

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991883** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.06

(51) Int. Cl. **C12Q 1/6886 (2018.01)**

(22) Дата подачи заявки
2018.03.09

(54) КЛАССИФИКАТОР МЕТИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНВАЗИВНЫХ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВПЧ, РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ И АНОГЕНИТАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ, НЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ВПЧ, И ИХ ПОРАЖЕНИЙ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ

(31) 17160346.7

(32) 2017.03.10

(33) EP

(86) PCT/NL2018/050143

(87) WO 2018/164577 2018.09.13

(71) Заявитель:
СЕЛФ-СКРИН Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Мейер Христофорус Йоаннес
Ламбертус Мария, Стенберген Ренске
Даниэла Мария, Снейдерс Петрус
Йозефус Фердинандус, Хейдеман
Данилле Анна Мария (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу выявления предраковых поражений высокой степени, индуцированных ВПЧ, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, и раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ, включающему выявление классификатора метилирования, состоящего из генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторной последовательности, в клетке, причем такое гиперметилирование указывает на присутствие поражений-предшественников с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, а также раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ. Настоящее изобретение также включает применение классификатора метилирования, состоящего из генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторной последовательности, в таком способе и набор для анализа для выявления метилирования LHX8, ASCL1 и/или ST6GALNAC5.

A1

201991883

201991883

A1

**КЛАССИФИКАТОР МЕТИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ИНВАЗИВНЫХ РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВПЧ,
РАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ И
АНОГЕНИТАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ, НЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ВПЧ, И ИХ
5 ПОРАЖЕНИЙ-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ**

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение принадлежит к области профилактики и медицинской
диагностики рака и относится к молекулярно-диагностическому анализу раковых
10 заболеваний, в частности, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных
вирусом папилломы человека (ВПЧ), и предшествующих им поражений-
предшественников высокой степени, например, инвазивного рака шейки матки и
предраковых патологических изменений (поражений) шейки матки, а также
раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не
15 индуцированных ВПЧ. В частности, настоящее изобретение относится к
применению классификатора метилирования на основании генов LHX8, ASCL1 и
ST6GALNAC5 и их регуляторных последовательностей в качестве маркера для
инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧвр, раковых заболеваний
женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ, и
20 соответствующих предраковых поражений (поражений-предшественников) с
инвазивным потенциалом.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рак шейки матки - четвертый по распространенности вид рака у женщин
25 и причина приблизительно 250000 смертей от рака в год.

Плоскоклеточная карцинома шейки матки характеризуется
последовательностью предраковых патологических изменений, так называемой
цервикальной интраэпителиальной неоплазией (ЦИН, CIN), дифференцируемой
на неоплазию 1-3 степени, называемые легкой дисплазией (ЦИН 1), умеренной
30 дисплазией (ЦИН 2) и тяжелой дисплазией/карциномой in situ (ЦИН 3),
соответственно. ЦИН 1 также называют плоскоклеточным интраэпителиальным
поражением низкой степени (LSIL), а ЦИН 2 и ЦИН 3 совместно называют
плоскоклеточным интраэпителиальным поражением высокой степени (HSIL).
Установленным поражением-предшественником аденокарциномы шейки матки
35 является аденокарцинома in situ (ACIS). В принципе эти предраковые поражения
обратимы, но чем тяжелее поражение, тем меньше шанс спонтанной регрессии.

Рак шейки матки считается предотвращаемым заболеванием, поскольку предраковые стадии можно обнаружить посредством эксфолиативной цитологии и, при необходимости, сравнительно легко вылечить с незначительными побочными эффектами. Целью скрининга шейки матки является ранняя диагностика предраковых поражений высокой степени (т.е. ЦИН 2/3 и аденокарциномы *in situ*) и поддающихся лечению раковых поражений, что позволяет снизить смертность от инвазивного рака шейки матки. Общепринятая медицинская практика включает лечение всех женщин с морфологически подтвержденными ЦИН 2, ЦИН 3 и аденокарциномой *in situ* с целью предотвращения развития рака шейки матки.

За последнее десятилетие хорошо установлено, что канцерогенез рака шейки матки инициируется инфекцией вирусом папилломы человека высокого риска (ВПЧвр). Показано, что экспрессия вирусных онкогенов E6 и E7, вызывающих нарушения в путях супрессии опухолей p53 и Rb, соответственно, имеет важное значение как для начала онкогенеза, так и для поддержания злокачественного фенотипа. Таким образом, тест на ВПЧвр является привлекательным инструментом первичного скрининга. Однако, для прогрессирования клетки, инфицированной ВПЧвр, до клетки инвазивного рака необходимы дополнительные изменения генома клетки-хозяина, что согласуется с многоэтапным процессом канцерогенеза. Предраковые поражения шейки матки высокой степени (ЦИН 2/3) и, при отсутствии лечения, рак шейки матки развивается лишь у небольшой доли женщин, инфицированных ВПЧ высокого риска. У большинства женщин с предраковыми поражениями шейки матки происходит спонтанная регрессия поражений. Положительный результат теста на ВПЧвр имел место у приблизительно 5-6% женщин, участвовавших в скрининге популяции. Однако лишь не более 20% из них (1% женщин-участников) имеют ЦИН $\geq 2/3$. Таким образом, без использования для мазков шейки матки маркеров, обеспечивающих стратификацию ВПЧвр-положительных женщин с риском развития $\geq$ ЦИН 2/3 и $\geq$ аденокарциномы *in situ*, первичный скрининг посредством теста на ВПЧвр будет сопровождаться значительным количеством избыточных процедур в рамках последующего наблюдения и излишним беспокойством у женщин.

Основная сложность заключается в том, чтобы снизить долю женщин с положительными результатами теста на ВПЧ по отношению к женщинам с клинически значимыми поражениями. Один из способов заключается в

применении цитологии в качестве вторичного (так называемого сортировочного или классифицирующего) теста для ВПЧвр-положительных женщин. Однако при этом остается значительное количество ВПЧвр-положительных женщин с нормальной цитологией (3,5% женщин в популяции, проходящей скрининг), у 10% из которых есть или развивается $\geq$ ЦИН 3. Кроме того, цитология недоступна для анализа образцов из влагалища и шейки матки, которые пациентка может самостоятельно получить на дому, поскольку они не являются представительными для цитологического состояния шейки матки. Еще один способ заключается в применении генотипирования ВПЧ16/18. Однако при этом для женщин с ВПЧ, относящимся к ВПЧ16/18, остается, хотя и меньшей степени, риск развития $\geq$ ЦИН 2/3 и $\geq$ аденокарциномы *in situ*. Таким образом, существует потребность во вспомогательных или альтернативных сортировочных инструментах для стратификации ВПЧвр-положительных женщин на женщин с $\geq$ ЦИН 2/3 и $\geq$ аденокарциномой *in situ* и без них.

Первичный скрининг рака шейки матки по маркерам заболевания на основе изменений раковых генов в клетках-хозяевах обеспечивает перспективную альтернативу при условии достаточно высокой специфичности и чувствительности. Этот способ представляет особенный интерес для стран с низким и средним доходом, где отсутствует контроль качества цитологических анализов и затруднено внедрение алгоритмов последующего наблюдения ВПЧ-положительных женщин. Показано, что самостоятельный пробоотбор в этих странах облегчает доступ к скринингу шейки матки (Laczano-Ponce et al., Lancet. 2011; 378: 1868-1873). В этом смысле очень полезно иметь маркеры, которые также преобладают в самостоятельно взятых образцах. По-видимому, существуют значимые различия в «поведении» маркеров в мазках из влагалища, полученных квалифицированным медицинским персоналом, например, врачами или медсестрами, и в мазках из влагалища, самостоятельно полученных женщиной. Оказалось, что многие маркеры, пригодные для образцов, полученных врачом, нельзя использовать в самостоятельно полученных образцах. Необходимость работы с самостоятельно полученными образцами вместо образцов, полученных врачом, актуальна для стран с низким и средним доходом, поскольку в этих странах на душу населения приходится меньшее число медицинского персонала и зачастую имеют место культурные препятствия для допуска посторонних лиц к отбору образцов из влагалища. Кроме того, даже в высокоразвитых странах самостоятельный

пробоотбор является идеальным способом снижения затрат на получение образцов из влагалища для широкомасштабного скрининга рака шейки матки. Еще более высокого уровня охвата можно было бы ожидать, если бы для раннего выявления рака можно было использовать образцы мочи.

- 5 Рак эндометрия представляет собой наиболее распространенное гинекологическое злокачественное новообразование во многих развитых странах (Siegel et al., CA Cancer J. Clin., 64 (2014), стр. 9–29). Прогноз при ранних стадиях рака эндометрия весьма благоприятен. Таким образом, раннее выявление увеличивает шансы на излечение и позволяет избежать или снизить трудоемкость
- 10 и стоимость терапевтических вмешательств. Поскольку продемонстрировано отслоение опухолевых клеток в соскобах с шейки матки, раннее выявление рака эндометрия можно реализовать посредством неинвазивного пробоотбора. В то же время традиционная цитология соскобов с шейки матки обладает крайне низкой чувствительностью в отношении выявления рака эндометрия. Анализ
- 15 молекулярных изменений, например, метилирования ДНК, ассоциированных с раком эндометрия, может обеспечить перспективный подход к раннему выявлению рака эндометрия (de Strooper et al., J Clin Pathol. 2014;67(12):1067-71, Bakkum-Gamez et al. Gynecol Oncol. 2015;137(1):14-22). Аналогичным образом, недавно предложен анализ специфичных для рака изменений ДНК в соскобах с шейки
- 20 матки с целью выявления рака яичников (Kindle et al., Sci Transl Med. 2013; 5(167):1-21).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 25 Авторы настоящего изобретения нашли способ выявления инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ, и их предраковых поражений высокой степени, причем указанный способ включает выявление гиперметилирования в последовательности генов (генной последовательности) LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 или в регуляторной
- 30 последовательности этих генов в клетке, при этом такое гиперметилирование указывает на присутствие поражений-предшественников с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, и/или раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ. В предпочтительном варианте

при таком способе указанное предраковое поражение высокой степени, индуцированное ВПЧ, или инвазивная карцинома, индуцированная ВПЧ, представляет собой предраковое поражение шейки матки высокой степени или инвазивный рак шейки матки, в более предпочтительном варианте - инвазивный рак шейки матки, индуцированный ВПЧ высокого риска. В предпочтительном варианте указанный рак женских половых органов, не индуцированный ВПЧ, представляет собой рак эндометрия. В предпочтительном варианте указанный рак аногенитальной области, не индуцированный ВПЧ, представляет собой рак вульвы или полового члена.

В настоящее изобретение также включен способ выявления рака вульвы, и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, причем указанный способ включает выявление классификатора метилирования, состоящего из ASCL1 и одной или более последовательностей ZIC1, ZNF-582 и LHX8 в клетке, при этом такое гиперметилирование указывает на присутствие рака вульвы и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ.

Кроме того, изобретение включает способ выявления рака заднего прохода и предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, причем указанный способ включает выявление классификатора метилирования, состоящего из ASCL1 и одной или более последовательностей ZIC1 и ZNF-582, в клетке, при этом такое гиперметилирование указывает на присутствие рака заднего прохода и предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ.

Также частью настоящего изобретения является способ выявления рака яичников и предраковых поражений яичников, причем указанный способ включает выявление классификатора метилирования, состоящего из ASCL1 и одной или более последовательностей LHX8 и ZIC1 в клетке, при этом такое гиперметилирование указывает на присутствие рака яичников и предраковых поражений яичников.

В предпочтительном варианте реализации изобретения гиперметилирование выявляют в последовательностях, представленных на фигурах 1, 2, 3, 7 и 8. В другом предпочтительном варианте реализации указанное гиперметилирование представляет собой повышенное метилирование

классификатора метилирования, CpG-богатых последовательностей промотора и/или гена LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 и ST6GALNAC5, таких как регуляторные последовательности, исследуемой клетки по сравнению с сопоставимой здоровой клеткой.

5

В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения выявление (гипер)метилирования выполняют с применением эндонуклеазы рестрикции, чувствительной к метилированию, выбранной из группы, состоящей из BssHII, MspI, NotI и HpaII. В еще одном предпочтительном варианте реализации

10

настоящего изобретения выявление (гипер)метилирования выполняют с использованием нанотехнологии. В альтернативном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения выявление (гипер)метилирования выполняют посредством ПЦР, специфичной по отношению к метилированию, основанной на модификации ДНК бисульфитом с последующими специфическими реакциями

15

ПЦР, мишенью которых являются CpG-богатые последовательности. В предпочтительном варианте в таком способе реагент представляет собой нуклеотидный зонд или праймер, связывающийся с нуклеиновой кислотой, как показано на фигурах 1, 2 или 3, и, в более предпочтительном варианте, указанный нуклеотидный зонд или праймер содержит детектируемую метку.

20

В другом варианте реализации изобретения нуклеотидный зонд содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

а) полинуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться в жестких условиях с последовательностью ASCL1, приведенной на фигуре 1, или с последовательностью LHX8, приведенной на фигуре 2, или с последовательностью ST6GALNAC5, приведенной на фигуре 3; или с последовательностью ZIC1, приведенной на фигуре 8, или с последовательностью ZNF-582, приведенной на фигуре 7;

25

б) полинуклеотида, по меньшей мере на 70% идентичного полинуклеотиду по подпункту а);

30

в) полинуклеотида, комплементарного полинуклеотиду по подпункту а);

и

д) полинуклеотида, содержащего по меньшей мере 15 оснований нуклеотида по подпункту а) или б).

Далее предпочтительным в настоящем способе изобретения является определение метилирования последовательности генов LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 и ST6GALNAC5 или регуляторной последовательности этих генов.

Изобретение также включает применение LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 и

- 5 ST6GALNAC5 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления инвазивной карциномы, индуцированной ВПЧ, карциномы женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированной ВПЧ, и их предраковых поражений высокой степени. Частью настоящего изобретения является также применение классификатора метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в
 - 10 качестве молекулярного диагностического маркера для выявления предракового поражения высокой степени, индуцированного ВПЧ, или инвазивного рака, индуцированного ВПЧ, или рака женских половых органов или аногенитальной области, не индуцированного ВПЧ, предпочтительно, когда метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия
 - 15 указанного поражения, карциномы или рака. Также частью изобретения является применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из ZIC1, ZNF-582 и LHX8 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака вульвы или предракового поражения вульвы высокой степени, индуцированного ВПЧ, предпочтительно когда метилирование указанного маркера является
 - 20 прогностическим показателем присутствия указанного поражения или рака. Следующей частью изобретения является применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из ZIC1 и ZNF-582 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака заднего прохода или предракового поражения заднего прохода высокой степени, индуцированного ВПЧ,
 - 25 предпочтительно, когда метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия указанного поражения или рака.
- Далее, изобретение также включает применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из LHX8 и ZIC1 в качестве молекулярного диагностического
- 30 маркера для выявления рака яичника, предпочтительно, когда метилирование указанного маркера является прогностическим фактором присутствия указанного рака.

