предпочтительно по меньшей мере 10-летний.

Предпочтительно лечение считается неуспешным/неэффективным, если не достигнута какая-либо из указанных выше целей.

Настоящим изобретением предлагается способ определения опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у больного, включающий определение до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; при этом увеличенное количество метилированной геномной ДНК данного гена в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на то, что у данного больного опухолевая нагрузка или тяжесть ракового заболевания увеличились или не изменились или что опухолевая нагрузка или тяжесть заболевания не уменьшились в результате лечения. В одном из предпочтительных воплощений настоящего изобретения предлагается способ определения развития опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у больного, включающий: а) определение до лечения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; б) определение после лечения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного; и с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения, при этом увеличенное или такое же количество метилированной геномной ДНК данного гена или его фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на то, что у данного больного опухолевая нагрузка или тяжесть ракового заболевания увеличились или не изменились или что опухолевая нагрузка или тяжесть заболевания не уменьшились в результате лечения. В одном из предпочтительных воплощений указанного способа этот способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения и d) на основании результатов указанного сравнения по п.с) определение развития опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у больного; при этом увеличенное или такое же количество метилированной геномной ДНК данного гена или его фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на то, что у данного больного опухолевая нагрузка или тяжесть ракового заболевания увеличились или не изменились или что опухолевая нагрузка или тяжесть заболевания не уменьшились в результате лечения.

Настоящим изобретением предлагается способ определения опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у больного, включающий сравнение уровня метилированной геномной ДНК некоторого или его фрагмента в биологическом образце, взятом у больного до лечения, с уровнем метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у этого больного после лечения; при этом увеличенное количество метилированной геномной ДНК данного гена или его фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на то, что у данного больного опухолевая нагрузка или тяжесть ракового заболевания увеличились или не изменились или что опухолевая нагрузка или тяжесть заболевания не уменьшились в результате лечения. В одном из предпочтительных воплощений указанного способа этот способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК до и после лечения и d) на основании результатов указанного сравнения по п.с) определение опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у больного; при этом увеличенное количество метилированной геномной ДНК данного гена или его фрагмента в образце, взятом после лечения, по сравнению с образцом, взятым до лечения, указывает на то, что у данного больного опухолевая нагрузка или тяжесть ракового заболевания увеличились или не изменились или что опухолевая нагрузка или тяжесть заболевания не уменьшились в результате лечения.

Уровень метилированной ДНК генов по данному изобретению в целом может служить маркером таких показателей ракового заболевания, как агрессивность и опухолевая нагрузка. Сравнение уровней метилированной ДНК, определенных в разные моменты времени, показывает - независимо от осуществляемого лечения, - как эти показатели ракового заболевания изменяются с течением времени.

Поэтому настоящим изобретением предлагается способ отслеживания показателей ракового заболевания, выбираемых из группы, состоящей из опухолевой нагрузки, тяжести заболевания, агрессивности рака и прогноза для больного раком, включающий стадии а) определения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в первом взятом у больного раком биологическом образце; б) определения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в следующем взятом у данного больного биологическом образце и с) сравнения измеренных уровней метилированной ДНК в более позднем образце и в первом образце, причем повышенный уровень метилированной ДНК данного гена или его фрагмента в позже взятом образце по сравнению с первым образцом указыва-

ет на то, что опухолевая нагрузка, тяжесть ракового заболевания или его агрессивность возросли или что прогноз для данного больного ухудшился и (ii) пониженный уровень метилированной ДНК данного гена или его фрагмента в позже взятом образце по сравнению с первым образцом указывает на то, что опухолевая нагрузка, тяжесть ракового заболевания или его агрессивность уменьшились или что прогноз для данного больного улучшился.

В одном из предпочтительных воплощений указанного способа этот способ включает следующие стадии с) и d): с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК в более позднем образце и в первом образце и d) на основании результатов сравнения по п.с) определение изменения опухолевой нагрузки, тяжести ракового заболевания или его агрессивности, а именно увеличились они или уменьшились, или определение изменения прогноза для данного больного, а именно ухудшился он или улучшился.

Первый и второй образцы могут быть взяты у больного в любой момент времени при условии, что второй образец берут позже первого. Предпочтительно второй образец берут по меньшей мере через 1, по меньшей мере через 2, по меньшей мере через 3, по меньшей мере через 6, по меньшей мере через 9 или по меньшей мере через 12 месяцев после взятия первого образца.

Описанный выше способ отслеживания показателей ракового заболевания особенно подходит для наблюдения за больными, которые уже получали противораковое лечение до рецидива и/или прогрессирования заболевания. Таким образом, в особенно предпочтительном воплощении настоящего изобретения пациент является больным раком, у которого это заболевание по видимости вылечили. Для того чтобы обнаружить рецидив ракового заболевания, можно использовать определение метилирования генов по данному изобретению по меньшей мере в двух образцах, взятых у больного в разные моменты времени после лечения. В области лечения рака нередко возникает та проблема, что лечение по видимости эффективно, то есть опухолевая нагрузка у больного становится ниже предела выявления доступными диагностическими методами, в частности методами визуализации. Однако, несмотря на по видимости успешное лечение, в организме может оставаться некоторое количество раковых клеток. Эти клетки могут пролиферировать и вызвать обострение ракового заболевания даже годы спустя после по видимости успешного лечения. Чтобы как можно раньше выявить обострение заболевания, желательно наблюдение прошедших противораковое лечение пациентов в течение какого-то времени после лечения. Поскольку способ по данному изобретению и чувствительный (в частности, для выявления ранних стадий карциномы толстой кишки можно использовать Septin9), и легко осуществимый, и не инвазивный, то он особенно подходит для наблюдения прошедших противораковое лечение пациентов после лечения.

В одном из вариантов способов по данному изобретению определяют метилирование гена SEPTIN9 (SEPTIN9 - SEQ ID NO: 1) или RASSF2a (SEQ ID NO: 16).

В другом варианте способов по данному изобретению указанный ген является геном SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1).

В другом варианте способов по данному изобретению указанный ген является RASSF2A (SEQ ID NO: 16).

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения описанные выше способы основываются на определении уровня метилирования ДНК обоих генов -SEPTIN9 и RASSF2A.

В другом варианте способа по данному изобретению раковое заболевание выбирают из группы, состоящей из рака толстой кишки и колоректального рака. В одном из воплощений данного изобретения стадией ракового заболевания является стадия I колоректального рака. В другом воплощении данного изобретения стадией ракового заболевания является стадия II колоректального рака. В другом воплощении данного изобретения стадией ракового заболевания является стадия III колоректального рака. В другом воплощении данного изобретения стадией ракового заболевания является стадия IV колоректального рака.

В другом варианте способов по данному изобретению лечение выбирают из группы, состоящей из хирургического вмешательства или иссечения; иммунотерапии; лучевой терапии; химиотерапии; терапии, направленной на солидные опухоли; терапии, направленной на опухоли мягких тканей; терапии, направленной на клетки крови.

В другом варианте способов по данному изобретению лечение локально, ограничиваясь областью ракового поражения/опухоли у больного. В другом варианте способов по данному изобретению лечение не ограничено областью ракового поражения/опухоли у больного.

Термин "локальное лечение" предпочтительно относится к хирургическому удалению опухоли и/или лучевой терапии. Термин "нелокальное лечение" равнозначен системному лечению и предпочтительно относится к химиотерапии и/или иммунотерапии.

В другом варианте способов по данному изобретению биологический образец выбирают из группы, состоящей из ткани, крови, кала, мочи, жидкости легочного лаважа, ткани молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки или комбинации этих тканей. В одном из воплощений данного изобретения указанный образец является сывороткой или плазмой крови. Предпочтительно использовать сыворотку или плазму крови.

В другом варианте способов по данному изобретению метилированную геномную ДНК или ее фрагмент определяют количественно или частично количественно. В другом варианте способов по дан-

ному изобретению метилированную геномную ДНК или ее фрагмент определяют качественно или частично качественно. В другом варианте способов по данному изобретению метилированную геномную ДНК или ее фрагмент определяют частично количественно и частично качественно или полуколичественно.

В другом варианте способов по данному изобретению определение метилированной геномной ДНК или ее фрагмента включает контактирование геномной ДНК из биологического образца по меньшей мере с одним реагентом или последовательно с несколькими реагентами, которые позволяют различить метилированные и не метилированные динуклеотиды CpG в пределах по меньшей мере одной области-мишени геномной ДНК, причем эта область-мишень содержит или гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по меньшей мере из 9, по меньшей мере 16 или по меньшей мере 25 смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 16 указанных непрерывно расположенных нуклеотидов содержат по меньшей мере одну динуклеотидную последовательность CpG. В одном из воплощений данного изобретения контактирование геномной ДНК или ее фрагмента в b) включает использование реагента, выбираемого из группы, включающей бисульфит, сернистую кислоту, дисульфит и их сочетания.

В другом варианте способы по данному изобретению включают а) экстракцию или выделение иным путем геномной ДНК или ее фрагмента из биологических образцов; b) обработку экстрагированной или выделенной иным путем ДНК или ее фрагмента одним (или более) реагентом для превращения цитозинов, неметилированных в 5-м положении пиримидинового кольца, в урацил или другое основание, которое отличимо от цитозина с точки зрения гибридизации; c) контактирование обработанной указанным образом ДНК или ее фрагмента с ферментами амплификации и по меньшей мере одним праймером, содержащим последовательность по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов, которые комплементарны обработанной последовательности, или гибридизуются при умеренно жестких или жестких условиях с обработанной последовательностью, или комплементарной ей последовательностью, причем указанная обработанная геномная ДНК или ее фрагмент амплифицированы с образованием по меньшей мере одного ампликона или не амплифицированы; и d) на основании присутствия, отсутствия или количества или какого-либо свойства указанного ампликона определение состояния или уровня метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG данного гена или среднего состояния или уровня метилирования (или величины, отражающей это среднее) множества динуклеотидов CpG данного гена. Упомянутую выше обработанную геномную ДНК выбирают из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 и 20.

В другом варианте способы по данному изобретению включают а) экстракцию или выделение иным путем геномной ДНК или ее фрагмента из биологических образцов; b) расщепление указанной экстрагированной или выделенной иным путем ДНК или ее фрагмента одним или более рестрикционными ферментами, чувствительными к метилированию; c) контактирование продукта (b) расщепления указанной ДНК рестрикционным ферментом с амплификационным ферментом и по меньшей мере с двумя праймерами, подходящими для амплификации последовательности, содержащей по меньшей мере один динуклеотид CpG данного гена; и d) на основании присутствия, отсутствия или количества, или класса ампликона определение состояния или уровня метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG данного гена.

Дальнейшую информацию о предпочтительных способах определения уровня метилированной геномной ДНК можно найти ниже в настоящем документе. В одном из особенно предпочтительных воплощений данного изобретения способом определения уровней метилированной геномной ДНК является использование систем ПЦР MethyLight™, HeavyMeth™ или ПЦР, специфичной к метилированию.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются метилированная геномная нуклеиновая кислота SEPTIN9 или ее фрагмент, содержащий по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12 по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов указанной нуклеиновой кислоты или комплементарных ей последовательностей для использования при определении прогноза для больного раком. В другом воплощении данного изобретения предлагаются метилированная геномная нуклеиновая кислота RASSF2A или ее фрагмент, содержащий по меньшей мере 9, по меньшей мере 16, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов указанной нуклеиновой кислоты или комплементарных ей последовательностей для использования при определении прогноза для больного раком. В одном из воплощений данного изобретения у этого больного колоректальный рак.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются метилированная геномная нуклеиновая кислота SEPTIN9 или ее фрагмент, содержащий по меньшей мере 9, по меньшей мере 16, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов указанной нуклеиновой кислоты или комплементарных ей последовательностей для использования при определении прогноза для больного раком. В одном из

воплощений данного изобретения у этого больного колоректальный рак.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются обработанная бисульфитом геномная нуклеиновая кислота SEPTIN9 или RASSF2A, содержащая по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12 по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов или комплементарную им последовательность для использования при определении прогноза для больного раком. Предпочтительно последовательность обработанной бисульфитом ДНК SEPTIN9 или RASSF2A определяется последовательностями SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19 или 20. В одном из воплощений данного изобретения последовательность непрерывно расположенных оснований содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG, TpG или CpA.

В другом аспекте данного изобретения предлагается набор для определения прогноза для больного раком; для определения лечебных мероприятий для больного раком; для определения того, имеются ли указания на агрессивность опухоли у данного больного или на ее метастатический потенциал или на сокращение продолжительности жизни данного больного; для выявления агрессивной формы ракового заболевания у данного пациента; для отбора пациентов для противоракового лечения или для определения опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у данного больного; этот набор включает а) ряд олигонуклеотидов или полинуклеотидов, способных гибридизоваться при жестких или умеренно жестких условиях с продуктами транскрипции данного гена или метилированной геномной ДНК; и б) средства для определения гибридизации. В одном из воплощений данного изобретения геном или метилированной геномной ДНК является ген SEPTIN9 (SEPTIN9). В одном из воплощений данного изобретения геном или метилированной геномной ДНК является ген RASSF2A.

В другом аспекте данного изобретения предлагается набор для определения прогноза для больного раком; для определения лечебных мероприятий для больного раком; для определения того, имеются ли указания на агрессивность опухоли у данного больного или на ее метастатический потенциал или на сокращение продолжительности жизни данного больного; для выявления агрессивной формы ракового заболевания у данного пациента; для отбора пациентов для противоракового лечения или для определения опухолевой нагрузки или тяжести ракового заболевания у данного больного; этот набор включает а) бисульфитный реагент; б) по меньшей мере один набор олигонуклеотидов, содержащий два олигонуклеотида, последовательности которых в каждом случае идентичны, комплементарны или гибридизуются в жестких или особо жестких условиях с участком последовательности SEPTIN9 или гена RASSF2A длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 нуклеотидов.

В других аспектах данного изобретения предлагается применение описанных в настоящем документе способов, нуклеиновых кислот и/или наборов для определения прогноза для больного раком.

Настоящим изобретением предлагается способ для определения прогноза для больного раком, включающий определение уровней экспрессии по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которая при раковых заболеваниях метилирована, а в не злокачественных тканях не метилирована. Метилирование геномной ДНК какого-либо гена, в частности метилирование области его промотора, снижает уровень экспрессии указанного гена. Следовательно, уровень метилирования гена, представляющего интерес в контексте данного изобретения, дает диагностическую информацию, сходную с той, которую дает пониженный уровень его экспрессии. Таким образом, уровень или количество метилированности/или экспрессии данного гена в биологическом образце, взятом у больного раком, является указанием на прогноз для этого индивида. В различных аспектах данного изобретения предлагаются генетические маркеры, анализ экспрессии которых позволяет определить прогноз для больного раком. В одном из воплощений данного изобретения указанный уровень экспрессии определяют, выявляя присутствие, отсутствие или уровень матричной РНК, образовавшейся в результате транскрипции указанного гена. В других воплощениях данного изобретения указанный уровень экспрессии определяют, выявляя присутствие, отсутствие или уровень полипептида, кодируемого указанным геном или входящей в него последовательностью.

Настоящим изобретением предлагается метод определения прогноза для больного колоректальным раком или раком толстой кишки, включающий определение уровней метилирования ДНК Septin9 (SEPTIN9) или RASSF2A в плазме крови, взятой у указанного индивида; при этом после иссечения первичной опухоли состояние метилированности является указанием на прогноз для указанного больного. В одном из воплощений данного изобретения оперативное вмешательство является радикальным.

Примеры, описанные в настоящем документе, показали, что после иссечения первичной опухоли уровень биологического маркера SEPTIN9 понижен в приблизительно 73% исследованных случаев стадии II колоректального рака и только в 20% случаев стадии III. Присутствие SEPTIN9 у больных колоректальным раком после предположительно радикального лечения можно использовать как указание на рецидив заболевания. Факт выявления SEPTIN9 после иссечения первичной опухоли указывает на высокий риск присутствия опухолевых клеток (например, микрометастазов) в организме пациента.

В других воплощениях данного изобретения указанную экспрессию определяют, выявляя присутствие, отсутствие или количество метилированных CpG в указанном гене, и на основании этого делают прогноз для указанного больного раком. Указанный способ включает следующие стадии: i) контактирование геномной ДНК, выделенной из биологического образца, взятого у данного пациента, по меньшей мере с одним реагентом или с рядом реагентов, позволяющих отличить метилированные динуклеотиды CpG от не метилированных по меньшей мере в одной области-мишени геномной ДНК, причем нуклеотидная последовательность указанной области-мишени содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG по меньшей мере одного гена или геномной последовательности этой группы генов, и ii) определение прогноза для больного раком. Предпочтительно область-мишень включает последовательность из по меньшей мере 16, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов или же гибридизуется с этой последовательностью при жестких условиях гибридизации.

Указанное использование данного гена осуществляется с помощью любого метода анализа экспрессии этого гена, мРНК или белка. В одном из воплощений данного изобретения определение прогноза для больного раком осуществляется путем анализа состояния метилирования по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые метилированы в раковой ткани и не метилированы в незлокачественных тканях, включая изоформы, фрагменты, промоторы или регуляторные элементы и их анти-смысловые варианты.

Настоящим изобретением предлагается способ анализов биологических образцов на наличие признаков, ассоциированных с прогрессированием ракового заболевания; этот способ отличается тем, что нужная нуклеиновая кислота или ее фрагмент контактирует с реагентом или рядом реагентов, позволяющих отличить метилированные динуклеотиды CpG от не метилированных в геномной последовательности. В одном из воплощений данного изобретения указанный ген является SEPTIN9 или RASSF2A.

Предпочтительно последовательность SEPTIN9 определяется последовательностями SEQ ID NO: 1, 2 или 3. Более предпочтительно последовательность SEPTIN9 определяется последовательностями SEQ ID NO: 2 или 3. Последовательность RASSF2A предпочтительно определяется последовательностью SEQ ID NO: 16.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения определяют состояние метилирования промоторной области SEPTIN9 и/или RASSF2A. В более предпочтительном воплощении данного изобретения определяют состояние метилирования по меньшей мере одного цитозина, содержащегося в геномной последовательности, определяемой последовательностями SEQ ID NO: 32 и/или 34. В еще более предпочтительном воплощении данного изобретения определяют состояние метилирования по меньшей мере одного цитозина, выбираемого из группы, состоящей из цитозинов в положениях 21, 28, 30, 37 и 39 последовательности SEQ ID NO: 32 и в положениях 25, 29, 46, 52, 58, 70, 74, 79 и 89 последовательности SEQ ID NO: 34. В наиболее предпочтительном воплощении данного изобретения определяют состояние метилирования цитозина во всех упомянутых выше положениях последовательностей SEQ ID NO: 32 и/или 34.

Настоящим изобретением предлагается способ определения эпигенетической характеристики геномной ДНК, ассоциированной с развитием рака.

Источником образца для анализа служит ткань или жидкость тела, например ткани и жидкости тела, выбираемые из группы, которая состоит из ткани, крови, плазмы крови, сыворотки крови, мочи, жидкости легочного лаважа, каловых масс, легких, молочных желез, толстой кишки, прямой кишки, тонкого кишечника и их комбинаций.

В частности, настоящим изобретением предлагается способ определения прогноза для больного раком, пригодный для применения как средство предсказания, который включает получение биологического образца, содержащего геномную нуклеиновую кислоту (кислоты); контактирование этой нуклеиновой кислоты (кислот) или ее (их) фрагмента (фрагментов) с реагентом или рядом реагентов, позволяющими отличать метилированные динуклеотиды CpG от неметилированных в последовательности-мишени нуклеиновой кислоты данного индивида, причем последовательность-мишень включает последовательность, содержащую по меньшей мере 16, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 нуклеотидов данного гена (в числе которых имеется по меньшей мере один динуклеотид CpG, или гибридизуется с ней; и на основании (по меньшей мере, частично) указанного различия определение состояния метилирования по меньшей мере одного динуклеотида-мишени CpG или среднего уровня метилирования, или величины, отражающей среднее состояние метилирования ряда динуклеотидов-мишеней CpG.

Различение метилированных и неметилированных динуклеотидов CpG в последовательности-мишени включает зависимую от состояния метилирования конверсию (или отсутствие конверсии) по меньшей мере одного динуклеотида CpG с образованием соответствующего конвертированного или неконвертированного динуклеотида в последовательности, выбираемой из группы, состоящей из прошедших бисульфитную обработку смысловой и антисмысловой цепей рассматриваемых генов и смежных их участков, соответствующих последовательности-мишени.

В других воплощениях данного изобретения предлагается способ для определения прогноза у больного раком, включающий забор биологического образца, содержащего геномную ДНК данного индиви-

да; выделение геномной ДНК; обработку этой геномной ДНК или ее фрагмента одним или более реагентов для превращения неметилированного в 5-м положении пиримидинового кольца цитозина в урацил или иное основание, отличное от цитозина в отношении гибридизации; контактирование обработанной указанным образом ДНК или ее фрагмента с ферментами, обеспечивающими амплификацию, и по меньшей мере двумя праймерами, содержащими (каждый) непрерывную последовательность длиной по меньшей мере 9 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности, выбираемой из группы, состоящей из прошедших бисульфитную обработку смысловой и антисмысловой цепей или комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с ней при умеренно жестких или жестких условиях, причем указанная обработанная ДНК или ее фрагмент амплифицированы с образованием ампликона либо не амплифицированы; и на основании присутствия, отсутствия или типа, или свойств указанного ампликона определение состояния метилирования или среднего уровня метилирования, или величины, отражающий средний уровень метилирования, по меньшей мере одного, но более предпочтительно - множества динуклеотидов CpG указанных геномных последовательностей.

