

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191694 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.09

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

(22) Дата подачи заявки
2020.02.21

(54) ПАНЕЛЬ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАКА

(31) 19158682.5; 19174483.8

(32) 2019.02.21; 2019.05.14

(33) EP

(86) PCT/EP2020/054667

(87) WO 2020/169826 2020.08.27

(71) Заявитель:
УНИВЕРСИТЕТ ГЕЙДЕЛЬБЕРГ
(DE)

(72) Изобретатель:

Шотт Сара, Зон Кристоф, Галават
Ифе, Витте Тобар Таня (DE)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу диагностики или прогнозирования рака, включающему определение in vitro уровней метилирования цитозина в маркерных генах и/или определение уровней экспрессии маркеров микроРНК.

202191694 A1

202191694

A1

ПАНЕЛЬ БИОМАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАКА

Настоящее изобретение относится к панелям маркеров метилирования и микроРНК, а также их применению для прогнозирования, диагностики и/или лечения рака, средствам для детекции указанного маркера и наборам, содержащим указанные средства.

Область техники

Рак представляет собой одну из наиболее значимых проблем медицины и здравоохранения в мире. Рак является основной причиной смертности во всем мире, и в 2008 году было зафиксировано 12,4 миллионов новых случаев рака и 7,6 миллионов смертей, связанных с раком. Было предсказано, что количество смертей от рака по всему миру будет непрерывно увеличиваться, и в 2030 году раком будут вызваны 12 миллионов смертей. Рак молочной железы представляет собой наиболее распространенный тип рака у женщин. Приблизительно у одной из девяти женщин в течение жизни развивается рак молочной железы (Feuer, E.J., et al., The lifetime risk of developing breast cancer. J Natl Cancer Inst 85, 892-897 (1993)). По всему миру ежегодно приблизительно у 1,3 миллионов женщин развивается рак молочной железы. С течением времени уровни смертности продолжают уменьшаться в связи с множеством попыток и успехов, достигнутых в области ранней диагностики и лечения (Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011; 61:69-90). Несмотря на это, каждый год тысячи женщин умирают от данного заболевания. У женщин в США общая пятилетняя выживаемость составляет 98% при диагностике на ранней стадии, тогда как в случаях, когда заболевание уже распространилось в отдаленные органы, выживаемость составляет 23%. Таким образом, ранняя детекция рака молочной железы относится к одной из основных задач в борьбе против данного заболевания. На сегодняшний день в качестве стандарта диагностики применяют маммографический скрининг. Однако он имеет ограничения в связи с применением ионизирующего излучения и показателя ложноположительных заключений, составляющего 8–10%, который также зависит от возраста индивидуумов, подлежащих скринингу (Taplin S *et al.*; J Natl Cancer Inst 2008; 100: 876-87).

Большинство случаев рака молочной железы возникают спорадически, в то время как на наследственный рак молочной железы приходится приблизительно 10% от всех

случаев рака молочной железы (Fackenthal *et al.*; Nat Rev Cancer 7, 937-948 (2007)). На мутации в основных генах, связанных с раком молочной железы, *BRCA1* и *BRCA2*, приходится 25%, а на мутации в других умеренно и низко-пенетрантных генах – приблизительно 5% всех наследственных случаев (Yang, R. & Burwinkel, B. (eds.).

5 Familial risk in breast cancer, 251-256 (Springer, 2010)). Недавние полногеномные поиски ассоциаций (GWAS) и методы поиска одиночных генов-кандидатов достаточно успешно использовали для детекции генетических вариантов с низким риском рака молочной железы (Thomas, G., *et al.*, Nat Genet 41, 579-584 (2009); Cox, A., *et al.*, Nat Genet 39, 352-358 (2007); Stacey, S.N., *et al.*, Nat Genet 40, 703-706 (2008); Ahmed, S., *et al.*, Nat Genet 10 41,585-590 (2009); Easton, D.F., *et al.*, Nature 447, 1087-1093 (2007); Milne, R.L., *et al.*, J Natl Cancer Inst 101, 1012-1018 (2009); Frank, B., *et al.*, J Natl Cancer Inst 100,437-442 (2008)). Однако большое количество факторов риска рака молочной железы все еще предстоит изучить.

По сравнению с РМЖ рак яичников (РЯ) возникает относительно редко, однако 15 является основной причиной смертности от гинекологического рака в связи с высокой злокачественностью. В 2008 году рак яичников был диагностирован у 225000 женщин в мире, и 140000 из этих женщин умерло от указанного заболевания. Как правило, у женщин с РЯ проявляются лишь несколько ранних симптомов, и, таким образом, приблизительно три четверти случаев рака яичников выявляют на прогрессирующей 20 стадии, когда заболевание распространилось далеко за пределы яичников. Рак поджелудочной железы (РПЖ) является наиболее агрессивным из всех эпителиальных злокачественных образований. При 279000 новых диагнозов РПЖ по всему миру уровень 5-летней общей выживаемости пациентов с РПЖ составляет менее 5%. Несмотря на то, что в ходе недавно проведенных общегеномных исследований 25 ассоциаций (GWAS) были успешно детектированы некоторые генетические варианты, ассоциированные с риском РМЖ, РЯ и РПЖ, не было выявлено ни одного поддающегося оценке маркера для ранней детекции РМЖ.

Метастатический рак молочной железы (МРМЖ) по всему миру представляет собой основную проблему в области здравоохранения. Применяемые сегодня стратегии 30 лечения МРМЖ направлены в первую очередь на паллиативный уход, и излечение происходит в незначительном числе случаев. Альтернативный подход к борьбе с МРМЖ заключается в разработке способов скрининга и применении биомаркеров для идентификации групп высокого риска и ответа на терапию. Данный подход может

облегчить клиницистам принятие решения и поможет корректировать подходящий для пациентов режим лечения.

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) были предложены в качестве одобренного FDA независимого прогностического маркера метастазирования, в частности, выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости. Основное пороговое значение более 5 ЦОК на 7,5 мл крови было определено как ЦОК-положительный результат (Cristofanilli *et al.*, N Engl J Med. 2004 Aug 19;351(8):781-91). Однако важно отметить, что значительная часть пациентов с выраженными отдаленными метастазами является отрицательной по ЦОК. Этому отчасти может способствовать явление эпителиально-мезенхимального перехода ЦОК, и в таком случае они могут быть пропущены при использовании методик подсчета, в которых используют экспрессию эпителиальных маркеров, таких как ЕрСАМ или цитокератин-8, -18 и -19.

Помимо ЦОК в качестве прогностических маркеров, а также при мониторинге успешности лечения и последующего наблюдения при раке молочной железы широко используют также циркулирующие опухолевые маркеры на основе белков, такие как карциноэмбриональный антиген (СЕА) и углеводный антиген 15-3 (СА 15-3) (Uehara *et al.*, Int J Clin Oncol 2008;13:447-51; Harris *et al.*, J Clin Oncol 2007; 25:5287-312). Однако чувствительность данных маркеров является низкой. Таким образом, необходимы новые чувствительные и специфичные, а также минимально инвазивные маркеры.

Эпигенетические изменения по определению представляют собой изменения экспрессии генов, которые не являются следствием каких-либо изменений в последовательности геномной ДНК. Аберрантные эпигенетические сигнатуры считают отличительным признаком рака человека (Esteller, M. Nat Rev Genet 8, 286-298 (2007)). Одна из наиболее важных эпигенетических сигнатур, метилирование ДНК, играет важнейшие роли в контроле активности генов и в архитектуре ядра клетки (Weber, M., *et al.*, Nat Genet 37, 853-862 (2005)). Более того, в отличие от генетических маркеров или вариантов, метилирование ДНК преимущественно является обратимым. Соответственно, профиль метилирования конкретных генов рассматривают в качестве терапевтической мишени (Mack, G.S. J Natl Cancer Inst 98, 1443-1444 (2006)). При этом в связи с вариабельностью характера метилирования ДНК оно может выступать в качестве связующего звена между факторами окружающей среды и геномом. Метилирование ДНК, которое модулируют факторы окружающей среды или старение, может изменять экспрессию критически важных генов клеток и, вследствие этого, вызывать

злокачественную трансформацию клеток или даже рак (Widschwendter, M., *et al.*, PLoS One 3, e2656 (2008)).

Как событие, происходящее на ранних стадиях развития рака, изменения метилирования ДНК, в частности, являются перспективными маркерами для ранней
5 детекции рака. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что анализ метилирования ДНК клеток крови может выступать в качестве надежного и устойчивого маркера. В ходе интенсивных исследований были обнаружены измененные сигнатуры метилирования ДНК при раке на соматическом уровне, при этом только в нескольких исследованиях на основе метода генов-кандидатов были проанализированы сигнатуры
10 метилирования в ДНК периферической крови при раке.

В предыдущих исследованиях изучали гиперметилирование в промоторных областях генов супрессоров опухолей и гипометилирование в промоторных областях онкогенов при раке молочной железы по сравнению с нормальными смежными тканями (Ito, Y., *et al.* Hum Mol Genet 17, 2633-2643 (2008); Potapova *et al.*, Cancer Res 68, 998-1002
15 (2008); Radpour *et al.*, Oncogene 28, 2969-2978 (2009); Widschwendter, M. & Jones, P.A. Oncogene 21, 5462-5482 (2002)). Лишь незначительная часть исследований была сфокусирована на сигнатурах метилирования в ДНК периферической крови и риске возникновения рака молочной железы. В этих исследованиях изучали только конкретные гены, такие как BRCA1 (Iwamoto *et al.*, Breast Cancer Res Treat 129, 69-77
20 (2011)), ATM (Flanagan, *et al.*, Hum Mol Genet 18, 1332-1342 (2009)) и гены в конкретных путях (Widschwendter *et al.* (2008), *выше*).