Изобретение также включает набор компонентов для применения в способе выявления инвазивной карциномы, индуцированной ВПЧ, карциномы

женских половых органов или аногенитальной области, не индуцированной ВПЧ, и их предраковых поражений высокой степени, причем указанный набор включает

- средства выявления метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и нуклеотидной последовательности LHX8 согласно фигуре 2 и нуклеотидной последовательности ST6GALNAC5 согласно фигуре 3;

- средства выявления метилирования ASCL1 и ST6GALNAC5, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и нуклеотидной последовательности ST6GALNAC5 согласно фигуре 3; или

- средства выявления метилирования ASCL1 и LHX8, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и нуклеотидной последовательности LHX8 согласно фигуре 2, или

- средства выявления ASCL1 и по меньшей мере одного из ZIC1, ZNF-582 и LHX8, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и любой из нуклеотидной последовательности ZNF-582 согласно фигуре 7, нуклеотидной последовательности ZIC1 согласно фигуре 8 и/или нуклеотидной последовательности LHX8 согласно фигуре 2;

Этот набор предпочтительно дополнительно содержит средства выявления инфекции ВПЧ, причем указанные средства включают зонды и праймеры, специфичные по отношению к ВПЧ.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 показана область промотора и CpG-богатая последовательность, экзон 1, гена ASCL1; кодирующая последовательность показана прописными буквами.

На фигуре 2 показана 5'-регуляторная область и кодирующая последовательность (экзон 1) гена LHX8. Кодирующая последовательность показана прописными буквами.

На фигуре 3 показана 5'-регуляторная область, кодирующая последовательность (экзон 1 и 2) и интрон 1 гена ST6GALNAC5. Кодирующая последовательность показана прописными буквами.

На фигуре 4 показаны блочные диаграммы уровней метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в ВПЧвр-положительных самостоятельно полученных образцах из шейки матки и влагалища, измеренных с помощью количественной ПЦР, ПЦР, специфичной по отношению к метилированию (qMSP), в образцах смыва (А) и в самостоятельно полученных с помощью щетки образцах (В). В анализе qMSP значения метилирования мишеней нормированы по референсному гену АСТВ с использованием сравнительного метода Ct ($2^{-\Delta Ct}$). На 5 10 оси Y представлены уровни метилированной ДНК; на оси X представлены значения контрольных субъектов (то есть женщин с $\leq$ ЦИН1), женщин с ЦИН2, ЦИН3 и плоскоклеточным раком шейки матки. Уровни метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 возрастают с тяжестью заболевания и значительно 15 повышены в группах ЦИН3 и SCC (плоскоклеточной карциномы) по сравнению с контрольными субъектами. Указаны значимые различия в уровнях метилирования между группами, * означает $<0,05$, ** означает $<0,005$, *** означает $<0,0005$. На С показаны кривые рабочих характеристик приёмника (ROC-кривые).

На фигуре 5А показаны блочные диаграммы уровней метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в соскобах шейки матки и образцах мочи 20 контрольных субъектов (то есть женщин с $\leq$ ЦИН1) и женщин с раком шейки матки, измеренных с помощью количественной ПЦР, специфичной по отношению к метилированию (qMSP). В анализе qMSP значения метилирования мишеней нормированы сравнением с эталонным геном АСТВ, используя сравнительный 25 метод Ct ($2^{-\Delta Ct}$). На оси Y представлены уровни метилированной ДНК; на оси X представлены значения контрольных субъектов (зеленый; женщины с $\leq$ ЦИН1) и женщин с раком шейки матки (красный). Уровни метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 значительно повышены как в соскобах, так и в моче женщин с раком шейки матки по сравнению с контрольными субъектами. Указаны значимые 30 различия в уровнях метилирования между группами, * означает $<0,05$, ** означает $<0,005$, *** означает $<0,0005$. На В показана кривая рабочих характеристик приёмника (ROC-кривая) любой комбинации маркеров в соскобах шейки матки ВПЧвр+, показывающая, что любая комбинация маркеров позволяет выявлять все раковые заболевания с высочайшей специфичностью. На фигуре В приведен

показана кривая рабочих характеристик приёмника (ROC-кривая) отдельных маркеров (слева) и любой комбинации маркеров в моче, показывающая, что комбинация из 3 маркеров позволяет выявлять все раковые заболевания с высочайшей специфичностью.

5

На фигуре 6 показаны блочные диаграммы уровней метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в соскобах шейки матки у женщин с раком эндометрия, измеренных с помощью количественной ПЦР, специфичной по отношению к метилированию. В анализе qMSP значения метилирования мишеней нормированы сравнением с эталонным геном ACTB, используя сравнительный метод Ct ($2^{-\Delta Ct}$). На осях Y представлены уровни метилированной ДНК; на осях X представлены значения контрольных женщин и женщин с раком эндометрия. Уровни метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 значительно повышены у женщин с раком эндометрия по сравнению с контрольными субъектами.

10

На фигуре 7 показана 5'-регуляторная область и кодирующая последовательность (экзон 1) ZNF-582. Кодирующая последовательность показана прописными буквами.

На фигуре 8 показана 5'-регуляторная область и кодирующая последовательность (экзон 1) ZIC1. Кодирующая последовательность показана прописными буквами.

20

На фигуре 9 показаны блочные диаграммы уровней метилирования (A) ASCL1, (B) ST6GALNAC5, (C) LHX8, (D) ZNF-582 и (E) ZIC1 в образцах тканей вульвы. Преобразованные логарифмически с основанием 2 уровни метилирования ДНК относительно эталонного гена ACTB (ось Y) изображены для здорового эпителия вульвы (зеленый), VIN без (желтый) и с (оранжевым) VSCC и случаи VSCC (красный). Уровни метилирования ДНК значительно повышены в группе VIN с риском рака (VIN с VSCC; оранжевый) и группе VSCC (красный) по сравнению с группой VIN без рака (желтый) и группой здорового эпителия вульвы (зеленый). VIN: интраэпителиальная неоплазия вульвы; VSCC: плоскоклеточная карцинома вульвы.

25

30

На фигуре 10 показаны блочные диаграммы уровней метилирования: (A) ASCL1, (B) ST6GALNAC5, (C) ZNF-582 и (D) ZIC1 в образцах анальной ткани. Преобразованные логарифмически с основанием 2 уровни метилирования ДНК

относительно эталонного гена АСТВ (ось у) изображены для различных гистологических категорий образцов анальной ткани от ВИЧ-положительных мужчин (ось X). Здоровые ткани и AIN1 (зеленый), AIN2 и AIN3 (оранжевый) и рак (SCC; красный) * и °: образцы с крайними и умеренными выбросами,

5 соответственно. Уровни метилирования всех 4 маркеров значимо возрастают с тяжестью анального заболевания. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, NS: не значимо.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин «инвазивный рак, индуцированный ВПЧ», относится к
 10 карциноме, индуцированной ВПЧ высокого риска, прорастающей в окружающую ткань. Сюда входят все гистотипы карцином, индуцированных ВПЧ, т.е. плоскоклеточные карциномы, аденокарциномы, аденоплоскоклеточные карциномы и нейроэндокринные карциномы в соответствующих органах, например, шейке матки, ротовой полости, ротоглотке, заднем проходе, прямой
 15 кишке, половом члене, вульве, влагалище и т.д. Этот термин включает, в частности, плоскоклеточные карциномы головы и шеи (HNSCC), плоскоклеточные карциномы шейки матки и аденокарциномы шейки матки.

Термин «инвазивный рак шейки матки» относится к карциноме шейки матки, прорастающей в окружающую ткань. Сюда входят все гистотипы карцином, т.е. плоскоклеточные карциномы, аденокарциномы, аденоплоскоклеточные карциномы и нейроэндокринные карциномы.

Термин «рак женских половых органов или аногенитальной области, не индуцированный ВПЧ» относится к ВПЧ-отрицательному раку эндометрия, раку яичников, раку вульвы, раку влагалища, раку заднего прохода и раку полового
 25 члена.

Термины «предраковое поражение» и «поражение-предшественник» относятся к стадии многоэтапной эволюции клеток в раковые клетки со значительно повышенными шансами прогрессирования в карциному. При классической морфологии патолог не может прогнозировать, какие из этих
 30 поражений у отдельного пациента будут прогрессировать или регрессировать. Настоящий патент относится к способу, позволяющему прогнозировать (предсказывать) инвазивный рак или его поражение-предшественник высокой степени.

Термин «предраковое поражение шейки матки высокой степени» относится к стадии многоэтапной эволюции клеток в рак шейки матки со значительно повышенными шансами прогрессирования в карциному шейки матки. Термин «способный к специфической гибридизации с» относится к

5 нуклеотидной последовательности, способной к специфическому спариванию оснований с комплементарной нуклеотидной последовательностью и связыванию с ней с образованием нуклеотидной двухцепочечной структуры.

«Комплементарная последовательность» представляет собой последовательность нуклеотидов, образующую с другой последовательностью

10 нуклеотидов двухцепочечную структуру, связанную водородными связями по правилам спаривания оснований Уотсона-Крика. Например, комплементарная последовательность оснований для 5'-AAGGCT-3' представляет собой 3'-TTCCGA-5'.

Термин "жесткие условия гибридизации" относится к условиям гибридизации, влияющим на стабильность гибридов, например, температуре,

15 концентрации солей, pH, концентрации формамида и т.п. Эти условия эмпирически оптимизируют для достижения максимального усиления специфического связывания и минимизации неспецифического связывания праймера или зонда с нуклеотидной последовательностью, являющейся его мишенью. Здесь эти термины включают указания на условия, в которых зонд или

20 праймер гибридизуется со своей последовательностью-мишенью в обнаружимо большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере, в 2 раза по сравнению с фоном). Жесткие условия зависят от последовательности и различаются в различных обстоятельствах. Более длинные последовательности специфически гибридизуются при более высоких

25 температурах. Как правило, жесткие условия выбирают приблизительно на 5°C ниже, чем температура плавления (T_m) конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. T_m представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной последовательности-мишени гибридизуется с идеально совпадающим зондом или

30 праймером. Как правило, жесткие условия представляют собой условия, в которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,0 М иона Na, как правило, приблизительно от 0,01 до 1,0 М иона Na (или других солей) при pH 7,0 - 8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30 °C для коротких зондов или праймеров (например, от 10 до 50 нуклеотидов) и по меньшей мере

приблизительно 60 °C для длинных зондов или праймеров (например, более 50 нуклеотидов). Жестких условий также можно достичь путем добавления дестабилизирующих агентов, например, формамида. Типичные условия низкой жесткости или "условия пониженной жесткости" включают гибридизацию в 5
буферном растворе, содержащем 30% формамида, 1 М NaCl, 1% ДСН, при 37°C и промывку в 2x SSC при 40°C. Типичные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, 1 М NaCl, 1% ДСН при 37°C и промывку в 0,1 x SSC при 60°C. Процедуры гибридизации хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Ausubel et al, Current Protocols in Molecular
10 Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994.

Термин "олигонуклеотид" относится к короткой последовательности нуклеотидных мономеров (обычно от 6 до 100 нуклеотидов), соединенных фосфорными связями (например, фосфодиэфир, алкил и арилфосфат, фосфоротиоат) или нефосфорными связями (например, пептид, сульфамат и
15 другие). Олигонуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, имеющие модифицированные основания (например, 5-метилцитозин) и модифицированные сахарные группы (например, 2'-О-метил рибозил, 2'-О-метоксиэтил рибозил, 2'-фтор рибозил, 2'-амино рибозил и тому подобное). Олигонуклеотиды могут представлять собой природные или синтетические
20 молекулы двух- и одноцепочечной ДНК и двух- и одноцепочечной РНК с круглой, разветвленной или линейной формой и, необязательно, с включением доменов, способных образовывать стабильные вторичные структуры (например, структуры стебель и петля и петля-стебель-петля).

Термин «праймер» в настоящем описании относится к олигонуклеотиду, способному отжигаться с мишенью амплификации, позволяя ДНК-полимеразе
25 присоединяться к ним и выступая в качестве точки инициации синтеза ДНК в условиях, при которых индуцируется синтез продукта удлинения праймера, комплементарного цепи нуклеиновой кислоты, т. е. в присутствии нуклеотидов и агента для полимеризации, например, ДНК-полимеразы, и при подходящей
30 температуре и pH. Праймер (для амплификации) предпочтительно является одноцепочечным с целью максимальной эффективности амплификации. В предпочтительном варианте праймер является олигодезоксирибонуклеотидом. Праймер должен быть достаточно длинным для инициации синтеза продуктов удлинения в присутствии агента для полимеризации. Точная длина праймеров

зависит от многих факторов, включая температуру и источник праймера. «Пара двуправленных праймеров» в настоящем документе относится к одному прямому и одному обратному праймеру, что широко используется в области амплификации ДНК, например, амплификации посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Термин «зонд» относится к одноцепочечной олигонуклеотидной последовательности, распознающей комплементарную последовательность анализируемой нуклеиновой кислоты-мишени или ее кДНК-производного и образующей с ней двухцепочечную структуру за счет водородных связей.

Метилирование ДНК представляет собой биохимический процесс, важный для нормального развития высших организмов. Он включает добавление метильной группы в 5-положении пиримидинового кольца цитозина или к атому азота номер 6 пуринового кольца аденина. Метилирование ДНК по 5-положению цитозина оказывает специфическое влияние, снижая экспрессию генов, и выявлено у всех исследованных позвоночных. Во взрослых соматических тканях метилирование ДНК обычно происходит в контексте динуклеотида CpG.

Применение широкого геномного скрининга метилирования ДНК на самостоятельно полученных образцах из шейки матки и влагалища и всесторонней оценки крупной серии генов, на которые нацелено метилирование в собранных образцах из шейки матки и влагалища женщин с ЦИН3 и раком шейки матки, позволило в настоящее время установить, что классификатор метилирования, состоящий из генов, кодирующих транскрипционный фактор 1 семейства *Achaete-scute bHLH* (далее называемый *ASCL1*; номер доступа в GenBank NM_004316), ген, кодирующий LIM-гомеобокс 8 (далее называемый *LHX8*; номер доступа в GenBank NM_001001933), и ген, кодирующий ST6 N-ацетилгалактозаминид-альфа-2,6-сиалилтрансферазу 5 (далее называемый *ST6GALNAC5*; номер доступа в GenBank NM_030965), и их регуляторные последовательности являются важными детерминантами канцерогенеза, индуцированного ВПЧвр. Таким образом, гены *LHX8*, *ASCL1* и *ST6GALNAC5* и их регуляторные последовательности представляют собой ценные маркеры для диагностики инвазивного рака шейки матки и его предраковых поражений высокой степени в различных типах образцов, то есть соскобах шейки матки, самостоятельно полученных образцах из шейки матки и влагалища, а также образцах мочи. Кроме того, настоящее изобретение

пригодно для диагностики ВПЧвр-ассоциированных инвазивных раковых заболеваний, не имеющих отношения к раку шейки матки, и их предраковых поражений высокой степени. Кроме того, их метилирование дополнительно
 5 пригодно для диагностики эндометриальных и других раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ.