Способы, описанные в настоящем документе, включают применение по меньшей мере одного способа, выбираемого из группы, состоящей из i) гибридизации по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей непрерывную последовательность длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности, выбираемой из группы, состоящей из прошедших бисульфитную обработку смысловой и антисмысловой цепей и комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с ней при умеренно жестких или жестких условиях; ii) гибридизации по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, связанной на твердой фазе, содержащей непрерывную последовательность длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности, выбираемой из группы, состоящей из прошедших бисульфитную обработку смысловой и антисмысловой цепей и комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с ней при умеренно жестких или жестких условиях; iii) гибридизации по меньшей мере одной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей непрерывную последовательность длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности, выбираемой из группы, состоящей из прошедших бисульфитную обработку смысловой и антисмысловой цепей и комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с ней при умеренно жестких или жестких условиях, и удлинение по меньшей мере одной такой молекулы нуклеиновой кислоты по меньшей мере на один нуклеотид; и iv) определение нуклеотидной последовательности ампликона.

В других воплощениях данного изобретения предлагается способ для оценки (то есть определения) прогрессирования заболевания и/или прогноза у данного пациента) ракового заболевания, включающий забор биологического образца, содержащего геномную ДНК данного пациента; выделение геномной ДНК; контактирование этой геномной ДНК или ее фрагмента, содержащего одну или более последовательностей, выбираемых из группы, состоящей из геномных последовательностей или последовательностей, гибридизующихся с ними при жестких условиях, с одним или более рестрикционных ферментов, чувствительных к метилированию, причем указанная геномная ДНК расщеплена на фрагменты или не расщеплена на фрагменты; и на основании присутствия или отсутствия, или типа, или свойств по меньшей мере одного такого фрагмента определение состояния метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG геномных последовательностей или среднего состояния метилирования множества динуклеотидов CpG или величины, отражающей это среднее. Перед указанным определением расщепленная на фрагменты или не расщепленная геномная ДНК может быть амплифицирована. В других воплощениях данного изобретения предлагаются геномные и химически модифицированные нуклеотидные последовательности, а также олигонуклеотиды и/или олигомеры пептидо-нуклеиновых кислот (PNA) для анализа профилей метилирования цитозина в геномных последовательностях.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1-4 изображают коробчатые диаграммы для отношения количества ДНК Septin9 после хирургического лечения/до хирургического лечения (пикограммы метилированной ДНК Sept9 после операции, деленные на пикограммы метилированной ДНК Sept9 до операции) у больных колоректальным раком, распределенных по стадиям рака (ось x). Отношение рассчитывали только для индивидов, у которых уровни ДНК Septin9 до операции были >0. Четыре числа сверху - значения p по одностороннему t-критерию (использовали уровни после лечения/до лечения попарно). На фиг. 1 и 3 - стадия I: линии из точек и кружочки, стадия II: пунктирные линии и треугольники, стадии III: пунктирные линии с точками и крестики, стадия IV: сплошные линии и ромбики.

Фиг. 5 и 6 представляют уровни ДНК Septin9 (ось y: Log10 от пикограммов метилированной ДНК Sept9) у больных колоректальным раком до и после хирургического лечения (ось x). Различные стадии рака изображены следующим образом. Фиг. 5: стадия I (4 пациента): линии из точек и кружочки; стадия II (9 пациентов): пунктирные линии и треугольники; стадия III (4 пациента): пунктирные линии с точками и крестики; стадия IV (2 пациента): сплошные линии и ромбики.

Фиг. 7 и 8 изображают коробчатые диаграммы для отношения количества ДНК RASSF2A после хирургического лечения/до хирургического лечения (пикограммы метилированной ДНК после операции,

деленные на пикограммы метилированной ДНК RASSF2A до операции) у больных колоректальным раком, распределенных по стадиям рака (ось x). Отношение рассчитывали только для индивидов, у которых уровни ДНК RASSF2A до операции были >0 . Четыре числа сверху - значения p по одностороннему парному t-критерию (использовали уровни после лечения/до лечения попарно). На фиг. 5: стадия I (4 пациента): линии из точек и кружочки, стадия II (9 пациентов): пунктирные линии и треугольники, стадия III (4 пациента): пунктирные линии с точками и крестики, стадия IV (2 пациента): сплошные линии и ромбики.

Фиг. 9-12 представляют уровни метилированной ДНК RASSF2A (ось y: Log10 от пикограммов метилированной ДНК RASSF2A) у больных колоректальным раком до и после хирургического лечения (ось x). Различные стадии рака изображены следующим образом. Стадия I (4 пациента): линии из точек и кружочки; стадия II (9 пациентов): пунктирные линии и треугольники; стадия III (4 пациента): пунктирные линии с точками и крестики; стадия IV (2 пациента): сплошные линии и ромбики.

Фиг. 13 представляет расположение гена SEPT9 в человеческом геноме на хромосоме 17q25 (база данных Ensembl Jul 2005). Стрелками показано положение последовательностей SEQ ID NO: 2 и 3.

Фиг. 14 демонстрирует количественный анализ метилирования гена Septin9 в образцах плазмы крови больных колоректальным раком до и после хирургического лечения.

Фиг. 15 демонстрирует количественный анализ метилирования гена RASSF2A в образцах плазмы крови больных колоректальным раком до и после хирургического лечения.

Осуществление изобретения

Определения.

Термин "отношение наблюдаемого значения величины к ожидаемому" (отношение О/Е) относится к частоте динуклеотидов CpG в конкретной последовательности ДНК и соответствует $[\text{число сайтов CpG}/(\text{число цитозинов} \times \text{число гуанинов})]/\text{длина полосы для каждого фрагмента}$.

Термин "островок CpG" относится к непрерывному участку геномной ДНК, удовлетворяющему следующим критериям: (1) в нем частота динуклеотидов CpG соответствует отношению $\text{О/Е} > 0,6$, и (2) в нем содержание GC $> 0,5$. Острова CpG обычно (но не всегда) бывают длиной от около 0,2 кб до около 2 кб.

Термин "состояние метилирования"/"статус метилирования" относится к присутствию, отсутствию или типу 5-метилцитозина (5-mCyt) в одном или множестве динуклеотидов CpG в последовательности ДНК. Состояния метилирования в одном или более конкретных сайтах метилирования CpG, в каждом из которых два динуклеотида CpG в последовательности ДНК включают следующие варианты: не метилированное, полностью метилированное и полуметилированное.

Термин "полуметилированное" относится к состоянию двухцепочечной ДНК, в которой метилирование имеет место только в одной из цепей.

Аббревиатура AUC в настоящем документе обозначает величину "площадь под кривой". В частности, оно относится к площади под рабочей характеристической кривой (ROC-кривой). Кривая ROC - это график, отображающий соотношение между долей верных положительных классификаций от общего числа положительных классификаций с долей ошибочных положительных классификаций от общего числа отрицательных классификаций при варьировании порога решающего правила. Он показывает соотношение между чувствительностью и специфичностью в зависимости от выбранного порога (всякое увеличение чувствительности будет сопровождаться уменьшением специфичности). Площадь под кривой ROC (AUC) является мерой качества классификации/точности анализа (чем эта величина больше, тем лучше; оптимум - 1, испытание по случайной схеме характеризуется кривой ROC, лежащей на диагонали с площадью 0,5; см. J.P. Egan. Signal Detection Theory and ROC Analysis, Academic Press, New York, 1975).

Термин "микроматрица" относится в широком смысле слова как к ДНК-микроматрицам, так и к ДНК-микрочипам"; в данной области техники этот термин охватывает все известные твердые носители и все методы прикрепления к ним или синтеза на них молекул нуклеиновых кислот.

Термин "генетические характеристики" подразумевает мутации и полиморфизмы генов и нуклеотидных последовательностей, требующихся для их регуляции. К мутациям, в частности, относятся вставки, делеции, точковые мутации, инверсии и полиморфизмы и особенно предпочтительны однонуклеотидные полиморфизмы (SNP).

Термин "эпигенетические характеристики" подразумевает, в частности, метилирование цитозина. Другие эпигенетические характеристики включают, например, ацетилирование гистонов, которое, однако, нельзя анализировать непосредственно, используя описанные здесь способ, но которое, в свою очередь, коррелирует с метилированием ДНК.

Термин "бисульфитный реагент" относится к реагентам, включая бисульфит, дисульфит, сернистую кислоту или их сочетания, используемые, как описано в настоящем документе, для того чтобы различать метилированные и неметилированные динуклеотиды CpG.

Термин "анализ метилирования" относится к любому аналитическому методу для определения состояния метилирования одного или более динуклеотидов CpG в нуклеотидной последовательности ДНК.

Аббревиатурой MS.AP-PCR (от англ. Methylation-Sensitive Arbitrarily-Primed Polymerase Chain Reac-

tion - чувствительная к метилированию полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами) обозначается известный в данной области техники метод полного секвенирования генома с использованием CG-богатых праймеров для концентрации на участках, с наибольшей вероятностью содержащих динуклеотиды CpG; этот метод описан, например, в работе Gonzalgo et al., *Cancer Research* 57:594-599, 1997.

Обозначение MethyLight™ относится к известной в данной области техники методике полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с оценкой интенсивности флуоресценции, описанной в работе Eads et al., *Cancer Res.* 59:2302-2306, 1999.

Обозначение HeavyMethyl в описанном в настоящем документе воплощении изобретения относится к аналитическому методу, в котором специфичные к метилированию блокирующие зонды (называемые в настоящем документе также блокаторами), покрывающие положения CpG между праймерами для амплификации или покрытые ими, делают возможной специфичную к метилированию избирательную амплификацию образца нуклеиновой кислоты.

Анализ, называемый в настоящем документе HeavyMethyl™ MethyLight™, в одном из воплощений данного изобретения представляет собой вариант метода MethyLight™, в котором этот последний сочетается с использованием специфичных к метилированию блокирующих зондов, покрывающих положения CpG между праймерами для амплификации.

Аббревиатура Ms-SNuPE (от англ. Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension - чувствительное к метилированию однонуклеотидное расширение праймера) относится к известному в данной области техники аналитическому методу, описанному в работе Gonzalgo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997.

Аббревиатура MSP (от англ. Methylation-specific PCR - специфичная к метилированию полимеразная цепная реакция) относится к известному в данной области техники методу анализа метилирования, описанному в работе Herman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9821-9826, 1996, и by US Patent No. 5786146.

Аббревиатура COBRA (от англ. Combined Bisulfite Restriction Analysis - комбинированный бисульфитный рестрикционный анализ) относится к известному в данной области техники методу анализа метилирования, описанному в работе Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.* 25:2532-2534, 1997.

Аббревиатура MCA (от англ. Methylated CpG Island Amplification - амплификация метилированных островков CpG) относится к методу анализа метилирования, описанному в работе Toyota et al., *Cancer Res.* 59:2307-12, 1999 и в публикации WO 00/26401 A1.

Термин "гибридизация" подразумевает связывание олигонуклеотида с комплементарной последовательностью соответственно уотсон-криковским правилам спаривания оснований в образце ДНК с образованием двойной спирали.

Выражение "жесткие условия гибридизации" в настоящем документе означает, что гибридизация происходит при температуре 68°C в растворе 5× хлорид натрия/цитрат натрия (SSC)/5× раствор Денхардта/1,0% додецилсульфат натрия (SDS) с промыванием в 0,2× SSC/0,1% SDS при комнатной температуре или включает известные в данной области техники равноценные манипуляции (например, гибридизация осуществляется при температуре 60°C в буферном растворе 2,5× SSC 37°C с последующим многократным промыванием при температуре 37°C и низкой концентрации буферного раствора). "Умеренно жесткие условия гибридизации" в настоящем документе включают промывание в растворе 3× SSC при температуре 42°C или равноценные манипуляции, известные в данной области техники. Концентрацию солей и температуру можно варьировать, чтобы добиться оптимального уровня идентичности между зондом и нуклеиновой кислотой-мишенью. Рекомендации по условиям гибридизации имеются, например, в работах Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. и Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.) at Unit 2.10.

Термин "рестрикционные ферменты, специфичные к метилированию" или "рестрикционные ферменты, чувствительные к метилированию" подразумевает ферменты, избирательно расщепляющие нуклеиновые кислоты в зависимости от состояния метилирования узнаваемого ими сайта. В случае таких рестрикционных ферментов, которые специфично расщепляют субстрат, если узнаваемый ими сайт не метилирован или полуметилирован, расщепления не происходит или же оно происходит со значительно пониженной эффективностью, если узнаваемый сайт метилирован. В случае таких рестрикционных ферментов, которые специфично расщепляют субстрат, если узнаваемый ими сайт метилирован, расщепления не происходит или же оно происходит со значительно пониженной эффективностью, если узнаваемый сайт не метилирован. Предпочтительны рестрикционные ферменты, специфичные к метилированию, которые распознают последовательность, содержащую динуклеотиды CG (например, cgcg или cscggg). Для некоторых воплощений данного изобретения также предпочтительны рестрикционные ферменты, которые не расщепляют субстрат, если в этих динуклеотидах цитозин метилирован в положении C5.

"Рестрикционные ферменты, не специфичные к метилированию", или "рестрикционные ферменты,

не чувствительные к метилированию" - это рестрикционные ферменты, расщепляющие последовательность нуклеиновой кислоты независимо от состояния метилирования с почти одинаковой эффективностью. Их также называют рестрикционными ферментами, аспецифичными к метилированию.

Что касается составных матричных последовательностей, то выражение "смежные нуклеотиды" относится к непрерывному участку последовательности любой отдельно взятой непрерывной последовательности составной матрицы, но не включает участок составной матричной последовательности, который содержит "узел", определенный выше.

Характеристику биологического маркера, который при раке метилирован, а в не злокачественных тканях не метилирован, как прогностического показателя в отношении рака следует считать включающей все варианты его транскриптов, все промоторы и все его регуляторные элементы. Также, поскольку известно множество однонуклеотидных полиморфизмов в биологическом маркере или гене, указанный термин должен включать все варианты его последовательности.

Общие сведения.

Настоящим изобретением предлагается способ определения прогноза для больного раком, включающий определение уровней метилирования и/или экспрессии по меньшей мере одного биологического маркера, который при раке метилирован, а в не злокачественных тканях не метилирован, в биологическом образце, взятом у указанного больного, причем статус метилирования и/или экспрессии является показателем, существенным для прогноза у указанного больного раком.

Способы для определения прогноза и тем самым способы и агенты для лечения больных раком включают определение стадии развития опухоли на основании различных критериев. Часто такое определение включает инвазивные процедуры для выявления гистологических изменений в структуре ткани, степени инвазии опухоли в соседние ткани и метастазирования. Для оценки прогрессирования и определения степени тяжести ракового заболевания используются различные системы установления стадии рака или методы классификации опухоли, в которых фигурируют стандартные классификационные критерии.

В отношении колоректального рака обычно используются две системы определения стадии заболевания, а именно схема TNM (от англ. Tumor-Node-Metastasis), предполагающая стадии I-IV, которая разработана Американским объединенным комитетом по раку (см. AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edition, Springer-Verlag, New York, 2002) и включена в настоящий документ путем отсылки, и модифицированная система Дюка (Duke) или Астлера-Коллера (Astler-Coller) (стадии A-D) (см. Astler V.B., Collier F.A., Ann Surg 1954; 139:846-52). Оба метода стадирования предполагают оценку прогрессирования опухоли по распространению первичной опухоли через слои стенки толстой и прямой кишки в соседние органы, лимфатические узлы и в более удаленные участки организма. В настоящее время оценка риска рецидива ракового заболевания и принятие решений о лечении базируется преимущественно на результатах стадирования опухоли.

Настоящим изобретением предлагаются способы и наборы для определения прогноза у больного раком, определения лечебных мероприятий для больного раком, определения агрессивности опухоли, метастатического потенциала или сокращения продолжительности его жизни, выявления агрессивной формы ракового заболевания у пациента, отбора больных раком для лечебных мероприятий или определения опухолевой нагрузки или степени тяжести ракового заболевания у индивида, включающие определение уровней метилирования и/или экспрессии по меньшей мере одного биологического маркера, который при раке метилирован, а в не злокачественных тканях не метилирован, в биологическом образце, взятом у указанного индивида, причем состояние метилирования и/или экспрессии является указанием на прогноз для указанного больного раком. Эти способы включают экстрагирование или выделение иным методом геномной ДНК или ее фрагмента из биологических образцов; обработку выделенной геномной ДНК или ее фрагмента одним или более реагентами для превращения цитозина, не метилированного в 5-м положении, в урацил или иное основание, отличное от цитозина с точки зрения гибридизации; контактирование обработанной указанным образом геномной ДНК или ее фрагмента с ферментами, обеспечивающими амплификацию, и по меньшей мере с одним праймером, содержащим последовательность длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 18, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов, которая комплементарна указанной обработанной последовательности или гибридизуется с ней (или с комплементарной ей последовательностью) при умеренно жестких или жестких условиях, причем обработанная указанным образом геномная ДНК или ее фрагмент амплифицируется с образованием по меньшей мере одного ампликона или же не амплифицируется; и на основании присутствия, отсутствия или количества или свойств указанного ампликона определение состояния или уровня метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG данного гена или среднего состояния или величины, отражающей это среднее состояние метилирования множества динуклеотидов CpG данного гена.

Способы обработки выделенной геномной ДНК, амплификации ДНК, ее выявления и определения описаны в настоящем документе ниже.

Настоящим изобретением предлагается выявление в биологическом образце, взятом у больного раком, биологического маркера или гена, который метилирован при раке, но не метилирован в не злокаче-

ственных тканях; дальнейший прогноз, определение клинического исхода или определение лечебных мероприятий для больного раком.

Предпочтительно способ по данному изобретению включает стадии а) определения уровня метилированной геномной ДНК некоторого гена или его фрагмента в первом биологическом образце, взятом у больного раком; б) определения уровня метилированной геномной ДНК этого гена или его фрагмента в биологическом образце, взятом у данного больного раком позже; и с) сравнение измеренных уровней метилированной ДНК в двух (более раннем и более позднем) биологических образцах, взятых у больного раком.

В одном из воплощений данного изобретения искомую ДНК выявляют и определяют в биологическом образце, взятом у больного раком до лечения, и в образце, взятом после лечения, причем под лечением здесь понимается любое воздействие на пациента (или на его ткань), включающее процедуру или применение какого-либо агента, уменьшающие, ликвидирующие, сокращающие размеры, сводящие к минимуму или удаляющие опухоль. Такие процедуры или применения включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) хирургическое иссечение, иммунотерапию, лучевую терапию, химиотерапию, терапию направленную на солидные опухоли, лазерную терапию, терапию направленную на мягкие ткани и терапию раковых заболеваний крови. В том воплощении "образец, взятый до лечения" соответствует "первому образцу" и "образец, взятый после лечения" соответствует "образцу, взятому позже".

Образец до лечения может быть взят в любой момент прежде, чем начнется лечение. Однако предпочтительно брать его не больше чем за 1 неделю, не больше чем за 2 недели, не больше чем за 4 недели или не больше чем за 8 недель до начала лечения. Образец после лечения может быть взят в любой момент после начала лечения. Если лечение представляет собой химиотерапию, то однозначно предполагается, что образец после лечения берется прежде, чем курс лечения пациента будет завершен, при условии, что данный пациент получил по меньшей мере одну дозу по меньшей мере одного фармацевтического вещества, используемого для химиотерапии.

Рекомендуемое лечение при колоректальном раке зависит от стадирования опухоли. Стадии I, II и III характеризуются отсутствием удаленных метастазов. Соответственно предпочтительным лечебным мероприятием является хирургическое удаление опухоли. При стадиях II B, II C, III при высоком риске II A может быть рекомендована адъювантная химиотерапия. При стадии IV хирургическое удаление опухоли рекомендуется только, если число и локализация удаленных метастазов указывает на вероятность полного излечения путем удаления всех опухолей. При колоректальном раке IV стадии хирургическое удаление сопровождается адъювантной и/или неoadъювантной химиотерапией.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения опухоль является карциномой толстой кишки I, II или III стадий. В этом случае уровень метилированной геномной ДНК в образце после лечения, указывающий на полную ликвидацию опухоли, предпочтительно ниже предела выявления, свидетельствует о том, что лечение рака путем хирургического удаления опухоли оказалось успешным. Это равнозначно хорошему прогнозу для данного пациента, и адъювантная химиотерапия как дополнительное лечебное мероприятие предпочтительно не рекомендуется.

В другом предпочтительном воплощении данного изобретения лечение представляет собой адъювантную или неoadъювантную химиотерапию опухолей I, II или III стадии или операбельной опухоли IV стадии либо химиотерапию без дополнительного хирургического вмешательства, как и системное лечение неоперабельной опухоли IV стадии. В таком случае пониженный уровень метилированной геномной ДНК в образце после лечения по сравнению с образцом до лечения предпочтительно указывает, что выбранная схема химиотерапевтического лечения оказалась успешной и опухолевая нагрузка у данного больного уменьшилась. Это равнозначно указанию на то, что данную схему химиотерапевтического лечения не нужно изменять. Однако если уровень метилированной геномной последовательности в образце после лечения остается постоянным или даже возрастает, это предпочтительно указывает, что примененное лечение неэффективно и схему лечения нужно изменить. В этом воплощении предпочтительно взять у больного более одного образца после лечения в различные моменты времени в ходе химиотерапии, чтобы надежно определить, принесло ли успех применение данной схемы химиотерапевтического лечения.