Таким образом, в данной области техники существует потребность в идентификации дополнительных маркеров рака молочной железы, рака яичников и другого рака, предпочтительно, позволяющих идентифицировать пораженных
25 субъектов путем отбора образца малоинвазивными способами, например, путем взятия образца крови.

Таким образом, в данной области техники существует безотлагательная потребность в усовершенствованных способах диагностики и прогнозирования рака, в частности, рака молочной железы, рака яичников и рака поджелудочной железы.
30 Указанные способы предпочтительно также будут использоваться при превентивном скрининге клинически здоровых субъектов; предпочтительной будет низкая степень инвазивности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен способ диагностики или прогнозирования рака у субъекта, причем указанный способ включает этапы определения *in vitro* в образце, полученном от указанного субъекта:

- 5 а) метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из *HYAL2*, *MGRN1*, *RPTOR*, *SLC22A18*, *FUT7*, *RAPSN* и *SI00P* и/или
- б) уровня экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, которая выбрана из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b
- 10 и miR-141, при условии, что по меньшей мере одна микроРНК содержит по меньшей мере одну микроРНК, которая выбрана из группы, состоящей из miR-200c-3p, miR-375 и miR-320b,

при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение уровня экспрессии miR-451a,

- 15 причем сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена и измененный уровень экспрессии по меньшей мере одной микроРНК служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания у указанного субъекта.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложен способ

20 диагностики рака или скрининга рака, включающий предсказание или детекцию рака согласно первому аспекту настоящего изобретения.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложен способ мониторинга субъекта, имеющего повышенный риск развития рака, включающий предсказание или детекцию рака неоднократно согласно первому аспекту настоящего

25 изобретения.

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предложен способ мониторинга лечения рака у субъекта, включающий предсказание или детекцию рака в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения неоднократно на протяжении всего периода лечения.

30 Согласно пятому аспекту настоящего изобретения предложен способ оценки ответа субъекта на лечение рака, включающий предсказание или детекцию рака согласно первому аспекту настоящего изобретения во время и/или после лечения.

Согласно шестому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, детектированный способом согласно первому аспекту

настоящего изобретения, дополнительно включающий введение указанному субъекту противораковой терапии.

Согласно седьмому аспекту настоящего изобретения предложен набор, содержащий олигонуклеотиды для специфичной детекции:

- 5 - уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из *HYAL2*, *MGRN1*, *RPTOR*, *SLC22A18*, *FUT7*, *RAPSN* и *S100P*, и/или
- 10 - уровня экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, выбранной из группы, состоящей из 148b, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-375, miR-320b, miR-451a и miR-141, при условии, что по меньшей мере одна микроРНК содержит по меньшей мере одну микроРНК, выбранную из группы, состоящей из miR-200c-3p, miR-375, miR-320b и miR-451a.

15 Согласно восьмому аспекту настоящего изобретения предложено применение набора согласно седьмому аспекту изобретения для предсказания, прогнозирования и/или диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы, рака яичников и/или рака поджелудочной железы, предпочтительно рака молочной железы и рака яичников.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

20 Ниже описано содержание чертежей, включенных в настоящее описание. В этом контексте также рекомендовано изучение подробного описания изобретения выше и/или ниже в тексте.

Фиг. 1: перечень 15 используемых маркеров. Приведенный перечень генов включает гены, для которых определяли метилирование цитозина в динуклеотидах CpG. В правом столбце указано предпочтительное измеренное значение CpG, предпочтительно для ранней диагностики рака молочной железы. Кроме того, представлены предпочтительные микроРНК, уровень экспрессии которых был определен. Кроме того, приведен предпочтительный клинический маркер – возраст, и показатель общего количества циркулирующих микроРНК – «Qubit».

30 **Фиг. 2:** относится к шести различным моделям, протестированным в когорте HEIScreen, состоящей из пациентов с раком яичников. 49 маркеров, протестированных в Модели 1, представляют собой: Возраст пациента, CA125, Qubit, miR-409, miR-652, miR-148b, miR-375, miR-200c, miR-320b, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6, RPTOR_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4,

FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, S100P_CpG2.3, S100P_CpG4, S100P_CpG7, S100P_CpG8, S100P_CpG9, S100P_CpG10.11.12, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, SLC22A18_CpG8, HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG5.6.7.8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG16.17.18, MGRN1_CpG19.20, MGRN1_CpG22.23, MGRN1_CpG26, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG2, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8.

В Модели 2 антиген CA125, который обычно используют при диагностике рака яичников, был опущен. В Модель 3 были включены все сайты метилирования Модели 1 и клинического маркера «возраст». Модель 4 включала только маркеры метилирования в указанных генах. В Модели 5 использовали все микроРНК, включенные в Модель 1, и клинический маркер «возраст», тогда как в Модели 6 использовали только уровень экспрессии указанных микроРНК. Точность, чувствительность, специфичность и площадь под кривой (AUC) для указанных моделей приведены в таблице ниже. Для прогнозирования использовали алгоритм случайного леса и деревья решений с экстремальным усилением.

Фиг. 3: относится к маркерам микроРНК при раке яичников. Две разные модели и отдельные маркеры микроРНК, протестированные в когорте Dresden пациентов с раком яичников. В Модели 1 использовали все микроРНК, представленные на приведенных выше графиках, тогда как в Модели 2 использовали только указанные микроРНК. Точность, чувствительность, специфичность и площадь под кривой (AUC) для указанных моделей приведены в таблице ниже.

Фиг. 4: относится к маркерам при раке яичников. Две модели тестировали в объединенных когортах рака яичников HEIScreen и Dresden на Фиг. 2 и 3. В Модели 1 использовали все микроРНК Модели 1 с Фиг. 3, тогда как в Модели 2 использовали только указанные микроРНК. В столбцах, где указан 251 протестированный субъект, использована только когорта Dresden (176 случаев заболевания и 75 контролей), тогда как 401 пациент включали дополнительную когорту HEIScreen (91 случай и 59 контролей).

Фиг. 5 относится к маркерам микроРНК при раке молочной железы и раке яичников. Уровни экспрессии указанных микроРНК, измеренные в когорте HEIScreen и Dresden пациентов с раком яичников и в 163 случаях рака молочной железы. Звездочками обозначены следующие р-значения: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * ** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$

Фиг. 6: относится к маркерам микроРНК при раке молочной железы. микроРНК-375 измеряли в когорте пациентов NeoAdjuvant с раком молочной железы. Уровень экспрессии miR-375 коррелировал с ответом пациентов на лечение рака и на его основе может быть предсказан ответ на терапию. На левом графике показана экспрессия miR-375 в когорте NeoAdjuvant. Члены когорты были сгруппированы в группы субъектов, отвечающих на лечение и не отвечающих на лечение в соответствии с патологическим ответом на момент операции (ОП). На левом графике показаны уровни экспрессии miR-375 на разных стадиях лечения. Уровень экспрессии выше у субъектов, не отвечающих на лечение. На правом графике представлены данные репрезентативного пациента (NB30) с прогрессирующим заболеванием (метастазированием), который не отвечал на лечение, также характеризующиеся 50-кратным повышением уровня бесклеточной микроРНК («Qubit»). А: время постановки диагноза; В и С: интервалы во время неоадьювантной химиотерапии; D Pre-OP: до хирургической операции, E Post OP: через 22 дня после операции, ПН: последующее наблюдение через 7 месяцев после операции

Фиг. 7: относится к маркерам метилирования при раке молочной железы. Измеряли уровни метилирования отдельных CpG-сайтов в указанных генах. Определяли маркеры в когорте NeoAdjuvant, состоящей из 54 пациентов, и проводили измерения в пяти временных точках. По оси Y на графиках отмечен процент метилирования. HER2+, TNBC и LumB относятся к различным типам рака молочной железы. А: время постановки диагноза; В и С: интервалы во время неоадьювантной химиотерапии; D Pre-OP: до операции, E Post OP: после операции

Фиг. 8: относится к маркерам метилирования при HER2+ раке молочной железы. Определяли индивидуальные уровни метилирования у членов когорты NeoAdjuvant. Члены сгруппированы в группы отвечающих на лечение и не отвечающих на лечение в связи с патологическим ответом, определенным на момент операции.

Фиг. 9: относится к долгосрочному последующему наблюдению рака молочной железы. Приведены характеристики участников долгосрочного последующего наблюдения. Показатели 87 пациентов были измерены при первой постановке диагноза, и образцы для последующего наблюдения были получены от 52 пациентов, при этом 5 образцов имели неудовлетворительное качество и 26 пациентов умерли во время исследования.

Фиг. 10 относится к микроРНК в качестве прогностических маркеров при долгосрочном последующем наблюдении. МикроРНК: miR-625 и miR-200c были определены и скоррелированы с общей выживаемостью (ОВ), выживаемостью без

признаков заболевания (ВБЗ) и выживаемостью без прогрессирования заболевания (ВБП). В качестве дополнительного маркера определяли Qubit. Время на оси X указано в годах. Исследуемые пациенты были распределены в группы «низкого» и «высокого» уровня на основании отличия от медианного значения уровня экспрессии микроРНК, причем в группе низкого уровня значения были ниже медианного значения, а в группе высокого уровня значения были выше медианного значения.

