

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034953**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.10

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

(21) Номер заявки
201501004

(22) Дата подачи заявки
2015.08.03

(54) СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(43) 2017.02.28

(96) 2015000072 (RU) 2015.08.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ДЖИНЭКСТ" (RU)**

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

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

(56) VAANANEN Riina-Minna. Quantitative analysis of novel prostate cancer markers in tissue. Painosalama Oy - Turku, Finland 2014, p.1-98, especially pp. 32-55, table 6

YE Jian et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 2012, 13, 134, doi;10.1186/1471-2105-13-14, pp. 1-11

SARAMAKI Outi R. et al. Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. Int. J. Cancer, 2006, 119, pp. 1322-1329

GROSKOPF Jack et al. APTIMA PCA3 Molecular Urine Test: Development of a Method to Aid in the Diagnosis of Prostate Cancer. Clinical Chemistry, 2006, 52, 6, pp. 1089-1095

(57) Изобретение относится к области медицины, точнее к средствам для выявления онкологических заболеваний простаты. Предложен способ получения ДНК-праймеров и зондов для неинвазивной диагностики рака предстательной железы посредством определения уровня экспрессии гена PCA3 по генетическому материалу из образца мочи пациента. Также предложен набор праймеров и зондов для неинвазивной диагностики рака предстательной железы и способ неинвазивной диагностики рака предстательной железы с использованием этого набора.

B1

034953

**034953
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

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

Уровень техники

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

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

В настоящее время методами диагностики рака предстательной железы являются:
 исследование уровня простатического специфического антигена (ПСА) крови;
 трансректальная эхография (трансректальное ультразвуковое исследование простаты);
 ректальное пальцевое обследование простаты;
 биопсия предстательной железы;
 магнитно-резонансная томография;
 радиоизотопные исследования;
 рентгенологические обследования;
 компьютерная томография;
 ультразвуковое исследование брюшной полости;
 урофлоуметрия.

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

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

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

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

Раскрытие изобретения

В настоящем тексте использованы следующие сокращения:

ПСА - простатический специфический антиген;
 ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота;
 РНК - рибонуклеиновая кислота;
 ПЦР - полимеразная цепная реакция;
 ЭДТА - этилендиаминтетраацетат натрия;
 РСА3 - prostate cancer antigen 3;
 KLK3 - kallikrein-related peptidase 3.
 СОМТ - catechol-O-methyl transferase.
 кДНК - комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота.
 dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate.

Задача настоящего изобретения состоит в создании способа определения уровня экспрессии гена РСА3 в образце мочи пациента и диагностического набора для его осуществления, позволяющего проводить неинвазивную диагностику рака предстательной железы по образцу мочи пациента.

Определение уровня экспрессии гена РСА3 предполагает проведение количественного анализа на транскрипт названного гена, то есть его РНК. Из-за низкой воспроизводимости результатов выделения нуклеиновых кислот необходимо проводить выравнивание результатов по транскрипту (РНК) другого гена, экспрессия которого относительно стабильна. В качестве такого гена нами выбран KLK3.

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

При разработке методик детекции количества копий кДНК с помощью разрушаемых олигонуклео-

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

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

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

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

характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

гомологичные им по меньшей мере на 95 % олигонуклеотиды.

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

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

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

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

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

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

гомологичные им по меньшей мере на 95 % олигонуклеотиды.

Прямой праймер, обратный праймер и зонд для PCA3 предпочтительно выбраны из группы олигонуклеотидов, включающей (в строках ниже первым указан прямой праймер, вторым - обратный праймер, третьим - зонд):

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

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

и гомологичные им по меньшей мере на 95 % олигонуклеотиды.

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

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

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

приблизительно 67 мМ трис-НСl, рН 8,8 при 25°C,
 приблизительно 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄,
 приблизительно 6,7 мМ MgCl₂,
 приблизительно 6,7 мкМ ЭДТА,
 приблизительно 170 мкг БСА, и
 смесь четырех основных dNTP в концентрации приблизительно 0,2 мМ каждого.

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

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

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

При этом предлагаемый способ предусматривает следующие стадии:

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

Предпочтительно, когда на стадии (3) вышеописанного способа:

начальное плавление проводят в течение 1-5 мин при температуре 94-96°C,
 цикл, включающий плавление в течение 10-30 с при температуре 94-96°C, проводят 30-60 раз,
 отжиг и синтез при температуре 58-66°C осуществляют в течение 30-60 мин, а детекцию продуктов полимеразной цепной реакции проводят во время стадии отжига.