Настоящее изобретение обеспечивает способ прогнозирования состояния больного раком, включающий выявление опухолевых клеток, когда первичная опухоль уже удалена, например, описанными выше способами. Таким образом, данное изобретение позволяет определять, принесли ли успех мероприятия по удалению первичной опухоли и дали ли они полный эффект. Кроме того, настоящим изобретением предлагаются способы, позволяющие определять, распространилась ли опухоль. Способы, позволяющие определять, распространилась ли опухоль, основываются на патологоанатомических и гистологических методах определения пораженности лимфатических узлов и выявления метастазов, например описанные выше методы стадирования рака. Настоящее изобретение позволяет определять такие показатели, как опухолевая нагрузка, степень тяжести ракового заболевания, распространение опухоли и/или метастазирование путем взятия первого образца, в геномной ДНК которого определяют присутствие гена или биологического маркера, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы, и второго образца, в геномной ДНК которого определяют присутствие гена или биологического

маркера, которые при раке метилированы, а в не злокачественных тканях не метилированы, и путем определения, остались ли в организме пациента опухолевые или злокачественные клетки, что указывает на необходимость в клиническом лечении.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения присутствие выявляемых уровней биологического маркера после удаления первичной опухоли указывает на то, что опухоль удалена не полностью. Преимущественно такая ситуация указывает на то, что данная опухоль уже распространилась локально в окружающие ткани или лимфатические узлы или системно в другие органы помимо толстой кишки, прямой кишки и аппендикса.

В некоторых воплощениях данного изобретения методы выявления являются количественными, частично количественными, качественными, частично качественными или частично количественными и частично качественными.

В некоторых воплощениях данного изобретения геном или биологическим маркером, который метилирован при раке, но не метилирован в не злокачественных тканях, является Septin9. В некоторых воплощениях данного изобретения геном или биологическим маркером, который метилирован при раке, но не метилирован в не злокачественных тканях, является RASSF2A.

У человека ген белка, называемого Septin 9 (он известен также под названиями септиноподобный слитый белок MLL, септиноподобный слитый белок MLL MSF-A, Slpa, эсептин, Msf, септиноподобный белок яичников/септин молочной железы (септин Ov/Br) и септин D1) находится на хромосоме 17q25 в контиге AC068594.15.1.168501 и является членом семейства септиновых генов. На фиг. 13 представлено описание гена Septin 9 и показаны четыре транскрипционных варианта, варианты Septin 9 и варианты Q9HC74 (которые представляют собой укороченные варианты транскриптов Septin 9). SEQ ID NO: 1 представляет последовательность указанного гена, включающую участки транскриптов как Septin 9, так и Q9HC74 и промоторные участки. SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 представляют собой их субучастки, которые являются последовательностями богатых CpG промоторных участков транскриптов Septin9 и Q9HC74 соответственно. SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК Septin9 и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 1 (то есть там, где динуклеотиды CpG метилированы), как показано в табл. 1. SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК Septin 9 и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 1 (то есть там, где динуклеотиды CpG не метилированы), как показано в табл. 1. SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК Septin 9 и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 2 (то есть там, где динуклеотиды CpG метилированы), как показано в табл. 1. SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК SEPTIN9 и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 2 (то есть там, где динуклеотиды CpG не метилированы), как показано в табл. 1. SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК Q9HC74 и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 3 (то есть там, где динуклеотиды CpG метилированы), как показано в табл. 1. SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК Septin9 и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 3 (то есть там, где динуклеотиды CpG не метилированы), как показано в табл. 1. Septin9 и эти варианты были также описаны в опубликованной заявке на патент США № US-2009-0075260, по которой выдан патент США № 7951563; опубликованной заявке на патент США № 2006-0286576, по которой выдан патент США № 7749702; опубликованной заявке на патент США № US-2011-0039719; все эти работы включаются в настоящий документ путем отсылки для описания гена SEPTIN9 и информации по последовательности. Дополнительные последовательности, относящиеся к гену Septin9, описываются в примерах и настоящем описании.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения геном или биологическим маркером, который метилирован при раке, но не метилирован в не злокачественных тканях, является RASSF2A (SEQ ID NO: 16). Ген RASSF2 располагается на хромосоме 20p13 и кодирует множество изоформ мРНК-транскриптов. Члены семейства белков Ras ассоциированы с раком; RASSF2 связывается с K-Ras и экспрессия RASSF2 связана с контролируемым клеточным ростом. Утрата его экспрессии приводит к безудержной пролиферации клеток и соответственно RASSF2 является геном-супрессором опухолей (Vos et al. J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 30, 28045-28051, Jul. 25, 2003). Ген RASSF2 содержит богатый динуклеотидами CpG участок в промоторе, охватывающий первые два не кодирующих экзона. Этот участок характеризовали совместным метилированием, а также его метилирование ассоциировано с развитием карцином желудка и толстой кишки. В работе Hesson et al. (Oncogene. 2005 Jun. 2; 24(24):3987-94) говорится о совместном метилировании островков CpG, что было показано путем анализа COBRA и бисульфитного секвенирования в клеточных линиях рака толстой кишки. Кроме того, путем специфичной к метилированию полимеразной цепной реакции (MSP) было подтверждено, что в 70% (21/30) изученных клеточ-

ных линий рака толстой кишки имело место метилирование в промоторной области RASSF2A. Дальнейшие исследования показали, что метилирование RASSF2 может быть связано с раком желудка (Endoh et al. Br J. Cancer. 2005 Dec. 12; 93(12):1395-9) и назофарингеальным раком (Zhang et al. Int J. Cancer. 2007 Jan. 1; 120(1):32-8). В SEQ ID NO: 16 представлена последовательность RASSF2A. SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК RASSF2A и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 16 (то есть там, где динуклеотиды CpG метилированы), как показано в табл. 1. SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20 - это последовательности, соответствующие химически обработанной (бисульфитом) смысловой цепи ДНК RASSF2A и антисмысловой цепи соответственно, которые соответствуют последовательности SEQ ID NO: 16 (то есть там, где динуклеотиды CpG не метилированы), как показано в табл. 1. Геномная последовательность полного гена, представленная SEQ ID NO: 16, описана в опубликованной заявке на патент США № US-2010-0092953, которая включена в настоящий документ путем отсылки для описания гена RASSF2A и информации по последовательности.

Если при помощи способов по настоящему изобретению в образце, взятом после лечения у больного раком I или II стадии, количественно, частично количественно, качественно, частично качественно или частично количественно и частично качественно определяется присутствие определенного гена или биологического маркера, это указывает на плохой прогноз для данного пациента и необходимость в более агрессивном противораковом лечении.

Если при помощи способов по настоящему изобретению в образце, взятом после лечения у больного раком III стадии, определяется не измененный или повышенный уровень определенного гена или биологического маркера, это указывает на необходимость продолжения наблюдения с помощью способов, описанных в настоящем документе, чтобы выяснить, имеется ли тенденция к увеличению уровня этого гена или биологического маркера.

Способы по данному изобретению обеспечивают возможность не только определения изменения в уровне определенного гена или биологического маркера, но также продолжительного наблюдения или контроля реакции индивида на лечение или эффекта отсутствия лечения и могут применяться с целью определить фазу - ремиссия или обострение - ракового заболевания.

Бисульфитная модификация ДНК - известное в данной области техники средство определения состояния метилирования. Чаще всего применяемый метод анализа ДНК с целью выявить присутствие 5'-метилцитозина основывается на реакции бисульфита с цитозином, в результате которого с последующим щелочным гидролизом цитозин превращается в урацил, спаривающийся с другими основаниями так же, как тимин. Важно, что 5'-метилцитозин в этих условиях не изменяется. Таким образом, исходная ДНК конвертируется так, что метилцитозин, который с точки зрения гибридизации неотличим от цитозина, теперь можно выявить как единственный оставшийся вариант цитозина, используя обычные известные в данной области техники молекулярно-биологические методы, например амплификацию и гибридизацию или секвенирование. Все эти методы основываются на различиях в спаривании оснований, которыми после описанной модификации можно воспользоваться.

Обзор известных методов, применяемых для определения 5'-метилцитозина, можно найти в работе Rein, T., et al., *Nucleic Acids Res.*, 26:2255, 1998.

В настоящее время бисульфитный метод применяется за редким исключением (см., например, Zeschnigk M., et al., *Eur J Hum Genet.* 5:94-98, 1997) только в исследовательских целях. Вкратце делается обычно следующее. После обработки бисульфитом определенные фрагменты известного гена амплифицируют и либо полностью секвенируют (см. Olek & Walter, *Nat Genet.* 1997 17:275-6, 1997), осуществляя один или более раз удлинение праймера (Gonzalgo & Jones, *Nucleic Acids Res.*, 25:2529-31, 1997; WO 95/00669; патент США № 6251594) для того, чтобы определить положения каждого из цитозинов, либо проводят ферментативное расщепление (Xiong & Laird, *Nucleic Acids Res.*, 25:2532-4, 1997). Описано также определение путем гибридизации (Olek et al., WO 99/28498). Кроме того, описано применение бисульфитного метода для определения метилирования в отношении отдельных генов (Grigg & Clark, *Bio-essays*, 16:431-6, 1994; Zeschnigk M., et al., *Hum Mol Genet.*, 6:387-95, 1997; Feil R., et al., *Nucleic Acids Res.*, 22:695-, 1994; Martin V., et al., *Gene*, 157:261-4, 1995; WO 9746705 и WO 9515373).

Настоящее изобретение обеспечивает возможность применения бисульфитного метода в сочетании с одним или более методов определения метилирования для установления состояния метилирования динуклеотидов CpG в геномных последовательностях. Геномные динуклеотиды CpG могут быть метилированы или же не метилированы (иначе говоря, уровень метилирования повышен или понижен соответственно). Однако способы по данному изобретению пригодны для анализа биологических образцов гетерогенной природы, например крови или эякулята, содержащих опухолевые клетки в низкой концентрации. Соответственно для определения состояния метилирования CpG в каком-либо положении в таком образце специалист в данной области техники может применить количественный анализ, чтобы установить уровень (например, процент, долю, отношение, пропорцию или степень) метилирования CpG в конкретном положении - в противоположность состоянию метилирования. Таким образом, термин "состояние/статус метилирования" следует понимать как означающий величину, отражающую степень метилирования CpG в каком-либо положении. Термины "гиперметилированный" или повышенный уровень

метилирования" следует (если не оговорено иного) понимать как означающие уровень метилирования выше некоторого предела, который может быть величиной, представляющей средний или срединный уровень метилирования для данной популяции, или предпочтительно является оптимизированным предельным уровнем. Термин "предел" в настоящем документе также означает "порог". В контексте данного изобретения термины "метилированный", "гиперметилированный" или "повышенный уровень метилирования" следует понимать как включающие уровни метилирования выше предельного/порогового/нулевого (0%) или равнозначного уровня метилирования для CpG во всех положениях по меньшей мере в одном гене или геномной последовательности и связанных с ним (ней) участках (например, промоторах или регуляторных участках), которые при раке метилированы, а в не злокачественных тканях не метилированы.

По данному изобретению определение состояния метилирования динуклеотидов CpG в геномных последовательностях можно использовать при выяснении прогноза для больного раком.

Методы определения метилирования.

В данной области техники известны различные аналитические методы определения метилирования, которые можно применять вместе с данным изобретением. Эти методы позволяют определять состояние метилирования одного из множества динуклеотидов CpG (например, островков CpG в последовательности ДНК. Такой анализ включает, помимо прочего, секвенирование обработанной бисульфитом ДНК, полимеразную цепную реакцию (для амплификации, специфичной к последовательности), саузери-блоттинг и применение рестрикционных ферментов, чувствительных к метилированию.

Например, использование бисульфитной обработки упростило геномное секвенирование для определения профиля метилирования ДНК и распределения 5'-метилцитозин (Frommer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992). Кроме того, используется расщепление рестрикционными ферментами продуктов ПЦР, полученных в результате амплификации конвертированной бисульфитом ДНК, как, например, описано в работе Sadri & Hornsby (Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996), или метод комбинированного рестрикционного анализа с использованием бисульфита (COBRA) (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997).

Комбинированный рестрикционный анализ с использованием бисульфита (COBRA).

Метод COBRA™ представляет собой метод определения метилирования, который можно использовать для определения уровней метилирования ДНК в конкретных генных локусах при малом количестве геномной ДНК (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997). Вкратце он состоит в том, что для выявления зависимых от метилирования различий в последовательности продуктов ПЦР обработанной бисульфитом ДНК используют расщепление ферментами рестрикции. Вначале путем стандартной обработки бисульфитом, как описано в работе Frommer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992), в геномной ДНК создаются зависимые от метилирования различия в нуклеотидной последовательности. Затем проводят амплификацию путем ПЦР конвертированной бисульфитом ДНК с использованием праймеров, специфичных к нужным островкам CpG, после чего расщепляют продукты ПЦР рестрикционными эндонуклеазами, проводят гель-электрофорез и выявляют искомые последовательности с помощью специфичных меченых гибридизационных зондов. Уровни метилирования в образце изначально ДНК представлены относительными количествами расщепленных и нерасщепленных продуктов ПЦР в линейной количественной зависимости для широкого диапазона уровней метилирования ДНК. Также этот метод вполне надежно применим к ДНК, полученным из микропрепаратов залитых в парафин образцов тканей.

Обычно применяемые реагенты для COBRA™ (например, входящие в готовый набор для COBRA™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь): праймеры для ПЦР для определенного гена (или обработанной бисульфитом ДНК, или островка CpG); рестрикционные ферменты и буферный раствор, подходящий для их использования; олигонуклеотид, гибридизующийся с данным геном; контрольный гибридизующийся олигонуклеотид; набор для мечения киназой олигонуклеотидного зонда; меченые нуклеотиды. Кроме того, могут применяться реагенты для преобразования бисульфитом: буферный раствор для денатурации ДНК; буферный раствор для сульфирования; реагенты или наборы для выделения ДНК (например, осаждения, ультрафильтрации, аффинной колонки); буферный раствор для десульфирования; компоненты для выделения ДНК.

Предпочтительно используются - по отдельности или в сочетании друг с другом или с иными методами следующие аналитические методы: MethyLight™ (ПЦР в режиме реального времени с оценкой интенсивности флуоресценции; см. Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999), Ms-SNuPE™ (чувствительное к метилированию однонуклеотидное расширение праймера; см. Gonzalgo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997), MSP (чувствительная к метилированию ПЦР; см. Herrman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; US Patent No. 5,786,146) и MCA (амплификация метилированных островков CpG; см. Toyota et al., Cancer Res. 59:2307-12, 1999).

Метод, известный под названием HeavyMethyl™, является количественным методом оценки различий в метилировании на основе специфичной к метилированию амплификации обработанной бисульфитом ДНК. Специфичные к метилированию блокирующие зонды (называемые в настоящем документе

также блокаторами), покрывающие положения CpG между праймерами для амплификации или покрытые ими, делают возможной специфичную к метилированию избирательную амплификацию образца нуклеиновой кислоты.

Метод HeavyMethyl™ MethyLight™ в одном из описанных в настоящем документе воплощений данного изобретения представляет собой вариант метода MethyLight™, в котором этот последний сочетается с использованием специфичных к метилированию блокирующих зондов, покрывающих положения CpG между праймерами для амплификации. Метод HeavyMethyl™ можно также применять в сочетании с праймерами для амплификации, специфичными к метилированию.

Обычно используемые для HeavyMethyl™ реагенты (например, входящие в готовый набор на основе MethyLight™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь): праймеры для ПЦР для определенных генов (или обработанной бисульфитом ДНК, или островка CpG); блокирующие олигонуклеотиды; оптимизированные буферные растворы и дезоксинуклеотиды для ПЦР; ДНК-полимеразу Taq.

Полимеразная цепная реакция, специфичная к метилированию (MSP).

Этот метод позволяет оценить состояние метилирования, по существу, любой группы сайтов CpG в островке CpG независимо от использования ферментов рестрикции, чувствительных к метилированию (Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; US Patent No. 5786146). Вкратце он состоит в следующем. ДНК модифицируют бисульфитом натрия, в результате чего все неметилированные цитозины превращаются в урацил, а метилированные - нет. Затем преобразованную таким образом ДНК амплифицируют, используя праймеры, специфичные к метилированной ДНК, но не к неметилированной. Для метода MSP требуются лишь небольшие количества ДНК, чувствительность составляет 0,1% метилированных аллелей данного локуса островка CpG; его можно применять к ДНК, выделенной из затитых в парафин образцов. Обычно используемые для MSP реагенты (например, входящие в стандартный готовый набор для MSP) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) метилированные и неметилированные праймеры для ПЦР для определенного гена (или обработанной бисульфитом последовательности ДНК, или островка CpG), оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды, а также специфичные зонды.

MethyLight™.

Метод, известный под названием MethyLight™, - это высокопроизводительный количественный метод определения метилирования с использованием ПЦР в режиме реального времени с оценкой интенсивности флуоресценции (TaqMan™), в котором после ПЦР дальнейшие манипуляции не требуются (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). Вкратце, метод MethyLight™ состоит в следующем. Вначале смешанный образец геномной ДНК модифицируют путем стандартной обработки бисульфитом натрия, получая смешанный набор различий в последовательности, зависящих от метилирования (в результате обработки бисульфитом не метилированные цитозины преобразуются в урацилы). Затем проводят основанную на детекции флуоресцентного сигнала асимметричную ПЦР с использованием праймеров, перекрывающих известные динуклеотиды CpG. Различение последовательностей возможно как на уровне процесса амплификации, так и на уровне детекции флуоресцентного сигнала.

Метод MethyLight™ можно применять для определения профилей метилирования в образце геномной ДНК, причем различение последовательностей происходит на уровне гибридизации зонда. В этом количественном варианте метода полимеразная цепная реакция обеспечивает специфичную к метилированию амплификацию в присутствии флуоресцентного зонда, перекрывающего определенный предполагаемый сайт метилирования. Для объективного контроля количества вводимой ДНК используются праймеры и зонды, не перекрывающие ни один динуклеотид CpG. Или же для качественного определения геномного метилирования в качестве зондов для продуктов смещенной ПЦР используются либо контрольные олигонуклеотиды, не "покрывающие" известные сайты метилирования (вариант HeavyMethyl™ и MSP, основанный на детекции флуоресцентного сигнала), либо олигонуклеотиды, покрывающие потенциальные сайты метилирования.

Метод MethyLight™ можно осуществлять с любыми подходящими зондами, например можно использовать TaqMan®, Lightcycler® и др. Например, двухцепочечную геномную ДНК обрабатывают бисульфитом натрия и проводят один из двух циклов ПЦР с зондами TaqMan®; например, с праймерами для MSP и/или блокирующими олигонуклеотидами для HeavyMethyl и зондом TaqMan. Зонд TaqMan® несет двойную флуоресцентную метку - молекулы репортера и гасителя; он сконструирован таким образом, что специфичен для области с относительно высоким содержанием GC и потому в цикле ПЦР плавится при температуре на 10°C выше, чем прямой или обратный праймеры. Это позволяет зонду TaqMan® оставаться полностью гибридизованным в ходе стадии отжига/элонгации ПЦР. По мере того как полимеразы Taq синтезируют новую цепь в ходе ПЦР, она достигает отожденного зонда TaqMan® probe. В результате 5'→3' эндонуклеазной активности полимеразы Taq зонд TaqMan® расщепляется и высвобождается молекула-репортер для количественной детекции в режиме реального времени флуоресцентного сигнала, который теперь не гасится.

Обычно применяемые для MethyLight™ реагенты (например, входящие в стандартный готовый на-

бор на основе MethyLight™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) праймеры для ПЦР для определенного гена (или обработанной бисульфитом последовательности ДНК, или островка CpG); зонды TaqMan® или Lightcycler®; оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды, а также полимеразу Taq.

Метод количественного метилирования (QM™) - это иной количественный метод определения профилей метилирования образцов геномной ДНК, в котором различие последовательностей происходит на уровне гибридизации с зондами. В этом варианте ПЦР обеспечивает несмещенную амплификацию в присутствии флуоресцентного зонда, перекрывающего определенный предполагаемый сайт метилирования. Для объективного контроля количества вводимой ДНК используются праймеры и зонды, не перекрывающие ни один динуклеотид CpG. Или же для качественного определения геномного метилирования в качестве зондов для продуктов смещенной ПЦР используются либо контрольные олигонуклеотиды, не "покрывающие" известные сайты метилирования (вариант HeavyMethyl™ и MSP, основанный на детекции флуоресцентного сигнала), либо олигонуклеотиды, покрывающие потенциальные сайты метилирования.

Метод QM™ можно осуществлять с любыми подходящими зондами, например можно использовать TaqMan®, Lightcycler® и др. Например, двухцепочечную геномную ДНК обрабатывают бисульфитом натрия и используют для нее несмещенные праймеры и зонд TaqMan®. Зонд TaqMan® несет двойную флуоресцентную метку - молекулы репортера и гасителя; он сконструирован таким образом, что специфичен для области с относительно высоким содержанием GC и потому в цикле ПЦР плавится при температуре на 10°C выше, чем прямой или обратный праймеры. Это позволяет зонду TaqMan® оставаться полностью гибридизованным в ходе стадии отжига/элонгации ПЦР. По мере того как полимеразу Taq синтезирует новую цепь в ходе ПЦР, она достигает отожденного зонда TaqMan®. В результате 5'→3' эндонуклеазной активности полимеразы Taq зонд TaqMan® расщепляется и высвобождается молекула-репортер для количественной детекции в режиме реального времени флуоресцентного сигнала, который теперь не гасится.

Обычно применяемые для QM™ реагенты (например, входящие в стандартный готовый набор на основе QM™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) праймеры для ПЦР для определенного гена (или обработанной бисульфитом последовательности ДНК, или островка CpG); зонды TaqMan® или Lightcycler®; оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды, а также полимеразу Taq.

Чувствительное к метилированию однонуклеотидное расширение праймера (Ms-SNuPE).

Метод Ms-SNuPE™ - это количественный метод определения различий в метилировании в определенных сайтах CpG, основанный на бисульфитной обработке ДНК с последующим однонуклеотидным расширением праймера (Gonzalzo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997). Вкратце, делают следующее. Геномную ДНК подвергают воздействию бисульфита для превращения не метилированных цитозинов в урацил; при этом 5-метилцитозины не затрагиваются. Затем осуществляют амплификацию желаемой последовательности-мишени, используя праймеры для ПЦР, специфичные к преобразованной бисульфитом ДНК; полученный продукт выделяют и он служит матрицей для определения метилирования в искомым сайтах CpG. Этим методом можно анализировать малые количества ДНК (например, микропрепараты срезов, изготовленных при патологоанатомическом исследовании); это устраняет необходимость в использовании ферментов рестрикции для определения состояния метилирования сайтов CpG.