Фиг. 11 относится к метилированию ДНК в качестве прогностического маркера для общей выживаемости. Было определено метилирование динуклеотидов CpG в указанных генах (были использованы те же CpG, что и перечисленные на Фигуре). Затем пациенты должны быть распределены в две разные группы (с низким уровнем метилирования и высоким уровнем метилирования) на основании -2 стандартных отклонений от среднего значения метилирования каждого ампликона. Пять из шести протестированных генов значимо коррелируют с плохим прогнозом ОВ при низких уровнях метилирования на момент постановки диагноза.

Фиг. 12 относится к метилированию ДНК в качестве прогностического маркера для выживаемости без прогрессирования. Было определено метилирование динуклеотидов CpG (как и на Фигуре 11) в указанных генах. Затем пациенты должны быть распределены в две различные группы (с низким уровнем метилирования и высоким уровнем метилирования) на основании отклонения от среднего значения для каждого из сайтов метилирования. Три из шести протестированных генов в значительной степени коррелируют с ВБП при низких значениях метилирования на момент постановки диагноза.

Фиг. 13 относится к метилированию ДНК в качестве прогностического маркера для выживаемости без заболевания. Было определено метилирование динуклеотидов CpG (как и на Фигуре 11) в указанных генах. Затем пациенты должны быть распределены в две различные группы (с низким уровнем метилирования и высоким уровнем метилирования) на основании отклонения от среднего значения для каждого из сайтов метилирования.

Фиг. 14 относится к тесту маркеров во всей когорте случаев рака молочной железы (312 контролей и 238 случаев рака молочной железы) и наилучшим маркерам-предикторам по результатам расчетов с применением модели с гибкими штрафами.

Для анализа использовали следующие маркеры: Qubit, возраст, miR-148b, miR-652, miR-200c, miR-409, miR-375, miR-320b, miR-801, HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, S100P_CpG2.3, S100P_CpG4, S100P_CpG7, S100P_CpG8,

S100P_CpG9, S100P_CpG_10.11.12, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, SLC22A18_CpG8, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG3, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6, RPTOR_CpG8, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG2, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG5, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4, FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, FUT7_CpG8, MGRN1_CpG2, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG_5.6.7.8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG16.17.18, MGRN1_CpG_19.20, MGRN1_CpG_22.23, MGRN1_CpG26, MGRN1_CpG27, MGRN1_CpG28, MGRN1_CpG29, MGRN1_CpG31, MGRN1_CpG32, Nationality, рост [см], масса тела [кг], возраст первой менструации, высокий уровень холестерина, диабет, эндометриоз, миома, киста яичника, СПКЯ, аутоиммунное заболевание, лекарства, беременность, возраст первой беременности, контрацептивы или гормоны, курение, вегетарианство, занятия спортом.

Фиг. 15 относится к выбранным наилучшим маркерам-предикторам в той же когорте случаев рака молочной железы, что и на Фигуре 14, но группы разделены на подгруппы по возрасту (<50 лет и >50 лет).

Фиг. 16 относится к долгосрочному исследованию когорты HEIScreen с раком молочной железы применительно к общей выживаемости. Для долгосрочного исследования использовали следующий перечень маркеров (анализ общей выживаемости, выживаемости без прогрессирования и выживаемости без признаков заболевания (n=63): возраст, уровень заболеваемости, тип рака молочной железы, стадия, cT, cN, cM, "pT (хирургия)", "pN (хирургия)", химиотерапия (проводилась/не проводилась), HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, S100P_CpG2.3, S100P_CpG4, S100P_CpG7, S100P_CpG8, S100P_CpG9, S100P_CpG10.11.12, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG2, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG5, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4, FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, SLC22A18_CpG8, MGRN1_CpG.2, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG5.6.7.8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG16.17.18, MGRN1_CpG_19.20, MGRN1_CpG_22.23, MGRN1_CpG26, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG3, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6, RPTOR_CpG8, Qubit, miR-148b, -200c, -320b, -375, -409, -652, -205, 141 и -210.

Целью этого исследования было сравнение общей выживаемости (ОВ), выживаемости без признаков заболевания (ВБЗ) и выживаемости без прогрессирования

(ВБП) и выбор для каждого из них маркеров, которые обеспечивают хорошее сравнение. В первом анализе наряду с маркерами использовали клинические маркеры «Возраст постановки диагноза», «Уровень заболеваемости», «Тип рака молочной железы», «сТ», «сN», «сМ», «Степень», «рТ» и «рN». Во втором анализе рТ и рN были исключены.

5 Кроме того, в двух анализах использовали только маркеры метилирования и микроРНК, соответственно.

Маркеры были выбраны путем аппроксимации регрессионной моделью Кокса с гибким штрафом (Elastic-Net). Затем конструировали две группы на основе выбранных маркеров путем кластеризации методом 2 средних и сравнивали соответствующие значения времени выживания путем построения кривых Каплана-Мейера с соответствующими доверительными интервалами.

Маркерами, выбранными из вышеописанной панели маркеров в качестве наилучших предикторов для ОВ, были клинические маркеры «Уровень заболеваемости» (тип метастазирования: висцеральный, невисцеральный или оба), «Тип рака молочной железы», «сТ», «сМ» и «рТ». Кроме того, были выбраны с помощью модели следующие маркеры метилирования: HYAL2 CpG3, HYAL2 CpG4, S100P CpG9 и RPTOR CpG8, а также уровень экспрессии mi-200с. Анализ с использованием логрангового критерия показал значимое различие между группами 1 и 2 ($p < 0,0001$).

Фиг. 17 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 16, но были исключены маркеры рТ и рN (патологическое стадирование опухоли). Анализ с использованием логрангового критерия показал значимое различие между группами 1 и 2 ($p < 0,0001$).

Фиг. 18 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 16, но использовали только маркеры метилирования ($n=43$). Затем модель выбирала наилучшие маркеры, а именно: HYAL2 CpG3, HYAL2 CpG4, S100P CpG9, RAPSNCpG4, RAPSN CpG5, FUT7 CpG3, SLC22A18 CpG8, MGRN1CpG2, MGRN1CpG4 и RPTOR CpG8. Анализ с использованием логрангового критерия показал $p=0,003$.

Фиг. 19 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 16, но все микроРНК (miR-148b, -200с, -320b, -375, -409, -652, -205, 141 и -210) были включены в анализ. Из-за малого количества переменных микроРНК невозможно было выбрать; логранговый критерий показал $p=0,136$.

Фиг. 20 относится к тому же исследованию, что и подробно представленное на Фиг. 16, с той разницей, что в этом случае выживаемость без признаков заболевания была скоррелирована с маркерами, указанными на Фигуре 16. Маркерами, выбранными для этого теста в качестве наилучших предикторов, были клинические маркеры «уровень

заболеваемости», «тип рака молочной железы», «сТ», «сN» и «сМ». Кроме того, моделью были выбраны следующие маркеры метилирования: SLC22A18 CpG8 и MGRN1 CpG2, а также Qubit и микроРНК 200с, 320b и -141. Анализ с использованием логрангового критерия показал значимое различие между группами 1 и 2 ($p < 0,001$).

5 **Фиг. 21** относится к тому же исследованию, что и Фиг. 20, с использованием выживаемости без признаков заболевания в качестве параметра для предсказания используемой моделью. Использовали те же маркеры, что и на Фигуре 20, за исключением «рТ» и «рN». Модель выбирала следующие маркеры в качестве наилучших предикторов: Уровень заболеваемости, тип рака молочной железы, сТ, сN, сМ,
10 SLC22A18.CpG8, MGRN1.1.CpG2, miR-200с, -320b, -141 и Qubit. Анализ с использованием логрангового критерия показал значимое различие между группами 1 и 2 ($p < 0,0001$).

Фиг. 22 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 20. Однако маркеры, используемые для этой модели, включают только маркеры метилирования. Следующие
15 маркеры метилирования были выбраны в качестве лучших предикторов: NYAL2 (CpG2 и CpG4), S100P (CpG2.3 и CpG4), RAPSN (CpG7 и CpG8), FUT7 (CpG3), SLC22A18 (CpG4 и CpG8), MGRN1 (CpG2 и CpG26) и RPTOR (CpG5 и CpG8). Анализ с использованием логрангового критерия показал $p = 0,524$.

Фиг. 23 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 20, но были использованы
20 только маркеры микроРНК. Используемая модель с гибкими штрафами не могла предсказать наилучшие маркеры из-за малого количества переменных (маркеры микроРНК). Анализ с использованием логрангового критерия показал $p = 0,108$.

Фиг. 24 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 16, и использует все указанные там маркеры, с той разницей, что в этом случае выживаемость без
25 прогрессирования была скоррелирована с маркерами. Маркерами, выбранными в качестве наилучших предикторов, были клинические маркеры «уровень заболеваемости», сN и сМ. Кроме того, следующие маркеры метилирования были выбраны моделью: NYAL2 CpG4, S100P CpG4, RAPSN CpG7, FUT7 CpG3, SLC22A18 CpG8 и MGRN1 CpG2, а также Qubit и микроРНК -200с, -320b и -375. Анализ с
30 использованием логрангового критерия показал значимое различие между группами 1 и 2 ($p < 0,001$).

Фиг. 25 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 24, с использованием выживаемости без прогрессирования в качестве параметра для предсказания используемой моделью. Использовали те же маркеры, что и на Фигуре 24, за

исключением «pT» и «pN», и модель выбрала те же наилучшие маркеры, что и на Фигуре 24. Логранговый критерий показал $p=0,174$.

Фиг. 26 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 24, но были протестированы только маркеры метилирования. Следующие маркеры метилирования
5 были выбраны моделью: HYAL2 CpG3 и CpG4, RAPSN CpG2, CpG5 и CpG7, FUT7 CpG3, SLC22A18 CpG8, MGRN1 CpG2 и CpG26 и RPTOR CpG5 и CpG8. Анализ с использованием логрангового критерия показал $p=0,108$.