Желательно, когда обратную транскрипцию в вышеописанном способе проводят 50-150 единицами ревертазы в течение 30-90 мин при температуре 36-43°C. Предпочтительно, когда концентрация праймеров в реакционной смеси в вышеописанном способе составляет 400±100 нМ, зондов - 200±50 нМ, а температура отжига - 60±5°C.

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

Краткое описание фигур

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

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

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

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

Осуществление изобретения

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

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

В качестве такого гена выбран KLK3.

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

Синтезированы праймеры и зонды для амплификации кДНК участков названных генов.

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

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

и/или

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

На основе полученных значений можно сделать вывод о том, что особенно предпочтительными для

набора по изобретению являются следующие сочетания праймеров и зондов: COMT-6 (III) (COMT-F7; COMT-R12; COMT-Z5); PSA-3 (III) (PSA-F8; PSA-R8; PSA-Z2); PCA3-9 (III) (PCA3-F4; PCA3-RE1; PCA3-Z2); PCA3-3 (II) (PCA3-ex1-F3; PCA3-ex2-R3; PCA3-ex12-FAM3).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и характеристики праймеров и зондов

Система	Праймер	Длина	Tm	gC%	Последовательность (5'-3')	Экзон 5'	Экзон 3'	Локализация	Продукт	Продукт на геномной ДНК
COMT-3 (III)	1 COMT-F5	19	59.93	57.89	tgccgtgaaggacaagtc (SEQ ID NO: 11)	tgccgtgaaggacaag	gtc	ex2-3	160	4804
	2 COMT-R5	20	59.67	55.00	caggccacattctccaaga (SEQ ID NO: 12)	caggccacattc	ctccaaga	ex3-4		
	3 COMT-Z5	20	59.97	70.00	aggaccggtacctgccggac (SEQ ID NO: 13)	-	-	ex3		
COMT-6 (III)	4 COMT-F7	19	59.93	57.89	ctggcgtgaaggacaaggt (SEQ ID NO: 21)	ctggcgtgaaggacaag	gt	ex2-3	162	4806
	5 COMT-R12	18	59.64	61.11	gcaggccacattctcca (SEQ ID NO: 22)	gcaggccacattc	ctcca	ex3-4		
	6 COMT-Z5	20	59.97	70.00	aggaccggtacctgccggac (SEQ ID NO: 13)	-	-	ex3		
COMT-3 (II)	7 COMT-ex4-F3	17	63.20		ggatggtgatttcgct (SEQ ID NO: 31)	-	-	ex4	172	
	8 COMT-ex6-	18	62.20		ccacattctccaagaga	ccacattc	ctccaagaga	ex5-6		
	R3				(SEQ ID NO: 32)					
	9 COMT-ex46-FAM3	25	72.00		cacactggacatggtcttctctgac (SEQ ID NO: 33)	-	-	ex5		
PSA-1 (III)	10 PSA-F4	20	59.82	60.00	ctgtctcggatttggagg (SEQ ID NO: 41)	-	-	ex2	160	1789
	11 PSA-R4	22	60.03	45.45	gcaagatcacgcttttctct (SEQ ID NO: 42)	gcaagatcacgctttg	ttctct	ex2-3		
	12 PSA-Z2	20	59.98	65.00	gcagtctcggcggtgttct (SEQ ID NO: 43)	-	-	ex2		
PSA-2 (III)	13 PSA-F5	20	59.82	60.00	cctgtctcggatttggagg (SEQ ID NO: 51)	-	-	ex2	162	1791
	14 PSA-R5	22	60.03	45.45	agcaagatcacgcttttctcc (SEQ ID NO: 52)	agcaagatcacgctttg	ttcc	ex2-3		
	15 PSA-Z2	20	59.98	65.00	gcagtctcggcggtgttct (SEQ ID NO: 43)	-	-	ex2		
PSA-3 (III)	16 PSA-F8	20	60.39	55.00	ctgggagtgcgagaagcatt (SEQ ID NO: 61)	-	-	ex2	139	1768
	17 PSA-R8	23	59.75	43.48	caagatcacgcttttctctga (SEQ ID NO: 62)	caagatcacgctttg	ttctctga	ex2-3		
	18 PSA-Z2	20	59.98	65.00	gcagtctcggcggtgttct	-	-	ex2		