Обычно применяемые для Ms-SNuPE™ реагенты (например, входящие в стандартный готовый набор на основе Ms-SNuPE™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) праймеры для ПЦР для определенного гена (или обработанной бисульфитом последовательности ДНК, или островка CpG); оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды; набор для гель-экстракции; праймеры для положительного контроля; праймеры Ms-SNuPE™ для определенного гена; буферный раствор для Ms-SNuPE™; меченые нуклеотиды. Кроме того, могут применяться реагенты для преобразования бисульфитом: буферный раствор для денатурации ДНК; буферный раствор для сульфонирования; реагенты или наборы для выделения ДНК (например, осаждения, ультрафильтрации, аффинной колонки); буферный раствор для десульфонирования; компоненты для выделения ДНК.

Новое средство для выявления биологического маркера, который при раке метилирован, а в незлокачественных тканях не метилирован, в качестве прогностического признака наличия ракового заболевания/опухоли в крови.

В одном из вариантов настоящего изобретения предлагаемый способ включает следующие стадии: i) определение метилирования и/или экспрессии по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которая метилирована в пораженной раком ткани, но не метилирована в незлокачественных тканях; и ii) определение прогноза для больного раком. В одном из воплощений настоящего изобретения эти стадии осуществляются в ткани тела или в крови. В одном из воплощений данного изобретения анализируется ген SEPTIN9 (последовательности SEQ ID NO: 1-15 и другие описанные в настоящем документе последовательности), геномная последовательность которого в незлокачественных тканях не ме-

тилирована, а в пораженной раком ткани метилирована. В другом воплощении данного изобретения анализируется ген RASSF2A (последовательности SEQ ID NO: 16-20 и другие описанные в настоящем документе последовательности), геномная последовательность которого в незлокачественных тканях не метилирована, а в пораженной раком ткани метилирована.

Для осуществления способа по данному изобретению пригоден любой метод анализа экспрессии РНК, транскрибированной с указанного гена или геномной последовательности, или полипептида, или белка, образовавшихся в результате трансляции указанной РНК, предпочтительно путем определения экспрессии матричной РНК или полипептида. В наиболее предпочтительном воплощении данного изобретения определение прогноза для больного раком осуществляется посредством анализа состояния метилирования по меньшей мере одного гена или геномной последовательности и/или промотора или регуляторных элементов этой геномной последовательности, которая не метилирована в не злокачественных тканях и метилирована в ткани, пораженной раком. В других воплощениях данного изобретения предлагается метод анализа, результаты которого имеют прогностическое значение, и способы - как количественные, так и качественные - для определения экспрессии одного или более генов у данного индивида и на основании полученных данных определение прогноза для указанного больного раком. В других воплощениях данного изобретения повышенный уровень метилирования (гиперметилированность) и/или пониженный уровень экспрессии одного или более генов ассоциированы с прогрессированием и агрессивностью ракового заболевания.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения присутствие в образце, взятом у больного до хирургического лечения, ДНК Septin9 в количестве более 3 пг/мл является признаком наличия ракового заболевания. Предпочтительно после хирургического лечения отсутствие метилирования ДНК Septin9 указывает на хороший прогноз (0 пг/мл метилированной ДНК Septin9). Предпочтительно после хирургического лечения содержание метилированной ДНК Septin9 в образце более 0-3 пг/мл указывает на низкий риск рецидивирования ракового заболевания. Предпочтительно после хирургического лечения содержание метилированной ДНК Septin9 в образце более 3-30 пг/мл указывает на средний риск рецидивирования ракового заболевания. Предпочтительно после хирургического лечения содержание метилированной ДНК Septin9 в образце более 30 пг/мл указывает на высокий риск рецидивирования ракового заболевания. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения присутствие в образце, взятом у больного до хирургического лечения, ДНК RASSF2A в количестве более 3 пг/мл является признаком наличия ракового заболевания. Предпочтительно после хирургического лечения отсутствие метилирования ДНК RASSF2A указывает на хороший прогноз (0 пг/мл метилированной ДНК RASSF2A). Предпочтительно после хирургического лечения содержание метилированной ДНК RASSF2A в образце более 0-3 пг/мл указывает на низкий риск рецидивирования ракового заболевания. Предпочтительно после хирургического лечения содержание метилированной ДНК RASSF2A в образце более 3-30 пг/мл указывает на средний риск рецидивирования ракового заболевания. Предпочтительно после хирургического лечения содержание метилированной ДНК RASSF2A в образце более 30 пг/мл указывает на высокий риск рецидивирования ракового заболевания. Предпочтительные образцы - это образцы крови, опухолевой ткани и плазмы крови. Предпочтительно раковое заболевание является колоректальным раком.

Чтобы обнаружить присутствие матричной РНК, соответствующей нужному гену или геномной последовательности, у индивида берут образец биологического материала. Это может быть любой подходящий материал, содержащий клетки опухоли. Подходящим материалом являются ткань, кровь, плазма или сыворотка крови или любые их сочетания. Предпочтительным материалом для образца является кровь. Указанный образец может быть подвергнут той или иной обработке для выделения содержащейся в нем РНК. Полученную из образца нуклеиновую кислоту анализируют. Для определения абсолютных и относительных уровней генной экспрессии в данной области техники на сегодняшний день известно множество методов; из числа обычно применяемых с этой целью методов для применения подходящие для данного изобретения включают гибридизацию *in situ* (например, флуоресцентная гибридизация *in situ* - FISH), нозерн-блоттинг, метод защиты от РНКазы (RPA), методы микроматричного анализа на основе ПЦР (например, количественная ПЦР и дифференциальный дисплей) или любые другие методы выявления нуклеиновых кислот. Можно использовать метод ПЦР с обратной транскриптазой (RT-PCR), хорошо известный в данной области техники (см., например, работу Watson, Fleming, указанную выше).

Метод RT-PCR можно осуществлять следующим образом. Выделяют тотальную клеточную РНК например, стандартным методом с гуанидинизотиоцианатом и проводят обратную транскрипцию этой тотальной РНК. Метод обратной транскрипции включает синтез ДНК на матрице (РНК) с помощью фермента обратной транскриптазы и праймер 3'- олиго(dT) и/или случайные гексамерные праймеры. Полученную таким образом кДНК затем амплифицируют путем ПЦР (см. Belyavsky et al., Nucl Acid Res 17:2919-2932, 1989; Krug and Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol. 152, p. 316-325, 198; эти публикации включены в настоящий документ путем отсылки). Также предпочтительна ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени, при которой продукт ПЦР выявляется с помощью гибридизационных зондов (например, TaqMan, LightCycler, Molecular Beacons & Scorpion) или флуоресцентного красителя SYBR Green. Затем проводят количественный анализ детектируемых сигналов от зондов или SYBR Green путем сравнения со стандартной кривой или путем сравнения значений порогового

цикла реакции (Ct) с калибровочными. Для нормализации результатов часто используют результаты такого же анализа генов "домашнего хозяйства".

При нозерн-блоттинге матричную РНК - тотальную или поли(А)+ - денатурируют, фракционируют в агарозном геле и выявляют путем гибридизации с мечеными зондами прямо в высушенном геле или сначала переносят на фильтр. Детектируемый сигнал пропорционален количеству РНК-мишени во всей РНК.

При сравнении сигналов, полученных для двух или более клеточных популяций или тканей, выявляет относительные различия в уровнях генной экспрессии. Для получения абсолютных количественных значений проводят сравнение наблюдаемых сигналов со стандартной кривой, построенной для известных количеств транскриптов, соответствующих РНК-мишени (*in vitro*). Для нормализации результатов часто используется такой же анализ генов "домашнего хозяйства", уровни экспрессии которых считаются относительно постоянными независимо от условий, так что исключаются те выявляемые различия, которые обусловлены несовершенством переноса РНК на фильтр или нанесения на гель.

Первый этап при нозерн-блоттинге - выделение чистой, интактной РНК из изучаемых клеток или ткани. Поскольку в этом методе РНК различают по размеру, на концентрацию сигнала в отдельной полосе влияет целостность образца. Частично разрушенные образцы РНК дадут сигнал, смазанный или распределенный по нескольким полосам, в результате чего теряется чувствительность и возможна ошибочная интерпретация данных. При нозерн-блоттинге могут использоваться РНК-, ДНК- и олигонуклеотидные зонды, предпочтительно меченые (используют, например, радиоактивные метки, изотопные метки или флуоресцентные метки). Размеры выявленной полосы определяются размерами РНК-мишени, а не зонда, поэтому для синтеза зондов можно использовать случайные праймеры, что дает зонды разной длины. Уровень чувствительности определяется специфической активностью зонда, поэтому предпочтительно использовать зонды с высокой специфической активностью.

В методе защиты от РНКазы (RPA) РНК-мишень и РНК-зонд определенной длины гибридизуются в растворе. После гибридизации РНК расщепляется РНКазой, специфичной к одноцепочечным молекулам нуклеиновых кислот и таким образом удаляются все не гибридизовавшиеся одноцепочечные РНК-мишени и зонды. РНКазу инактивируют и разделяют РНК, например, путем денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Количество интактной РНК-зонда пропорционально количеству РНК-мишени во всей РНК. Метод защиты от РНКазы можно использовать для относительного и абсолютного определения генной экспрессии, а также для картирования структуры РНК, например границ между нитронами и экзонами и сайтов начала транскрипции. Метод RPA предпочтительнее нозерн-блоттинга, так как обычно характеризуется более низким пределом детекции.

Используемые при RPA антисмысловые РНК-зонды создают путем транскрипции *in vitro* ДНК-матриц с определенной "конечной точкой"; обычно они состоят из 50-600 нуклеотидов. Использование РНК-зондов, включающих дополнительные последовательности, не гомологичные РНК-мишени, позволяет отличить защищенный фрагмент от всего зонда. Обычно используют не ДНК-зонды, а РНК-зонды, поскольку одноцепочечные РНК-зонды легче получить, притом выше воспроизводимость и надежность расщепления дуплексов РНК:РНК РНКазой (Ausubel et al. 2003); особенно предпочтительны зонды с высокой специфической активностью.

Особенно предпочтителен микроматричный анализ. Этот процесс можно разделить на две основных части. Первая - иммобилизация последовательностей известных генов на стекле или другом твердом носителе, за которой следует гибридизация флуоресцентно-меченой кДНК (содержащей изучаемые последовательности) с известными генами, иммобилизованными на стекле (или иной твердой подложке). После гибридизации носители (панели) сканируют с помощью флуоресцентного сканера микрочипов. Определяя относительную интенсивность флуоресценции различных генов, оценивают различия в генной экспрессии.

Микрочипы (микроматрицы) ДНК можно получить путем иммобилизации предварительно синтезированных олигонуклеотидов на подготовленном стекле или ином твердом носителе. В этом случае последовательности репрезентативных генов получают путем стандартных методов синтеза и очистки олигонуклеотидов. Эти синтезированные генные последовательности комплементарны РНК-транскриптам по меньшей мере одного гена, который при раке метилирован, а в незлокачественных тканях не метилирован; они обычно небольшой длины - 25-70 нуклеотидов. Или же иммобилизованные олигонуклеотиды могут быть химически синтезированы *in situ* на поверхности стекла. Синтез олигонуклеотидов *in situ* включает последовательное добавление нужных нуклеотидов в точки на микрочипе; точки, в которые не добавляют нуклеотид, на каждой стадии процесса защищают физическими или проецируемыми масками. Предпочтительно указанные синтезируемые нуклеиновые кислоты являются замкнутыми.

В экспериментах по определению профиля генной экспрессии путем микроматричного анализа используемые РНК-матрицы представляют профиль транскрипции в изучаемых клетках или тканях. Вначале выделяют РНК из клеточных популяций или тканей, которые нужно сравнить. Затем каждый образец РНК используют в качестве матрицы для создания флуоресцентно меченных кДНК путем обратной транскрипции. Флуоресцентное мечение кДНК осуществляется напрямую либо опосредованно. При прямом мечении флуоресцентно модифицированные нуклеотиды (например, Cy®3- или Cy®5-dCTP) вклю-

чаются непосредственно в кДНК в ходе обратной транскрипции. Непрямое мечение достигается путем включения модифицированных (аминоаллил-) нуклеотидов в ходе синтеза кДНК и затем после завершения обратной транскрипции конъюгирования аминоаллил-модифицированной кДНК с N-гидроксисукцинимидом (NHS-эфир). Или же зонд может быть немеченым, но выявляемым путем специфического связывания с каким-либо меченым (прямо или опосредованно) лигандом. Известные в данной области техники подходящие метки и методы мечения лигандов (и зондов) включают, например, радиоактивные метки, которые могут быть введены известными методами (например, путем ник-трансляции или воздействия киназой). Другие подходящие метки включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) биотин, флуоресцирующие группы, хемилуминесцирующие группы (например, диоксетаны, иницированные диоксетаны), ферменты, антитела и проч.

Для анализа дифференциальной генной экспрессии кДНК, полученную с разных образцов РНК, метят Су®3. Полученную меченую кДНК очищают, чтобы удалить не включившиеся нуклеотиды, свободный краситель и оставшуюся РНК. Очищенную меченую кДНК гибридизуют на микроматрицу. Степень жесткости условий гибридизации определяется числом факторов в ходе гибридизации и процедуры промывания, включая температуру, ионную силу, продолжительность, концентрацию формамида. Эти факторы приведены, например, в работе Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 1989). После гибридизации микрочип сканируют с помощью флуоресцентного сканера биочипов. Интенсивность флуоресценции в каждой точке отражает уровень экспрессии изучаемого гена: чем ярче точка, тем больше экспрессия.

Когда достигнута визуализация, приступают к анализу полученных данных. Прежде всего, следует вычесть из сигнала в каждой точке фоновую флуоресценцию. Затем данные нормализуют относительно контрольной последовательности, например экзогенной нуклеиновой кислоты (предпочтительно РНК или ДНК) или панели генов "домашнего хозяйства", чтобы учесть неспецифическую гибридизацию, несовершенство матрицы или вариабельность компоновки микрочипа, мечения кДНК, гибридизации или отмытки. Нормализация данных позволяет сравнивать результаты по множеству матриц.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к набору, используемому для определения прогноза у больного раком согласно способам по данному изобретению, причем указанный набор включает средства для определения уровня транскрипции по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения средства для определения уровня транскрипции включают олигонуклеотиды или полинуклеотиды, способные гибридизоваться при жестких или умеренно жестких условиях с продуктами транскрипции по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы. В одном из наиболее предпочтительных воплощений данного изобретения уровень транскрипции определяют методом, выбираемым из группы нозерн-блоттинга, ПЦР с обратной транскрипцией, ПЦР в реальном времени, защиты от РНКазы и микроматричного анализа. В другом воплощении данного изобретения указанный набор также содержит средства для получения и/или хранения биологического образца, взятого у индивида. Предпочтителен набор, содержащий также емкость, которая наиболее предпочтительно подходит для помещения средств определения уровня транскрипции и биологического образца, взятого у индивида, и наиболее предпочтительно содержит инструкции по применению и интерпретации результатов, получаемых с помощью этого набора.

В одном и предпочтительных воплощений данного изобретения указанный набор содержит (а) ряд олигонуклеотидов или полинуклеотидов, способных гибридизоваться при жестких или умеренно жестких условиях с продуктами транскрипции по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы; (b) емкость, предпочтительно подходящую для помещения олигонуклеотидов или полинуклеотидов и биологического образца, взятого у индивида, включающего продукты транскрипции, с которыми указанные олигонуклеотиды или полинуклеотиды могут гибридизоваться при жестких или умеренно жестких условиях; (с) средства для выявления гибридизации (b) и при необходимости (d) инструкции по применению и интерпретации результатов, получаемых с помощью указанного набора.

Указанный набор может также содержать другие компоненты, например буферный раствор для гибридизации (в котором предполагается использовать олигонуклеотидные зонды), помещенный в отдельную емкость. Или же в том случае, когда олигонуклеотиды предполагается использовать для амплификации мишени, указанный набор может содержать (в отдельных емкостях) полимеразу и буферный раствор для проведения реакции, оптимизированный для расширения праймеров с участием полимеразы, например ПЦР. Предпочтительно эта полимераз является обратной транскриптазой. Предпочтительно также, чтобы указанный набор содержал реагент с РНКазной активностью.

Настоящим изобретением также предлагаются способы для выявления присутствия полипептида, кодируемого указанными генными последовательностями в образце, взятом у указанного индивида.

Измененные уровни экспрессии полипептидов, кодируемых по меньшей мере одним геном или геномной последовательностью, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы, ассоциированы с прогнозом для больного раком.

По данному изобретению пониженный уровень экспрессии указанных полипептидов ассоциирован с плохим прогнозом для больного раком.

Для выявления указанных полипептидов подходит любой известный в данной области техники метод. Такие методы включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) масс-спектрометрию, иммунодиффузию, иммуноэлектрофорез, иммунохимические методы, анализ связывания с лигандом, иммуногистохимические методы, агглютинацию и связывание комплемента (см., например, работы Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton & Lange, Norwalk, Conn, p. 217-262, 1991, которая включена в настоящий документ путем отсылки). Предпочтительны иммунологические методы, основанные на связывании лиганда, включая взаимодействие антител с эпитопом (эпитопами) и конкурентное вытеснение меченого полипептида или его производного.

Некоторые воплощения данного изобретения включают использование специфичных антител к указанному полипептиду (полипептидам), кодируемому (кодируемым) по меньшей мере одним геном или геномной последовательностью, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы.

Такие антитела можно использовать для определения прогноза у больного раком. В некоторых воплощениях данного изобретения образование моноклональных или поликлональных антител индуцируется эпитопом полипептида, кодируемого по меньшей мере одним геном или геномной последовательностью, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы. Такие антитела можно, в свою очередь, использовать для выявления экспрессирующихся полипептидов. Уровни этих полипептидов можно определить количественно обычно применяемыми с такой целью методами. Связывание антител с указанными полипептидами можно выявить и определить количественно с помощью различных средств, известных в данной области техники, например флуоресцентных или радиоактивных меток лиганда. Данное изобретение включает также наборы для осуществления упомянутых выше методов, причем эти наборы содержат антитела, специфичные к изучаемым полипептидам.

В данной области техники известно много аналитических иммунологических методов, в которых используется конкурентное или неконкурентное связывание полипептидов. Используемые для таких методов антитела могут быть немечеными, например, для метода на основе агглютинации, или же мечеными, как это имеет место для разнообразных аналитических методов. При этом могут использоваться следующие метки: радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцирующие агенты, хемилюминесцирующие агенты, субстраты или кофакторы ферментов, ингибиторы ферментов, частицы, красители и проч. Предпочтительные методы включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) радиоиммунологический анализ (RIA), иммуноферментный анализ, например твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ и т.п. Моноклональные или поликлональные антитела, или соответствующие эпитопы для иммунологических методов анализа можно получить любым из множества применяемых с этой целью методов, известных в данной области техники.

В других воплощениях настоящего изобретения белки выявляют путем вестерн-блоттинга. Этот метод, который стал стандартным в данной области техники, вкратце состоит в следующем. Вначале белки разделяют путем электрофореза, например, в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Разделенные белки переносят на мембрану (или бумагу), например нитроцеллюлозную, сохраняя пространственное распределение, достигнутое при электрофорезе. Затем мембрану инкубируют с блокирующим агентом для связывания оставшихся на мембране мест; обычно для этого используют какой-либо неспецифический белок (например, белки молока). Теперь прибавляют антитела, специфичные к искомому белку и меченные так, чтобы обеспечить детекцию, например, красителем или ферментативно (например, используют щелочную фосфатазу или пероксидазу хрена). Наконец, выявляют связавшиеся на мембране антитела.

В других воплощениях способа по данному изобретению искомые белки выявляют иммуногистохимическим методом (используют антитела к определенным антигенам в образце). Этот метод очень часто применяется в данной области техники, причем, когда требуется выявить антигены в ткани, говорят о иммуногистохимической детекции, а когда речь идет о культурах клеток, его называют иммуноцитохимическим. Вкратце, делают следующее. Вначале осуществляют связывание первых (первичных) антител, специфичных к искомому антигену. Образовавшийся комплекс антиген-антитело связывают с вторыми (вторичными) антителами, конъюгированными с ферментом. В присутствии соответствующих субстратов и хромогена связанный фермент обнаруживается по окрашиванию в местах связывания антител с антигеном. Существует множество различных вариантов - в зависимости от характера образца, сродства антител к антигену, типа антител и способов усиления детектируемого сигнала. В каждом конкретном случае определение оптимальных условий иммуногистохимической или иммуноцитохимической детекции остается на долю исследователя - специалиста в данной области техники.

Одним из подходов к получению антител к нужному полипептиду является отбор и выделение полной или частичной аминокислотной последовательности этого полипептида, химический синтез этой последовательности и введение ее подходящему животному (обычно кролику или мыши; см., например, работы Milstein and Kohler Nature 256:495-497, 1975; Gelfand and Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46, Langone and Banatis eds., Academic Press, 1981, которые целиком включе-

ны в настоящий документ путем отсылки). Методы получения нужных полипептидов или их эпитопов включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) химический синтез, технологию рекомбинантной ДНК и выделение из биологических образцов.

На конечной стадии способа по настоящему изобретению определяется прогноз для данного индивида; при этом пониженный уровень экспрессии (мРНК или полипептидов) указывает на наличие ракового заболевания. Термин "пониженный уровень экспрессии" здесь означает, что при определении уровня экспрессии получено значение, которое меньше предварительно установленного порога отсечения, выбираемого из группы, состоящей из среднего, медианного и оптимизированного пороговых значений. Термин "повышенный уровень экспрессии" здесь означает, что при определении уровня экспрессии получено значение, которое больше, чем предварительно установленный порог отсечения, выбираемый из группы, состоящей из среднего, медианного и оптимизированного пороговых значений.