Фиг. 27 относится к тому же исследованию, что и Фиг. 24, но были протестированы только маркеры микроРНК. В анализ были включены только
10 микроРНК-маркеры miR-148b, -200c, -320b, -375, -409, -652, -205, 141 и -210. Из-за малого количества переменных невозможно было выбрать микроРНК. Анализ с использованием логрангового критерия показал $p=0,23$.

Фиг. 28 относится к диагностике рака молочной железы (PMЖ) в целом (все пациенты) и в подгруппах пациентов, сгруппированных по возрасту или на основании
15 высокого риска (BRCA+). Следующие маркеры метилирования были определены для группы высокого риска: HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, S100P_CpG2,3, S100P_CpG7, S100P_CpG8, S100P_CpG9, S100P_CpG10,11,12, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG3, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6,
20 RPTOR_CpG8, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4, FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG5,6,7,8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG16,17,18, MGRN1_CpG19,20, MGRN1_CpG22,23, MGRN1_CpG26.

Следующие маркеры были определены для всех групп и возрастных подгрупп
25 PMЖ: Возраст, рост [см], вес [кг], диабет, миомы, аутоиммунное заболевание, беременность, возраст при первой беременности, контрацептивы, курение, занятия спортом, miR-148b, miR-652, miR-200c, miR-409, miR-375, miR-320b, Qubit, HYAL2_CpG_1, HYAL2_CpG_2, HYAL2_CpG_3, HYAL2_CpG_4, S100P_CpG_2,3, S100P_CpG_4, S100P_CpG_7, S100P_CpG_8, S100P_CpG_9, S100P_CpG_10,11,12,
30 SLC22A18_CpG_1, SLC22A18_CpG_3, SLC22A18_CpG_4, SLC22A18_CpG_6, SLC22A18_CpG_8, RPTOR_CpG_1, RPTOR_CpG_2, RPTOR_CpG_3, RPTOR_CpG_5, RPTOR_CpG_6, RPTOR_CpG_8, RAPSN_CpG_1, RAPSN_CpG_2, RAPSN_CpG_4, RAPSN_CpG_5, RAPSN_CpG_6, RAPSN_CpG_7, RAPSN_CpG_8, FUT7_CpG_1, FUT7_CpG_2, FUT7_CpG_3, FUT7_CpG_4, FUT7_CpG_6, FUT7_CpG_7,

MGRN1_CpG_2, MGRN1_CpG_4, MGRN1_CpG_5,6,7,8, MGRN1_CpG_12, MGRN1_CpG_15, MGRN1_CpG_16,17,18, MGRN1_CpG_19,20, MGRN1_CpG_22,23, MGRN1_CpG_26.

Фиг. 29 относится к диагностической эффективности на ранней стадии РЯ. 10-проходная перекрестная проверка отражает среднее значение AUC, полученное для маркеров набора РЯ отдельно (А), маркеров из набора для РЯ в комбинации с СА-125 (В) или с СА-125 по отдельности (С) на ранней стадии РЯ.

Фиг. 30 относится к диагностической эффективности при раке молочной железы. 10-проходная перекрестная проверка отражает среднее значение AUC, полученное для набора из 15 маркеров для РК (А) или для набора из 14 маркеров для РК без использования возраста в качестве переменной (В) при РК.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- SEQ ID NO: 1** hsa-miR-652-3p (MIMAT0003322): aauggcgccacuagguugug
- SEQ ID NO: 2** hsa-miR-652-5p (MIMAT0022709): caac
- SEQ ID NO: 3** hsa-miR-409-3p (MIMAT0001639): gaauguugcucggugaaccccu
- SEQ ID NO: 4** hsa-miR-409-5p (MIMAT0001638): agguuacccgagcaacuuuu
- SEQ ID NO: 5** hsa-miR-148b-3p (MIMAT0000759): ucagugcaucacagaacuuugu
- SEQ ID NO: 6** hsa-miR-148b-5p (MIMAT0004699): aaguucuguuauacacacucucucucaggc
- SEQ ID NO: 7** hsa-miR-200c-3p (MIMAT0000617): uaauacugccggguuaugaugga
- SEQ ID NO: 8** hsa-miR-200c-5p (MIMAT0004657): cgucuuacccagcaguguug
- SEQ ID NO: 9** hsa-miR-375-3p (MIMAT0000728): uuuguucguucggcucgcguga
- SEQ ID NO: 10** hsa-miR-375-5p (MIMAT0037313): gcgacgagccccccucgcacaacc
- SEQ ID NO: 11** hsa-miR-141-3p (MIMAT0000432): uaacacugucugguaaagaugg
- SEQ ID NO: 12** hsa-miR-141-5p (MIMAT0004598): caucuuccaguacaguugga
- SEQ ID NO: 13** hsa-miR-451a (MIMAT0001631): aaaccguuaccuuacugaguu
- SEQ ID NO: 14** hsa-mir-320b-1 (MI0003776):
- auaaaauauaucccucuuuucuaguucuuuccuagugagagggaaaagcuggguugagggcaaacaaaaauaa
- SEQ ID NO: 15** hsa-mir-320b-2 (MI0003839):
- gucucuuaggcuuuucuucucccagauuucccaaaguugggaaaagcuggguugagggcaaaaggaaaa

Подробное описание изобретения

Перед тем, как настоящее изобретение будет подробно описано ниже, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методологией, протоколами и реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку все
5 перечисленное может варьировать. Также следует понимать, что терминология в настоящей заявке предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предполагает ограничения объема настоящего изобретения, который ограничен исключительно прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение,
10 которое является общепринятым в понимании специалиста в данной области техники.

Предпочтительно, термины, используемые в настоящей заявке, определены согласно описанию в «Словаре биотехнологических терминов на нескольких языках: (Рекомендации IUPAC)» ("A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B., Klbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica
15 Acta, CH-4010, Basel, Switzerland).

В тексте настоящей заявки и прилагаемой формуле изобретения, если контекстом не определено иное, термины «включать» и «содержать» и их варианты, такие как «включает», «содержит», «включающий», «содержащий», следует понимать как включение указанного целого числа или этапа, либо группы целых чисел или этапов, но
20 без исключения каких-либо других целых чисел или этапов, либо группы целых чисел или этапов. В следующих разделах более подробно описаны различные аспекты изобретения. Каждый аспект, определенный таким образом, может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явным образом не указано иное. В частности, любой признак, указанный как необязательный, предпочтительный или
25 благоприятный, может быть объединен с любым другим признаком или признаками, указанными как необязательные, предпочтительные или благоприятные.

В тексте настоящей заявки приведены ссылки на некоторые документы. Каждый из документов, ссылки на которые приведены в настоящей заявке (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и
30 т.д.), выше или ниже по тексту, полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Ничто в настоящей заявке не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не дает права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения. Некоторые документы, ссылки на которые приведены в настоящей заявке, характеризуются как «*включенные посредством ссылки*».

В случае противоречий между определениями или принципами таких включенных посредством ссылки источников и определениями или принципами, приведенными в настоящей заявке, текст настоящего описания имеет преимущественную силу.

Ниже описаны элементы настоящего изобретения. Указанные элементы
5 приведены с конкретными вариантами реализации, однако следует понимать, что они могут быть объединены любым способом и в любом количестве для создания дополнительных вариантов реализации. Различным образом описанные примеры и предпочтительные варианты реализации не следует истолковывать как ограничивающие настоящее изобретение исключительно явным образом описанными вариантами
10 реализации. Настоящее описание следует понимать как подтверждающее и охватывающее варианты реализации, которые объединяют описанные в явном виде варианты реализации с любым количеством раскрытых и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных в настоящей заявке элементов следует считать раскрытыми путем описания настоящей заявки, если
15 контекст не указывает на иное.

Определения

Далее приведены некоторые определения терминов, часто используемых в настоящем описании. Указанные термины во всех случаях использования в тексте
20 настоящего описания ниже будут иметь соответствующим образом определенное значение и предпочтительные значения.

В тексте настоящей заявки приведены ссылки на некоторые документы. Каждый из документов, ссылки на которые приведены в настоящей заявке (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, спецификации производителей, инструкции и
25 т.д.) выше или ниже по тексту, полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Ничто в настоящей заявке не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не дает права датировать такое раскрытие задним числом на основании предшествующего изобретения.

МикроРНК представляют собой небольшие неcodирующие РНК (длиной ~18–25
30 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне путем разложения молекул мРНК или блокады их трансляции (Bartel DP. Cell 2004; 116: 281-97). Как следствие, они играют существенную роль в регуляции большого числа биологических процессов, включая рак (Calin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:15524-9). В стандартной системе номенклатуры названия присваивают
35 подтвержденным экспериментальным способом микроРНК. За префиксом «miR» следует

дефис и номер. Строчный «miR-» означает пре-микроРНК, тогда как «miR-» с прописной буквой означает зрелую форму. МикроРНК с практически идентичными последовательностями, отличающимися на один или два нуклеотида, помечают дополнительной строчной буквой. Вид, из которого происходит микроРНК, обозначают

5 трехбуквенным префиксом, например, hsa для *Homo sapiens* (человека). Две зрелые микроРНК, происходящие из противоположных фрагментов одной и той же пре-микроРНК, обозначают окончанием -3p или -5p.