Другими генами, которые оказались полезными для выявления этих типов ВПЧвр-ассоциированных раковых заболеваний и предраковых поражений, являются ZIC1 и ZNF-582.

Ген ZIC1 кодирует белок с молекулярной массой 48 кДа, который
 10 функционирует как фактор транскрипции и является членом семейства белков ZIC "цинковые пальцы" C2H2-типа. Члены этого семейства важны в процессе развития. ZIC1 участвует в нейрогенезе. Он играет важные роли на ранней стадии органогенеза ЦНС, а также во время развития грудного отдела спинного мозга и созревания мозжечка (обзор Grinberg and Millen, Clin Genet. 2005, 67(4):290-6).
 15 Гиперметилирование ZIC1 было описано при колоректальном, желудочном, гепатоцеллюлярном раке и раке яичников (Gan et al., PLoS One. 2011, 6(2):e16916; Wang et al., Biochem Biophys Res Commun. 2009, 379(4):959-63; Huang et al., Epigenetics. 2013, 8(6):624-34; Wang et al., Tumour Biol. 2014, 35(8):7429-33). Гиперметилирование ZIC1 было упомянуто как один из факторов, обнаруженных
 20 при скрининге гиперметилированных генов при карциноме in situ и раке в мазке с шейки матки (Wang et al., Cancer Med. 2015, 4(1):43-55), но только как один из более чем 2200 генов. Кроме того, в нашей более ранней заявке WO 2017/034407 было описано, что метилирование промоторов ZIC1 и GHSR являются важными детерминантами канцерогенеза, индуцированного ВПЧвр. Таким образом,
 25 геномные и регуляторные последовательности ZIC1 и GHSR обеспечивают ценные маркеры для диагностики инвазивного рака шейки матки и их поражений-предшественников высокой степени.

ZNF-582 является членом семейства KRAB-ZNF, и члены этого семейства
 30 функционируют как корепрессоры транскрипции генов в биологических процессах, связанных с реакцией повреждения ДНК, пролиферацией, контролем клеточного цикла и неопластической трансформацией (Urrutia 2003; Genome Biol. 4: 231). Обнаружено, что этот маркер метилирован при остром миелолейкозе (Figuroa et

al. 2010; Cancer Cell. 17: 13-27), и также был описан при раке шейки матки (Huang et al. 2012; PLOS one. 7: e41060).

Рак шейки матки почти во всех случаях ассоциирован с инфекцией вирусом папилломы человека (ВПЧ). Папилломавирусы человека составляют группу из более чем 150 типов вирусов, идентифицируемых по различиям в последовательности ДНК. Различные ВПЧ вызывают большое количество заболеваний кожи и слизистых. ВПЧ в широком смысле классифицируются на типы низкого и высокого риска на основании их способности вызывать злокачественные изменения в инфицированных клетках. ВПЧ низкого риска, например, 1, 2, 4, 6, 11, 13 и 32 типа, ассоциированы главным образом с доброкачественными поражениями или обыкновенными бородавками, в то время как ВПЧ высокого риска, например, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 и 68 типа, ассоциированы в первую очередь с предраковыми и злокачественными поражениями эпителия. Обнаружено, что ВПЧ высокого риска вызывают инвазивную карциному шейки матки, а также инвазивную карциному других отделов аногенитального тракта и/или области головы и шеи. Соответственно, настоящее изобретение пригодно не только для выявления инвазивного рака шейки матки и его стадий-предшественников, но и других инвазивных раковых заболеваний и соответствующих стадий-предшественников, индуцированных ВПЧ, в особенности, высокого риска. Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ оценки риска любого предракового поражения высокой степени или инвазивного рака, индуцированного ВПЧ.

Очень подходящими поражениями-предшественниками и инвазивными раковыми опухолями в контексте настоящего изобретения являются предраковые поражения шейки матки и инвазивные раковые опухоли шейки матки, а также поражения-предшественники и инвазивные раковые опухоли, индуцированные ВПЧ высокого риска в других тканях, например, ротовой полости, ротоглотке, заднем проходе, прямой кишке, половом члене, вульве, влагалище и т.д.

Как указано выше, классификатор метилирования, состоящий из маркеров метилирования ASCL1, LHX8 и ST6GALNAC5, также позволяет выявлять поражения-предшественники и инвазивные раковые заболевания, не индуцированные ВПЧ. В контексте настоящего изобретения такими раковыми

заболеваниями предпочтительно являются рак эндометрия, рак яичников, рак вульвы, рак влагалища, рак заднего прохода и рак полового члена.

Исследуемая клетка может представлять собой (пред)опухолевую клетку, пролиферирующую клетку шейки матки или любую другую клетку области, где
5 планируется выявление присутствия поражения-предшественника с инвазивным потенциалом, индуцированного ВПЧ, инвазивного рака, индуцированного ВПЧ, рака женских половых органов или аногенитальной области, не индуцированного ВПЧ.

Маркер ASCL1 является пронейральным транскрипционным фактором и
10 функционирует в качестве главного регулятора в начале дифференцировки в нейрогенезе (Vasconcelos et al. 2014; Front. Cell. Neurosci. 8: 412). Обнаружено, что ASCL1 метилирован при раке полости рта и колоректальном раке (Jin et al. 2009; Cancer Res. 69:7412–21; Li et al. 2015; Epigenetics 10:229–36).

Маркер LHX8 функционирует в качестве высококонсервативного
15 транскрипционного фактора для регуляции судьбы клеток в нейрогенезе, морфогенезе зубов и оогенезе (Zhou et al. 2015; FASEB J.; 29:4083–91).

Метилирование LHX8 было описано для рака шейки матки, молочной железы и колоректального рака (Tommasi et al. 2009; Breast cancer Res. 11: R14; Øster, B. et al. 2011; Int. J. Cancer 129:2855–66; Farkas et al. 2013; Epigenetics 8:1213–25; Boers
20 et al. 2016; Clin. Epigenetics 8:29).

Маркер ST6GALNAC5 представляет собой трансмембранную
сиалилтрансферазу, участвующую в биосинтезе ганглиозидов на поверхности клетки. (Drolez et al. 2016; Int. J. Mol. Sci. 17:1309). Метилирование ST6GALNAC5
25 было описано для рака шейки матки, молочной железы и колоректального рака (Tommasi et al. 2009; Breast cancer Res. 11: R14; Øster, B. et al. 2011; Int. J. Cancer 129:2855–66; Farkas et al. 2013; Epigenetics 8:1213–25; Boers et al. 2016; Clin. Epigenetics 8:29).

Хотя отдельные маркеры уже были описаны ранее как метилированные при раке шейки матки, их диагностическая ценность для выявления рака шейки
30 матки и ЦИН3 в анализе материала шейки матки, полученного любым методом сбора образцов, полученных с помощью любого устройства для самостоятельного сбора образцов, а также образцов мочи и соскобов из шейки матки, является новшеством. Что еще более важно, три эти гена неожиданно дополняют друг друга с точки зрения выявления рака шейки матки и ЦИН3 во всех типах образцов.

Обнаружено, что маркер ST6GALNAC5, который имеет среднюю диагностическую эффективность, позволяет обнаруживать отдельные поражения, которые не обнаруживаются маркерами LHX8 и/или ASCL1. Кроме того, последние два маркера демонстрируют комплементарность друг к другу, что обнаружено при анализе методом логистической регрессии.

Авторы настоящего изобретения установили, что выявление классификатора метилирования, основанного на комбинации метилирования промоторов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, часто встречается при карциномах шейки матки, относящихся к гистотипам плоскоклеточной карциномы, аденоплоскоклеточной карциномы, аденокарциномы и нейроэндокринной карциномы, и их поражениях-предшественниках высокой степени. Интереснее всего показанный авторами настоящего изобретения факт, что классификатор метилирования, выявляющий гиперметилирование генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторных последовательностей, может быть обнаружен в самостоятельно полученных как с помощью смыва, так и образцах из шейки матки и влагалища, а также в соскобах шейки матки, полученных врачами, и что этот признак способен предсказать наличие поражения ЦИН высокой степени или инвазивной карциномы. Кроме того, гиперметилирование генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторных последовательностей также можно обнаружить в образцах мочи, полученных самостоятельно, и было обнаружено, что метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 ассоциировано с наличием лежащего в основе поражения ЦИН высокой степени или инвазивного рака шейки матки.

Гиперметилирование генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторных последовательностей также можно обнаружить при ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных раковых заболеваниях вульвы и рака заднего прохода и их предраковых поражений высокого риска.

Кроме того, выявление гиперметилирования генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторных последовательностей пригодно для диагностики рака эндометрия, яичников и других видов рака женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ.

Соответственно, в настоящем изобретении предложен способ выявления предраковых поражений высокой степени, индуцированных ВПЧ, и инвазивных

раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ, таких как карцинома эндометрия и яичников, при этом указанный способ включает выявление гиперметилирования генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторных последовательностей в клетке, при этом такое гиперметилирование указывает на присутствие поражений-предшественников с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, и инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, и раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ, таких, как карцинома эндометрия.

Исследуемая клетка субъекта может включать клетку из образца клеток слизистой, например, клеток шейки матки, а также других тканей, например, ротовой полости, ротоглотки, полового члена, вульвы, заднего прохода, прямой кишки, эндометрия, яичника и других тканей, где планируется выявление поражения-предшественника или рака, ассоциированного с ВПЧ, или рака женских половых органов, аногенитальной области или ротоглотки, не индуцированного ВПЧ. Все указанные образцы можно использовать в качестве образца в способе согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте образец клеток пациента содержит клетки шейки матки или другие эпителиальные клетки аногенитального тракта или ротоглотки в качестве исследуемых клеток. Клетки шейки матки могут быть представлены, например, в виде гистологического или цитологического образца. Цитологические образцы включают обычные мазки из шейки матки, а также тонкослойные препараты образцов из шейки матки и образцы из шейки матки и влагалища или из влагалища, собранные самостоятельно. В качестве альтернативы, клетки могут присутствовать в образцах мочи. Особое преимущество настоящего изобретения перед другими известными способами выявления раковых заболеваний в шейке матки и близлежащих тканях состоит в том, что исследуемая клетка является исследуемой клеткой, полученной из образца, самостоятельно собранного пациенткой.

Способ согласно настоящему изобретению особенно хорошо подходит для выявления предраковых поражений высокой степени и инвазивных раковых заболеваний, ассоциированных с LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, индуцированных ВПЧ высокого риска или происходящих из (женского) аногенитального тракта.

Способ выявления предраковых поражений высокой степени с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, и рака женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированного ВПЧ, может включать измерение промотора LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5.

На фигуре 1 показана CpG-богатая область промотора гена ASCL1, а также часть экзона 1 кодирующей последовательности.

На фигуре 2 показана CpG-богатая область промотора гена LHX8, а также часть экзона 1 кодирующей последовательности.

На фигуре 3 показана CpG-богатая область промотора гена ST6GALNAC5, а также экзон 1, интрон 1 и часть экзона 2 кодирующей последовательности.

Изобретение также включает способ выявления рака вульвы и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, причем указанный способ включает выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей генов ASCL1 и одного или более из ZIC1, ZNF-582 и LHX8, в клетке, причем такое гиперметилирование указывает на присутствие рака вульвы и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ. Как было показано в экспериментальной части настоящего изобретения, комбинация ASCL1 с одним или несколькими из упомянутых генов образует очень полезную тестовую панель метилирования для выявления этих типов или раковых заболеваний/поражений. Таким образом, изобретение также включает применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из ZIC1, ZNF-582 и LHX8 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака вульвы или предракового поражения вульвы высокой степени, индуцированного ВПЧ, причем предпочтительно метилирование указанного маркера является прогностическим фактором присутствия указанного поражения или рака.

Кроме того, в экспериментальной части настоящего изобретения было продемонстрировано, что выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей ASCL1 и одного или более из ZIC1 и ZNF-582, в клетке можно использовать для выявления рака заднего прохода и предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ. В

таком случае гиперметилирование указывает на присутствие рака заднего прохода и предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ. Таким образом, изобретение также включает применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из ZIC1 и ZNF-582 в качестве

5 молекулярного диагностического маркера для выявления рака заднего прохода или предракового поражения высокой степени заднего прохода, индуцированного ВПЧ, причем предпочтительно метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия указанного поражения или рака.

Далее, было показано, что выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей ASCL1 и одного или более LHX8 и ZIC1, в

10 клетке очень пригодно для выявления рака яичников и предраковых поражений яичников, причем гиперметилирование указанных генов указывает на присутствие рака яичников и предраковых поражений яичников. Соответственно, в настоящем изобретении также предусмотрено применение классификатора

15 метилирования ASCL1 и одного из LHX8 и ZIC1 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака яичников, причем предпочтительно метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия указанного рака.

20 Выявление метилирования выполняют в нуклеиновой кислоте, например, ДНК. Применяемые реагенты обычно представляют собой нуклеотидный (ДНК) зонд или праймер (для ПЦР) или эндонуклеазу рестрикции, предпочтительно эндонуклеазу рестрикции, чувствительную к метилированию, для выявления метильных групп в ДНК исследуемой клетки.