В другом своем аспекте настоящее изобретение предлагает набор для использования при определении прогноза у больного раком способами по данному изобретению, включающий средства для определения полипептидов, кодируемых по меньшей мере одним геном или геномной последовательностью, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы. Средства для определения указанных полипептидов включают предпочтительно антитела, производные антител или фрагменты антител. Указанные полипептиды определяют наиболее предпочтительно методом вестерн-блоттинга с использованием меченых антител. В другом воплощении данного изобретения указанный набор также содержит средства для взятия биологического образца у индивида. Предпочтительны наборы, содержащие также емкости, подходящие для помещения средств для определения полипептидов в биологических образцах, взятых у индивида, и наиболее предпочтительны наборы, содержащие также инструкции по применению и интерпретации результатов, получаемых с помощью этого набора. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения указанный набор содержит (а) средства для определения полипептидов, кодируемых по меньшей мере одним геном или геномной последовательностью, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы; (b) емкости, подходящие для помещения указанных средств и биологического образца, взятого у индивида и содержащего указанные полипептиды, причем указанные средства могут образовывать комплексы с указанными полипептидами; (с) средства для определения комплексов по п.(b) и при необходимости (d) инструкции по применению и интерпретации результатов, получаемых с помощью этого набора.

Набор по данному изобретению может также содержать другие компоненты, например буферные или иные растворы, подходящие для блокирования, промывания или нанесения, помещенные в отдельной емкости.

Анализ метилирования.

В конкретных воплощениях настоящего изобретения предлагается новое применение анализа уровней и/или профилей метилирования по меньшей мере в одном гене или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы, которое позволяет определить прогноз для больного раком. В одном из воплощений способа по данному изобретению прогноз для больного раком определяют путем анализа состояния метилирования одного или более динуклеотидов CpG по меньшей мере в одном гене или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы.

В одном из воплощений данного изобретения указанный способ включает следующие стадии: i) контактирование геномной ДНК (предпочтительно выделенной из ткани, крови, плазмы крови или сыворотки крови), полученной от индивида, по меньшей мере с одним реагентом или последовательно с несколькими реагентами, которые позволяют различить метилированные и не метилированные динуклеотиды CpG по меньшей мере в одном гене или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы (включая их промоторы и регуляторные участки), и ii) определение прогноза для указанного больного раком.

Предпочтительно, чтобы указанные один или более динуклеотидов CpG по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы, содержались в соответствующей геномной последовательности-мишени и комплементарных ей последовательностях. Настоящим изобретением предлагается также способ установления генетических и/или эпигенетических параметров по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы, и/или геномной последовательности соответственно геномным последовательностям данного индивида путем анализа метилирования цитозинов. Указанный способ включает контактирование нуклеиновой кислоты, содержащей геномные последовательности биологического образца, взятого у указанного индивида, по меньшей мере с одним реагентом или последовательно с несколькими реагентами, которые позволяют различить метилированные и не метилированные динуклеотиды CpG в нуклеиновой кислоте-мишени.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения указанный способ включает следующие стадии. На первой стадии получают образец ткани для исследования. Его источником может быть любой подходящий источник, например ткань, кровь, плазма крови или сыворотка крови и все их возможные комбинации. Предпочтительно, чтобы указанными источниками ДНК были ткань, кровь,

плазма крови или сыворотка крови.

Затем из образца выделяют геномную ДНК. Геномная ДНК может быть выделена любыми обычно применяемыми с этой целью в данной области техники методами, включая использование готовых имеющихся в продаже наборов. Вкратце, в тех случаях, когда искомая ДНК заключена в клеточную мембрану, биологический образец нужно структурно разрушить и подвергнуть лизису ферментативными, химическими или механическими средствами. Полученный раствор, содержащий ДНК, очищают от белков и других примесей, например, путем расщепления протеиназой К. Затем из раствора выделяют геномную ДНК. Это можно осуществить с помощью различных методов, включая высаливание, экстракцию органическими растворителями или связывание ДНК с твердофазным носителем. Выбор метода определяется рядом факторов, включая время, стоимость процедуры и требуемое количество ДНК.

Когда ДНК не заключена в мембрану (например, циркулирующая ДНК в образце крови), возможно применение стандартных в данной области техники методов выделения и/или очистки ДНК. Эти методы включают использование агентов, вызывающих денатурацию белков, например хаотропных солей, например гуанидина гидрохлорида или мочевины; или детергентов, например додецилсульфата натрия (SDS), цианогена бромида.

Другие методы включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) осаждение этиловым или пропиловым спиртом, вакуумную концентрацию в числе прочего с помощью центрифуги. Специалисты в данной области техники используют также такие приспособления, как фильтрующие устройства (например, ультрафильтрация), кремниевые поверхности или мембраны, магнитные частицы, полистирольные частицы, полистирольные поверхности, положительно заряженные поверхности и положительно заряженные мембраны, заряженные мембраны, поверхности с переключаемым зарядом, мембраны с переключаемым зарядом.

Когда нуклеиновые кислоты выделены, для анализа берут геномную двухцепочечную ДНК; анализ метилирования может быть осуществлен с помощью любых известных в данной области техники средств, включая (но не ограничиваясь перечисленным здесь) ферменты рестрикции, чувствительные к метилированию, и химические реагенты.

Химический анализ.

На второй стадии способа по данному изобретению образец геномной ДНК обрабатывают таким образом, что цитозины, не метилированные в 5'-положении, превращаются в урацил, тимин или иное основание, отличное от цитозина в отношении гибридизации. В настоящем документе это называется предварительной обработкой, или обработкой.

Это предпочтительно достигается путем обработки бисульфитным реагентом. Термин "бисульфитный реагент" относится к реагентам, содержащим бисульфит, дисульфит, сернистую кислоту или их сочетания, позволяющие, как описано в настоящем документе, различать метилированные и не метилированные динуклеотиды CpG. Методы указанной обработки известны в данной области техники (см., например, РСТ/ЕР2004/011715, полностью включаемую в настоящий документ путем отсылки). Предпочтительно проводить бисульфитную обработку в присутствии денатурирующих растворителей, например (примеры не ограничиваются перечисленным здесь) n-алкиленгликоли, в частности диметиловый эфир (DME) диэтиленгликоля, или в присутствии диоксана или производных диоксана. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения денатурирующие растворители используются в концентрациях от 1% до 35% (об./об.). Также предпочтительно, чтобы бисульфитная реакция осуществлялась в присутствии поглотителей, например (примеры не ограничиваются перечисленным здесь) производных хроманов, например 6-гидрокси-2,5,7,8-тетрамethylхроман 2-карбоновой кислоты или тригидроксибензойной кислоты и их производных, например галловой кислоты (см. РСТ/ЕР2004/011715, полностью включаемую в настоящий документ путем отсылки). Бисульфитная конверсия предпочтительно осуществляется при температуре реакции 30-70°C, причем в ходе реакции на короткие периоды времени температуру поднимают выше 85°C (см. РСТ/ЕР2004/011715, полностью включаемую в настоящий документ путем отсылки). Прошедшую бисульфитную обработку ДНК предпочтительно очищают, прежде чем проводить количественный анализ. Для очистки можно применять любые известные в данной области техники средства, например (примеры не ограничиваются перечисленным здесь) путем ультрафильтрации, предпочтительно осуществляемой с помощью колонок Microcon™ (производства Millipore™). Очистку проводят согласно модифицированному протоколу производителя (см. РСТ/ЕР2004/011715, полностью включаемую в настоящий документ путем отсылки).

На третьей стадии способа по данному изобретению проводят амплификацию фрагментов обработанной ДНК, используя набор олигонуклеотидов-праймеров по данному изобретению и фермент, обеспечивающий амплификацию. Амплификацию нескольких участков ДНК можно проводить одновременно в одном и том же реакционном сосуде. Обычно для амплификации используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Предпочтительно длина ампликонов составляет 100-2000 пар оснований. Набор олигонуклеотидов-праймеров включает по меньшей мере два олигонуклеотида, последовательности которых обратны комплементарны или идентичны непрерывному участку длиной по меньшей мере 16 пар оснований одной из последовательностей после бисульфитной обработки и комплементарных ей последовательностей или гибридизуются с ним при жестких или особо жестких условиях.

В другом воплощении способа по данному изобретению состояние метилирования динуклеотидов CpG в предварительно выбранных положениях по меньшей мере в одном гене или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы, и предпочтительно в последовательностях нуклеиновых кислот, соответствующих геномным последовательностям можно выявить, используя олигонуклеотиды-праймеры, специфичные к метилированию. Этот метод (MSP) описан в патенте США № 6265171 (по работе J.G. Herman et al.). Использование специфичных к состоянию метилирования праймеров для амплификации прошедшей бисульфитную обработку ДНК позволяет различить метилированные и не метилированные нуклеиновые кислоты. Пары праймеров, специфичных к метилированию, включают по меньшей мере один праймер, гибридизующийся с динуклеотидом CpG, подвергнутому бисульфитной обработке. Таким образом, последовательности указанных праймеров содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG. Праймеры для MSP, специфичные к не метилированной ДНК, содержат "Т" в том положении, где в CpG стоит С. Поэтому предпочтительно, чтобы нуклеотидная последовательность указанных праймеров содержала последовательность длиной по меньшей мере 9 нуклеотидов, гибридизующуюся с последовательностью прошедшей бисульфитную обработку нуклеиновой кислоты, соответствующей одной из прошедших бисульфитную обработку последовательностей и комплементарных им последовательностей, в которых последовательность оснований указанных олигомеров содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG. Другое предпочтительное воплощение способа по данному изобретению включает использование блокирующих олигонуклеотидов (метод HeavyMethyl™). Использование таких блокирующих олигонуклеотидов описано в работе Yu et al., *BioTechniques* 23:714-720, 1997. При гибридизации с нуклеиновой кислотой, прошедшей бисульфитную обработку, блокирующие олигонуклеотидные зонды конкурируют с праймерами для ПЦР. Амплификация нуклеиновой кислоты путем ПЦР останавливается в 5'-положении блокирующего зонда, так что амплификация нуклеиновой кислоты подавляется там, где присутствует последовательность, комплементарная блокирующему зонду. Эти зонды могут быть сконструированы так, чтобы они гибридизовались с нуклеиновой кислотой, прошедшей бисульфитную обработку, зависимым от состояния метилирования образом. Например, чтобы выявить метилированные нуклеиновые кислоты среди неметилированных, нужно подавить амплификацию тех нуклеиновых кислот, в которых данное положение не метилировано, с помощью блокирующих зондов, содержащих в данном положении "СрА" или "ТрА" - в противоположность "СрГ", если желательно подавить амплификацию метилированных нуклеиновых кислот.

При ПЦР с использованием блокирующих олигонуклеотидов для эффективного прекращения амплификации, обеспечиваемой полимеразой, нужно, чтобы эти блокирующие олигонуклеотиды не наращивались под действием полимеразы. Предпочтительно это достигается путем использования блокирующих 3'-дезоксинуклеотидов или олигонуклеотидов, у которых в положении 3' находится не "свободная" гидроксильная группа, а другая группа. Например, в качестве блокирующих молекул предпочтительны представители 3'-О-ацетилолигонуклеотидов.

Кроме того, следует предотвратить расщепление блокирующих олигонуклеотидов при участии полимеразы. Предпочтительно такое предотвращение включает либо использование полимеразы, лишенной 5'-3'-экзонуклеазной активности, либо использованием модифицированных блокирующих олигонуклеотидов, в которых есть, например, тиоатные мостики на 5'-конце, что придает блокирующему олигонуклеотиду устойчивость к нуклеазной активности. В некоторых случаях такая 5'-модификация блокирующих олигонуклеотидов может не требоваться. Например, если сайты связывания блокирующего олигонуклеотида и праймера перекрываются, тем самым предотвращая связывания праймера (например, при избытке блокирующего олигонуклеотида), то предотвращается в основном и деградация блокирующего олигонуклеотида, поскольку полимеразы не будут наращивать праймер в направлении блокирующего олигонуклеотида и через (в направлении 5'→3') него, что приводило бы к деградации гибридизовавшегося блокирующего олигонуклеотида.

Один из особенно предпочтительных вариантов ПЦР с блокирующими олигонуклеотидами для целей данного изобретения, описанный в настоящем документе, включает использование олигомеров пептидо-нуклеиновых кислот (PNA) в качестве блокирующих олигонуклеотидов. Такие молекулы идеально подходят на роль блокаторов: они не разрушаются и не наращиваются полимеразой.

Предпочтительно, чтобы нуклеотидная последовательность указанных блокирующих олигонуклеотидов содержала последовательность длиной по меньшей мере 9 нуклеотидов, гибридизующуюся с последовательностью, прошедшей бисульфитную обработку и соответствующей одной из прошедших бисульфитную обработку последовательностей и комплементарных им, причем нуклеотидная последовательность указанных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG, TrG или CpA. Особенно предпочтительно, чтобы нуклеотидная последовательность указанных блокирующих олигонуклеотидов содержала последовательность длиной по меньшей мере 9 нуклеотидов, которая гибридизуется с прошедшей бисульфитную обработку нуклеиновой кислотой, соответствующей одной из последовательностей SEQ ID NO: 5, 6, 9 или 10 и комплементарным им последовательностям, причем нуклеотидная последовательность указанных олигонуклеотидов содержит по меньшей мере один динуклеотид TrG или CpA.

Фрагменты, полученные путем амплификации, могут нести метку, выявляемую напрямую или опосредованно. Предпочтительны флуоресцентные метки, радиоактивные метки или отделяемые фрагменты молекул, обладающие характерной массой, которые можно детектировать с помощью масс-спектрометра. В тех случаях, когда метка является масс-спектрометрической, предпочтительно, чтобы меченые ампликоны имели единичный положительный или отрицательный суммарный заряд, так как это улучшает выявляемость при масс-спектрометрии. Детекция может осуществляться и визуализироваться путем, например, матричной лазерной десорбционной/ионизационной масс-спектрометрии (MALDI) или масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI).

Матричная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF) - очень эффективный метод исследования биологических молекул (Karas & Hillenkamp, *Anal Chem.*, 60:2299-301, 1988). Анализ помещается в светопоглощающий матричный материал. Этот материал испаряется под действием коротких лазерных импульсов и тем самым молекулы анализа целыми переходят в газовую фазу. Анализ ионизуется в результате столкновения с молекулами матричного материала. В пролетной трубе, где отсутствует электрическое поле, приложенное напряжение ускоряет ионы. Ионы с разной массой ускоряются в разной степени. Более мелкие ионы достигают детектора раньше более крупных. Спектрометр MALDI-TOF прекрасно подходит для исследования пептидов и белков. Исследование нуклеиновых кислот более затруднительно (Gut & Beck, *Current Innovations and Future Trends*, 1:147-57, 1995). Чувствительность метода применительно к нуклеиновым кислотам приблизительно в 100 раз ниже, чем в случае пептидов, причем уменьшается (не пропорционально) с увеличением размеров фрагментов. Кроме того, поскольку остов молекул нуклеиновых кислот несет множественный отрицательный заряд, ионизация через матричный материал значительно менее эффективна. В методе MALDI-TOF выбор матричного материала играет огромную роль. Для пептидов подобран ряд очень эффективных матричных материалов, обеспечивающих очень тонкую кристаллизацию. В настоящее время существует ряд подходящих для ДНК матричных материалов, однако разница в чувствительности метода в отношении нуклеиновых кислот и белков по-прежнему велика. Эту разницу можно сократить путем химической модификации ДНК, в результате которой она приобретает сходство с пептидами. Например, фосфоротионатные нуклеиновые кислоты, в которых фосфаты скелета заменены на тиофосфаты, можно превратить в электронейтральные молекулы просто путем алкилирования (Gut & Beck, *Nucleic Acids Res.* 23: 1367-73, 1995). Включение "метки заряда" в такую модифицированную ДНК приводит к увеличению чувствительности MALDI-TOF практически до уровня таковой для пептидов. Еще одним преимуществом "мечения зарядом" оказывается повышение стабильности метода в отношении примесей, из-за которых детекция не модифицированных молекул значительно труднее.

На четвертой стадии способа по данному изобретению анализируют ампликоны, полученные на третьей стадии, чтобы определить состояние метилирования динуклеотидов CpG до обработки.

В тех воплощениях данного изобретения, в которых ампликоны получали путем амплификации MSP, присутствие, отсутствие или тип ампликона сами по себе указывают на состояние метилирования динуклеотидов CpG в положениях, покрываемых праймером, соответственно нуклеотидной последовательности указанного праймера.

Ампликоны, как полученные путем обычной ПЦР, так и в результате ПЦР, специфичной к метилированию, можно далее анализировать с помощью методов, основанных на спаривании оснований, например (примеры не ограничиваются перечисленным здесь) микроматричного анализа, гибридизации зондов, а также путем секвенирования и направляемого матрицей наращивания.

В одном из воплощений способа по данному изобретению ампликоны, синтезированные на третьей стадии, затем гибридизуются с панелью или набором олигонуклеотидов и/или РНК-зондов. При этом гибридизация происходит следующим образом: набор зондов, используемых в ходе гибридизации, предпочтительно состоит по меньшей мере из двух олигонуклеотидов или PNA-олигомеров; в этом процессе ампликоны служат как зонды, гибридизующиеся с олигонуклеотидами, предварительно связанными на твердой фазе; не гибридизовавшиеся фрагменты затем удаляются; указанные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере одну нуклеотидную последовательность длиной по меньшей мере 9 нуклеотидов, которая обратно комплементарна или идентична непрерывному участку нуклеотидной последовательности, представленной в Списке последовательностей настоящего документа; указанный участок содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG, TrG или CpA.

Гибридирующаяся часть гибридирующейся нуклеиновой кислоты обычно состоит из 9, 15, 20, 25, 30 или 35 нуклеотидов. Однако более длинные молекулы также имеют ценность в контексте данного изобретения и поэтому входят в его объем.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения указанный динуклеотид имеется в центральной трети олигомера. Например, когда олигомер содержит один динуклеотид CpG, то указанный динуклеотид находится в участке с 5-го по 9-й нуклеотид, считая от 5'-конца 13-мера. Для анализа каждого динуклеотида CpG в последовательности, выбираемой из группы, состоящей из геномных последовательностей, и эквивалентных положений в последовательностях после бисульфитной обработки имеется по одному олигонуклеотиду. Указанные олигонуклеотиды могут также быть представлены в форме пептидо-нуклеиновых кислот. Не гибридизовавшиеся ампликоны затем удаляются, а гибридизо-

вавшиеся выявляют и определяют. В этом отношении предпочтительно, чтобы присоединенные к ампликонам метки можно было идентифицировать в каждом положении твердой фазы, где находится олигонуклеотидная последовательность.

В еще одном воплощении способа по данному изобретению геномное состояние метилирования положений, в которых находятся динуклеотиды CpG, можно определить с помощью олигонуклеотидных зондов (как описано выше), гибридизующихся с прошедшей бисульфитную обработку ДНК одновременно с праймерами для амплификации путем ПЦР (указанные праймеры могут быть чувствительными к метилированию или обычными).

В одном из особенно предпочтительных воплощений способа по данному изобретению используется количественная ПЦР в реальном времени с детекцией флуоресцентного сигнала (Heid et al., *Genome Res.* 6:986-994, 1996; also see United States Patent No. 6331393) от олигонуклеотидного зонда с двойной флуоресцентной меткой (TaqMan™ PCR, система детекции ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Perkin Elmer Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния США). Реакция ПЦР с полимеразой TaqMan™ предполагает использование не наращиваемого запросного олигонуклеотида, называемого зондом TaqMan™, который в предпочтительных воплощениях данного изобретения сконструирован так, чтобы он гибридизовался с богатой CpG последовательностью, расположенной между прямым и обратным праймерами для амплификации. Зонд TaqMan™ также содержит флуоресцентную репортерную группу и группу - гаситель флуоресценции, ковалентно связанные с линкерными структурами (например, амидо-фосфитами), присоединенными к нуклеотидам олигонуклеотида TaqMan™. Для анализа метилирования в нуклеиновых кислотах после бисульфитной обработки нужно, чтобы этот зонд был специфичен в отношении метилирования, как описано в патенте США № 6331393 (полностью включенным в настоящий документ путем отсылки); этот метод известен также под названием MethyLight™. Варианты детекции с использованием TaqMan™, которые можно использовать по данному изобретению, включают применение метода с двойным зондом (LightCycler™) или флуоресцентных праймеров для амплификации (метод Sunrise™). Оба метода можно модифицировать таким образом, чтобы использовать их применительно к прошедшей бисульфитную обработку ДНК, а также для анализа метилирования динуклеотидов CpG.

В другом предпочтительном воплощении способа по данному изобретению четвертая стадия этого способа включает использование матричного наращивания олигонуклеотидов, например MS-SNuPE, как описано в работе Gonzalgo & Jones, *Nucleic Acids Res.* 25:2529-2531, 1997.

В еще одном предпочтительном воплощении способа по данному изобретению четвертая стадия этого способа включает определение и последующий анализ последовательностей ампликонов, образовавшихся на третьей стадии указанного способа (Sanger F., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467, 1977).