						(SEQ ID NO: 43)							
PSA-2 (II)	19	PSA-ex1-F2	17	64.20		gtccgtgacgtggattg (SEQ ID NO: 71)	-	-	ex1	189			
	20	PSA-ex3-R2	18	62.10		atcacgctttgttctg (SEQ ID NO: 72)	atcacgctttg	ttctg	ex2-3				
	21	PSA-ex13-FAM2	20	72.50		ccagaacaccgccagact (SEQ ID NO: 73)	-	-	ex2				
PSA (I)	22	PSA-ex2-F	18	64.70		ggagtgcgagaagcattc (SEQ ID NO: 81)	-	-	ex2	182			
	23	PSA-ex3-R	18	64.30		atacttgcctgtgtctt (SEQ ID NO: 82)	-	-	ex3				
	24	PSA-ex23-FAM	24	69.20		tgcatacaggaaacaaagcgtgatc (SEQ ID NO: 83)	tgcatacaggaa	caaaagcgtgatc	ex2-3				
PCA3-1 (III)	25	PCA3-F3	24	59.35	45.83	gacctgatgatacagaggtagaa (SEQ ID NO: 91)	gacctgatgatacagag	gtgagaa	ex1-2	218	19595		
	26	PCA3-R2	20	59.15	55.00	ggcatttctcccaggatct (SEQ ID NO: 92)	ggcatttctcccaggat	ct	ex2-3				
	27	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-2	28	PCA3-F3	24	59.35	45.83	gacctgatgatacagaggtagaa (SEQ ID NO: 91)	gacctgatgatacagag	gtgagaa	ex1-2	210	19587		
(III)						(SEQ ID NO: 91)						(19349)	
	29	PCA3-R3	20	60.25	55.00	tcccaggatctctgtgctt (SEQ ID NO: 102)	tcccaggat	ctctgtgctt	ex2-3				
	30	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-3 (III)	31	PCA3-F3	24	59.35	45.83	gacctgatgatacagaggtagaa (SEQ ID NO: 91)	gacctgatgatacagag	gtgagaa	ex1-2	208	19585 (19349)		
	32	PCA3-RE1	20	59.82	60.00	cccaggatctctgtgcttc (SEQ ID NO: 112)	cccaggat	ctctgtgcttc	ex2-3				
	33	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-4 (III)	34	PCA3-F3	24	59.35	45.83	gacctgatgatacagaggtagaa (SEQ ID NO: 91)	gacctgatgatacagag	gtgagaa	ex1-2	209	19586 (19349)		
	35	PCA3-RE2	20	59.82	60.00	cccaggatctctgtgcttc (SEQ ID NO: 122)	cccaggat	ctctgtgcttc	ex2-3				
	36	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-8 (III)	37	PCA3-F4	23	60.05	47.83	aggacctgatgatacagaggtaga (SEQ ID NO: 131)	aggacctgatgatacagag	gtga	ex1-2	212	19589 (19351)		
	38	PCA3-R3	20	60.25	55.00	tcccaggatctctgtgctt	tcccaggat	ctctgtgctt	ex2-3				