25 Компонент исследуемой клетки можно непосредственно обнаружить *in situ* или выделить из других компонентов клетки обычными способами, известными специалистам в данной области техники, до контакта с реагентом (см., например, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. 1995. 4th edition, John Wiley and Sons; "A Laboratory Guide to RNA: Isolation, analysis, and synthesis", Krieg (ed.), 1996, Wiley-Liss; "Molecular Cloning: A laboratory manual", J. Sambrook,

30 E.F. Fritsch. 1989. 3 Vols, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Поскольку в представленных примерах продемонстрировано частое метилирование гена и регуляторной последовательности ASCL1, желательно непосредственное определение присутствия гиперметилирования гена и

- регуляторной последовательности ASCL1. Аналогичным образом, желательно непосредственное определение присутствия гиперметилирования гена и регуляторной последовательности LHX8 и ST6GALNAC5. В частности, области, богатые цитозином, называемые "CpG-островками", обычно расположенные в 5'-регуляторных областях генов, в норме не метилированы. Термин "гиперметилирование" включает любое метилирование цитозина в положении, в норме не метилированном в гене и регуляторной последовательности LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 (например, регуляторной последовательности и первом экзоне LHX8 и ASCL1 и регуляторной последовательности, первом экзоне, первом интроне и части второго экзона ST6GALNAC5, см. фиг. 1, 2 и 3 соответственно). Метилирование ДНК можно обнаружить с помощью следующих анализов, используемых в настоящее время в научных исследованиях:
- ПЦР, специфичной по отношению к метилированию (MSP), основанной на химической реакции бисульфита натрия с ДНК, преобразующей неметилированные остатки цитозина CpG-динуклеотидов в урацил или UrG, с последующей традиционной ПЦР. Однако метилированные остатки цитозина не подвергаются преобразованию при этом процессе, а праймеры сконструированы так, чтобы перекрывать исследуемый CpG-сайт, что позволяет определить состояние метилирования как «метилирован» или «не метилирован».
 - Полногеномного бисульфитного секвенирования, также известного как BS-Seq, которое представляет собой высокопроизводительный анализ метилирования ДНК в масштабах генома. Оно основано на вышеупомянутом преобразовании геномной ДНК бисульфитом натрия с ее последующим секвенированием на платформе секвенирования нового поколения. Затем полученные последовательности повторно выравнивают по отношению к эталонному геному с целью определения состояния CpG-динуклеотидов на основании несовпадений в результате преобразования неметилированных остатков цитозина в урацил.
 - HELP-анализа, основанного на различной способности ферментов рестрикции распознавать и расщеплять метилированные и неметилированные CpG-сайты ДНК.

- Анализа на чипе ChIP, основанного на способности коммерчески изготовленных антител связываться с белками, ассоциированными с метилированием ДНК, например, MeCP2.
- 5 • Сканирования генома с рестрикционными ориентирами, сложного и в настоящее время редко используемого анализа на основе различного распознавания метилированных и неметилированных CpG-сайтов ферментами рестрикции; концепция этого анализа аналогична HELP-анализу.
- 10 • Иммунопреципитации метилированной ДНК (MeDIP), аналогичной иммунопреципитации хроматина, использующей иммунопреципитацию для выделения метилированных фрагментов ДНК для получения исходного материала для методов выявления ДНК, например, ДНК-микрочипов (MeDIP-chip) или секвенирования ДНК (MeDIP-seq).
- 15 • Пиросеквенирования ДНК, обработанной бисульфитом. Это - секвенирование ампликона с использованием обычного прямого праймера и биотинилированного обратного праймера при ПЦР выбранного гена. Затем пиросеквенатор анализирует образец путем денатурации ДНК и добавления одного нуклеотида за раз к смеси в соответствии с последовательностью, заданной пользователем. В случае присутствия
- 20 несовпадения, оно регистрируется и отмечается доля ДНК, в которой присутствуют несовпадения. Это дает пользователю процент метилирования на CpG-островок.
- 25 • Световой анализ молекулярных разрывов для оценки активности ДНК-аденинметилтрансферазы - анализ, основанный на специфичности фермента рестрикции DpnI по отношению к полностью метилированным (метилирование по аденину) сайтам GATC в олигонуклеотиде, меченном флуорофором и гасителем. Аденинметилтрансфераза метилирует олигонуклеотид, образуя из него субстрат для DpnI. Гидролиз олигонуклеотида DpnI приводит к усилению флуоресценции.
- 30 • Саузерн-блоттинг, чувствительный к метильным группам, аналогичен HELP-анализу, но применяет методики саузерн-блоттинга для анализа с помощью зондов ген-специфических различий метилирования с использованием продуктов рестрикционного гидролиза. Эту методику

используют для оценки локального метилирования вблизи сайтов связывания зонда.

- Анализ метилирования на основе квантовых точек - анализ, описанный в публикации Bailey, V. et al. (Genome Res. 19:1455-1461, 2009), который объединяет высокую специфичность MSP и высокую чувствительность и простоту FRET-технологии на основе квантовых точек (QD-FRET) (Zhang, C. et al., 2005, Nat. Mater. 4:826-831).
- Выявления метилирования ДНК с применением технологии наночипов. Эта методика может обнаруживать метилирование ДНК с высокой чувствительностью и специфичностью при минимальных количествах клинического материала без необходимости бисульфитного преобразования и ПЦР-амплификации. Способы, использующие твердотельные нанопоры, описаны Shim, J. et al. (Sci. Rep. 3:1389, 2013). Устройство для технологии «лаборатория на чипе» описано в публикации патента WO2009104967 (A1).

15

В предпочтительном варианте гиперметилирование можно обнаружить с помощью ПЦР, специфичной по отношению к метилированию, которая основана на модификации ДНК бисульфитом с последующими специфическими реакциями ПЦР, нацеленными на CpG-богатые последовательности.

20

Альтернативным предпочтительным средством анализа на метилирование последовательностей является секвенирование модифицированной бисульфитом ДНК следующего поколения.

Третье предпочтительное средство выявления метилированных последовательностей и различения метилированной и неметилированной ДНК основано на нанотехнологиях.

25

Для целей настоящего изобретения для выявления присутствия полинуклеотида LHX8, ASCL1 и/или ST6GALNAC5 (с применением нуклеотидного зонда) в биологических жидкостях или тканях может быть использован нуклеотидный зонд, специфичный по отношению к LHX8, ASCL1 и/или ST6GALNAC5. Для амплификации ДНК, например, с помощью ПЦР, полезны олигонуклеотидные праймеры на основе любой области кодирующей последовательности и области регуляторной последовательности в последовательности LHX8, ASCL1 и/или ST6GALNAC5.

30

При использовании ПЦР-праймеров, нуклеотидных зондов или эндонуклеаз рестрикции исследуют 5'-регуляторную область и кодирующую последовательность генов LHX8 и ASCL1 или 5'-регуляторную область, кодирующую последовательность и последовательность первого интрона

5 ST6GALNAC5 (как показано на фигурах 1, 2 и 3 соответственно).

Можно использовать любой образец, содержащий обнаружимое количество полинуклеотида LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5. Предпочтительные образцы для анализа согласно способам в соответствии с настоящим изобретением включают такие образцы, как соскобы (из шейки матки или влагалища), смывы

10 или образцы, отобранные с помощью тампон-зонда из шейки матки и влагалища, моча, кровь и/или биоптаты (из шейки матки) и т.п. Хотя субъект может быть любым млекопитающим, в предпочтительном случае субъект является человеком.

Диагностические способы выявления расстройств включают способы, в которых получают образец для анализа, причем указанный образец содержит

15 препарат клеток из шейки матки или другой ткани. Предпочтительно такие образцы получают в виде мазков или других цитологических образцов. Дополнительные подходящие образцы включают мочу и кровь.

Образец клеток или ткани, полученный от млекопитающего, предпочтительно человека, предварительно обрабатывают подходящим образом

20 для обеспечения контакта между клеточной ДНК исследуемой клетки, содержащейся в указанном образце, с реагентом, обеспечивающим выявление LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и обеспечивающим выявление изменений метилирования генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 или их регуляторной последовательности по сравнению с генами сопоставимой здоровой клетки.

25 Образцы можно поместить на подходящую подложку, позволяющую наблюдать отдельные клетки. Примеры хорошо известных материалов подложки включают стекло, полистирол, полипропилен, полиэтилен, поликарбонат, полиуретан, необязательно снабженные слоями для улучшения адгезии и иммобилизации клеток образца, например, слоями поли-L-лизина или силана. Мазки или

30 биоптаты из шейки матки можно, например, получить в соответствии с тестом Папаниколау (Pap) или любой из его подходящих модификаций, известных специалисту, и фиксировать в соответствии с процедурами, обеспечивающими надлежащий доступ реагента к компоненту-мишени. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения цитологические образцы получают в виде

обычных мазков или тонкослойных препаратов клеток шейки матки или жидких цитологических образцов или препарата любого вида, известного специалистам в данной области техники. Если требуется хранение, в обычных процедурах используют забуференный формалин для фиксации с последующей заливкой в парафин, что обеспечивает хорошее сохранение инфраструктуры тканей.

В одном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению выявляют повышенное метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 или их регуляторной последовательности в исследуемой клетке по сравнению с сопоставимой здоровой клеткой.

В настоящем изобретении также предложен набор компонентов, заданных в формуле изобретения, для применения в способе выявления предраковых поражений с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, и раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ. Такой набор может надлежащим образом содержать щетку или шпатель для получения соскоба (с шейки матки) либо вместе с контейнером, заполненным средой для сбора для исследуемых клеток, либо без него. В качестве альтернативы, в набор будет включено устройство для пробоотбора, состоящее из шприца для ирригации, одноразового женского мочевого катетера и контейнера с жидкостью для ирригации, для сбора клеток шейки матки посредством смыва с шейки матки и влагалища. Дополнительно или в качестве альтернативы, можно применять контейнер для сбора мочи, предпочтительно, используемый для сбора утренней мочи. Набор по настоящему изобретению дополнительно содержит праймеры и зонды для выявления генов или регуляторных последовательностей LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5.

Набор компонентов согласно изобретению дополнительно содержит средства для выявления метилирования генов или регуляторной последовательности LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, например, ферменты рестрикции, чувствительные к метилированию, или зонды или праймеры, способные гибридизоваться с нуклеотидной последовательностью согласно фигуре 1 и/или согласно фигуре 2 и/или согласно фигуре 3.

В еще одном альтернативном варианте реализации набора по изобретению средства для выявления метилирования генов или регуляторной последовательности LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 могут быть объединены со

средствами для выявления инфекции ВПЧ, предпочтительно для выявления инфекции ВПЧ типов высокого риска. Такие средства могут содержать ВПЧ-специфические праймеры или зонды, белковые маркеры для инфекции ВПЧ или даже суррогатные маркеры для инфекции ВПЧ, известные в данной области техники.

Настоящее изобретение далее будет проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

10 ПРИМЕРЫ

Пример 1. Обнаружение возможности применения LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в качестве оптимальной панели маркеров метилирования для выявления рака и предрака шейки матки в самостоятельно полученных образцах

15 Всесторонний анализ изменений метилирования ДНК в масштабах генома, обнаруживаемых в самостоятельно полученных образцах и ассоциированных с канцерогенезом шейки матки, выполнили с помощью чипа Infinium 450K BeadChip на ВПЧвр-положительных самостоятельно полученных образцах. Включенная серия образцов состояла из 68 ВПЧвр-положительных самостоятельно полученных образцов 39 женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией

20 степени 3 (ЦИН3) высокой степени и 29 женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией степени 0 или 1 ($\leq$ ЦИН1) низкой степени. Чип Infinium HumanMethylation450 BeadChip позволяет проанализировать более 485 000 сайтов метилирования на образец с разрешением на уровне единичного

25 нуклеотида генома человека (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). При таком подходе мы выявили 12 мишеней метилирования, которые были специфически ассоциированы с наличием ЦИН3. Затем эти 12 наиболее характерных метилированных генов были исследованы с применением мультиплексных анализов qMSP в двух отдельных больших сериях, состоящих либо из ВПЧвр-

30 положительных самостоятельно полученных образцов смыва ($n = 245$), либо из ВПЧвр-положительных образцов самостоятельно полученных с помощью щетки ($n = 246$) от женщин с и без ЦИН3. В образцах, самостоятельно полученных как с помощью смыва, так и с помощью щетки, 11 из 12 отобранных генов показали значительно повышенные уровни метилирования ($p < 0,0005$) в самостоятельно

собранных женщинами с ЦИНЗ образцах по сравнению с ВПЧвр-положительными контрольными субъектами (см. также фиг. 4).

Для последующего построения оптимального классификатора маркеров метилирования, который был бы универсально применим к любому типу

- 5 самостоятельно полученных образцов, был проведен логистический регрессионный анализ наборов данных qMSP от самостоятельно полученных образцов как с помощью смыва, так и с помощью щетки. После обратного исключения сравнивали оптимальные классификаторы метилирования при обоих типах сбора образцов. Причина анализа обоих типов самостоятельного сбора образцов с целью
- 10 определения классификатора метилирования, который универсально применим к самостоятельно полученным из шейки матки и влагалища образцам из шейки матки и влагалища, независимо от используемого устройства для сбора, основана на результатах предыдущих исследований, свидетельствующих о том, что
- 15 клиническая эффективность маркеров метилирования зависит от типа используемого самостоятельного сбора образцов. Например, было обнаружено, что маркеры метилирования MAL и mir124-2 показывают хорошую клиническую эффективность для выявления ЦИНЗ+ в самостоятельно полученных образцах смыва, но не в самостоятельно полученных образцах с помощью щетки.
- 20 Неожиданно в этом исследовании был найден оптимальный классификатор метилирования, состоящий из генов ASCL1, LHX8 и ST6GALNAC5 и их регуляторной последовательности, для обоих типов самостоятельного сбора образцов. Уровни метилирования ASCL1, LHX8 и ST6GALNAC5, обнаруженные при самостоятельном сборе образцов с помощью смыва и с помощью щетки, показаны на фигурах 4А и 4В соответственно. Уровни метилирования всех трех
- 25 генов были значимо повышены у женщин с ЦИНЗ и чрезвычайно высоки у женщин с раком шейки матки. Классификатор метилирования показал отличную клиническую эффективность для выявления ЦИНЗ как в ВПЧвр-положительных самостоятельно полученных образцах смыва (ППК = 0,90), так и с помощью щетки (ППК = 0,86). Классификатор метилирования показал 83% (25 из 30) из
- 30 самостоятельно полученных образцов смыва и 76% (52 из 68) самостоятельно полученных образцов с помощью щетки у женщин с положительным метилированием ЦИНЗ, с соответствующей специфичностью у ВПЧвр-положительных контрольных субъектов, составляющей 80%. Важно отметить, что

практически все женщины с раком шейки матки показали положительный результат на этот классификатор метилирования.

Клиническая эффективность выявления ЦИН3+ (ЦИН3 и рак) превосходит ранее опубликованные панели маркеров метилирования. Предлагаемый классификатор метилирования обладает чувствительностью 79-89% и специфичностью 75-77% в отношении ЦИН3+ в самостоятельно полученных образцах с помощью смыва и щетки. Для сравнения, лучшей доступной в настоящее время панелью метилирования, исследованной на больших сериях самостоятельно полученных образцов, является FAM19A4/miR124-2, с чувствительностью 69-71% и специфичностью 68-76% для выявления ЦИН3+ в самостоятельно полученных образцах с как с помощью смыва, так и с помощью щетки (De Strooper *et al. Gynecol. Oncol.* **141**, 341–347 (2016)). Другие панели маркеров, такие как JAM3/EPB41L3/TERT/C13ORF18, были исследованы только на небольших сериях образцов (Boers. *et al. Br. J. Cancer* **111**, 1095–101 (2014).;Eijsink *et al. Gynecol. Oncol.* **120**, 280–283 (2011).)