В еще одном воплощении способа по данному изобретению геномные нуклеиновые кислоты выделяют и обрабатывают согласно охарактеризованному выше первым трем стадиям этого способа, а именно:

- a) взятие у индивида биологического образца, содержащего геномную ДНК индивида;
- b) выделение геномной ДНК путем экстракции или иным способом;
- c) обработка геномной ДНК по п. b) или ее фрагмента одним или более реагентами для превращения цитозинов, не метилированных в 5'-положении, в урацил или иное основание, отличимое от цитозина в отношении гибридизации; и
- d) амплификация после обработки по п. c), осуществляемая специфичным к метилированию образом, а именно с использованием праймеров, специфичных к метилированию, или блокирующих олигонуклеотидов; а также
- e) выявление ампликонов, осуществляемое с помощью детекционного зонда в режиме реального времени, как описано выше; и
- f) определение прогноза для данного индивида.
- g) предпочтительно при осуществлении амплификации по п. d) с использованием праймеров, специфичных к метилированию, как описано выше, указанные праймеры, специфичные к метилированию, содержат последовательность длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 6, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 нуклеотидов, гибридизующихся с последовательностью нуклеиновой кислоты, прошедшей бисульфитную обработку и соответствующей одной из прошедших бисульфитную обработку последовательностей и комплементарных ей последовательностей, причем указанная последовательность оснований указанных олигомеров содержит по меньшей мере один динуклеотид CpG.

Стадия e) способа по данному изобретению, а именно выявление специфических ампликонов, свидетельствующих о состоянии метилирования одного или более положений CpG, соответствующих геномным последовательностям, осуществляется с помощью методов детекции в режиме реального времени, как описано выше.

Анализ с помощью ферментов рестрикции, чувствительных к метилированию.

В одном и предпочтительных воплощениях данного изобретения описанная выше вторая стадия предлагаемого способа может осуществляться с помощью ферментов рестрикции, чувствительных (спе-

цифичных) к метилированию. В данной области техники известны методы, применяемые для определения метилирования, с использованием рестрикционных ферментативных реагентов, чувствительных к метилированию, или ряда рестрикционных ферментативных реагентов, включающего чувствительные к метилированию рестрикционные ферментативные реагенты, которые различают метилированные и не метилированные динуклеотиды CpG в области мишени; примером (не ограничивающим) таких методов является гибридизация, дифференциальная по метилированию (DMH).

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения до бисульфитной обработки ДНК ее расщепляют рестрикционными ферментами, чувствительными к метилированию. В данной области техники известны такие методы, которые могут включать как физические, так и ферментативные воздействия. Особенно предпочтительно применять один или множество не чувствительных к метилированию рестрикционных ферментов, в которых сайты распознавания богаты динуклеотидами AT, но не содержат динуклеотидов CG. Использование таких ферментов позволяет сохранить островки CpG и области, богатые CpG, во фрагментированной ДНК. Рестрикционные ферменты, специфичные к не метилированному состоянию, выбирают из группы, состоящей из MseI, BfaI, Csp6I, TruII, TvuII, Tru9I, Tvu9I, MaeI и XspI. Особенно предпочтительно использовать два или три таких фермента. Особенно предпочтительно использовать комбинацию MseI, BfaI и Csp6I.

Фрагментированную ДНК можно затем присоединить к адаптерным олигонуклеотидам, чтобы способствовать последующей ферментативной амплификации. В данной области техники известно, как присоединять олигонуклеотиды к фрагментам ДНК с тупыми и липкими концами: это делается путем дефосфорилирования концов (например, с помощью щелочной фосфатазы из кишечника телят или из креветок) и последующего присоединения с помощью ферментов-лигаз (например, ДНК-лигазы T4) в присутствии дезоксиаденозинтрифосфата. Обычно используют адаптерные олигонуклеотиды длиной по меньшей мере 18 пар оснований.

На третьей стадии способа по данному изобретению ДНК (или ее фрагменты) расщепляют с помощью одного или более рестрикционных ферментов, чувствительных к метилированию. Расщепление происходит так, что гидролиз ДНК в сайтах рестрикции дает информацию о состоянии метилирования конкретных динуклеотидов CpG по меньшей мере в одном гене или геномной последовательности, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы.

Предпочтительно рестрикционные ферменты, специфичные к метилированию, выбирают из группы, состоящей из Bsi E1, Hga I, HpaI, Hpy99I, Ava I, Bce AI, Bsa HI, BsiI, BstUI, BshI236I, AccII, BstFNI, McrBC, GlnI, MvnI, HpaII (HapII), HhaI, AclI, SmaI, HpaII, HpyCH4IV, EagI и смесей двух или более из этих ферментов. Предпочтительны смеси, содержащие рестрикционные ферменты BstUI, HpaII, HpyCH4IV и HpaII.

На четвертой стадии способа по данному изобретению, которая не обязательна, но предпочтительна, полученные в результате рестрикции фрагменты амплифицируют. Это достигается предпочтительно путем полимеразной цепной реакции; указанные ампликоны могут нести подходящие детектируемые метки, как обсуждалось выше, а именно флуоресцентные, радиоактивные и изотопные метки. Особенно предпочтительна амплификация с использованием амплифицирующего фермента и по меньшей мере двух праймеров, содержащих в каждом случае непрерывную последовательность длиной по меньшей мере 16 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности, выбираемой из группы, состоящей из геномных последовательностей и комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с этими последовательностями при умеренно жестких или жестких условиях. Предпочтительно указанная непрерывная последовательность состоит по меньшей мере из 16, 20 или 25 смежных нуклеотидов. В другом воплощении данного изобретения указанные праймеры могут быть комплементарны адаптерам, присоединенным к фрагментам ДНК.

На пятой стадии способа по данному изобретению выявляют амплификаты. Детекция может осуществляться любыми обычно применяемыми в данной области техники методами, например (приведенные здесь примеры не ограничивают объем изобретения) путем гель-электрофореза, гибридизационного анализа, включения детектируемых меток в продукты GWH, микроматричного анализа, матричной лазерной десорбционной/ионизационной масс-спектрометрии (MALDI) или масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI). Предпочтительно указанная детекция осуществляется путем гибридизации по меньшей мере с одной нуклеиновой кислотой или пептидо-нуклеиновой кислотой, содержащими в каждом случае непрерывную последовательность длиной по меньшей мере 16 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности, выбираемой из группы, состоящей из геномных последовательностей и комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с этими последовательностями при умеренно жестких или жестких условиях. Предпочтительно указанная непрерывная последовательность состоит по меньшей мере из 16, 20 или 25 смежных нуклеотидов.

После определения состояния метилирования или уровня метилирования геномных нуклеиновых кислот делается прогноз для больного раком на основании состояния или уровня метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG, который при раке метилирован, а в не злокачественных тканях не метилирован, или среднего состояния метилирования или величины, отражающей средний уровень метилирования множества динуклеотидов CpG геномных последовательностей, причем метилирование

ассоциировано с прогнозом для больного раком. Когда указанное метилирование определено количественно, устанавливают порог отсечения для определения указанного наличия метилирования; этот порог предпочтительно "ноль" (то есть если в образце обнаруживается любая степень метилированности, то считается, что в данном положении CpG имеется состояние метилирования). Тем не менее, специалисту в данной области техники может понадобиться сдвинуть порог отсечения для достижения какой-либо особенно предпочтительной чувствительности или специфичности. Соответственно указанный порог отсечения можно повысить (тем самым увеличивая специфичность), причем указанная величина порога отсечения может быть в пределах, выбираемых из группы, состоящей из 0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-30% и 30-50%. Особенно предпочтительные пороги отсечения - 0,1, 1, 10, 15, 25 и 30%.

В настоящем документе термин "прогноз" следует понимать как показатель предсказанного прогрессирования заболевания (включая агрессивность и метастатический потенциал, но не ограничиваясь ими) и/или предсказанного времени выживания пациента.

В контексте данного изобретения термин "агрессивность" означает высокую вероятность одного или более рецидивов после хирургического лечения; время выживания меньше среднего или медианного; продолжительность ремиссии меньше средней или медианной; период без рецидивов меньше среднего или медианного; связанные с опухолью осложнения выше среднего; быстрое прогрессирование опухоли или метастазов.

В настоящем документе термин "выживание" следует понимать как включающий следующее (если не оговорено иного): время жизни до смерти, называемое также общей выживаемостью (указанная смерть может быть безотносительна к причине или связанной с ней опухолью); безрецидивное выживание (термин "рецидив" включает как локальный рецидив, так и удаленный от первичной опухоли); выживание без метастазов; ремиссия, или отсутствие признаков заболевания (термин "заболевание" включает рак и связанные с ним патологические состояния). Продолжительность указанного выживания можно рассчитать относительно определенной начальной точки (например, момента установления диагноза или момента начала лечения) и конечной точки (например, смерти, рецидива или появления метастаза).

Данным изобретением предлагаются обработанные нуклеиновые кислоты, происходящие из геномных последовательностей, причем указанная обработка подходит для превращения по меньшей мере одного не метилированного цитозина геномной ДНК в урацил или иное основание, отличное от цитозина в отношении гибридизации, для использования при определении прогноза для пациента с раковым заболеванием или опухолью. Геномные последовательности, имеющие значение в контексте данного изобретения, - одно или более смежных метилированных динуклеотидов CpG. Указанная обработка нуклеиновых кислот предпочтительно включает использование реагента, выбираемого из группы, состоящей из бисульфита, сернистой кислоты, дисульфита и их сочетаний. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаются не существующие в природе модифицированные нуклеиновые кислоты, содержащие последовательность по меньшей мере из 16 смежных нуклеотидов, входящих в состав последовательности, выбираемой из группы, состоящей из прошедших бисульфитную обработку последовательностей, в частности из последовательностей, обозначаемых SEQ ID NO: 5, 7, 10-13 и 18-20. В других предпочтительных воплощениях данного изобретения указанная нуклеиновая кислота длиной по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250 или 500 пар оснований является отрезком последовательности нуклеиновой кислоты, содержащейся в последовательностях, прошедших бисульфитную обработку. Особенно предпочтительны молекулы нуклеиновых кислот, идентичные или комплементарные всем или некоторым последовательностям, прошедшим бисульфитную обработку, но не геномным последовательностям или иным природным ДНК.

Предпочтительно, чтобы указанная последовательность содержала по меньшей мере один динуклеотид CpG, TpA или CpA и комплементарные им последовательности. Прошедшие бисульфитную обработку последовательности представляют неприродные варианты нуклеиновых кислот, соответствующих геномным последовательностям, причем модификация каждой геномной последовательности приводит к тому, что образуется нуклеиновая кислота, последовательность которой уникальна и отлична от указанной геномной последовательности следующим образом. Для каждой смысловой цепи геномной ДНК описываются четыре модифицированных (конвертированных) варианта. В первом варианте "С" превращен в "Т," но "CpG" остаются "CpG" (то есть соответствует тому случаю, когда в геномной последовательности все цитозины динуклеотидов CpG метилированы и потому не превращаются в другие основания); во втором варианте содержится последовательность, комплементарная геномной последовательности ДНК (то есть антисмысловая цепь), где "С" превращен в "Т," но "CpG" остаются "CpG" (то есть соответствует тому случаю, когда все цитозины в динуклеотидах CpG метилированы и потому не превращаются в другие основания). Конвертированные последовательности с высокой метилированностью геномных последовательностей соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 4-9 для SEPTIN9 и SEQ ID NO: 17 и 18 для RASSF2A. Предлагается также химически модифицированный (конвертированный) третий вариант каждой геномной последовательности, в котором все "С" превращены в "Т", включая таковые динуклеотиды CpG (то есть соответствует тому случаю, когда в геномных последовательностях все "С" в динуклеотидах CpG не метилированы); последний химически модифицированный (конвертированный) вариант каждой последовательности содержит последовательность, комплементарную геномной

последовательности ДНК (то есть антисмысловой цепи), в которой все "С" превращены в "Т" включая таковые динуклеотидов "СрG" (то есть соответствует тому случаю, когда в антисмысловой цепи (то есть комплементарной) каждой геномной последовательности все "С" динуклеотидов СрG не метилированы). Конвертированные последовательности с низкой метилированностью геномных последовательностей соответствуют последовательностям SEQ ID NO: 10-15 для SEPTIN9 и SEQ ID NO: 19 и 20 для RASSF2A.

Следует заметить, что до сих пор молекулы и последовательности нуклеиновых кислот, соответствующие последовательностям, подвергнутым бисульфитной обработке, не рассматривались в связи с прогнозом для больных раком.

В другом воплощении данного изобретения предлагаются также олигонуклеотиды или олигомеры, подходящие для использования в способах по данному изобретению для выявления состояния метилирования цитозина в геномных и химически модифицированных (прошедших бисульфитную обработку) ДНК. Указанные олигонуклеотиды или олигомерные нуклеиновые кислоты являют собой новые прогностические средства. Указанные олигонуклеотиды или олигомерные нуклеиновые кислоты содержат последовательность длиной по меньшей мере девять (9) нуклеотидов, которая идентична последовательности нуклеиновой кислоты, прошедшей бисульфитную обработку и соответствующей подвергнутым бисульфитной обработке последовательностям и/или комплементарным им последовательностям, или геномной последовательности, соответствующей геномным последовательностям и/или комплементарным им последовательностям, или гибридизуется с ней при жестких или умеренно жестких условиях (как описано выше).

Таким образом, настоящее изобретение включает молекулы нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотиды и РНА-олигомеры - молекулы пептидо-нуклеиновых кислот (РНА)), которые гибридизуются при умеренно жестких или жестких условиях гибридизации со всеми или с некоторыми указанными последовательностями или с комплементарными им последовательностями. Особенно предпочтительны молекулы нуклеиновых кислот, которые в жестких или умеренно жестких условиях гибридизуются со всеми или с некоторыми последовательностями, подвергшимися бисульфитной обработке, но не гибридизуются с геномными последовательностями или другими геномными ДНК человека.

В гибридизующихся нуклеиновых кислотах идентичная или гибридизующаяся часть обычно длиной по меньшей мере 9, 16, 20, 25, 30 или 35 нуклеотидов. Но и более длинные молекулы можно использовать по данному изобретению, и они таким образом входят в его объем.

Предпочтительно гибридизующаяся часть гибридизующихся нуклеиновых кислот по данному изобретению по меньшей мере на 95, или по меньшей мере на 98, или на 100% идентична данной последовательности, или ее части, или комплементарной ей последовательности. Гибридизующиеся нуклеиновые кислоты описанного в настоящем документе типа можно использовать, например, в качестве праймера (например, праймера для ПЦР) или прогностического зонда или праймера. Предпочтительно гибридизация олигонуклеотида-зонда с образцом нуклеиновой кислоты осуществляется в жестких условиях и зонд на 100% идентичен последовательности-мишени. Стабильность двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гибрида выражается температурой плавления (T_m), то есть температурой, при которой зонд отделяется от ДНК-мишени. Эта температура плавления используется для определения требующейся жесткости условий гибридизации.

Для последовательностей-мишеней, не идентичных, а родственных или в основном идентичных соответствующей последовательности геномных последовательностей (например, аллельных вариантов и однонуклеотидных полиморфизмов - SNP) следует сначала установить самую низкую температуру, при которой происходит только гомологичная гибридизация при определенной концентрации соли, например цитрата натрия-хлорида натрия (SSC) или фосфата натрия-хлорида натрия-этилендиаминтетраацетата (SSPE). Затем, полагая, что снижение T_m на 1°C приходится на 1% несовпадения последовательностей, соответственно снижают температуру конечного промывания в реакции гибридизации (например, если нужно найти последовательности, более чем на 95% идентичные зонду, температура конечной промывки снижают на 5°C). На практике изменение T_m составляет от 0,5 до 1,5°C на 1% несовпадения.

Примеры олигонуклеотидов по данному изобретению длиной X (нуклеотидов), как указывают положения в полинуклеотиде по отношению к геномным или описанным в настоящем документе последовательностям, прошедшим бисульфитную обработку, включают олигонуклеотиды, соответствующие рядам (смысловым и антисмысловым) последовательных перекрывающихся олигонуклеотидов длиной X, и олигонуклеотиды в каждом таком ряду (соответствующим данному значению X) определяются как ограниченный ряд Z олигонуклеотидов по положениям нуклеотидов:

$$\text{от } n \text{ до } (n + (X-1)),$$

где $n = 1, 2, 3, \dots (Y-(X-1))$;

Y равно длине (в нуклеотидах, или парах оснований) последовательностей SEQ ID NO: 1-20;

X равно общей длине (в нуклеотидах) каждого олигонуклеотида в ряду (например, для ряда последовательно перекрывающихся 20-меров $X = 20$) и

число (Z) последовательно перекрывающихся олигомеров длиной X для данной последовательности SEQ ID NO: длиной Y равно $Y-(X-1)$.

Предпочтительно такой ряд ограничен теми олигонуклеотидами, которые содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG, TrG или CpA.

Примеры 20-мерных олигонуклеотидов по данному изобретению включают описанные в настоящем документе олигомеры (и антисмысловый ряд комплементарных им), указывающие положения в полинуклеотидах по отношению к последовательностям SEQ ID NO: 1-20: 1-20, 2-21, 3-22, 4-23, 5-24 и т.д.

Предпочтительно такой ряд ограничен теми олигомерами, которые содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG, TrG или CpA.

Аналогично, примеры 25-мерных олигонуклеотидов по данному изобретению включают следующий ряд олигомеров xxx (и антисмысловый ряд комплементарных им), указывающий положения в полинуклеотидах по отношению к последовательностям SEQ ID NO: 1-20: 1-25, 2-26, 3-27, 4-28, 5-29 и т.д.

Предпочтительно такой ряд ограничен теми олигомерами, которые содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG, TrG или CpA.

Настоящим изобретением охватывается каждая из последовательностей, которые метилированы при раке, но не метилированы в незлокачественных тканях (смысловые и антисмысловые), множество перекрывающихся рядов олигонуклеотидов или модифицированных олигонуклеотидов длиной X, где, например, X = 9, 10, 17, 20, 22, 23, 25, 27, 30 или 35 нуклеотидам.

Олигонуклеотиды или олигомеры по данному изобретению являют собой эффективный инструмент для определения генетических и эпигенетических параметров данной геномной последовательности, соответствующей геномным последовательностям. Ряды таких олигонуклеотидов или модифицированных олигонуклеотидов - это те последовательно перекрывающиеся ряды олигомеров, которые соответствуют последовательности, метилированной при раке, но не метилированной в незлокачественных тканях (и комплементарной ей последовательности). Предпочтительно указанные олигомеры содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG, TrG или CpA.

Особенно предпочтительны те олигонуклеотиды или олигомеры по данному изобретению, в которых цитозин динуклеотида CpG (или соответствующего конвертированного динуклеотида TrG или CpA) находится в средней трети олигонуклеотида; то есть, если олигонуклеотид, например, длиной 13 пар оснований, то динуклеотид CpG TrG или CpA находится в отрезке с 5-го по 9-й нуклеотид считая от 5'-конца.

Олигонуклеотиды по данному изобретению также могут быть модифицированы химически путем присоединения олигонуклеотида к одной или более молекул/группировок или конъюгатов для повышения активности, стабильности или для выявления данного олигонуклеотида. Такие молекулы/группировки или конъюгаты включают хромофоры, флуорофоры, липиды (например, холестерин), холевую кислоту, тиозифры, алифатические цепи, фосфолипиды, полиамины, полиэтиленгликоль (PEG), остаток пальмитиновой кислоты и др., как описано, например, в патентах США №№ 5514758, 5565552, 5567810, 5574142, 5585481, 5587371, 5597696 и 5958773. Зонды по данному изобретению могут быть также в форме пептидо-нуклеиновых кислот (PNA), которые обладают особенно предпочтительными свойствами в отношении спаривания. Таким образом, олигонуклеотиды по данному изобретению могут включать другие присоединенные группировки, например пептиды, и расщепляющие агенты, действующие при гибридизации (Krol et al., *BioTechniques* 6:958-976, 1988) или интеркалирующие агенты (Zon, *Pharm. Res.* 5:539-549, 1988). Итак, олигонуклеотиды по данному изобретению могут быть конъюгированы с другими молекулами, например хромофорами, флуорофорами, пептидами, сшивающими агентами, действующими при гибридизации, переносчиками, расщепляющими агентами, действующими при гибридизации, и др.

Олигонуклеотиды по данному изобретению могут также содержать по меньшей мере один известный в данной области техники модифицированный сахар и/или основание, или в олигонуклеотиде может быть модифицирован остов или связи между нуклеозидами могут быть неприродными.

Олигонуклеотиды или олигомеры по конкретным воплощениям данного изобретения обычно используются рядами, содержащими по меньшей мере один олигомер для анализа каждого из динуклеотидов CpG геномной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из геномных последовательностей и последовательностей, комплементарных им или соответствующему динуклеотиду CpG, TrG или CpA в последовательности прошедших бисульфитную обработку нуклеиновых кислот, соответствующих прошедшим бисульфитную обработку последовательностям или комплементарных им последовательностям. Однако предпочтительно по экономическим или иным причинам может быть предпочтительно анализировать ограниченный набор динуклеотидов CpG в указанных последовательностях, и тогда соответственно меняется ряд олигонуклеотидов.

Таким образом, в конкретных воплощениях данного изобретения предлагается набор по меньшей мере из двух (2) олигонуклеотидов/или олигомеров, которые можно использовать для выявления состояния метилирования цитозина в геномной ДНК, прошедшей бисульфитную обработку, или в геномной ДНК (геномных последовательностях и последовательностях, им комплементарных). Эти зонды позволяют определять прогноз для большого рака. Ряд олигомеров по данному изобретению также можно использовать для выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в ДНК, прошедшей бисульфитную обработку, или в геномной ДНК (в геномных последовательностях и в последовательностях, им

комплементарных).

В предпочтительных воплощениях данного изобретения по меньшей мере один олигонуклеотид, а более предпочтительно - все олигонуклеотиды ряда связаны на твердой фазе.

В других воплощениях данного изобретения предлагаются ряды по меньшей мере из двух (2) олигонуклеотидов, которые используются как праймеры для амплификации последовательностей ДНК одной из последовательностей, метилированных при раке, но не метилированных в незлокачественных тканях, и комплементарных им последовательностей, или их участков.