Циркулирующие микроРНК по определению представляют собой микроРНК, присутствующие в бесклеточном компоненте жидкостей организма, таком как плазма,

10 сыворотка и т.п. Lawrie с соавторами (Lawrie *et al.* (Br J Haematol 2008; 141:672-5)) одними из первых продемонстрировали присутствие микроРНК в жидкостях организма. С тех пор сообщалось, что циркулирующие микроРНК аберрантно экспрессируются в плазме крови или сыворотке при различных типах рака, например, карциноме предстательной железы, карциноме толстой и прямой кишки или пищевода (Brase *et al.*,

15 Int J Cancer 2011;128:608-16.; Huang *et al.*, Int J Cancer 2010;127:118-26.; Zhang *et al.*, Clin Chem 2010; 56:1871-9.). Их наиболее важные преимущества включают возможность неоднократного измерения минимально инвазивным образом, а также выдающуюся стабильность в плазме/сыворотке, где они циркулируют в основном вне экзосом и стабильны за счет связывания с белками Argonaute (Mitchell *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S

20 A 2008;105:10513-8; Turchinovich *et al.* Nucleic Acids Res 2011;39:7223-33; Arroyo *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:5003-8).

В настоящей заявке термин «микроРНК» и его варианты, такие как «ми-РНК» и «miR», понятны специалисту в данной области техники и относятся к короткой молекуле

25 рибонуклеиновой кислоты (РНК), обнаруживаемой в эукариотических клетках и жидкостях организма многоклеточных организмов. МикроРНК включают микроРНК человека, зрелые одноцепочечные микроРНК, предшественники микроРНК (пре-микроРНК) и их варианты, которые могут встречаться в природе. В некоторых случаях термин «микроРНК» также включает первичные транскрипты микроРНК (при-микроРНК) и дуплексные микроРНК. Если не указано иное, в настоящей заявке название

30 конкретной микроРНК относится к зрелой микроРНК. Предшественник микроРНК может состоять из нуклеотидов в количестве от 25 до нескольких тысяч, как правило, от 40 до 130, от 50 до 120 или от 60 до 110 нуклеотидов. Как правило, зрелая микроРНК состоит из нуклеотидов в количестве от 5 до 100 нуклеотидов, часто от 10 до 50, от 12 до 40 или от 18 до 26 нуклеотидов. Термин «микроРНК» также включает

«направляющую» цепь, которая в конечном счете поступает в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), а также «сопровождающую» цепь, комплементарную ей.

Последовательность нескольких микроРНК известна в данной области техники и легко доступна для специалиста в общеизвестных базах данных последовательностей, таких как, например, miRBase (<http://www.mirbase.org/>), (Griffiths-Jones S., NAR 2004 32(Database Issue):D109-D111; Kozomara A, Griffiths-Jones S., NAR 2011 39(Database Issue):D152-D157). Следует понимать, что указанные ниже номера доступа индивидуальных микроРНК в базах данных представляют собой номера микроРНК, происходящих от человека. Однако указанные записи в базах данных также включают номера доступа баз данных соответствующих микроРНК иного происхождения, таких как, например, микроРНК любого вида млекопитающих, пресмыкающихся или птиц, например, микроРНК, которые выбраны из группы, состоящей из микроРНК лабораторных животных (например, мыши или крысы), домашних животных (включая, например, морскую свинку, кролика, лошадь, осла, корову, овцу, козу, свинью, курицу, верблюда, кошку, собаку, морскую черепаху, сухопутную черепаху, змею или ящерицу), или микроРНК приматов, включая шимпанзе, бонобо и горилл. Также следует понимать, что упоминание конкретной микроРНК в виде номера (например, miR-652) в равной степени означает последовательность -3p и -5p (miR-652-3p и miR-652-5p).

Последовательность miR-652 депонирована под учетным номером miRBase ID MI0003667, который включает hsa-miR-652-3p (MIMAT0003322) и hsa-miR-652-5p (MIMAT0022709), соответствующий SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, по настоящему изобретению.

Последовательность miR-409 депонирована под учетным номером miRBase ID MI0001735, который включает hsa-miR-409-3p (MIMAT0001639) и hsa-miR-409-5p (MIMAT0001638), соответствующий SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно, по настоящему изобретению.

Последовательность miR-148b депонирована под учетным номером miRBase ID MI0000811, который включает hsa-miR-148b-3p (MIMAT0000759) и hsa-miR-148b-5p (MIMAT0004699), соответствующий SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно, по настоящему изобретению.

Последовательность miR-200c депонирована под учетным номером miRBase ID MI0000650, который включает hsa-miR-200c-3p (MIMAT0000617) и hsa-miR-200c-5p (MIMAT0004657), соответствующий SEQ ID NO 7 и 8, соответственно, по настоящему изобретению.

Последовательность miR-375 депонирована под учетным номером miRBase ID MI0000783, который включает hsa-miR-375-3p (MIMAT0000728) и hsa-miR-375-5p (MIMAT0037313), соответствующий SEQ ID NO 9 и 10, соответственно, по настоящему изобретению.

5 Последовательность miR-141 депонирована под учетным номером miRBase ID MI0000457, который включает hsa-miR-141-3p (MIMAT0000432) и hsa-miR-141-5p (MIMAT0004598), соответствующий SEQ ID NO 11 и 12, соответственно, по настоящему изобретению.

10 Последовательность miR-451a депонирована под учетным номером miRBase ID MI0001729, который включает hsa-miR-451a (MIMAT0001631), соответствующий SEQ ID NO: 13 настоящего изобретения.

15 Последовательность miR-320b депонирована под учетным номером miRBase ID MIMAT0005792, который включает hsa-mir-320b-1 (MI0003776) и hsa-mir-320b-2 (MI0003839), соответствующий SEQ ID 14 и 15, соответственно, по настоящему изобретению.

Термин «комбинация микроРНК» относится к комбинациям микроРНК согласно настоящему изобретению. Количество микроРНК в образце от субъекта можно определить с помощью методов, хорошо известных в данной области техники. В зависимости от природы образца указанное количество можно определить с помощью 20 методов на основе ПЦР для количественного определения полинуклеотида, или с помощью других способов, таких как масс-спектрометрия или секвенирование (нового поколения); или с помощью одного из способов, описанных в примерах (Cissell KA, Deo SK. Trends in microRNA detection. Anal Bioanal Chem. 2009;394(4):1109-1116 or de Planell-Saguer M, Rodicio MC. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review. Anal Chim 25 Acta 2011 Aug 12;699(2):134-52). Термин «определение количеств по меньшей мере микроРНК из комбинации микроРНК» в настоящей заявке предпочтительно относится к отдельному определению количества каждой микроРНК в комбинации для обеспечения возможности сравнения количества каждой микроРНК комбинации с референсом, специфичным для указанной микроРНК.

30 Термин «праймер» в настоящей заявке означает одноцепочечный олигонуклеотид, который, как правило, выступает в качестве точки старта для ферментов, реплицирующих ДНК. Праймер связывается или гибридизуется с матрицей ДНК и, как правило, содержит последовательность, которая комплементарна последовательности ДНК, с которой он предположительно связывается. Праймер может

также содержать дополнительные последовательности, например, последовательности, выступающие в качестве сайтов расщепления нуклеазами (например, Bam H1, Hind III и т.д.). Длину праймера выбирают в зависимости от предполагаемого применения. Например, длина праймеров, используемых для амплификации ДНК в полимеразной цепной реакции (ПЦР), как правило, составляет по меньшей мере 10 нуклеотидов, предпочтительно от 10 до 50 (т.е. 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50) нуклеотидов, более предпочтительно от 15 до 30 нуклеотидов. Более короткие праймеры длиной по меньшей мере 5 нуклеотидов используют для секвенирования матриц ДНК. Также в термин «праймер» включены «вырожденные праймеры», которые представляют собой смесь подобных, но не идентичных праймеров. Праймер может быть снабжен меткой или помечен маркерной молекулой, детектируемой спектроскопическим, фотохимическим, биохимическим, иммунохимическим, химическим или другими физическими способами.

Термин «уровень экспрессии» означает количество продукта гена, присутствующего в организме или образце в определенной точке времени. Уровень экспрессии можно, например, измерить/количественно определить/детектировать посредством белка или мРНК, экспрессированной с гена. Уровень экспрессии можно, например, количественно определить посредством нормирования количества продукта гена, представляющего интерес, который присутствует в образце, к суммарному количеству продукта гена той же категории (суммарному белку или мРНК) в том же образце или в референсном образце (например, в образце, отобранном в то же время от того же индивидуума или в части того же образца идентичного размера (масса, объем)) либо посредством идентификации количества продукта гена, представляющего интерес, в пересчете на определенный размер образца (масса, объем и т.д.). Уровень экспрессии можно измерить или детектировать посредством любого способа, известного в данной области техники, например, способами прямой детекции и количественного определения продукта гена, представляющего интерес (такими как масс-спектрометрия), или способами опосредованной детекции и измерения продукта гена, представляющего интерес, которые обычно осуществляют посредством связывания продукта гена, представляющего интерес, с одной или несколькими различными молекулами или средствами детекции (например, праймером (праймерами), зондами, антителами, белковыми каркасами), специфичными к продукту гена, представляющему интерес. Определение уровня копий гена, включая также определение отсутствия или присутствия одного или более фрагментов (например, с помощью зондов на основе

нуклеиновых кислот или праймеров, например, количественной ПЦР, ПЦР на основе мультиплексной амплификации лигированных зондов («multiplex ligation-dependent probe amplification», MLPA), также знакомо специалисту в данной области техники.

Выпуск GeneBank, к которому относятся приведенные ниже номера доступа, представлен выпуском 228.