Праймеры и зонды, использованные для qMSP-анализа генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, перечислены в таблице 1. В качестве эталона для измерения исходной общей ДНК выбрали ген домашнего хозяйства β -актина (ACTB). Количественное определение выполняли с использованием сравнительного Ct-способа (Schmittgen *et al.*, *Nat Protoc* 2008, 3:1101-1108).

Пример 2. Валидация классификатора метилирования в самостоятельно полученных с помощью смыва и щетки образцах

Для валидации клинической эффективности данного классификатора метилирования, мы проанализировали другую, независимую, большую серию ВПЧвр-положительных самостоятельно полученных с помощью смыва (n = 198) и щетки образцов (n = 278), используя мультиплексный анализ qMSP. Классификатор метилирования показал хорошую и сопоставимую клиническую эффективность для выявления ЦИН3, как это наблюдалось в вышеописанной серии образцов, как для ВПЧвр-положительных самостоятельно полученных с помощью смыва (ППК = 0,88), так и щетки (ППК = 0,90) образцов (см. ROC-кривые на фигуре 4С). В валидационном множестве 74% (26 из 35) самостоятельно

полученных с помощью смыва и 88% (49 из 56) самостоятельно полученных с помощью щетки образцов у женщин с ЦИН3 показали положительное метилирование с соответствующей специфичностью у ВПЧвр-положительных контрольных субъектов, составляющей 79% и 81% соответственно.

5

Пример 3. Метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в качестве маркера для первичного скрининга в самостоятельно собранных образцах из шейки матки и влагалища

Исследованные на данный момент маркеры метилирования не очень подходят для применения при первичном скрининге вследствие слишком низкой специфичности при приемлемой чувствительности по отношению к ЦИН2/3 и раку. При оценке применения классификатора метилирования, состоящего из LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, в качестве маркера для первичного скрининга было неожиданно обнаружено, что при анализе ВПЧ-отрицательных самостоятельно собранных образцов и самостоятельно собранных образцов женщин с ЦИН3 этот классификатор также имеет очень большую ППК 0,895 для самостоятельно собранных с помощью смыва образцов для выявления ЦИН3, как и для самостоятельно собранных с помощью щетки образцов (ППК 0,828).

Настоящие результаты показывают, что классификатор метилирования, выявляющий гиперметилирование генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 и их регуляторной последовательности, позволяет выявлять лежащую в основе ЦИН2+ не только применительно к самостоятельно собранным образцам смыва с шейки матки и влагалища, но и к образцам из влагалища, самостоятельно собранным с помощью щетки. Последние представляют собой тип образца, для которого ранее известные маркеры часто определяются с низкой клинической чувствительностью. Следовательно, маркеры LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 можно рассматривать как универсальные маркеры, показывающие одинаковую эффективность независимо от используемого устройства для сбора образцов. Важно, что высокие значения ППК и показатели специфичности позволяют проводить первичный скрининг путем анализа генов классификатора метилирования, устраняя необходимость в первоначальном тесте на ВПЧвр. Как описано ниже (пример 6), такое приложение способа также позволяет выявлять ВПЧвр-отрицательные раковые заболевания, которые не выявляются в ныне применяемых условиях скрининга.

Пример 4: Выявление метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в ВПЧвр-положительных соскобах шейки матки

Среди женщин, участвующих в популяционном скрининге, мы изучали соскобы шейки матки ВПЧвр-положительных женщин, у которых была

5 диагностирована ЦИН3 (n = 56), и ВПЧвр-отрицательных и -положительных женщин, у которых была диагностирована максимум ЦИН 1 (n = 40 и n = 87, соответственно). Кроме того, были исследованы соскобы шейки матки у женщин с диагнозом плоскоклеточной карциномы (SCC; n = 23) и аденокарциномы (AdCa; n = 3) шейки матки. Соскобы шейки матки этих женщин собирали в консервирующей

10 среде, в которой нуклеиновые кислоты хорошо сохраняются. Метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 было значительно увеличено в соскобах у женщин с ЦИН3, SCC и AdCa по сравнению с ВПЧ-отрицательными и ВПЧ-положительными контрольными субъектами. Анализ ROC-кривых показал значение ППК=0,890 для выявления ЦИН3 в ВПЧ-положительной популяции и

15 ППК=1 для выявления рака шейки матки (фиг. 5B). Таким образом, эти гены обеспечивают перспективные сортировочные маркеры в скрининге путем первичного теста на ВПЧ, но также могут использоваться в качестве маркеров первичного скрининга как для связанных с ВПЧ, так и не связанных с ВПЧ карцином.

20

Пример 5: Метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в образцах мочи в качестве маркеров рака шейки матки и их поражений-предшественников высокой степени

В общей сложности 44 образца мочи, полученных от пациентов с раком шейки

25 матки, и 47 образцов мочи контрольных женщин были исследованы на метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5. По сравнению с контрольными субъектами, в образцах мочи женщин с раком шейки матки уровни метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 были значительно повышены (фиг. 5A). Анализ ROC-кривой показал значение ППК=0,936 для выявления рака шейки матки (фиг.

30 5C). Важно, что один случай рака, который не был обнаружен LHX8 или ASCL1, был обнаружен ST6GALNAC5, подтверждая комплементарность маркеров в составе классификатора. Эти результаты показывают, что выявление генов классификатора метилирования позволяет проводить скрининг рака шейки матки с применением мочи, тем самым обеспечивая наиболее простые и наиболее

удобные для пациентов неинвазивные способы скрининга рака, доступные в настоящее время.

Кроме того, анализ метилирования можно использовать для сортировки ВПЧ-положительных женщин в программах скрининга ВПЧ, основанных на анализе мочи.

Пример 6: Метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в соскобах шейки матки с карциномой эндометрия

В общей сложности 24 соскоба шейки матки с карциномой эндометрия были исследованы на метилирование LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5. По сравнению с соскобами шейки матки у ВПЧ-отрицательных и -положительных женщин, у которых была диагностирована максимум ЦИН 1, у женщин с карциномой эндометрия уровни метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 были значимо повышены (фиг. 6).

Таблица 1 Последовательности праймеров и зондов (5'-3'), используемых для количественного MSP-анализа генов LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5

	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
ASCL1	CGTTTAAGTAAGTTAA GCGATAGCGTTC	CCACGACGACCGACTAC TACTACG	GTTGTAAACGTCGGTTTAA TTTTAGC
LHX8	TAGGCGTCGTGACGGT TGTAC	AAACAAATCAAAAATTC CGAACG	GTTTCGTATTTTGAGGGTT TTTATTAGTTCGTTTTTCG
ST6GALNAC5	GACGGTGTTTTTTTGG TTTTAGTTGC	GCAACTAAAACAAAAAA AAC	TGCGGCGGGGTTGGGGTTT A

Также в настоящем изобретении могут быть полезны другие праймеры и зонды (также с учетом примеров 7-9); они перечислены в таблице 2.:

Таблица 2 Последовательности праймеров и зондов (5'-3'), используемых для количественного MSP-анализа генов ZIC1, ASCL1, LHX8 и ZNF-582

	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд
--	----------------	------------------	------

ZIC1	GGGCGGGTTAATGAGTTG C	TCACGTACTACCGACGC TAACG	CGCCGCGCCAACGAAAAAC
ZNF-582	TTTAAGGTCGGGTGTGTTG TTTTTAC	GCACAAAACACACCGAT ACTACG	ATAATAAAACCGACGCCGCAAT ATCTTCCG
LHX8	CGTCGTGACGGTTGTAC	CTCGACGCGAAAAACG	TCAAAAATACGAAACAACG
ASCL1	AGTAAGTTAAGCGATAGC GTTC	ACCGCTAAAATTAAACC GACG	TTCGTTCGAATTGATGCGTT

Пример 7. Метилирование LHX8, ASCL1, ST6GALNAC5, ZNF-582 и ZIC1 для выявления рака и предрака вульвы

5

Интраэпителиальная неоплазия вульвы (VIN) является поражением-предшественником плоскоклеточной карциномы вульвы (VSCC), но лишь малая часть VIN прогрессирует до рака. Интраэпителиальная неоплазия вульвы (VIN) высокой степени является предраковым состоянием плоскоклеточной карциномы вульвы (VSCC), но лишь малая часть VIN прогрессирует до рака, что указывает на гетерогенность заболевания. Нынешние клинические и гистологические классификации недостаточны для прогнозирования риска развития этого рака. Вследствие этого, пораженных женщин лечат одинаково с применением колючих вмешательств. Таким образом, существует клиническая потребность в объективных биомаркерах, отражающих риск развития рака. Поэтому мы оценили потенциальную ценность панели маркеров метилирования ДНК, LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, а также маркера метилирования ZNF-582 и ZIC1 для стратификации риска VIN. Маркер ZNF-582 был выявлен в том же самом геномном скрининге, что и описанный в примере 1. На фигуре 7 показана 5'-регуляторная область ZNF582 и кодирующая последовательность (экзон 1). Кодирующая последовательность показана прописными буквами, а CpG-богатая область подчеркнута.

Маркер ZIC1 был выявлен в предыдущем геномном скрининге для выявления предраковых поражений и рака шейки матки (Verlaet et al., Clinical Cancer Research, 2017). На фигуре 8 показана 5'-регуляторная область и кодирующая последовательность (экзон 1) ZIC1. Кодирующая последовательность показана прописными буквами, а CpG-богатые области выделены серым затенением.

25

- В это исследование были включены восемь здоровых (нормальных) образцов вульвы (контроль), 39 образцов VIN и 75 образцов VSCC. Из 39 VIN образцов 25 были ассоциированы с VSCC (VIN с VSCC) и 14 - нет (VIN без VSCC, то есть без развития VSCC в течение > 10 лет последующего наблюдения). Эта уникальная
- 5 серия хорошо охарактеризованных поражений VIN с клиническим последующим наблюдением позволяет идентифицировать маркеры, которые отличают поражения VIN с высоким риском развития рака, требующие агрессивного лечения, от поражений VIN, которые имеют низкий риск развития рака и выиграют от более консервативного, например, неинвазивного лечения.
- 10 Анализ метилирования LHX8, ASCL1, ST6GALNAC5 и ZNF-582 показал различающееся метилирование между ВПЧ-положительной VIN без VSCC и VIN с VSCC для всех пяти генов (фиг. 9).
- Графики рабочей характеристики приемника (ROC-кривые) для сравнения ВПЧ-положительной VIN без VSCC и ВПЧ-положительной VIN с VSCC на основе
- 15 логистической регрессии показали значения ППК 0,83 (LHX8), 0,80 (ASCL1), 0,69 (ST6GALNAC5), 0,80 (ZNF-582) и 0,78 (ZIC1).
- Анализ комбинаций маркеров выявил увеличение ППК при объединении двух маркеров: ASCL1 плюс ZIC1 (ППК = 0,82), ASCL1 плюс ZNF-582 (ППК = 0,82) и ASCL1 плюс LHX8 (ППК = 0,83). Эти данные указывают на то, что комбинацию
- 20 двух из маркеров метилирования LHX8, ASCL1, ZIC1 и ZNF-582 можно использовать для стратификации риска рака при ВПЧ-положительной VIN и для выявления VSCC.
- 25 Пример 8: Маркеры метилирования для выявления рака и предрака заднего прохода
- Рак заднего прохода вызван ВПЧ высокого риска, и его предвеляют поражения-предшественники: интраэпителиальная неоплазия заднего прохода (AIN; степень 1-3). Поскольку только лишь малая часть поражений в конечном итоге
- 30 прогрессирует до рака, предпочтительно лечат только поражения с высоким злокачественным потенциалом. К сожалению, прогностический маркер прогрессирования до рака отсутствует. В настоящее время лечат все случаи AIN высокой степени, что приводит к значительной излишней терапии. Поэтому мы оценили потенциальную ценность маркеров метилирования ДНК ASCL1,

ST6GALNAC5, ZIC1 и ZNF-582 для стратификации риска AIN. Маркеры ZIC1 и ZNF-582 были выявлены с помощью анализа всего генома в образцах, содержащих ВПЧ (см. Пример 1 и Verlaet et al., Clinical Cancer Research, 2017).

- Архивные образцы ткани ВИЧ-положительных мужчин с плоскоклеточной карциномой заднего прохода (SCC; n = 26), AIN3 (n = 24), AIN2 (n = 42) и мужчин без AIN2 или хуже (нормальный + AIN1; n = 56) были исследованы на метилирование ДНК четырех генов, о которых известно, что они обнаруживают гиперметилирование во время канцерогенеза, индуцированного ВПЧ, по данным количественной ПЦР, специфичной по отношению к метилированию. Уровни метилирования всех 4 генов значительно повышались с увеличением тяжести заболевания (фиг. 10). Для определения эффективности маркеров метилирования для выявления рака заднего прохода и AIN3 использовали логистическую регрессию и анализ ППК. ППК для выявления состояния AIN3 или хуже составляли 0,89 (ASCL1), 0,84 (ST6GALNAC5), 0,87 (ZIC1) и 0,91 (ZNF-582).
- Анализ комбинаций маркеров выявил еще более точное выявление AIN3 или хуже, с ППК 0,90 для ASCL1 плюс ZIC1 и 0,92 для ASCL1 плюс ZNF-582. Важно отметить, что обе комбинации маркеров выявляли все раковые заболевания заднего прохода.
- Эти данные указывают на то, что комбинации маркеров метилирования ASCL1 плюс ZIC1 и ASCL1 плюс ZNF-582 можно использовать для выявления рака заднего прохода и AIN высокой степени с риском прогрессирования до рака, что особенно важно для клинического ведения ВИЧ-положительных мужчин, имеющих половые контакты с мужчинами.

Пример 9: Метилирование LHX8, ASCL1 и ZIC1 в соскобах шейки матки у женщин с раком яичников

- В общей сложности 6 соскобов шейки матки женщин с раком яичниками, в том числе и серозным и светлоклеточным раком, были исследованы на метилирование LHX8, ASCL1 и ZIC1. По сравнению с соскобами шейки матки женщин без заболевания (т.е. ВПЧ-отрицательных и ВПЧ-положительных женщин с диагнозом максимум ЦИН 1), у женщин с раком яичников уровни метилирования LHX8, ASCL1 и ZIC1 были значительно повышены. Эти данные указывают на то, что комбинация любых из этих трех маркеров позволяет обнаружить рак яичников в соскобах шейки матки.