Предполагается, что олигонуклеотиды по данному изобретению могут составить всю микроматрицу (ДНК-чип) или ее часть (то есть связанные на твердой фазе упорядоченно расположенные различные олигонуклеотиды и/или PNA-олигомеры). Такая матрица из различных олигонуклеотидных или PNA-олигомерных последовательностей может отличаться, например, тем, что они расположены на твердой фазе в форме прямоугольной или гексагональной решетки. Поверхность твердой фазы может состоять из кремния, стекла, полистирола, алюминия, стали, железа, меди, никеля, серебра или золота. Можно также использовать нитроцеллюлозу, а также такие полимерные материалы, как нейлон, которые могут существовать в форме гранул, а также такие, как смолы. Обзор известных в данной области техники изготовления матриц олигомеров можно найти в специальном издании Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) и в цитируемых в этом источнике публикациях. Для сканирования иммобилизованных ДНК-матриц часто используются флуоресцентно меченые зонды. Для флуоресцентного мечения особенно удобно просто присоединять красители Cy3 и Cy5 к 5'-ОН-группе нужного зонда. Флуоресценцию гибридизовавшегося зонда можно детектировать с помощью конфокального микроскопа. Красители Cy3 и Cy5, а также многие другие, имеются в продаже.

Предполагается также, что олигонуклеотиды по данному изобретению или их определенные последовательности могут составить виртуальную матрицу - всю или ее часть, - в которой эти олигонуклеотиды или их определенные последовательности используются, например, в качестве спецификаторов как часть или в комбинации в различными специфическими мечеными зондами для анализа сложной смеси аналитов. Подобный способ, например, описан в заявке на патент США № 2003/0013091 (серийный номер США 09/898743, опубликована 16 января 2003 г.).

В таких методах делают достаточно меток, чтобы каждая нуклеиновая кислота в сложной смеси (то есть каждый аналит) могла специфично связываться с определенной меткой и таким образом ее можно детектировать (счет каждой метки идет непосредственно, что дает показания в цифровой форме для каждого вида молекул в смеси).

Особенно предпочтительно, чтобы олигомеры по данному изобретению использовались при определении прогноза для большого раком.

Наборы.

Настоящим изобретением в дополнительном его аспекте предлагаются наборы, включающие средства для определения метилирования по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, метилированных при раке, но не метилированных в незлокачественных тканях. Средства для определения метилирования по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, метилированных при раке, но не метилированных в незлокачественных тканях, предпочтительно включают реагент, содержащий бисульфит; один или множество олигонуклеотидов, последовательности которых в каждом случае идентичны, комплементарны участку длиной по меньшей мере 9, по меньшей мере 18, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 оснований последовательности, выбираемой из последовательностей, прошедших бисульфитную обработку, или гибридизуются с ним при жестких или особо жестких условиях; и при необходимости инструкции для осуществления описанного способа анализа метилирования и оценки получаемых данных. В одном из воплощений данного изобретения последовательности оснований указанных нуклеотидов содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG, CpA или TrG.

В другом воплощении данного изобретения указанный набор включает стандартные реагенты для осуществления анализа метилирования, специфичного к положению динуклеотида CpG. Причем указанный анализ включает один или более из следующих методов: MS-SNuPE, MSP, MethyLight™, Heavy-Methyl, COBRA и секвенирование нуклеиновых кислот. Однако набор по данному изобретению может также содержать лишь часть из упомянутых выше компонентов.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый набор содержит дополнительные реагенты для бисульфитной конверсии, выбираемые из группы, состоящей из буферного раствора для денатурации ДНК; буферного раствора для сульфирования; реагенты или наборы для выделения ДНК (например, путем осаждения, ультрафильтрации, аффинной хроматографии); буферный раствор для десульфирования; компоненты для выделения ДНК.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый набор содержит в отдельных емкостях полимеразу и буферный раствор для проведения полимеразной реакции, оптимизированный в отношении наращивания праймера при участии этой полимеразы, например путем ПЦР. В другом воплощении данного изобретения предлагаемый набор также содержит средства для взятия биологического образца у индивида и/или хранения этого образца. Предпочтителен набор, в состав которого входит также емкость, в которую можно поместить средства для определения метилирования по меньшей мере одного гена или

геномной последовательности, метилированной при раке, но не метилированной в незлокачественных тканях биологического образца, взятого у данного индивида; наиболее предпочтителен набор, содержащий также инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый набор содержит (а) бисульфитный реагент; (b) емкости, подходящие для размещения указанного бисульфитного реагента и биологического образца, взятого у индивида; (с) по меньшей мере один ряд олигонуклеотидов-праймеров, включающий два олигонуклеотида, последовательности которых в каждом случае идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере 9 или, более предпочтительно 18 оснований последовательности, выбираемой из последовательностей, прошедших бисульфитную обработку, или гибридизующиеся с этим участком при жестких или особо жестких условиях; и при необходимости (d) инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных. В другом предпочтительном воплощении данного изобретения предлагаемый набор содержит (а) бисульфитный реагент; (b) емкости, подходящие для размещения указанного бисульфитного реагента и биологического образца, взятого у индивида; (с) по меньшей мере один олигонуклеотид и/или PNA-олигомер длиной по меньшей мере 9 или 16 нуклеотидов, идентичный последовательности нуклеиновой кислоты, предварительно прошедшей бисульфитную обработку и соответствующей одной из прошедших бисульфитную обработку последовательностей и комплементарных им последовательностей, или гибридизующийся с ней; и при необходимости (d) инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных.

В другом предпочтительном воплощении данного изобретения предлагаемый набор содержит (а) бисульфитный реагент; (b) емкости, подходящие для размещения указанного бисульфитного реагента и биологического образца, взятого у индивида; (с) по меньшей мере один ряд олигонуклеотидов-праймеров, включающий два олигонуклеотида, последовательности которых в каждом случае идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере 9 или более предпочтительно 18 оснований последовательности, выбираемой из последовательностей, прошедших бисульфитную обработку, или гибридизующиеся с этим участком при жестких или особо жестких условиях; (d) по меньшей мере один олигонуклеотид и/или PNA-олигомер длиной по меньшей мере 9 или 16 нуклеотидов, идентичный последовательности нуклеиновой кислоты, предварительно прошедшей бисульфитную обработку и соответствующей одной из прошедших бисульфитную обработку последовательностей и комплементарных им последовательностей, или гибридизующийся с ней; и при необходимости (d) инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных.

Набор по данному изобретению может также содержать другие компоненты, например буферные растворы или растворы, подходящие для блокирования, промывания или покрытия, помещенные в отдельные емкости.

В другом своем аспекте данное изобретение относится к набору, который используется при определении прогноза для больного раком, причем указанный набор содержит средства для определения уровня транскрипции по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, метилированных при раке, но не метилированных в незлокачественных тканях, и средства для определения метилирования по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, метилированных при раке, но не метилированных в незлокачественных тканях.

Обычно применяемые реагенты для анализа методом COBRA™ (например, входящие в готовый набор для COBRA™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) праймеры для ПЦР для по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые метилированы при раке, но не метилированы в незлокачественных тканях; рестрикционные ферменты и буферный раствор, подходящий для их использования; олигонуклеотид, гибридизующийся с данным геном; контрольный гибридизующийся олигонуклеотид; набор для мечения киназой олигонуклеотидного зонда; меченые нуклеотиды. Обычно применяемые для анализа методом MethyLight™ реагенты (например, входящие в стандартный готовый набор на основе MethyLight™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) праймеры для ПЦР для прошедшей бисульфитную обработку последовательности по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые метилированы при раке, но не метилированы в незлокачественных тканях; специфичные к бисульфитной обработке зонды (например, TaqMan® или LightCycler®; оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды и полимеразу Taq).

Обычно применяемые для анализа методом Ms-SNuPE™ реагенты (например, входящие в стандартный готовый набор на основе Ms-SNuPE™) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) праймеры для ПЦР для определенного гена (или прошедшей бисульфитную обработку последовательности ДНК, или островка CpG); оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды; набор для гель-экстракции; праймеры для положительного контроля; праймеры Ms-SNuPE™ для подвергнутой бисульфитной обработке последовательности по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые метилированы при раке, но не метилированы в незлокачественных тканях; буферный раствор для реакции Ms-SNuPE и меченые нуклеотиды.

Обычно используемые для анализа методом MSP реагенты (например, входящие в стандартный го-

товый набор для MSP) включают (но не ограничиваются перечисленным здесь) метилированные и не метилированные праймеры для ПЦР для подвергнутой бисульфитной обработке последовательности по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые метилированы при раке, но не метилированы в незлокачественных тканях; оптимизированные буферные растворы для ПЦР и дезоксинуклеотиды, а также специфичные зонды.

В дополнительном аспекте данного изобретения предлагается другой набор, содержащий средства для определения метилирования по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, которые метилированы при раке, но не метилированы в незлокачественных тканях, причем указанные средства включают по меньшей мере один рестрикционный фермент, специфичный к метилированию; один или множество олигонуклеотидов-праймеров (предпочтительно одну или множество пар праймеров), подходящих для амплификации последовательности, содержащей по меньшей мере один динуклеотид CpG последовательности, выбираемой из геномных последовательностей; и при необходимости инструкции по осуществлению описанного метода анализа метилирования и оценки полученных данных. В одном из воплощений данного изобретения последовательности оснований указанных олигонуклеотидов идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере 18 оснований последовательности, выбираемой из геномных последовательностей, или гибридизуются с этим участком при жестких или особо жестких условиях.

В еще одном воплощении данного изобретения указанный набор может содержать один или множество олигонуклеотидных зондов для анализа рестрикционных фрагментов, причем указанные олигонуклеотиды предпочтительно идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере 16 оснований последовательности, выбираемой из геномных последовательностей, или гибридизуются с этим участком при жестких или особо жестких условиях.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый набор содержит дополнительные реагенты, выбираемые из группы, состоящей из буферных растворов (например, для рестрикционных ферментов, для ПЦР, для хранения или промывания); реагенты или наборы для выделения ДНК (например, путем осаждения, ультрафильтрации, аффинной хроматографии) и компоненты для выделения ДНК.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый набор может содержать помещенные в отдельные емкости полимеразу и буферный раствор для полимеразной реакции, оптимизированный для наращивания праймеров при участии полимеразы, например при ПЦР. В другом воплощении данного изобретения предлагаемый набор также содержит средства для взятия биологического образца у индивида и/или его хранения. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый набор содержит (а) ферментативный рестрикционный реагент, чувствительный к метилированию; (b) емкости, пригодные для размещения указанного реагента и биологического образца, взятого у индивида; (с) по меньшей мере один ряд олигонуклеотидов одной или множества нуклеиновых кислот или пептидо-нуклеиновых кислот, которые идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере 9 оснований последовательности, выбираемой из геномных последовательностей, или гибридизуются с этим участком при жестких или особо жестких условиях; и при необходимости (d) инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных. В другом предпочтительном воплощении данного изобретения предлагаемый набор содержит (а) ферментативный рестрикционный реагент, чувствительный к метилированию; (b) емкости, пригодные для размещения указанного реагента и биологического образца, взятого у индивида; (с) по меньшей мере один ряд олигонуклеотидов-праймеров, подходящих для амплификации последовательности, содержащей по меньшей мере один динуклеотид CpG последовательности, выбираемой из геномных последовательностей; и при необходимости (d) инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных.

В другом воплощении данного изобретения предлагаемый набор содержит (а) ферментативный рестрикционный реагент, чувствительный к метилированию; (b) емкости, пригодные для размещения указанного реагента и биологического образца, взятого у индивида; (с) по меньшей мере один ряд олигонуклеотидов-праймеров, подходящих для амплификации последовательности, содержащей по меньшей мере один динуклеотид CpG последовательности, выбираемой из геномных последовательностей; (d) по меньшей мере один ряд олигонуклеотидов одной или множества нуклеиновых кислот или пептидо-нуклеиновых кислот, которые идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере 9 оснований последовательности, выбираемой из геномных последовательностей, или гибридизуются с этим участком при жестких или особо жестких условиях; и при необходимости (е) инструкции по применению набора и интерпретации получаемых при его использовании данных.

Набор по данному изобретению может также содержать другие помещенные в отдельные емкости компоненты, например буферные растворы или растворы, подходящие для блокирования, промывания или покрытия.

Настоящее изобретение относится также к набору, который можно использовать при определении прогноза для больного раком с помощью ферментов рестрикции, чувствительных к метилированию. Указанный набор содержит емкость и компонент микроматрицы ДНК. Указанный компонент микромат-

рицы ДНК представляет собой поверхность, на которой в определенных точках иммобилизовано множество олигонуклеотидов, причем каждый олигонуклеотид содержит по меньшей мере один сайт метилирования CpG. По меньшей мере один из указанных олигонуклеотидов специфичен в отношении по меньшей мере одного гена или геномной последовательности, выбираемой из группы, состоящей из определенных генов, и содержит последовательность длиной по меньшей мере 15 пар оснований, но не более 200 пар оснований из последовательности, соответствующей одной из геномных последовательностей. Предпочтительно указанная последовательность имеет в длину по меньшей мере 15 пар оснований, но не более 80 пар оснований из последовательности, соответствующей одной из геномных последовательностей. Также предпочтительно, чтобы указанная последовательность была длиной по меньшей мере 20 пар оснований, но не более 30 пар оснований из последовательности, соответствующей одной из геномных последовательностей. Указанный аналитический набор предпочтительно также содержит рестрикционный ферментативный компонент, включающий один или множество ферментов рестрикции, чувствительных к метилированию. В другом воплощении данного изобретения указанный аналитический набор также отличается тем, что содержит по меньшей мере один фермент рестрикции, специфичный к метилированию, а олигонуклеотиды содержат сайт рестрикции по меньшей мере для одного из указанных рестрикционных ферментов, которые специфичны к метилированию.

Набор по данному изобретению может также содержать один или несколько из следующих известных в данной области техники компонентов, используемых для обогащения ДНК: белковый компонент, причем указанный белок избирательно связывается с метилированной ДНК; нуклеиновая кислота, образующая триплекс, один или множество линкеров, при необходимости в подходящем растворе; вещества или растворы для ковалентного соединения нуклеотидных цепей (например, лигазы), буферные растворы; вещества или растворы для осуществления колоночной хроматографии; вещества или растворы для осуществления обогащения на основе иммунологических свойств (например, путем иммунопреципитации); вещества или растворы для осуществления амплификации нуклеиновых кислот, например, путем ПЦР; один или несколько красителей, если их можно применить со сшивающим реагентом, если их можно применить в растворе; вещества или растворы для проведения гибридизации и/или вещества или растворы для осуществления стадии промывания.

По данному изобретению также предлагается композиция из веществ, нужных при определении прогноза для больного раком. Указанная композиция содержит по меньшей мере одну нуклеиновую кислоту длиной 18 пар оснований из участка последовательности нуклеиновой кислоты, представленной последовательностями, прошедшими бисульфитную обработку, и одно или более веществ из группы, включающей 1-5 mM хлорид магния, 100-500 мкМ dNTP, 0,5-5 единиц полимеразы Taq, бычий сывороточный альбумин, олигомер, в частности олигонуклеотид или пептидо-нуклеиновую кислоту (PNA), причем указанный олигомер в каждом случае содержит по меньшей мере одну последовательность оснований длиной по меньшей мере 9 нуклеотидов, которая комплементарна предварительно прошедшей бисульфитную обработку геномной ДНК, соответствующей одной из прошедших бисульфитную обработку последовательностей и комплементарных им последовательностей, или гибридизуется с ней при умеренно жестких или жестких условиях. Предпочтительно, чтобы указанная композиция содержала буферный раствор, подходящий для стабилизации указанной нуклеиновой кислоты в водной среде и обеспечивающий возможность протекания реакций с участием полимеразы в указанном растворе. Такие буферные растворы известны в данной области техники и имеются в продаже.

Данное изобретение относится также к использованию описанных выше наборов или олигонуклеотидов при определении прогноза для больного раком при определении лечебных мероприятий для больного раком, при определении по опухолевой ткани, взятой у больного раком, указаний на агрессивность опухоли, метастатический потенциал или сокращение времени жизни больного, при выявлении агрессивной формы рака у больного, при отборе больных для лечения рака или при определении опухолевой нагрузки или степени тяжести ракового заболевания у пациента, в том числе у больного раком.

В других предпочтительных воплощениях данного изобретения указанная по меньшей мере одна нуклеиновая кислота имеет в длину по меньшей мере 50, 100, 150, 200, 250 или 500 пар оснований из участка последовательности нуклеиновой кислоты, представленной в последовательностях, прошедших бисульфитную обработку.

Таблица 1

Геномные последовательности и их варианты после бисульфитной обработки по данному изобретению

SEQ ID NO:	Расположение ¹⁾	Расположение в геноме ¹⁾	Транскрипт (ы)	Метилированная смысловая последовательность ²⁾	Метилированная антисмысловая последовательность ²⁾	Неметилированная смысловая последовательность ²⁾	Неметилированная антисмысловая последовательность ²⁾
1	AC068594.15.1.1 68501 150580 - 151086(+) - AC111170.11.1.1 58988 137268 138151 (+)	17 72789082 - 73008258 (+)	Septin 9 и Q9HC74	4	5	10	11]
2	AC068594.15.1.1 68501 150580 151255 (+)	17 72789082 - 72789757 (+)	Septin 9	6	7	12	13
3	AC111182.20.1.1 71898 127830 129168 (+)	17 72881422 -72882760 (+)	Q9HC74	8	9	14	15
16			RASSF2A	17	18	19	20

¹⁾ По базе данных Ensembl.²⁾ После бисульфитной обработки.

Пример 1.

У больных колоректальным раком до и после хирургического удаления опухоли брали соответствующие образцы плазмы крови и исследовали уровни Septin9 и метилированного RASSF2A как примеров генов или геномных последовательностей, которые при раке метилированы, а в незлокачественных тканях не метилированы.

Уровни Septin9 и RASSF2A определяли триплексным методом, измеряя уровни генов Septin9, метилированного RASSF2A и HB14. Такой анализ можно провести моноплексным, дуплексным, триплексным, квадруплексным или мультиплексным методом.

Методы определения метилирования или состояния метилирования генов и геномных последовательностей известны в данной области техники (см., например, патент США № 7229759 или европейский патент № EP 1370691, которые включены в настоящий документ путем отсылки по поводу этих методов детекции и анализа метилирования). Определяли метилирование или состояние метилирования генов и геномных последовательностей. ДНК из плазмы крови подвергали бисульфитной обработке и триплексным методом определяли уровень метилированной ДНК в положениях этих геномных последовательностей.

Использовали магнитные штативы производства Invitrogen (DynaMag-15 и DynaMag-2). Смывающий раствор А получали, добавляя 45 мл этилового спирта (Merck, A000920; 99,8%) к концентрированному смывающему раствору А тестовой системы Epi proColonUS. Смывающий раствор В получали, добавляя 28 мл этилового спирта (Merck, A000920; 99,8%) к концентрированному смывающему раствору В тестовой системы Epi proColonUS.

В помеченные 15-миллилитровые пробирки (Falcon) помещали 3,5 мл плазмы крови и 3,5 мл буферного раствора для лизиса клеток и связывания ДНК, перемешивали вращательными движениями и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. К этой смеси, где происходил лизис, добавляли 90 мкл магнитных частиц (Dynabeads MyOne SILANE), только что суспендированных путем встряхивания в течение 30 с, и 2,5 мл этилового спирта до суммарного объема ~10 мл. Смесь перемешивали, переворачивая пробирку рукой 5-6 раз, и инкубировали с вращающейся мешалкой (Rotator) в течение 45 мин при комнатной температуре. Первый смыв делали, помещая 154-миллилитровые пробирки в магнитный штатив по меньшей мере на 5 мин, после чего буферный раствор отбрасывали и пробирки переносили в обычный штатив. Добавляли 1500 мкл смывающего раствора А (как описано выше: буферный раствор для лизиса и связывания + этиловый спирт f.d. Molekularbiologie) и частицы ресуспендировали встряхиванием в течение 10 с. Суспензию частиц переносили пипеткой для переноса жидкостей в помеченную 2-миллилитровую пробирку. Для центрифугирования использовали 2-миллилитровые пробирки с защелкой (SafeLock), чтобы гарантировать надежную закрытость в ходе инкубации при температуре 80°C. Чтобы собрать оставшиеся в 15-миллилитровой пробирке частицы, в нее вновь вводили пипетку для переноса жидкости по меньшей мере на 2 мин и этой же пипеткой переносили собранное в 2-миллилитровую пробирку. Эти 2-миллилитровые пробирки помещали в магнитный штатив на 2 мин, после чего пипеткой удаляли как можно больше буферного раствора, стараясь не захватить частицы. За-

тем пробирки центрифугировали в течение 10 с при относительной центробежной силе 1000, чтобы частицы собрались на дне, затем помещали в магнитный штатив на 2 мин и удаляли оставшийся буферный раствор.

Содержавшуюся в плазме крови ДНК элюировали, добавляя в каждую пробирку 100 мкл буферного раствора для элюирования (10 mM Tris pH 8,0) и ресуспендируя частицы встряхиванием в течение 10 с; при этом следует убедиться, что осадок полностью перешел в суспензию. Затем инкубировали при температуре 80°C в течение 15 мин в термостатированном шейкере при скорости вращения платформы 1000 об/мин. Чтобы стряхнуть капли с крышечки пробирки прерывисто вращали. Затем помещали в магнитный штатив на 2 мин. Полный элюат (около 100 мкл) переносили в предварительно помеченные 2-миллилитровые пробирки.