HYAL2:

№ доступа Genbank: NM_003773.5 (GI:289802998) для варианта транскрипта 1,

№ доступа Genbank: NM_033158.4 (GI:289802999) для варианта транскрипта 2,

№ доступа Genbank: NP_003764.3 (GI: 15022801) для полипептида HYAL2, кодируемого
10 вариантом транскрипта 1,

№ доступа Genbank: NP_149348.2 (GI: 34304377) для полипептида HYAL2, кодируемого
вариантом транскрипта 2.

MGRN1:

№ доступа Genbank: NM_001142289.2 для варианта транскрипта 2, и

15 № доступа Genbank: NM_001142290.2 для варианта транскрипта 3, и

№ доступа Genbank: NM_001142291.2 для варианта транскрипта 4, и

№ доступа Genbank: NM_015246.3 для варианта транскрипта 1, и

№ доступа Genbank: NP_001135761.2 для полипептида MGRN1, кодируемого вариантом
транскрипта 2;

20 № доступа Genbank: NP_001135762.1 для полипептида MGRN1, кодируемого вариантом
транскрипта 3;

№ доступа Genbank: NP_001135763.2 для полипептида MGRN1, кодируемого вариантом
транскрипта 4;

25 № доступа Genbank: NP_056061.1 для полипептида MGRN1, кодируемого вариантом
транскрипта 1;

RPTOR

№ доступа Genbank: NM_001163034.1 для варианта транскрипта 2,

№ доступа Genbank: NM_020761.3 для варианта транскрипта 1

30 № доступа Genbank: NP_001156506.1 для полипептида RPTOR, кодируемого вариантом
транскрипта 2;

№ доступа Genbank: NP_065812.1 для полипептида RPTOR, кодируемого вариантом
транскрипта 1;

SLC22A18

№ доступа Genbank: NM_002555.5 для варианта транскрипта 1,

№ доступа Genbank: NM_183233.2 для варианта транскрипта 2,

№ доступа Genbank: NP_002546.3 для полипептида SLC22A18, кодируемого вариантом транскрипта 1;

№ доступа Genbank: NP_899056.2 для полипептида SLC22A18, кодируемого вариантом транскрипта 2;

FUT7

№ доступа Genbank: NM_004479.3 для транскрипта,

№ доступа Genbank: NP_004470.1 для полипептида FUT7, кодируемого транскриптом;

RAPSN

№ доступа Genbank: NM_005055.5 для варианта транскрипта 1,

№ доступа Genbank: NM_032645.4 для варианта транскрипта 2,

№ доступа Genbank: NP_005046.2 для полипептида RAPSN, кодируемого вариантом транскрипта 1;

№ доступа Genbank: NP_116034.2 для полипептида RAPSN, кодируемого вариантом транскрипта 1;

S100P

№ доступа Genbank: NM_005980.3 для транскрипта,

№ доступа Genbank: NP_005971.1 для полипептида S100P, кодируемого транскриптом;

Термин «ткань» в настоящей заявке означает совокупность клеток одинакового происхождения, которые согласованно выполняют конкретную функцию. Примеры ткани включают, не ограничиваясь указанными, соединительную ткань, мышечную ткань, нервную ткань и эпителиальную ткань. Совокупность тканей вместе образуют «орган» для выполнения конкретной функции. Примеры органов включают, не ограничиваясь указанными, железы, мышцы, кровь, головной мозг, сердце, печень, почки, желудок, скелет, сустав и кожу.

Термины «заболевание» и «нарушение» используют в настоящей заявке взаимозаменяемо и означают аномальное состояние, в особенности, аномальное медицинское состояние, такое как болезнь или повреждение, при котором ткань, орган или индивидуум больше не способны эффективно выполнять свою функцию. Как правило, но не обязательно, заболевание приводит к специфическим симптомам или признакам, свидетельствующим о наличии такого заболевания. Наличие таких симптомов или признаков может, таким образом, свидетельствовать, что ткань, орган или индивидуум страдает от заболевания. Изменение данных симптомов или признаков может свидетельствовать о прогрессировании такого заболевания. Прогрессирование

заболевания, как правило, характеризуется увеличением или уменьшением таких симптомов или признаков, что может свидетельствовать об «ухудшении» или «улучшении» заболевания. «Ухудшение» при заболевании характеризуется уменьшением способности ткани, органа или организма эффективно выполнять свою функцию, тогда как «улучшение» при заболевании, как правило, характеризуется увеличением способности ткани, органа или индивидуума эффективно выполнять свою функцию. Ткань, орган или индивидуум, подверженные «риску развития» заболевания, находятся в здоровом состоянии, но демонстрируют потенциальную возможность возникновения заболевания. Как правило, риск развития заболевания связан с ранними или слабыми признаками или симптомами такого заболевания. В таком случае манифестацию заболевания все еще можно предотвратить посредством лечения. Примеры заболеваний включают, не ограничиваясь указанными, травматические заболевания, воспалительные заболевания, инфекционные заболевания, кожные заболевания, эндокринные заболевания, кишечные заболевания, неврологические расстройства, заболевания суставов, наследственные заболевания, аутоиммунные заболевания и различные типы рака.

«Рак» означает пролиферативное нарушение, включающее аномальный рост клеток, которые могут инвазировать или распространяться в другие ткани или органы субъекта. Рак классифицируют по типу клеток, с которым имеют сходство клетки опухоли, и который, вследствие этого, как предполагают, является источником опухоли. Данные типы включают, не ограничиваясь указанными, карциному (варианты рака, которые происходят из эпителиальных клеток), саркому (варианты рака, возникающие из соединительной ткани, такой как, например, костная, хрящевая, жировая, нервная ткань), лимфому и лейкоз (варианты рака, возникающие из гематопозитических клеток, которые покидают костный мозг и, как правило, созревают в лимфатических узлах и крови), герминогенную опухоль (варианты рака, которые происходят из плюрипотентных клеток) и бластому (варианты рака, которые происходят из незрелых клеток-«предшественников» или эмбриональной ткани). В частности, рак включает, не ограничиваясь перечисленным, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз, аденокортикальную карциному, СПИД-ассоциированный рак, СПИД-ассоциированную лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, рак мозжечка или головного мозга детского возраста, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, внепеченочный рак, рак мочевого пузыря, опухоль кости, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного

мозга, рак головного мозга, опухоль головного мозга (астроцитому мозжечка, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительного пути и гипоталамическую глиому), рак молочной железы, аденомы/карциноиды

5 бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, лимфому центральной нервной системы, астроцитому мозжечка, рак шейки матки, хронический бронхит, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, кожную Т-клеточную лимфому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак

10 пищевода, саркому Юинга семейства опухолей Юинга, внечерепную герминогенную опухоль, внегонадную герминогенную опухоль, внепеченочный рак желчных протоков, рак глаза (интраокулярную меланому, ретинобластому), рак желчного пузыря, гастрический рак (рак желудка), желудочно-кишечную карциноидную опухоль, желудочно-кишечную стромальную опухоль (GIST), герминогенную опухоль

15 (внечерепную, внегонадную или яичниковую), гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, гастрический карциноид, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоклеточный рак (рак печени), лимфому Ходжкина, гипофарингиальный рак, гипоталамическую глиому и глиому зрительных путей, интраокулярную меланому, карциному островковых клеток (эндокринной части

20 поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (почечноклеточный рак), рак гортани, лейкоз (острый лимфобластный, острый миелоидный, хронический лимфоцитарный, хронический миелогенный), рак губ и ротовой полости, липосаркому, рак печени, рак легких (немелкоклеточный, мелкоклеточный), лимфомы (СПИД-ассоциированные, Беркитта, кожную Т-клеточную, Ходжкина, первичную лимфому

25 центральной нервной системы), макроглобулинемию (Вальденстрема), рак молочной железы у мужчин, злокачественную фиброзную гистиоцитому кости/остеосаркому, медуллобластому, меланому, рак клеток Меркеля, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестной первичной локализацией, рак рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/плазмноклеточную

30 опухоль, грибовидный микоз, миелодиспластический синдром, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенный лейкоз, хронический, миелоидный лейкоз, миелому, миелопролиферативные нарушения, рак носовой полости и околоносовой пазухи, носоглоточную карциному, нейробластому, олигодендроглиому, рак ротовой полости, рак ротоглотки,

остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому кости, рак яичников, эпителиальный рак яичников, герминогенную опухоль яичников, потенциальную опухоль яичников низкой степени злокачественности, рак поджелудочной железы, рак носовой полости и околоносовой пазухи, рак паращитовидных желез, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, астроцитому шишковидной железы, герминому шишковидной железы, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмноклеточную опухоль/множественную миелому, плеврорлегочную бластому, лимфому первичной центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, карциному почечной лоханки и мочеточника, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому (семейство опухолей Юинга, Капоши, мягких тканей, матки), синдром Сезари, рак кожи (карциному, меланому, немеланомный рак, рак клеток Меркеля), мелкоклеточный рак легких, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника, трофобластическую опухоль, рак мочеиспускательного канала, рак матки (эндометриальный, саркома), рак влагалища, глиому зрительных путей и гипоталамуса, рак наружных половых органов, опухоль Вильмса (рак почки).

В настоящей заявке термин «опухоль молочной железы» относится к аномальной гиперпролиферации клеток ткани молочной железы у субъекта, которая может являться доброкачественной (нераковой) опухолью или злокачественной (раковой) опухолью. Доброкачественные опухоли молочной железы, предпочтительно, включают фиброаденомы, зернистоклеточные опухоли, интрадуктальные папилломы и филлоидные опухоли. Злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы (РМЖ), как указано в настоящей заявке выше.