Формула изобретения

1. Способ выявления предраковых поражений высокой степени, индуцированных ВПЧ, и инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, и раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ, включающий выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, в клетке, причем такое гиперметилирование указывает на присутствие поражений-предшественников с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, а также раковых заболеваний женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированных ВПЧ.
2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанное предраковое поражение высокой степени, индуцированное ВПЧ, или инвазивная карцинома, индуцированная ВПЧ, представляет собой предраковое поражение шейки матки высокой степени или инвазивный рак шейки матки.
3. Способ по п.1 или 2, характеризующийся тем, что указанный инвазивный рак, индуцированный ВПЧ, представляет собой инвазивный рак, индуцированный ВПЧ высокого риска.
4. Способ по п.1, характеризующийся тем, что указанный рак женских половых органов, не индуцированный ВПЧ, представляет собой рак эндометрия или яичника.
5. Способ выявления рака вульвы и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, включающий выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей ASCL1 и одного или более из ZIC1, ZNF-582 и LHX8, в клетке, причем такое гиперметилирование указывает на присутствие рака вульвы и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ.
6. Способ выявления рака заднего прохода и предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, включающий выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей ASCL1 и одного или более из ZIC1 и ZNF-582 в клетке, причем такое гиперметилирование указывает на присутствие рака заднего прохода и

предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ.

7. Способ выявления рака яичника и предраковых поражений яичников, включающий выявление классификатора метилирования, состоящего из последовательностей ASCL1 и одного или более из LHX8 и ZIC1, в клетке, причем такое гиперметилирование указывает на присутствие рака яичника и предраковых поражений яичников.
8. Способ по любому из предыдущих пунктов, характеризующийся тем, что указанное гиперметилирование выявляют в CpG-богатых последовательностях, показанных на фигурах 1, 2, 3, 7 и 8.
9. Способ выявления предракового поражения высокой степени, индуцированного ВПЧ, и инвазивных раковых заболеваний, индуцированных ВПЧ, а также рака женских половых органов или аногенитальной области, не индуцированного ВПЧ, по любому из пп.1-4 или выявления рака вульвы и предраковых поражений вульвы с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, по п.5 и/или выявления рака заднего прохода и предраковых поражений заднего прохода с инвазивным потенциалом, индуцированных ВПЧ, по п.6 и/или способ выявления рака яичника и предраковых поражений яичника, характеризующийся тем, что указанное гиперметилирование представляет собой повышенное метилирование классификатора метилирования CpG-богатых последовательностей промотора и/или гена LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 ST6GALNAC5 в исследуемой клетке по сравнению с сопоставимой здоровой клеткой.
10. Способ по любому из пп.1-9, характеризующийся тем, что реагент представляет собой чувствительную к метилированию эндонуклеазу рестрикции, выбранную из группы, состоящей из BssHII, MspI, NotI и HpaII.
11. Способ по любому из пп.1-9, характеризующийся тем, что этот способ включает нанотехнологию, предпочтительно технологию "лаборатории на чипе".
12. Способ по любому из пп.1-9, характеризующийся тем, что выполняют ПЦР, специфичную по отношению к метилированию, основанную на модификации ДНК бисульфитом с последующими специфическими реакциями ПЦР, нацеленными на CpG-богатые последовательности.

13. Способ по п.12, характеризующийся тем, что реагент представляет собой нуклеотидный зонд или праймер, который связывается с нуклеиновой кислотой, показанной на фигуре 1 или 2.
14. Способ по п.13, характеризующийся тем, что указанный нуклеотидный зонд или праймер содержит детектируемую метку.
- 15 Способ по п.12, 13 или 14, характеризующийся тем, что нуклеотидный зонд имеет нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:
 - а) полинуклеотидной последовательности, способной гибридизоваться в жестких условиях с последовательностью ASCL1, приведенной на фигуре 1, или с последовательностью LHX8, приведенной на фигуре 2, или с последовательностью ST6GALNAC5 приведенной на фигуре 3; или с последовательностью ZIC1, приведенной на фигуре 8, или с последовательностью ZNF-582, приведенной на фигуре 7;
 - б) полинуклеотида, по меньшей мере на 70% идентичного одному из полинуклеотидов по подпункту а);
 - в) полинуклеотида, комплементарного одному из полинуклеотидов по подпункту а); и
 - г) полинуклеотида, содержащего по меньшей мере 15 оснований одного из полинуклеотидов по подпункту а) или б).
16. Способ по любому из пп.1-13, характеризующийся тем, что определяют метилирование классификатора метилирования, содержащего ген LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 и/или ST6GALNAC5
17. Применение классификатора метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления предракового поражения высокой степени, индуцированного ВПЧ, или инвазивной карциномы, индуцированной ВПЧ, или рака женских половых органов и аногенитальной области, не индуцированного ВПЧ, при котором предпочтительно метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия указанного поражения, карциномы или рака.
18. Применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из ZIC1, ZNF-582 и LHX8 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака вульвы или предракового поражения вульвы высокой степени, индуцированного ВПЧ, при котором предпочтительно метилирование указанного

маркера является прогностическим показателем присутствия указанного поражения или рака.

19. Применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из ZIC1 и ZNF-582 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака заднего прохода или предракового поражения заднего прохода высокой степени, индуцированного ВПЧ, при котором предпочтительно метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия указанного поражения или рака.
20. Применение классификатора метилирования ASCL1 и одного из LHX8 и ZIC1 в качестве молекулярного диагностического маркера для выявления рака яичника, при котором предпочтительно метилирование указанного маркера является прогностическим показателем присутствия указанного рака.
21. Набор компонентов для применения в способе выявления предракового поражения высокой степени, индуцированного ВПЧ, или инвазивной карциномы, индуцированной ВПЧ, или рака женских половых органов или аногенитальной области, не индуцированного ВПЧ, причем указанный набор содержит
 - средства выявления метилирования LHX8, ASCL1 и ST6GALNAC5, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и нуклеотидной последовательности LHX8 согласно фигуре 2 и нуклеотидной последовательности ST6GALNAC5 согласно фигуре 3;
 - средства выявления метилирования ASCL1 и ST6GALNAC5, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и нуклеотидной последовательности ST6GALNAC5 согласно фигуре 3; или
 - средства выявления метилирования ASCL1 и LHX8, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и нуклеотидной последовательности LHX8 согласно фигуре 2, или
 - средства выявления ASCL1 и по меньшей мере одного из ZIC1, ZNF-582 и LHX8, причем указанные средства включают зонды и/или праймеры, специфичные по отношению к нуклеотидной последовательности ASCL1 согласно фигуре 1 и любой из нуклеотидной последовательности ZNF-582

согласно фигуре 7, нуклеотидной последовательности ZIC1 согласно фигуре 8 и/или нуклеотидной последовательности LHX8 согласно фигуре 2;

предпочтительно дополнительно содержащий;

5

- средства выявления ВПЧ-инфекции, причем указанные средства включают зонды и праймеры, специфичные по отношению к ВПЧ.

Фигура 1: Последовательность ASCL1 (регуляторная область и экзон 1), полученная из Refseq NM_004316 9hgl9). Кодирующая последовательность показана прописными буквами, а подчеркнута CpG - богатая область.

```
>hg19_refGene_NM_004316
ttcttttatgatattccgctaagctgggtccggaaataatcttttatggggagg
gggtggcggtagggggcgatggtacagggggccagaggtcatcctagggg
gacgtccctgccatatacacccacctacaggacgggtcaccaaccactcct
cgggtgtcgcttcccccgggccccccacacacttgctcagttatggggagc
acatcctagtttttagagctgaatgggacattagagaccatattctgtgg
ctgcagacgaggaagcgaaggctcagagaggatgccacttcgaggagcca
cagagcattgagaggacgccttgggactagaacccacgttttcacatagt
ccagcacttttttctactgttctggacggagtccttcccccaaccatgtt
tctaaacttcaatcgtaatttgctccaatttctagggtcaccgaggaacc
cgaagagaataacagtgaggagagagagaaaaacaggaaaagtgcagcccc
actccctcctcacctccacaccgttcctgtgccattttttctgccccaac
ccttccctgcgctttgttcaagttcttagtagaatccaagagagcttca
ccccaaagtctttccacctatacacctcaattcctagagccatttgctcct
cctgtgacgccccccaccccccttctaaagccacccccggcagcagcccg
ccccgagcgcgccgctgtttattcagccgggagtcgggcacgcgcccagg
cgcacgcactgcaacaacaaacccagctgaatggagagtttgcaaggagc
gggagaaaaggaacgggagggggggagaggagaggaggagggggagtttag
ggagtgggtgggaggaagaggttaagaggaggggggggagtgggggctgca
gccgctcgctgcagcagcggggagtggggggagggcggggcccagggtg
cgcggtggggctgggtgtcccattgaaaaggcggacgcactccggcagccc
AGCACTCTCTCACTTCTGGCCAGGGAACGTGGAAGGCGCACCGACAGGGA
TCCGGCCAGGGAGGGCGAGTGAAAGAAGGAAATCAGAAAGGAAGGGAGTT
AACAAAATAATAAAAACAGCCTGAGCCACGGCTGGAGAGACCGAGACCCG
GCGCAAGAGAGCGCAGCCTTAGTAGGAGAGGAACGCGAGACGCGGCAGAG
CGCGTTCAGCACTGACTTTTGCTGCTGCTTCTGCTTTTTTTTTTTCTTAGA
AACAGAAGGCGCCAGCGGCAGCCTCACACGCGAGCGCCACGCGAGGCTC
CCGAAGCCAACCCGCGAAGGGAGGAGGGGAGGAGGAGGAGGCGGCGTGC
AGGGAGGAGAAAAAGCATTTTCACTTTTTTTGCTCCCACTCTAAGAAGTC
TCCCGGGGATTTTGTATATATTTTTAACTTCCGTCAGGGCTCCCGCTTC
ATATTTCTTTTCTTTCCCTCTCTGTTTCTGCAACCAAGTTCTCTCTGTG
TCCCCCTCGCGGGCCCCGCACTTCGCGTCCCGGATCGCTCTGATTCCGCG
ACTCCTTGCCCGCCGCTGCGCATGGAAGCTCTGCCAAGATGGAGAGCGG
CGGCGCCGGCCAGCAGCCCCAGCCGAGCCCCAGCAGCCCTTCTTGCCGC
CCGCAAGCTGTTTCTTTGCCACGGCCGAGCCGCGGCGGCGGCGAGCCGCC
GCAGCGGCAGCGCAGAGCGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGGCGCCGAGCTGAGACCGGCGGCCGACGGCCAGCCCTCAGGGG
GCGGTCACAAGTCAGCGCCCAAGCAAGTCAAGCGACAGCGCTCGTCTTCG
CCCGAACTGATGCGCTGCAAACGCCGGCTCAACTTCAGCGGCTTTGGCTA
CAGCTTGCCGAGCAGCAGCCGGCCCGCTGGCGCGCCGCAACGAGCGCG
AGCGCAACCGCGTCAAGTTGGTCAACCTGGGCTTTGCCACCCTTCGGGAG
CACGTCCCCAACGGCGCGGCCAACAAAGAAGATGAGTAAGGTGGAGACACT
GCGCTCGGCGGTGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCAGCTGCTGGACGAGC
ATGACGCGGTGAGCGCCGCTTCCAGGCAGGCGTCTGTGCCCCACCATC
TCCCCAACTACTCCAACGACTTGAACCTCCATGGCCGGCTCGCCGGTCTC
ATCCTACTCGTCGGACGAGGGCTCTTACGACCCGCTCAGCCCCGAGGAGC
AGGAGCTTCTCGACTTCACCAACTGGTTCTGAGGGGCTCGGCCTGGTCAG
GCCCTGGTGCGAATGGACTTTGGAAGCAG
```

Фигура 2: Последовательность LHX8 (регуляторная область и экзон 1), полученная из Refseq NM_001001933 (hg19). Кодирующая последовательность показана прописными буквами, а подчеркнута CpG - богатая область .