					(SEQ ID NO: 102)								
	39	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-9 (III)	40	PCA3-F4	23	60.05	47.83	aggacctgatgatacagaggtga (SEQ ID NO: 31)	aggacctgatgatacagag	gtga	ex1-2	210	19587 (19351)		
	41	PCA3-RE1	20	59.82	60.00	ccagggatctctgtgcttcc (SEQ ID NO: 112)	ccagggat	ctctgtgcttcc	ex2-3				
	42	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-10 (III)	43	PCA3-F4	23	60.05	47.83	aggacctgatgatacagaggtga (SEQ ID NO: 131)	aggacctgatgatacagag	gtga	ex1-2	211	19588 (19351)		
	44	PCA3-RE2	20	59.82	60.00	cccagggatctctgtgcttc (SEQ ID NO: 122)	cccagggat	ctctgtgcttc	ex2-3				
	45	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-11 (III)	46	PCA3-F4	23	60.05	47.83	aggacctgatgatacagaggtga (SEQ ID NO: 131)	aggacctgatgatacagag	gtga	ex1-2	158	19307		
	47	PCA3-R9	21	60.20	47.62	ggggctggaatgtcaaaaa (SEQ ID NO: 142)	-	-	ex2				
	48	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct	-	-	ex2				
					(SEQ ID NO: 93)								
PCA3-12 (III)	49	PCA3-F4	23	60.05	47.83	aggacctgatgatacagaggtga (SEQ ID NO: 131)	aggacctgatgatacagag	gtga	ex1-2	164	19313		
	50	PCA3-R11	22	59.70	45.45	tttaaggggctggaatgtgc (SEQ ID NO: 152)	-	-	ex2				
	51	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-14 (III)	52	PCA3-F5	23	59.68	52.17	ggacctgatgatacagaggtgag (SEQ ID NO: 161)	ggacctgatgatacagag	gtgag	ex1-2	211	19588 (19350)		
	53	PCA3-R3	20	60.25	55.00	tcccagggatctctgtgctt (SEQ ID NO: 102)	tcccagggat	ctctgtgctt	ex2-3				
	54	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-15 (III)	55	PCA3-F5	23	59.68	52.17	ggacctgatgatacagaggtgag (SEQ ID NO: 161)	ggacctgatgatacagag	gtgag	ex1-2	209	19586 (19350)		
	56	PCA3-RE1	20	59.82	60.00	ccagggatctctgtgcttcc (SEQ ID NO: 112)	ccagggat	ctctgtgcttcc	ex2-3				
	57	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgagccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2				
PCA3-16	58	PCA3-F5	23	59.68	52.17	ggacctgatgatacagaggtgag	ggacctgatgatacagag	gtgag	ex1-2	210	19587		

(III)					(SEQ ID NO: 161)					(19350)	
	59	PCA3-RE2	20	59.82	60.00	cccagggatctctgtgcttc (SEQ ID NO: 122)	cccagggat	ctctgtgcttc	ex2-3		
	60	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgaggccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2		
PCA3-17 (III)	61	PCA3-F5	23	59.68	52.17	ggacctgatgatacagaggtgag (SEQ ID NO: 161)	ggacctgatgatacagag	gtgag	ex1-2	157	
	62	PCA3-R9	21	60.20	47.62	ggggctggaatgtgcaaaa (SEQ ID NO: 142)	-	-	ex2		19306
	63	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgaggccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2		
PCA3-18 (III)	64	PCA3-F5	23	59.68	52.17	ggacctgatgatacagaggtgag (SEQ ID NO: 161)	ggacctgatgatacagag	gtgag	ex1-2	163	
	65	PCA3-R11	22	59.70	45.45	tttaaagggctggaatgtgc (SEQ ID NO: 152)	-	-	ex2		19312
	66	PCA3-Z2	24	59.94	54.17	accatctgaggccacacatctgct (SEQ ID NO: 93)	-	-	ex2		
PCA3-3 (II)	67	PCA3-ex1-F3	20	63.00		cctgatgatacagaggtgag (SEQ ID NO: 171)	cctgatgatacagag	gtgag	ex1-2	103	
	68	PCA3-ex2-R3	22	62.60		cttctgtttctagtgtgta	-	-	ex2		
					(SEQ ID NO: 172)						
	69	PCA3-ex12-FAM3	24	72.30		cctcagatgtaaatcagcagcc (SEQ ID NO: 173)	-	-	ex2		

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

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

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

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

Перечень последовательностей.

<110> Общество с ограниченной ответственностью "Джинэксст"

<120> СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<130> 201501004/26

<140> 201501004/26

<141> 2015-03-08

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

tggcgtgaag gacaaggtc

19

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2

caggccacat tcctccaaga

20

<210> 3

<211> 20

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

aggaccggta cctgccggac

20

<210> 4

<211> 19

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 4

ctggcgtgaa ggacaaggt

19

<210> 5

<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 5
gcaggccaca ttcctcca
18

<210> 6
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 6
aggaccggta cctgccggac
20

<210> 7
<211> 17
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 7
ggatggtgga tttcgct
17

<210> 8
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 8
ccacattcct ccaagaga
18

<210> 9
<211> 25
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 9
cacactggac atggtcttcc tcgac
25

<210> 10
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 10
ctgtctcgga ttgtgggagg
20

<210> 11
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 11
gcaagatcac gcttttgttc ct
22

<210> 12
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 12
gcagtctgcg gcggtgttct
20

<210> 13
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 13
cctgtctcgg attgtgggag
20

<210> 14
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 14
agcaagatca cgcttttgtt cc
22

<210> 15
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15
gcagtctgcg gcggtgttct
20

<210> 16
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 16
ctgggagtgc gagaagcatt
20