В настоящей заявке термин «метастатический рак молочной железы» (МРМЖ) относится к раку молочной железы, при котором раковые клетки прорастают в форме метастаза по меньшей мере в один вторичный участок, т.е. неприлегающий орган или часть тела субъекта.

В настоящей заявке термин «опухоль яичников» относится к аномальной гиперпролиферации клеток ткани яичников у субъекта, которая может являться доброкачественной (нераковой) опухолью или злокачественной (раковой) опухолью.

Злокачественная опухоль представляет собой рак яичников (РЯ), как указано в настоящей заявке выше.

В настоящей заявке термин «опухоль поджелудочной железы» относится к аномальной гиперпролиферации клеток ткани яичников у субъекта, которая может
5 являться доброкачественной (нераковой) опухолью или злокачественной (раковой) опухолью. Злокачественная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы (РПЖ), как указано в настоящей заявке выше.

Термин «циркулирующая опухолевая клетка» или «ЦОК» является понятным специалисту в данной области техники и относится к опухолевой клетке,
10 отсоединившейся от первичной или метастатической опухоли и циркулирующей в кровеносном русле. Следует понимать, что количество ЦОК представляет собой прогностический маркер заболевания и результата терапии рака молочной железы, например, в отношении общей выживаемости. Термин «статус ЦОК» относится к присутствию или отсутствию более чем референсного количества ЦОК в образце.
15 Предпочтительно, референсное количество ЦОК составляет 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7 или 7,5 ЦОК/7,5 мл крови, причем, 5 ЦОК/7,5 мл крови является более предпочтительным. У субъектов, образец крови которых содержит более указанного референсного количества ЦОК, статус ЦОК является неблагоприятным, что свидетельствует о низкой вероятности успешного лечения и низкой вероятности
20 выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости. И, наоборот, у субъектов, образец крови которых содержит менее указанного референсного количества ЦОК, статус ЦОК является благоприятным, свидетельствует о высокой вероятности успешного лечения и высокой вероятности выживаемости без прогрессирования заболевания и общей выживаемости. Благоприятным образом,
25 согласно настоящему изобретению было обнаружено, что количества микроРНК, используемые для определения статуса ЦОК субъекта, как определено в настоящей заявке ниже, свидетельствуют о статусе ЦОК субъекта. Таким образом, определение статуса ЦОК у субъекта в настоящей заявке относится к определению количества или количеств указанной микроРНК или указанных микроРНК и, таким образом, к
30 получению показателя статуса ЦОК субъекта. Предпочтительно, статус можно диагностировать как «благоприятный» или «неблагоприятный».

«Симптомы» заболевания представляют собой последствия заболевания, заметные в ткани, органе или организме, страдающих от указанного заболевания, и включают, не ограничиваясь указанными, боль, слабость, болезненность, напряжение,

ригидность и спазм ткани, органа или индивидуума. «Признаки» или «сигналы» заболевания включают, не ограничиваясь указанными, изменение или модификацию, такую как наличие, отсутствие, увеличение или повышение, уменьшение или снижение уровня специфичных индикаторов, таких как биомаркеры или молекулярные маркеры, или развитие, наличие или ухудшение симптомов.

Термины «индикатор» и «маркер» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и означают признак или сигнал состояния, либо используются для мониторинга состояния. Такое «состояние» означает биологический статус клетки, ткани или органа, или статус здоровья и/или заболевания у индивидуума. Индикатор может быть представлен присутствием или отсутствием молекулы, в том числе, но не ограничиваясь указанными, пептида, белка и нуклеиновой кислоты, или может представлять собой изменение уровня экспрессии или паттерна такой молекулы в клетке или ткани, органе или индивидууме. Индикатор может представлять собой признак манифестации, развития или наличия заболевания у индивидуума или последующего прогрессирования такого заболевания. Индикатор может представлять собой также признак риска развития заболевания у индивидуума.

В настоящей заявке термин «продукт гена» предпочтительно относится к макромолекулярному физическому объекту, наличие которого в клетке зависит от экспрессии указанного гена в указанной клетке. Механизмы экспрессии генов хорошо известны специалисту в данной области техники и включают основные механизмы транскрипции, т.е. образования РНК в соответствии с указанным геном или частями указанного гена, и трансляции, т.е. образования молекул полипептида, содержащих аминокислотную последовательность, кодируемую указанной РНК согласно генетическому коду; специалисту в данной области техники хорошо известно, что в экспрессию генов также могут быть вовлечены другие процессы в клетке, например, процессинг РНК, редактирование РНК, протеолитический процессинг, редактирование белка и т.п. Термин «продукт гена», таким образом, включает РНК, предпочтительно, мРНК, а также полипептиды, экспрессированные с указанного гена. Из вышесказанного очевидно, что термин «продукт гена» также включает фрагменты указанной или указанных РНК, предпочтительно, длиной по меньшей мере десять, по меньшей мере двенадцать, по меньшей мере 20, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 нуклеотидов, и фрагменты (пептиды) указанных полипептидов, предпочтительно, длиной по меньшей мере восемь, по меньшей мере десять, по меньшей мере двенадцать, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 аминокислот.

«Определение» количества продукта гена относится к измерению количества указанного продукта гена, предпочтительно, полуколичественному или количественному. Измерение можно осуществлять напрямую или опосредованно. Предпочтительно, измерение проводят в обработанном образце, причем указанная
5 обработка включает экстракцию из образца полинуклеотидов или полипептидов. При этом настоящим изобретением также предусмотрено определение продукта гена *in situ*, например, методом иммуногистохимии (ИГХ).

Количества полинуклеотидов согласно настоящему изобретению можно определить несколькими способами, хорошо известными в данной области техники.
10 Количественное определение предпочтительно является абсолютным, т.е. относится к конкретному количеству полинуклеотидов, или, более предпочтительно, относительным, т.е. измеряется в условных нормированных единицах. Предпочтительно, нормирование проводят путем подсчета соотношения количества конкретных полинуклеотидов и общего количества полинуклеотидов или референсного
15 продукта амплификации. Способы, позволяющие проводить абсолютное или относительное количественное определение, хорошо известны в данной области техники. Например, способы количественной ПЦР представляют собой способы для относительного количественного определения; если в такой анализ включена калибровочная кривая, относительное количественное определение можно использовать
20 для абсолютного количественного определения. Другие известные способы представляют собой, например, амплификацию, основанную на последовательности нуклеиновых кислот («nucleic acid sequence-based amplification», NASBA), или метод амплификации сигнала на основе разветвленной ДНК (Branched DNA Signal Amplification Assay) в комбинации с детекцией амплифицированных полинуклеотидов
25 методом дот-блоттинга или в системе Luminex. Предпочтительно, количества полинуклеотидов представляют собой нормированные количества полинуклеотидов, т.е. полученные количества полинуклеотидов соотносят по меньшей мере с одним референсным продуктом амплификации, таким образом предпочтительно соотнося количества полинуклеотидов с количеством клеток в образце и/или эффективностью
30 амплификации полинуклеотидов. Таким образом, предпочтительно, референсный продукт амплификации представляет собой продукт, полученный из полинуклеотида, который, как известно, характеризуется постоянным относительным содержанием в каждой клетке, т.е. полинуклеотида, который содержится в большинстве, предпочтительно, во всех клетках образца в приблизительно одинаковом количестве.

Более предпочтительно, референсный продукт амплификации амплифицирован с хромосомного или митохондриального гена или с мРНК гена «домашнего хозяйства». Количество полинуклеотидов может быть определено с применением секвенирования методом дробовика, мостиковой ПЦР, секвенирования по Сэнгеру, пиросеквенирования, секвенирования нового поколения, секвенирования в реальном времени одиночных молекул, полупроводникового секвенирования по технологии Ion Torrent, секвенирования путем синтеза, секвенирования путем лигирования, массивно-параллельного опознавательного секвенирования, полони-секвенирования, секвенирования ДНК на наносферах, секвенирования одиночных молекул Heliscope, секвенирования одиночных молекул в реальном времени (SMRT), секвенирования ДНК в нанопорах, секвенирования ДНК методом регистрации туннельного тока, секвенирования путем гибридизации, секвенирования с помощью масс-спектрометрии, микрофлюидного секвенирования по методу Сэнгера, секвенирования ДНК с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, РНК-полимеразного секвенирования, высокопроизводительного секвенирования вирусов *in vitro*, выделения хроматина путем очищения РНК (ChIRP-Seq), секвенирования методом GRO-Seq (Global Run-On sequencing), секвенирования методом рибосомного профайлинга (Ribo-Seq)/ARTq, секвенирования с иммунопреципитацией РНК (RIP-Seq), высокопроизводительного секвенирования библиотеки кДНК CLIP (HITS-CLIP), секвенирования с перекрестным связыванием и иммунопреципитацией, перекрестного связывания и иммунопреципитации, усиленных фотоактивируемыми рибонуклеозидами (PAR-CLIP), индивидуального перекрестного связывания с разрешением нуклеотидов и иммунопреципитация (iCLIP), секвенирования нативных удлиняющихся транскриптов (NET-Seq), направленного очищения полисомальной мРНК (TRAP-Seq), перекрестного связывания, лигирования и секвенирования гибридов (CLASH-Seq), секвенирования с параллельным анализом концов РНК (PARE-Seq), полногеномного картирования некэпированных транскриптов (GMUCT), секвенирования изоформ транскриптов (TIF-Seq), анализа с секвенированием спаренных концов TSS (сайтов начала транскрипции) (PEAT), селективного 2'-гидроксилацилирования, анализируемого с помощью секвенирования с достройкой праймеров (SHAPE-Seq), параллельного анализа структуры РНК (PARS-Seq), секвенирования с фрагментацией (FRAG-Seq), секвенирования с аффинной очисткой на CXXC (CAP-Seq), секвенирования с щелочной фосфатазой кишечника телят и кислой пирофосфатазой табака (CAP-Seq), ICE-секвенирования («Inosine Chemical Erasing», ICE-Seq), секвенирования с