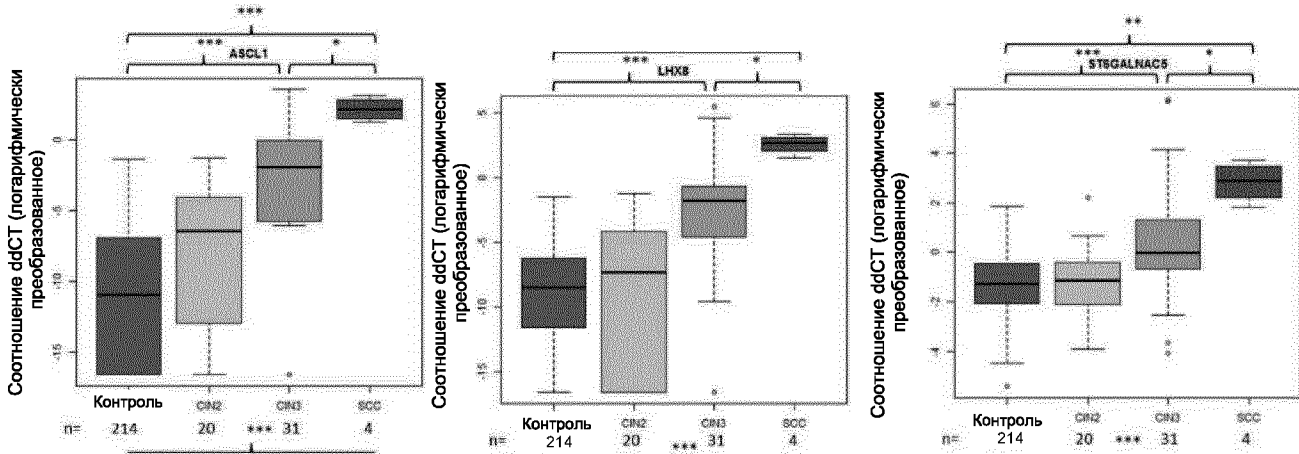
```
>hg19_refGene_NM_001001933
acatgtagagaaggcgggttttcctgaaagaggcgaagcaatttctccag
gaaagactttccccacacgcccccttcctttatattagggtccaccctc
tggaacaacaaactttttttttttttcttttcctggagggaactcaggaaaa
gctcagtgctcacttcactcagagctcagtgaaagctgggaaaggaatttt
aagaacgggttcacagaaagtgggtcaggccacagcggcctctttggacga
agacacacttgtagcattatccttctcggcatcagcttttattagtggtat
cggggcgggggagggggggagatcggcagacacggacagcctctgaccctc
tgaggttggtatgtgataagcagccctagcagtgccatgtattggaagaa
cgatcagatgtttgtgtgtaaaactagtagcaaaggacgtgccggagctgg
cagttccccctgagaagggtgagcagcggacgcctggccagaccagctga
atcgcatgttccttgaaactcgagttgtttgggctcctaacaagggttca
gaaactacctgtaacggcctcatcttcagacctggcaatttttttttttt
attacgtagtagcgttagtcagtaatcattgcactccctcccaaaagct
cacttaacctgagacatggagactgtaatttgggagatgaagcctcgagc
ctaaggcgctctcagggtccatgtgagtcgtgctttttgttctatttgctgt
ggtgatcgtggcggtccgggagagtggtcgaggaggactggcggtgtc
gggtggaaccggagacctggctcgtttcgttcggctgccccgggacactt
gctgccccctgaggcacacctccctctgccccgctccagaaaggcctccgg
gatccctgggcttgccgggagagccattttacctaataatgccaaaagaaa
accgcagggcacaaaacgagtcacgcggtttgtctgagtagactggggaa
gctgacaagctctcaccctcactcgggaggcaggacctgtgggtatttggt
gttttaagtttgaaatcatctgcagcctgtctgagggcctcagcaggacg
cgcgcgggggcgccccctgactattttctttgctccgaagccggttggggaca
ccaggcgaaaagcggagctgttctgttttaaacgccctttgtgtgtgaggac
gcggcctcagtgacgtacgctgggtcccgcgtagggagcgcaccccaga
aaggggaggggtctcggccgacgggtccgggaggccccaggttggtatcttg
cctgggtgcttcagagggaggggagaaaggggaggcgaacagtcagaaatgc
agaagtgcgagccgctcgagttcggggtaaccacccgcccccgagctaga
gtttttggaaaacgaaagcgggtctaagcccaggagcgtgcgttttcgttt
aagaacaaaactccagcaataacttggaacacttgagtaacgcgcgttg
tttctttaaaacattttgtcagaggttgggtgagttcttttaatggcaca
aattaaattcagctggatattttccattattctacccgctttttgcgctg
gttaaaaataatccttttagtagctcaaagtgttgacttactgagcaataag
tggaatttacaccttaagaaacgagtgtaaatcactcgccactctaata
tgctgtaagtttacgaaagagctgctggctcggtttaatctgaagcattt
tcattcaaatgtcatcggaacaaacaccaggcttcttaaatcccgctgt
aattagctttcaagtatcctattaaacctcttcacctttcgggctatcct
attcaaaaagccccctttttaaaatatatatgtgtcttgctcttttaatt
gaggttattaaagaaatctagtttcttctccacccccctcctcaatcctc
tttcttctctcgcactccacctcccactgccccgcaccccccttttagccc
ggtgttccccgctccgctatgattgacgtctggaaagaaagagctttgtg
aggggatgattgttattaaacttggtatccccggcgggggggcggggaacc
gacgtgccccgggtgagcgcgggagacccggagccccggggagcgcgggacg
agctaccagcgtcgggtggcgggccggcagcggccagcgaaggaggctgc
gcgccagccccggcgggcgccccgggctcaggcgccgtgacggctgcacg
cgctgccccgcactctgagggccttcattagctcgctccccgcgccgagg
ctggggcgggcagcacgctcggaacttctgatctgtttctccatactttc
tccccctcctactccgcagTGTGAGGGGCTCATGTGAGAGGAGTGCAGGGC
GGACTACAGCCCTGGCGGGCCGGGAGGACTCGCAAAGGCGCCGGGGAAAGAG
GGACTG
```

Фигура 3: Последовательность ST6GALNAC5 (регуляторная область, экзон 1, интрон 1 и экзон 2), полученная из Refseq NM_030965 (hg19). Кодировущая последовательность показана прописными буквами, а подчеркнута CpG - богатая область.

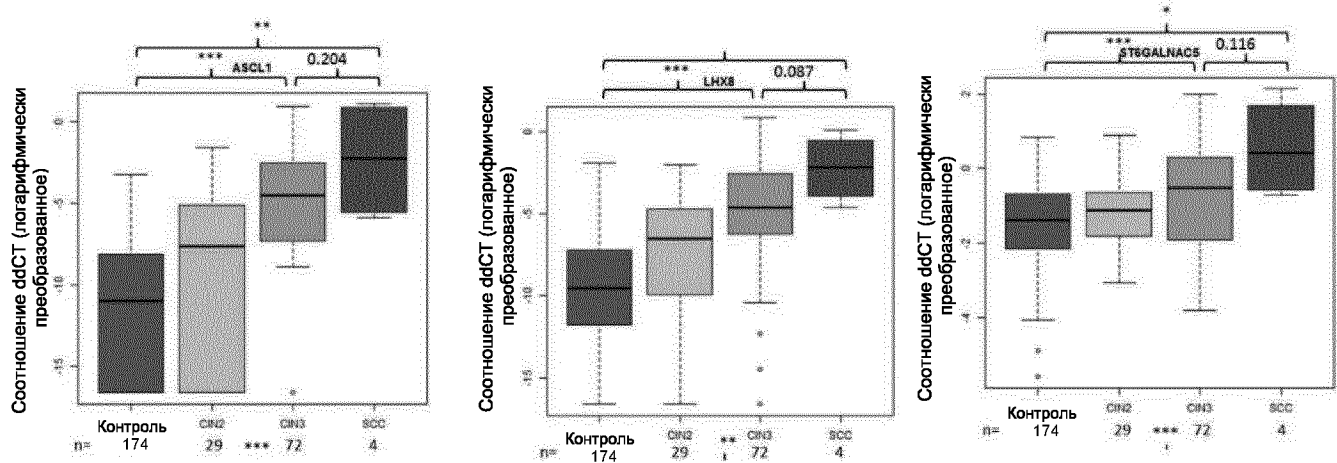
```
>hg19_refGene_NM_030965
agatgttaagtaatacattaagacaactattttctactgagcaatttcaca
agaaatatgttttttagctaaattagacatttaacaaatgccatttgtaat
tcaatgcagaggagacagcatccttaaaacaagctattgatgtgactttc
ccaacataaaaacaataacttatgtttttttaattttaattgaagtcctgaa
tgtgaaactatcgccgtcagtgacagtagaccaacggaaagcaccaaatac
cttaggattatgaaataagccatatgcagttttatctctagcagacagaa
attcttcatccaaattaggaagaatctacaggtcaagttaatcatgtagc
tgtgacgtgctgaatgtttttaaaactttaagatcatttagatgaacact
aggaactcagaggtcaggcagaaatgtaaatgtaatattcaatgaaaa
taataaatgaaataattgagatgaaatattatctaaagaatgcatgagaa
taactgaatctgataaagtaaaaattaaaattaagagagaagagaaaaataa
gaaagtgagcaattgaaaaacggaataataaataattttttaagaaaaat
aatttcatcatgtattttctctatgctacgtacataaacgcaaacgctata
aatagagttattgacatttgggaggttgatttggtttttatcaacatcgca
aaacagaaaaatttaggttgacagattttcacatggctatcacgttcagaat
ccaatcaggttctccttctttactacttgatgacttctttaagataaat
aagcccgcggaaccaagaagtgggtacactggctcggttaactctctctcc
ccagaaatttcactactgaaaagattattatttgggggcggggaaggga
tgtagaggtctttaggacccagcagggcggcgagggcggcagttgtgtag
atcgctgagagactacgaggggtccgggttcagttttaattctgtctctaat
CTCTGCAACAGCCGCGCTTCCCGGGTCCCGCGGCTCCCGCGCGCGATCTG
CCGCGGCCGGCTGCTGGGCAAAAATCAGAGCCGCTCCGCCCCATTACCC
ATCATGGAAACCCTCCAGGAAAAAGTGGCCCCGGACGCGCGAGCCTGAGG
ATTCTGCACAAAAGAGGTGCCCAAAATGAAGACCCTGATGgtgagtcagt
tgtggcaactccaccgggcaaagagggggatccccgggctcagggccac
gggacgcaccgtggagactccgagacgcctaaccctgggcccgcgaggtcg
cctgttacaaagggacaactttctacccgctccgcgttccctcccgattc
tccagctctgcctggctcggaatcccagagccaggatgggaactcgggggt
tgctcgcctcctagatctccggcgagaggtccgaggggggtggcgagag
ctgcaggagcgatggaggagtgggcagattgctcaagggatgggggtgcc
caaaagcaacagcctgccaaaaactaagagggacggggaggggggacctt
tgcagactttcttcgttttcttagatttcaaacttgcaaggatcgcaagg
atccaggggccccaggaaggaggggtgtgaaggactcaaaattccagcag
cttggttggttggttggtgctgcgcagacgggccccttccccaaagtgcacccc
accctgtcctcgggccccggcgctccctccctcagcccggggcccgtac
accacctgccctctaccgagagatctgggcggcgggcgccgaaagcagcg
acgcgcccggagcatcccttgcgatacgctaggggacggtgctttctctg
tcccagttgctgctgcggcggggctggggcccaggccgccccaaatctcccc
cactagagtgaaccacgcacagttgtccccgctgggcgcgctcctccggt
gtctgcgctcagccgctctctctctctctctcccgccccggcgagCGCC
ATGGTCTGGCAGTGTGTTTAGCGCTCACCACCATGTGCACCAGCTTGTG
CTAGTGTACAGCAGCCTCGGCGGCCAGAAGGAGCGGCCCCCGCAGCAGCA
GCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGGCGTCGGCCACCGGCAGCTCGC
AGCCGGCGGGGAGAGCAGCACCCAGCAGCGCCCCGGGGTCCCCGCGGGA
CCGCGGCCACTGGACGGATACCTCGGAGTGGCGGACCA|CAAG
```

Фигура 4

A. hrHPV-положительные самостоятельно полученные образцы, собранные с помощью смыва

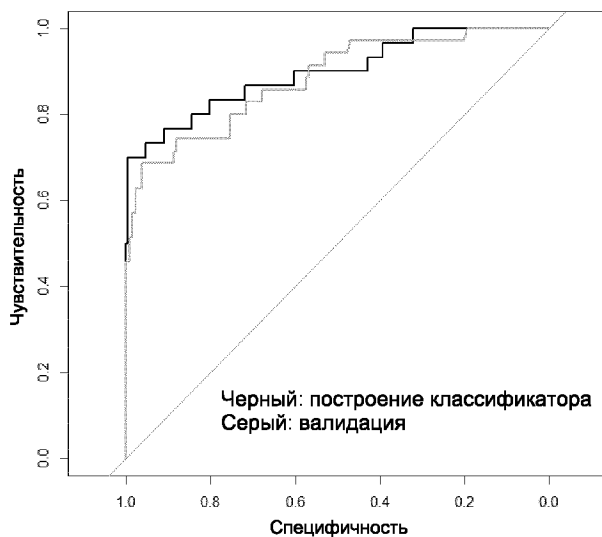


B. hrHPV-положительные самостоятельно взятые образцы, собранные с помощью щетки

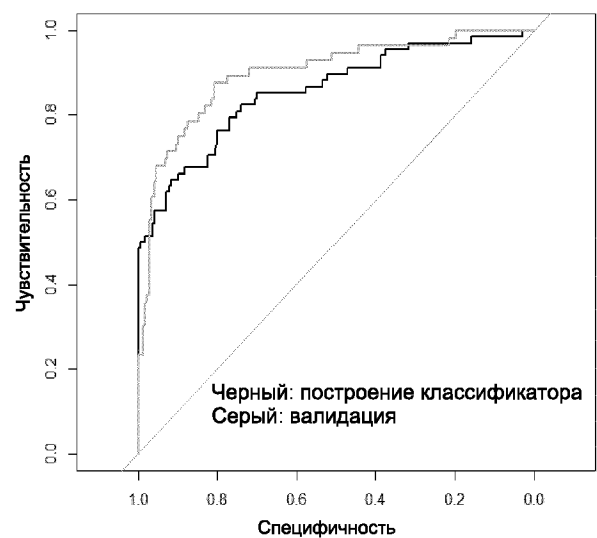


C.