<210> 17
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 17
caagatcacg cttttgttcc tga
23

<210> 18
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 18
gcagtctgcg gcggtgttct
20

<210> 19
<211> 17
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 19
gtccgtgacg tggattg
17

<210> 20
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 20
atcacgcttt tgttcctg
18

<210> 21
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 21
ссagaасacc gccgсagact
20

<210> 22
<211> 18

<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 22
ggagtgcgag aagcattc
18

<210> 23
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 23
atacctggcc tgtgtctt
18

<210> 24
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 24
tgcatacagga acaaaaagcgt gatc
24

<210> 25
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 25
gacctgatga tacagaggtg agaa
24

<210> 26
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 26
ggcatttctc ccagggatct
20

<210> 27
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 27
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 28
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 28
gacctgatga tacagaggtg agaa
24

<210> 29
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 29
tcccagggat ctctgtgctt
20

<210> 30
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 30
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 31
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 31
gacctgatga tacagaggtg agaa
24

<210> 32
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 32
ccagggatct ctgtgcttcc
20

<210> 33
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 33

accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 34
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 34
gacctgatga tacagaggag agaa
24

<210> 35
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 35
cccagggatc tctgtgcttc
20

<210> 36
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 36
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 37
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 37
aggacctgat gatacagagg tga
23

<210> 38
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 38
tcccaggat ctctgtgctt
20

<210> 39
<211> 24
<212> ДНК

<213> Homo sapiens
<400> 39
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 40
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 40
aggacctgat gatacagagg tga
23

<210> 41
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 41
ccagggatct ctgtgcttcc
20

<210> 42
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 42
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 43
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 43
aggacctgat gatacagagg tga
23

<210> 44
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 44
cccagggatc tctgtgcttc
20

<210> 45
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 45
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 46
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 46
aggacctgat gatacagagg tga
23

<210> 47
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 47
ggggctggaa atgtgcaaaa a
21

<210> 48
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 48
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 49
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 49
aggacctgat gatacagagg tga
23

<210> 50
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 50
tttaaagggg ctggaaatgt gc

22

<210> 51
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 51
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 52
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 52
ggacctgatg atacagaggt gag
23

<210> 53
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 53
tcccagggat ctctgtgctt
20

<210> 54
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 54
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 55
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 55
ggacctgatg atacagaggt gag
23

<210> 56
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 56
ccagggatct ctgtgcttcc
20

<210> 57
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 57
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 58
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 58
ggacctgatg atacagaggt gag
23

<210> 59
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 59
cccagggatc tctgtgcttc
20

<210> 60
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 60
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 61
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 61
ggacctgatg atacagaggt gag
23

<210> 62

<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 62
ggggctggaa atgtgcaaaa a
21

<210> 63
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 63
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 64
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 64
ggacctgatg atacagaggt gag
23

<210> 65
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 65
tttaaagggg ctggaaatgt gc
22

<210> 66
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 66
accatctgag gccacacatc tgct
24

<210> 67
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 67
cctgatgata cagaggtgag
20

<210> 68
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 68
cttgctgttt ctagtgatgt ta
22

<210> 69
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 69
cctcagatgg taaagtcagc agcc
24

Перечень последовательностей.

<110> Общество с ограниченной ответственностью "Джинэкст"
 <120> СПОСОБ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
 <130> 201501004/26
 <140> 201501004/26
 <141> 2015-03-08
 <160> 34
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 tggcgtgaag gacaaggtc
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 caggccacat tcctccaaga
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 aggaccggta cctgccggac
 <210> 21
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 ctggcgtgaa ggacaagggt
 <210> 22
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 gcaggccaca ttcctcca
 <210> 31
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 aggacctgat gatacagaggat tga
 <210> 32
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 ccacattcct ccaagaga
 <210> 33
 <211> 25