Проводили бисульфитную обработку содержащейся в плазме крови ДНК. Для этого к полученному, как описано выше, элюату прибавляли следующие реагенты: 150 мкл бисульфитного раствора (раствора бисульфита аммония (ABS), использовать следует только не открывавшиеся пробирки) и 25 мкл защитного буферного раствора (содержит THFA) (5 г Trolox + 40 мл THFA). Пробирки закрывали и тщательно перемешивали, встряхивая в течение 10 с. Затем пробирки прерывисто вращали, чтобы на крышечках не осталось жидкости, помещали в термостат или термостатированный шейкер и инкубировали в течение 45 мин при температуре 80°C без встряхивания. Затем пробирки прерывисто вращали, чтобы удалить капли с крышечек, и тщательно ресуспендировали частицы, встряхивая пробирки в течение 10 с. К каждой бисульфитной реакционной смеси прибавляли следующие компоненты в указанном порядке: 1000 мкл смывающего раствора А и 20 мкл магнитных частиц (Dynabeads MyOne SILANE) до суммарного объема 300 мкл и тщательно перемешивали встряхиванием, после чего инкубировали в термостатированном шейкере и перемешивали на нем при 1000 об/мин в течение 45 мин при комнатной температуре. Чтобы удалить капли с крышечек, пробирки прерывисто вращали, затем помещали их в магнитный штатив на 2 мин, чтобы все частицы осели. Новой пипеткой удаляли максимально возможное количество жидкости, не касаясь частиц. После этого пробирки снимали с магнитного штатива для промывания. Прибавляли 800 мкл смывающего раствора А и ополаскивали стенки, чтобы снять с них частицы, затем ресуспендировали частицы встряхиванием, прерывисто вращали, чтобы удалить капли с крышечек, и помещали в магнитный штатив на 2 мин. Новой пипеткой удаляли максимально возможное количество жидкости, не касаясь частиц. После этого пробирки снимали с магнитного штатива для промывания. Прибавляли 800 мкл смывающего раствора В и ополаскивали стенки, чтобы снять с них частицы, затем ресуспендировали частицы встряхиванием, прерывисто вращали, чтобы удалить капли с крышечек, и помещали в магнитный штатив на 2 мин. Новой пипеткой удаляли максимальное количество жидкости, не касаясь частиц. После этого пробирки снимали с магнитного штатива для промывания. Прибавляли 400 мкл смывающего раствора В и ополаскивали стенки, чтобы снять с них частицы, затем ресуспендировали частицы встряхиванием, прерывисто вращали, чтобы удалить капли с крышечек, и помещали в магнитный штатив на 2 мин. Новой пипеткой удаляли максимальное количество жидкости, не касаясь частиц. Затем пробирки недолго вращали, чтобы собрать оставшиеся капли на дно, помещали в магнитный штатив на 2 мин, после чего оставшуюся жидкость удаляли пипеткой. Не закрывая пробирки, давали осадку подсохнуть в течение 10 мин при комнатной температуре на магните.

Пробирки переносили в обычный штатив, в каждую пробирку прибавляли 55 мкл элюирующего буферного раствора (10 mM Tris pH 8.0).

Ресуспендировали частицы встряхиванием в течение 20 с/мин, после чего пробирки инкубировали при температуре 80°C в течение 5 мин в термостатированном шейкере со скоростью вращения 1000 об/мин, затем встряхивали еще 10 с и недолго вращали, чтобы жидкость осела на дно. После этого пробирки помещали в магнитный штатив на 2 мин и полный элюат переносили на 96-луночный планшет для ПЦР (или в предварительно помеченные 0,5-миллилитровые пробирки).

Последовательности зондов и праймеров для анализа триплексным методом представлены в табл. 2.

Таблица 2

Олигонуклеотид	Ген	Функция	Последовательность	SEQ ID NO:
10307-92	RASSF2A	Праймер	ctaaacctcaacctaac	21
10307-94	RASSF2A	Праймер	gatttagagtggaatgtaagtaa	22
10307-9B1	RASSF2A	Блокатор	cctaacatcttctcaccaccaaaaaaaca	23
10307-9taq2	RASSF2A	Зонд	taccgtaaacgaccccgga	24
17378-109	Ген Septin9	Праймер	gttggttattagttattatgt	25
Sept9 R 102	Ген Septin9	Праймер	aaataatcccatccaacta	26
Блокатор гена SEPTIN9	Ген Septin9	Блокатор	gttattatgttggtttgtggttaatgtgtag	27
17378-10taq4-TAM	Ген Septin9	Зонд	ttaaccgcgaataccgac	28
HB14.F.2 короткий	HB 14	Праймер	gtgatggaggaggttagtaagtt	29
HB14.R.2 короткий	HB 14	Праймер	ccaataaaacctactcctcccttaa	30
HB14.taql1-BNM5	HB 14	Зонд	accaccacccaacacacaataacaacacaca	31

Геномная последовательность гена Septin9:

Ctgccaccagccatcatgtcggaccccggtgcaacgcgcagctggatgggacattt (SEQ ID NO: 32).

Геномная последовательность гена Septin9, прошедшая бисульфитную обработку:

Tgtttattagttattatgtcggatttcggttaacgcgtagttggatgggattattt (SEQ ID NO: 33).

Геномная последовательность RASSF2A:

Acttagagctgaatgcaagtaagcgcctgaaatgcagaagtagccggggccgcccacggcacctgcctcgtcggggcgga gagaa-gacgccagctgaggtccag (SEQ ID NO: 34).

Геномная последовательность RASSF2A, прошедшая бисульфитную обработку:

Atttagagttgaatgtaagtaagcgttcgaaatgtagaagtagtcggggtcgtttacggtattttgttcgttcggggcgagagaag acgttaggtt-gaggttttag (SEQ ID NO: 35).

Таблица 3

Стадия колоректального рака	Число больных	Ген SEPTIN9 положительный результат до хирургического лечения	Ген SEPTIN9 положительный результат после хирургического лечения	RASSF2A положительный результат до хирургического лечения	RASSF2A положительный результат после хирургического лечения
I	4	1/4	0/4	1/4	0/4
II	9	9/9	4/9	6/9	5/9
III	4	4/4	2/4	4/4	2/4
IV	2	2/2	2/2	2/2	2/2

Полученные данные показывают, что у больных раком I и II стадии после хирургического лечения утрачиваются сигналы от генов Septin9 и RASF2A, у больных раком III стадии сигналы от этих генов сохраняются. У двух больных колоректальным раком IV стадии, у которых уже имелись метастазы, после хирургического лечения сигналы от генов Septin9 и RASF2A сохранялись. Это говорит о том, что по сигналам от генов Septin9 и RASF2A можно выявить метастазирование даже после удаления первичной опухоли. Эти результаты представлены на фиг. 1-12. Фиг. 14 и 15 представляют обсуждаемые результаты по генам Septin9 и RASSF2A количественно. Значения указаны в пикограммах метилированной ДНК Septin9/RASSF2A на 1 мл плазмы крови.

Способ определения прогноза для больных колоректальным раком после радикального удаления первичной опухоли.

Определение гена Septin9 может быть проведено на нескольких уровнях в данной области техники, позволяющих выявить метилирование ДНК в крови/плазме крови. Может быть осуществлен качественный, полуколичественный и/или количественный анализ mSeptin9, что имеет самое тесное отношение к предполагаемому применению и спектру больных/опухолей, представляющих интерес.

Определение образца для анализа.

Для качественного анализа:

больной колоректальным раком I стадии,

ген Septin9 - положительный результат до хирургического лечения,

ген Septin9 - отрицательный результат после хирургического лечения = хороший прогноз,

ген Septin9 - положительный результат после хирургического лечения = плохой прогноз (риск возникновения метастазов).

В предпочтительных воплощениях данного изобретения хороший прогноз подразумевает, что индивид, которому хирургически удалили опухоль, наблюдается, то есть периодически повторяют один или более анализов для выявления рецидивирования рака. В особенно предпочтительном воплощении данного изобретения анализ состоит в выявлении метилированного гена Septin9, как описано в настоящем документе, в патенте США 2006-0286576 или в публикации WO 2006/113466.

Ген RASSF2A - положительный результат до хирургического лечения,
 ген RASSF2A - отрицательный результат после хирургического лечения = хороший прогноз,
 ген RASSF2A - положительный результат после хирургического лечения = плохой прогноз (риск возникновения метастазов).

В предпочтительных воплощениях данного изобретения хороший прогноз подразумевает, что индивид, которому хирургически удалили опухоль, наблюдается, то есть периодически повторяют один или более анализов для выявления рецидивирования рака.

Для полуколичественного анализа:

больные колоректальным раком I-III стадий,

ген Septin9 - положительный результат до хирургического лечения (1 из 3 повторных измерений) = наличие опухоли,

ген Septin9 - отрицательный результат после хирургического лечения = хороший прогноз (3 из 3 повторных измерений),

ген Septin9 - положительный результат после хирургического лечения (1 из 3) = низкий риск,

ген Septin9 - положительный результат после хирургического лечения (2 из 3) = средний риск,

ген Septin9 - положительный результат после хирургического лечения (3 из 3) = высокий риск,

больные колоректальным раком I-III стадий,

ген RASSF2A - положительный результат до хирургического лечения (1 из 3 повторных измерений) = наличие опухоли,

ген RASSF2A - отрицательный результат после хирургического лечения = хороший прогноз (3 из 3 повторных измерений),

ген RASSF2A - положительный результат после хирургического лечения (1 из 3) = низкий риск,

ген RASSF2A - положительный результат после хирургического лечения (2 из 3) = средний риск,

ген RASSF2A - положительный результат после хирургического лечения (3 из 3) = высокий риск.

Для количественного анализа:

больные колоректальным раком II, III и (IV) стадий,

определение интенсивности сигнала от гена Septin9 до и после хирургического лечения, например, с использованием внутреннего стандарта,

больные колоректальным раком I-III стадий,

ген Septin9 до хирургического лечения - больше 3 пг/мл плазмы крови = наличие опухоли,

ген Septin9 после хирургического лечения - отрицательный результат = хороший прогноз (Septin9 0 пг/мл),

ген Septin9 после хирургического лечения - от >0 до 3 пг/мл плазмы крови = низкий риск,

ген Septin9 после хирургического лечения - от 3 до 30 пг/мл плазмы крови = средний риск,

ген Septin9 после хирургического лечения - больше 30 пг/мл плазмы крови = высокий риск.

Определение интенсивности сигнала от гена RASSF2A до и после хирургического лечения, например, с использованием внутреннего стандарта:

больные колоректальным раком I-III стадий,

ген RASSF2A до хирургического лечения - больше 3 пг/мл плазмы крови = наличие опухоли,

ген RASSF2A после хирургического лечения - отрицательный результат = хороший прогноз (RASSF2A 0 пг/мл плазмы крови),

ген RASSF2A после хирургического лечения - от >0 до 3 пг/мл плазмы крови = низкий риск,

ген RASSF2A после хирургического лечения - от 3 до 30 пг/мл плазмы крови = средний риск,

ген RASSF2A после хирургического лечения - больше 30 пг/мл плазмы крови = высокий риск.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения необходимости в дополнительных лечебных мероприятиях у пациента, больного раком толстой кишки или колоректальным раком, после иссечения, удаляющего первичную опухоль, но до возможного дополнительного противоракового лечения, включающий стадии:

а) определения уровня метилирования ДНК гена SEPTIN9 (SEQ ID NO: 1) или гена RASSF2a (SEQ ID NO: 16), которая метилирована в клетках указанной раковой опухоли, но не метилирована в нераковых клетках, или фрагмента указанной ДНК в биологическом образце, взятом у пациента до того, как была удалена первичная опухоль посредством иссечения (образец до иссечения);

б) определения уровня метилирования ДНК генов, указанных в а), или фрагмента указанной ДНК в биологическом образце, взятом у пациента после того, как была удалена первичная опухоль посредством иссечения, но до дополнительного лечения (образец после иссечения),

где сохранение или увеличение уровня метилирования указанной ДНК или ее фрагмента в образце после иссечения по сравнению с уровнем метилирования указанной ДНК или ее фрагмента в образце до иссечения указывает на необходимость в дополнительном противораковом лечении этого пациента.

2. Способ по п.1, в котором уровень метилирования указанной ДНК или ее фрагмента определяют по меньшей мере по одному цитозину, находящемуся в положении, выбираемом из группы, состоящей

из положений 21, 28, 30, 37 и 39 промоторной последовательности SEQ ID NO: 32 гена SEPTIN9 и положений 25, 29, 46, 52, 58, 70, 74, 79 и 89 промоторной последовательности SEQ ID NO: 34 гена RASSF2a.

3. Способ по п.1, в котором стадия колоректального ракового заболевания является стадией I, стадией II или стадией III.

4. Способ по п.1, в котором биологический образец выбирают из группы, состоящей из:

- a) ткани;
- b) мочи;
- c) кала;
- d) лаважной жидкости и
- e) крови, предпочтительно сыворотки или плазмы.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором уровень метилирования указанной ДНК или ее фрагмента определяют количественно или частично количественно, качественно и/или частично качественно, частично количественно и частично качественно или полуколичественно.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором уровень метилирования указанной ДНК или ее фрагмента определяют посредством MethyLight™, HeavyMethyl™ или специфичной к метилированию ПЦР.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором определение уровня метилирования указанной ДНК или ее фрагмента включает контактирование ДНК из биологического образца по меньшей мере с одним реагентом или с рядом реагентов, которые различают метилированные и неметилированные динуклеотиды CpG по меньшей мере в одной области-мишени геномной ДНК, которая содержит последовательность по меньшей мере из 9, по меньшей мере из 16 или по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16 или гибридизуется с этими последовательностями в жестких условиях, причем указанные последовательности смежных нуклеотидов содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG.

8. Способ по п.7, в котором указанный реагент выбран из группы, содержащей бисульфит, гидросульфит, дисульфит и их комбинации.

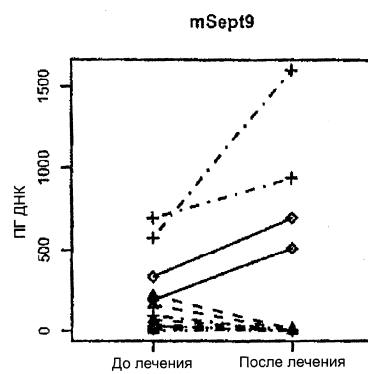
9. Способ по любому из пп.1-8, где биологический образец является образцом крови, сыворотки, плазмы или кала.

10. Способ по п.9, в котором уровень метилирования указанной ДНК или ее фрагмента определяют посредством MethyLight™, HeavyMethyl™ или специфичной к метилированию ПЦР.

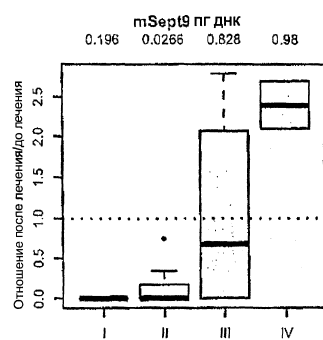
11. Применение прошедшей бисульфитную обработку геномной нуклеиновой кислоты гена SEPTIN9 или RASSF2a, содержащей по меньшей мере 9, по меньшей мере 16, по меньшей мере 25 или по меньшей мере 50 смежных нуклеотидов или комплементарную им последовательность, для осуществления способа по любому из пп.1-10, где определение уровня метилирования указанной ДНК или ее фрагмента включает контактирование ДНК из биологического образца по меньшей мере с одним реагентом или с рядом реагентов, которые различают метилированные и неметилированные динуклеотиды CpG по меньшей мере в одной области-мишени геномной ДНК, которая содержит последовательность по меньшей мере из 9, по меньшей мере из 16 или по меньшей мере из 25, по меньшей мере из 50 смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16 или гибридизуется с этими последовательностями в жестких условиях, причем указанные последовательности смежных нуклеотидов содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG и где обработанную бисульфитом геномную нуклеиновую кислоту гена SEPTIN9 или RASSF2a получают стадией контакта ДНК из биологического образца по меньшей мере с одним указанным реагентом или с рядом указанных реагентов.

12. Применение набора для осуществления способа по любому из пп.1-10, в котором измерение уровня метилирования указанной ДНК или ее фрагмента включает контактирование ДНК из биологического образца по меньшей мере с одним реагентом или с рядом реагентов, которые различают метилированные и неметилированные динуклеотиды CpG по меньшей мере в одной области-мишени геномной ДНК, которая содержит последовательность по меньшей мере из 9, по меньшей мере из 16 или по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16 или гибридизуется с этими последовательностями в жестких условиях, причем указанные последовательности смежных нуклеотидов содержат по меньшей мере один динуклеотид CpG и где для измерения уровня метилирования ДНК используют по меньшей мере один набор олигонуклеотидов, включающий два олигонуклеотида, последовательности которых в каждом случае идентичны или комплементарны участку длиной по меньшей мере в 9 оснований последовательности гена SEPTIN9 или RASSF2a или гибридизуются с этим участком при жестких или особо жестких условиях, причем набор включает (a) бисульфитный реагент; (b) по меньшей мере один указанный набор олигонуклеотидов.

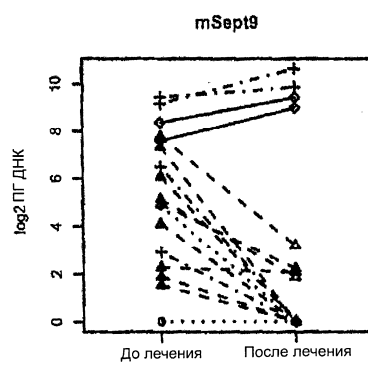
13. Применение набора по п.12, в котором область-мишень содержит или гибридизуется в жестких условиях с последовательностью по меньшей мере из 25 смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 16 и причем указанный по меньшей мере один набор олигонуклеотидов содержит два олигонуклеотида, последовательности которых в каждом случае идентичны, комплементарны или гибридизуются в жестких или особо жестких условиях с участком гена SEPTIN9 или RASSF2a протяженностью по меньшей мере 18 оснований.



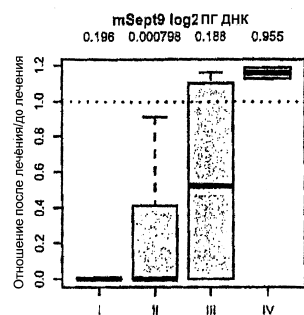
Фиг. 1



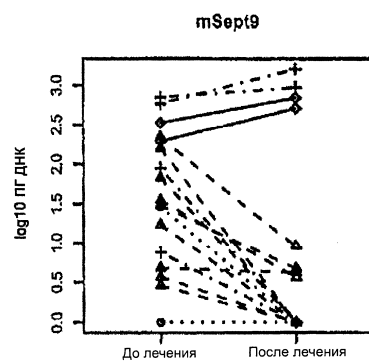
Фиг. 2



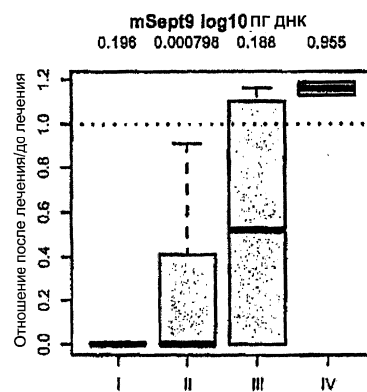
Фиг. 3



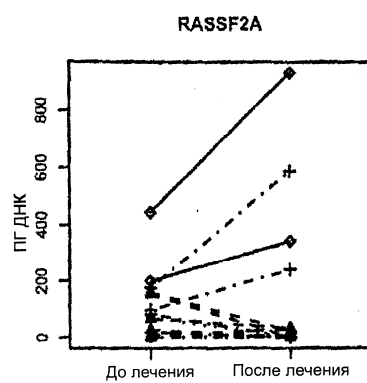
Фиг. 4



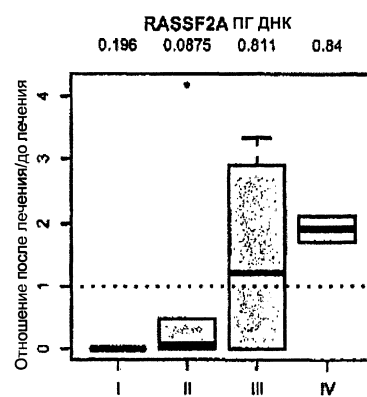
Фиг. 5



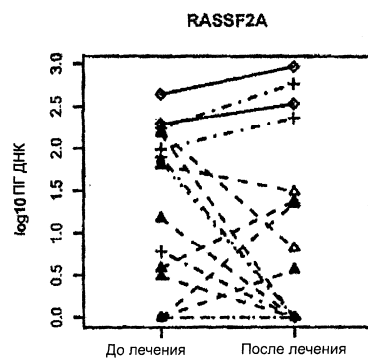
Фиг. 6



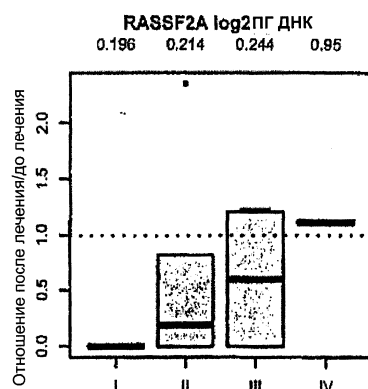
Фиг. 7



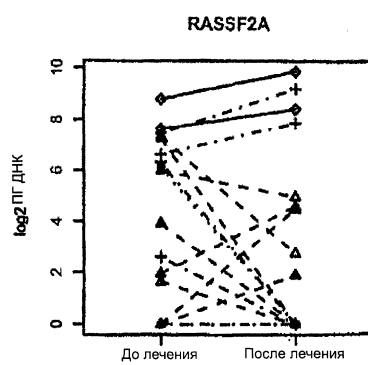
Фиг. 8



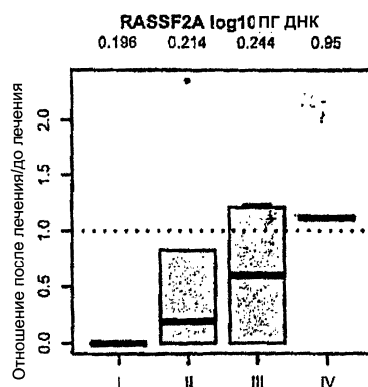
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