Смыв

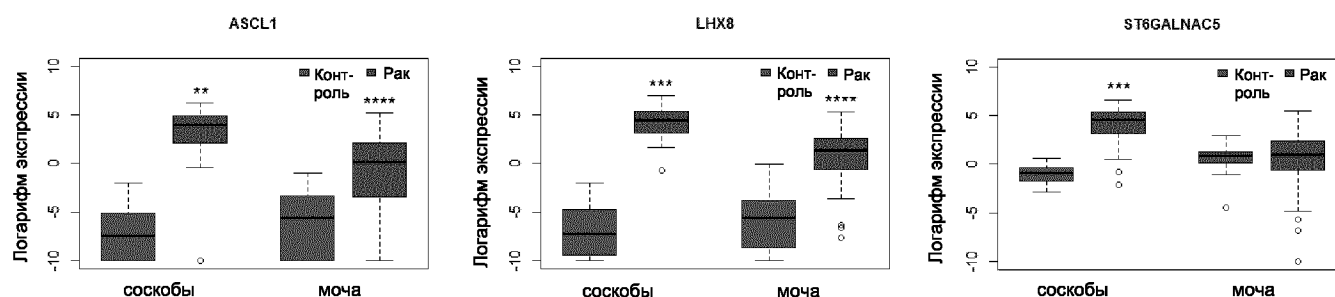


Щетка

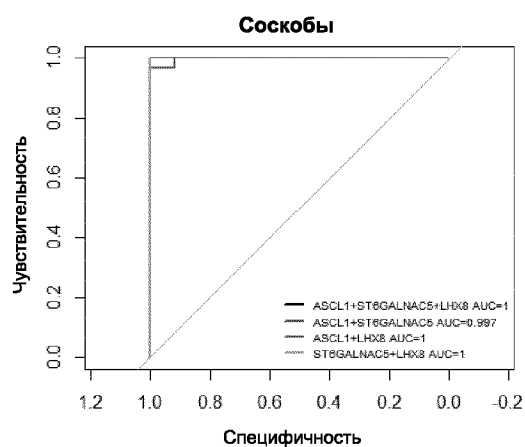


Фигура 5

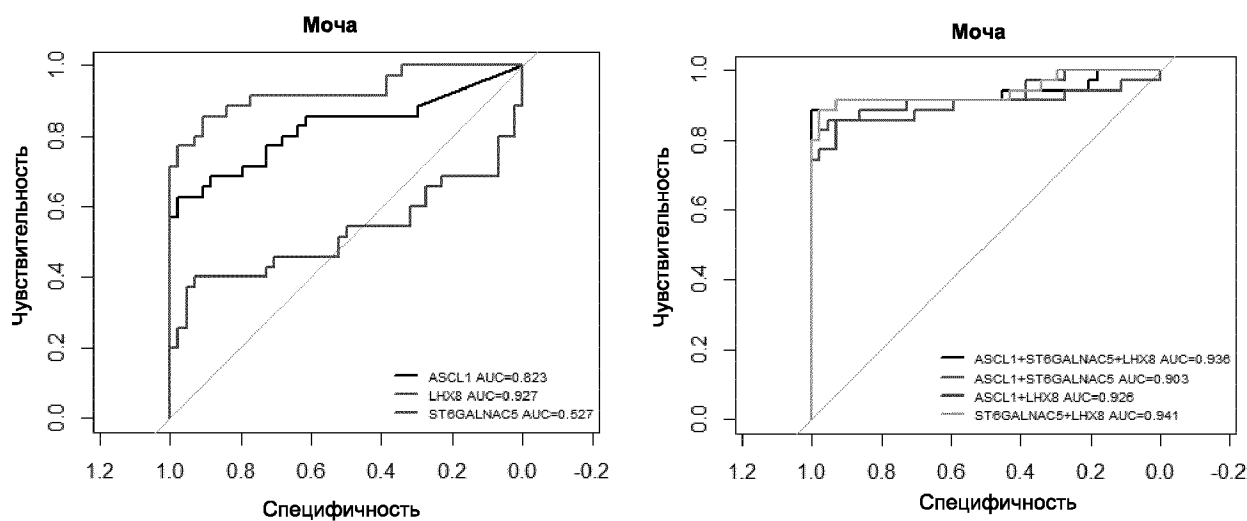
А. Результаты qMSP в соскобах и моче



В. Кривые рабочих характеристик приемника (ROC-кривые) в соскобах ВПЧ+

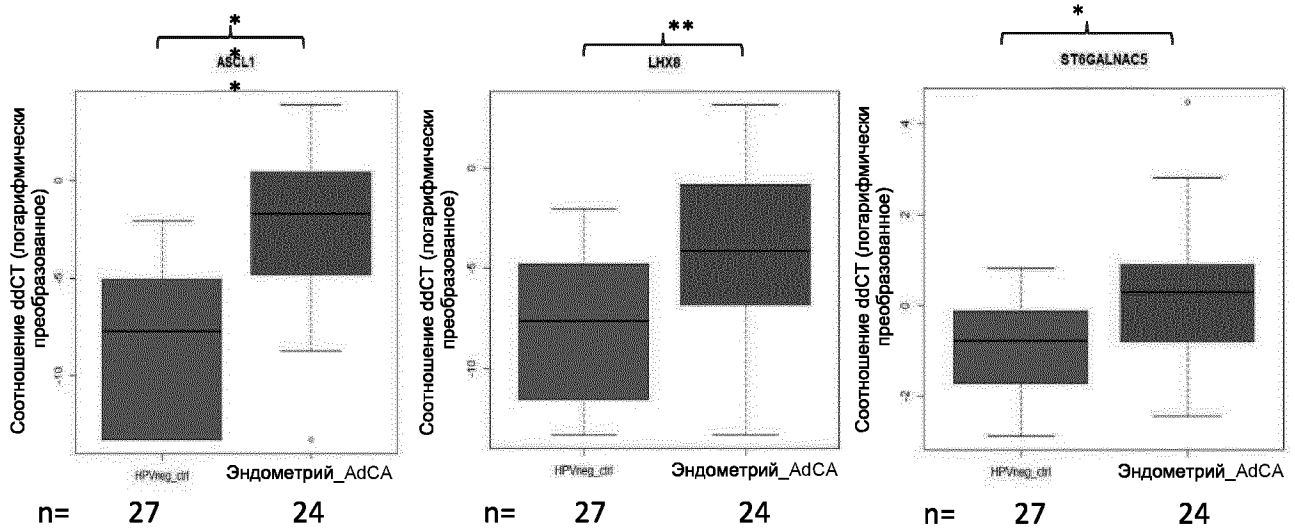


С. Кривые рабочих характеристик приемника (ROC-кривые) в моче



Фигура 6

Результаты qMSP в соскобах шейки матки пациентов с раком эндометрия



Фигура 7: Последовательность ZNF-582 (регуляторная область и экзон 1), полученная из Refseq NM_144690 (hg19). Кодирующая последовательность показана прописными буквами, а подчеркнута CpG - богатая область.

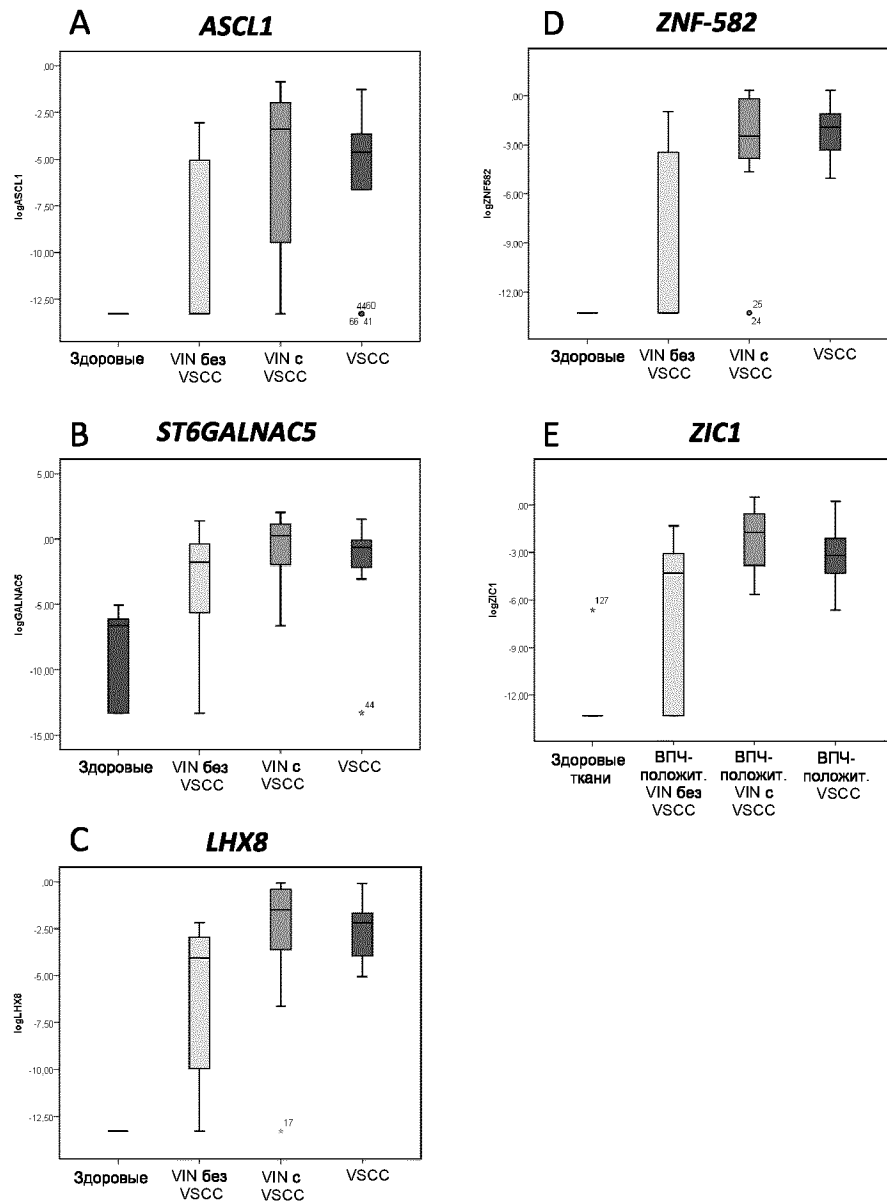
```
>hg19_refGene_NM_144690
agttcaggcattctgggtccagtcttagagatgggttaagggttcacactc
ttaaccatttattacaccatagagctcaccagggttgagggaacaggat
caaatacaaaagagtcactcaggactccagtcctcactcaaggacaaactg
ttccacctcggacagggagaggtttccgcattctgagacccagcataacag
gtcctgaccggcatctggcactcggactcccaatcatactggatcacact
ggctcgggatgtgtaaagtccagggcttctcacatttgatgacaccaaag
ccgcctaaaaacaagagagaattaacaactacctacggcgggtctgatatt
tgcccaagagatgccgccccataaaactcctttacatctttataacgttt
ttattttgcggttctccttcataacccacatttaactcaccatagatgtaa
tgtttaaaattagttaccagataaaactcttacgcttccaaactttaagggt
tccttcgaaaccttctggtaaaactggttggttcacggaaatgggaacgta
acggatgaggcaatcttccacagccgcacacagttgtgtatccaccgcta
aacgggtcccagtcatacattcaacgacccacgcggagtcagaagctacca
ccacacactgtcaaaatcacgcacacacagtgacggccccttgcccactc
ggtcactcgcccacaatctctcgctagagaatcacacgcagatagcacac
ccagcaccacagaccccaggaagcaaccacagggactcgaacacacgaaca
gcactcctccgcgcactgcgcaggcacgcctgcgtccgggtcacccctgaa
acatcgcgagatccggcttcaaggccgggctgctgcctttacgcctaaag
actatgtttcccggaagacactgcggcgccggccctatcatggcgagca
tcgggtgtgctttgtgcgtctgcgccatcttccggctgcgcacggcggaatc
CACCGGTACCGTGGTGGAAGCGCGCCCTGGGCTGCCGGGGGCGCGGCCGC
GGTGGCACTTGGACCCGAGGAGGCGGCAG
```


Фигура 8: Промоторная область ZIC1 и кодирующая последовательность (полученная из Refseq: NM_003412 (hgl9)); CpG-островки обозначены серым цветом, а кодирующая последовательность показана прописными буквами

```
>hg19_refGene_NM_003412 range=chr3:147126181-147131338
gagagacaggggttagcgggggcagtcgaaggagacaacggaaaggcagaa
aacagaaaaataacgcaagagagagaaaaagttaaaggaaaactggcaacaa
cgtttc aaatttgcattaaaaaattcaaacctcaataacctgggaactt
aagcgctttcatccacctgtgtgtgtgagtggtgtgtgtgtgtgtgtttc
ggggaggggggtgcgggtggtgcgggaagtcgtatagataaaagcgagaa
atacagaggctgcgggttacactgagaaattacattttttgttaaagaga
gcatagtgcccggtgtgtctccaagatcttaattataaacaggaggggga
caaagcaagagggaacaaactcaaaaggagcaaaatacaaaagcctct
tttgctgctcttgaagggaggggggaagggggaagaaagaaaagaaagtt
gotgaatcgggacattctggaaagtgcctttgctgtgtttactagcccat
cccgcctgctgcacccggagacgtctgaagtctctaatcgctcagcgaa
aagttggtttcgggaagggcagcgccggggtgcgggagggaaggaggga
agaggaatgcatatgactgtgagaaggaaaagtaatcgtggcaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaatctc
cgtgagaagagggaaaaaatttggctaaaaaaaagttgctaactctggc
agccctggtttgtcaaaaggggatgtcaagcgcttacaatacctgggat
tgatgagggcgggcgggccaatgagctgcgcgcggcgccctcggcgcgccct
ccgttggcgcgggcggtgagggcggggggaatgcgggcgcaccaatgggc
gccagcgtcggcagcagctgacacctccccctgctccattcatcaagg
gggggaagggtgtcgtccttcaattcatctatctgcaggaatgattgctg
ctatcagctctcgcgctcacccgccggctgaggaggtgaaagtttctcccc
aggaagataaaacgcgcaaaagacaaattattgtgcatgatttgcgccctttct
ttggctttttctttctttcttcaacccccccacccactttttttttttt
ttttcaaaagcagagaggggaaaaacggagagtgaaggagcgaggaggcg
agcgtgagagaaaggagagagagagaaaaagaaagggcgaggggcctagtgg
agaagtaaggaggggcgcgctgcggcgaggcgagagagggcgaaagcagtc
gcggcaactggcgctcacattcctctatgtctacaaatccaggaggaaagt
ttttttttaggggctgagatgctccatgcctttccccgggcagccttgacg
cgcgccctctcggcagagactgagcggcgagaaagtgcgagccgggcgg
gcagaaatctgcctggcgggcgctggagcctgcgttactcgcgcccgag
cgttccggctactttgcttttggcccgggccagcgcccgggcgcgccggcg
cattgccctgcaggctaggacttcgagaggtgggtcgactccccctcctc
ctcctcttcttctcctccttctcctcctccttcttctcctcctcctccc
gattttccctcctcggctggcgaggggtggggggggcgggggaggccgggg
ctcgccccgagcagccacgATGCTCCTGGACGCCGGCCCCAGTACCCAG
CGTCGCGCTGACCACTTTGGCGCTCCGCCACCACTCGCGGGCGAC
GTGGCCGACGAGACGTGGGCTGGGCAACAACCGTTGCGGACGGCAT
GGGCGCCTTCAAGCTCAACCCAGTTGCAAGAGCTGGCTTCGGCCGGCC
AGACGGCCTTCAAGTCGAGGCGCCAGGCTACGCGGCTGCTGCGGCCCTG
GGCCATCACCATCACCAGGCGCACGTGGCTCCTATTCAGCGCAGCCTT
CAACTTCACGCGGGACTTTCGTTCGGCAACCGGGTTTGGCGACGCGG
CGGCGGAGCCAGCGCACAGCAAGCCTCTTGTGCTATCGGCCGGGGC
TTCGGGGGCCACACGGCCACACGGACCGCGGGGCCACCTCCTCTCCC
CGGGCTTCACGAGCAGGCTGCCGGCCACGCTCGCCTAACGTGGTCAACG
GGCAGATGAGGCTCGGCTTCTCGGGGACATGTACCGCGACCGGAGCAG
TACGGCCAGGTGACCAAGCCGCTTCGGAGCACTATGCTGCGCCGAGCT
GCACGGCTACGGGCCCATGAACGTGAACATGGCCGCGCATCACGGCGCCG
GCGCCTTCTTCCGCTACATGCGCCAACCATCAAGCAAGAGCTCATCTGC
AAGTGGATCGAGCCGAGCAGCTGGCCAACCCAAAAAGTCGTGCAACAA
AACTTTCAGCACCATGCACGAGCTAGTTACGCACGTCAACGTGGAGCAG
TAGGTGGCCCGGAGCAGAGTAATCACATCTGCTTCTGGGAGGAGTGTCG
CGCGAGGGCAAGCCCTTCAAAGCCAAATACAACTGGTTAACCAATCCG
CGTGACACAGGGCGAGAAGCCCTTTCCTTGCCCTTCCCTGGCTGTGGCA
AGGTCTTCGCGCGCTCCGAGAATTAAAGATCCACAAAGGACGCACACA
GGGAGAAAGCCCTTCAAGTGCGAGTTTGAGGGCTGTGACCGGCGCTTCGC
```

Фигура 9

Результаты qMSP в образцах вульвы



Фигура 10

Результаты qMSP в образцах тканей заднего прохода