<212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 cacactggac atggctttcctcgac tcgac
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 ctgtctcgga ttgtgggagg
 <210> 42
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 gcaagatcac gcttttgttct ct
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 gcagtctgcg gcggtgttct
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 51
 cctgtctcgg attgtgggag
 <210> 52
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 52
 agcaagatca cgcttttgttcc cc
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 ctgggagtgc gagaagcatt
 <210> 62
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 caagatcacg cttttgttctga tga
 <210> 71
 <211> 17
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 71
 gtccgtgacg tggattg

```

<210> 72
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 72
atcacgcttt tgttcctg
<210> 73
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 73
ccagaacacc gccgcagact
<210> 81
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 81
ggagtgcgag aagcattc
<210> 82
<211> 18
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 82
atacctggcc tgtgtctt
<210> 83
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 83
tgcatacagga acaaaagcgtgac gatc
<210> 91
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 91
gacctgatga tacagaggtgagaa agaa
<210> 92
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 92
ggcatttctc ccagggatct
<210> 93
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 93
accatctgag gccacacatctgct tgct
<210> 102
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 102
tcccagggat ctctgtgctt
<210> 112
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 112
ccagggatct ctgtgcttcc
<210> 122
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 122
cccagggatc tctgtgcttc
<210> 131
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 131
aggacctgat gatacagaggatga tga
<210> 142
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 142
ggggctggaa atgtgcaaaaa a
<210> 152
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 152
tttaaagggg ctggaaatgtgc gc
<210> 161
<211> 23
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 161
ggacctgatg atacagaggatgag gag
<210> 171
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 171
cctgatgata cagaggatgag
<210> 172
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 172
cttgctgttt ctagtgatgtta ta
<210> 173
<211> 24
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 173
cctcagatgg taaagtcagcagcc agcc

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

(а) образец кодирующей дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК), соответствующей рибонуклеиновой кислоте (РНК) гена PCA3 (prostate cancer antigen 3);

(б) образец кДНК, соответствующей РНК гена KLK3 (kallikrein-3);

(в) образец кДНК, соответствующей РНК гена COMT (catechol-O-methyltransferase);

(г) образец геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) человека;

характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

и гомологичные им по меньшей мере на 95% олигонуклеотиды.

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

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

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

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

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

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

гомологичные им по меньшей мере на 95% олигонуклеотиды.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173 и

и гомологичные им по меньшей мере на 95% олигонуклеотиды.

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

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

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

приблизительно 67 мМ трис-НСl, рН 8,8 при 25°С,
 приблизительно 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄,
 приблизительно 6,7 мМ MgCl₂,
 приблизительно 6,7 мкМ ЭДТА,
 приблизительно 170 мкг БСА и
 смесь четырех основных dNTP в концентрации приблизительно 0,2 мМ каждого.

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

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

(а) образец мочи пациента;

(б) набор по любому из пп.2-9;

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

характеризующийся тем, что он предусматривает следующие стадии:

(1) выделяют РНК из образца (а);

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

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

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

12. Способ по п.11, характеризующийся тем, что на стадии (3) начальное плавление проводят в течение 1-5 мин при температуре 94-96°С, цикл, включающий плавление в течение 10-30 с при температуре 94-96°С, проводят 30-60 раз,

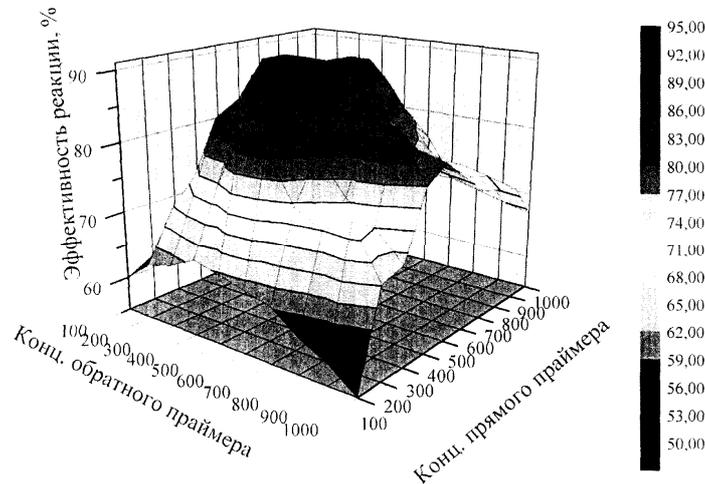
отжиг и синтез при температуре 58-66°С осуществляют в течение 30-60 мин,

а детекцию продуктов полимеразной цепной реакции проводят во время стадии отжига.

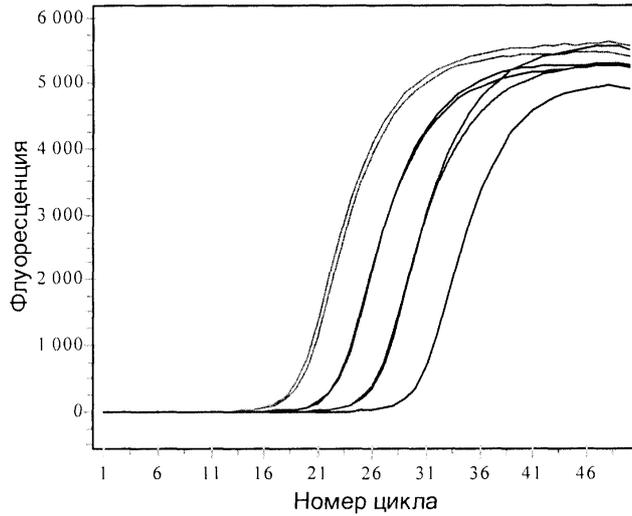
13. Способ по любому из пп.11 или 12, характеризующийся тем, что в нем обратную транскрипцию проводят 50-150 единицами ревертазы в течение 30-90 мин при температуре 36-43°С.

14. Способ по любому из пп.11-13, характеризующийся тем, что в нем концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 400±100 нМ, зондов - 200±50 нМ, а температура отжига - 60±5°С.

15. Способ по любому из пп.11-14, характеризующийся тем, что в нем в качестве диагностического показателя используют соотношение между сигналами от зондов для РСАЗ и сигналами от зондов КLK3 и/или СОМТ.

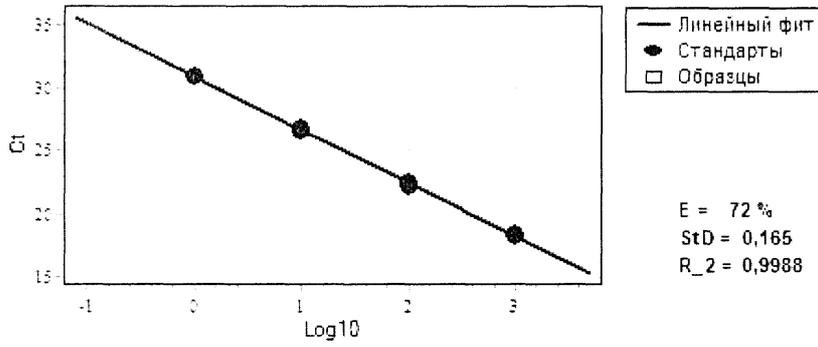


Фиг. 1

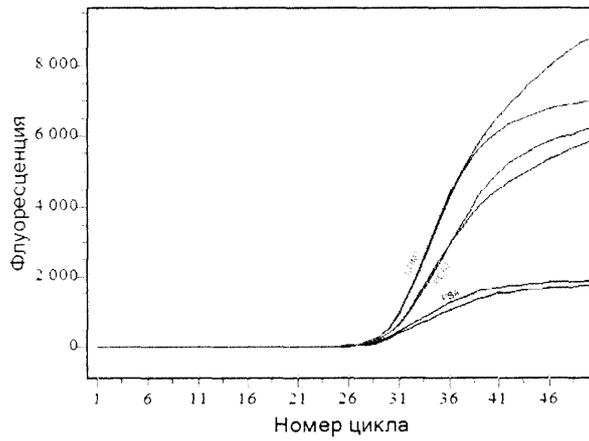


Фиг. 2

$$Y = 30,887 - 4,244 * X$$

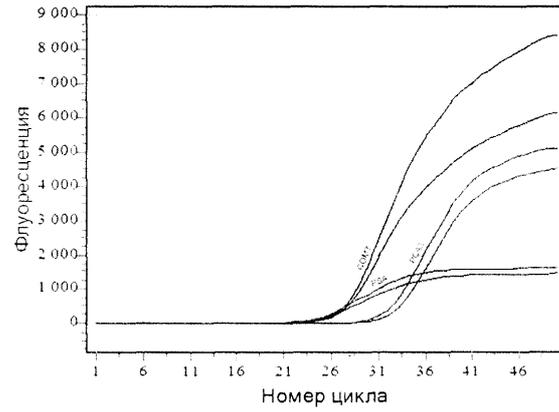


Фиг. 3



Пороговый цикл			Относит. уровень РСАЗ/КЛКЗ	Результат
СОМТ	КЛКЗ	РСАЗ		
29,50	28,30	29,60	406,126198	+

Фиг. 4



Пороговый цикл			Относит. уровень PCA3/KIK3	Результат
COMT	KIK3	PCA3		
27,00	24,20	32,00	4,487103	-

Фиг. 5