иммунопреципитацией m6A-специфичной метилированной РНК (MeRIP-Seq),
 цифрового секвенирования РНК, амплификацию полных транскриптов для отдельных
 клеток (Quartz-Seq), секвенирования РНК на основе дизайнерских праймеров (DP-Seq),
 секвенирования с механизмом переключения на 5'-концах матриц РНК (Smart-Seq),
 5 секвенирования с механизмом переключения на 5'-конце матриц РНК версии 2 (Smart-
 Seq2), уникальных молекулярных идентификаторов (UMI), экспрессии клеток с
 помощью секвенирования с линейной амплификацией (CEL-Seq), секвенирования путем
 обратной транскрипции с мечением для одиночных клеток (STRT-Seq),
 мономолекулярных зондов молекулярной инверсии (smMIP), амплификации с
 10 множественным вытеснением цепи (MDA), циклов многократного отжига и
 циклического усиления (MALBAC), олигонуклеотид-селективного секвенирования (OS-
 Seq), дуплексного секвенирования (Duplex-Seq), бисульфитного секвенирования (BS-
 Seq), постбисульфитного адаптерного мечения (PBAT), полногеномного бисульфитного
 секвенирования на основе тагментации (T-WGBS), окислительного бисульфитного
 15 секвенирования (oxBS-Seq), TET-опосредованного бисульфитного секвенирования
 (TAB-Seq), секвенирования методом иммунопреципитацией метилированной ДНК
 (MeDIP-Seq), секвенирования методом метилирования-захвата (MethylCap),
 секвенирования с захватом метил-связывающим доменом (MBDCap), бисульфитного
 секвенирования со сниженным количеством нуклеотидов (RRBS-Seq), секвенирования
 20 гиперчувствительных к ДНКазе I сайтов (DNase-Seq), секвенирования с опосредованным
 микрококковой нуклеазой выделением нуклеосом (MAINE-Seq), секвенирования с
 иммунопреципитацией хроматина (ChIP-Seq), опосредованного формальдегидом
 выделения регуляторных элементов (FAIRE-Seq), секвенирования методом анализа
 доступности хроматина для транспозазы (ATAC-Seq), анализа взаимодействия с
 25 хроматина методом секвенирования спаренных концевых меток (ChIA-PET),
 определения конформации хроматина (Hi-C/3C-Seq), определения конформации
 кольцевого хроматина (4-C или 4C-Seq), дублированного определения конформации
 хроматина («Chromatin Conformation Capture Carbon Copy», 5-C), секвенирования с
 определением ретротранспозонов (RC-Seq), секвенирования транспозонов (Tn-Seq) или
 30 секвенирования инсерций (INSeq), секвенирования с определением транслокаций (TC-
 Seq), способов на основе флуоресценции, таких как: микрочипы, ПЦР в реальном
 времени, способы на основе определения масс (масс-спектрометрические способы),
 способы на основе ферментов рестрикции, способы на основе
 антител/иммунопреципитации, а также цифровая ПЦР).

Количество пептидов или полипептидов согласно настоящему изобретению можно определить различными способами. Прямое измерение относится к измерению количества пептида или полипептида на основе сигнала, который получают от пептида или полипептида самого по себе и интенсивность которого напрямую коррелирует с количеством молекул пептида, присутствующих в образце. Такой сигнал – иногда называемый сигналом интенсивности – можно получить, например, посредством измерения величины интенсивности конкретного физического или химического свойства пептида или полипептида. Опосредованное измерение включает измерение сигнала, полученного от вторичного компонента (т.е. компонента, который не является пептидом или полипептидом самим по себе) или биологической системы считывания, например, измеряемых ответов клеток, лигандов, меток или продуктов ферментативных реакции.

Определение количества пептида или полипептида можно проводить всеми известными способами определения количества пептида в образце. Указанные способы включают устройства и способы иммуноанализа и/или иммуногистохимии, в которых могут применяться меченные молекулы в различных форматах анализа: «сэндвич»-формате, конкурентном формате или других. В указанных анализах будет развиваться сигнал, свидетельствующий о присутствии или отсутствии пептида или полипептида. Более того, сила сигнала может, предпочтительно, коррелировать напрямую или опосредованно (например, обратно пропорционально) с количеством полипептида, который присутствует в образце. Следующие подходящие способы включают измерение физического или химического свойства, специфичного для пептида или полипептида, такого как точная молекулярная масса или ЯМР-спектр (спектр ядерного магнитного резонанса) пептида или полипептида. Указанные способы включают, предпочтительно, биосенсоры, оптические устройства, объединенные с иммуноанализами, биочипы, аналитические устройства, такие как масс-спектрометры, ЯМР-анализаторы или устройства для хроматографии. Также указанные способы включают способы на основе микропланшетного анализа ELISA, полностью автоматизированные или роботизированные иммуноанализы, анализы связывания кобальта и анализы латекс-агглютинации.

Определение количества пептида или полипептида включает этап измерения специфичного сигнала интенсивности, получаемого от пептида или полипептида в образце. Как описано выше, такой сигнал может представлять собой интенсивность сигнала, наблюдаемую для переменной m/z (масса/заряд), специфичной для пептида или

полипептида, наблюдаемого в масс-спектре или ЯМР-спектре, который является специфичным для пептида или полипептида.

В настоящей заявке термин «СрG-сайт» относится к динуклеотидной последовательности 5'-CG-3', содержащейся в полинуклеотиде, предпочтительно содержащейся в ДНК, более предпочтительно – содержащейся в геномной ДНК субъекта. СрG-сайты для анализа согласно настоящему изобретению представляют собой СрG-сайты, расположенные в области интрона, экзона или промотора гена, представляющего интерес. В том случае, если СрG-сайты расположены в области промотора, указанная область расположена предпочтительно на 3000 нуклеотидов, 2500 нуклеотидов, 2100 нуклеотидов или 1750 нуклеотидов в 3'-5' направлении от сайта начала трансляции соответствующего гена, представляющего интерес. Более предпочтительно, СрG-сайты, анализ которых проводят согласно настоящему изобретению, представляют собой СрG-сайты, расположенные в области на 1750–3000 нуклеотидов, 2100–3000 нуклеотидов или 2500–3000 нуклеотидов в 3'-5' направлении от сайта начала трансляции соответствующего гена.

Таким образом, анализ СрG-сайта на соответствие с СрG-сайтом согласно настоящему изобретению также включен в настоящее изобретение. Специалисту известно, как определить СрG-сайты в образце в соответствии с СрG-сайтами, подробно описанными в настоящей заявке выше, например, посредством определения сайта начала трансляции гена, представляющего интерес, и/или посредством выравнивания указанных последовательностей из образца с последовательностью гена, представляющего интерес. К тому же, в настоящем изобретении также предусмотрено, что помимо определения статуса метилирования СрG-сайта согласно настоящему изобретению определяют статус метилирования других СрG-сайтов.

Термин «определение статуса метилирования» относится к определению того, присутствует ли метильная группа в 5-положении пиримидинового кольца цитозина в полинуклеотиде. Предпочтительно, за остатком цитозина в 3'-направлении следует остаток гуанозина, и данные два остатка образуют СрG-сайт. Присутствие указанной метильной группы можно определить посредством различных способов, хорошо известных специалисту в данной области техники, включая, например, ПЦР, специфичную к метилированию (MSP), полногеномное бисульфитное секвенирование или другие способы на основе секвенирования (бисульфитное секвенирование (BS-Seq), постбисульфитное адаптерное мечение (PBAT), полногеномное бисульфитное секвенирование на основе тагментации (T-WGBS), окислительное бисульфитное

секвенирование (oxBS-Seq), TET-опосредованное бисульфитное секвенирование TAB-Seq), секвенирование на основе иммунопреципитации метилированной ДНК (MeDIP-Seq), секвенирование на основе анализа метилирования (MethylCap), секвенирование с захватом метил-связывающим доменом (MBDCap), бисульфитное секвенирование со

5 сниженным количеством нуклеотидов (RRBS-Seq)), способы на основе ПЦР в реальном времени и бисульфитной обработки ДНК, например, MethyLight, рестрикцию чувствительным к метилированию рестрикционным ферментом, например, анализ на основе обогащения минимальными продуцируемыми HpaII фрагментами путем опосредованной лигирования ПЦР (HELP), пиросеквенирование обработанной

10 бисульфитом ДНК или другие подобные способы AIMS, амплификацию интерметилированных сайтов; BC-seq, бисульфитную конверсию с последующим захватом и секвенированием; BiMP, бисульфитное профилирование метилирования; BS, бисульфитное секвенирование; BSPP, бисульфитные замыкающие кольцо зонды; CHARM, комплексные высокопроизводительные матрицы для анализа относительного

15 метилирования; COBRA, комбинированный бисульфитный рестрикционный анализ; DMH, дифференциальную гибридизацию для определения метилирования; HELP, анализ на основе обогащения минимальными продуцируемыми HpaII фрагментами путем опосредованной лигирования ПЦР; MCA, амплификацию метилированных CpG-островков; MCAM, MCA с гибридизацией на микрочипах; MeDIP, mDIP и mCIP,

20 иммунопреципитацию метилированной ДНК; MIRA, анализ с выделением метилированных CpG-островков; MMAS, оценку метилирования одиночных образцов на основе микрочипов; MS-AP-PCR, чувствительную к метилированию ПЦР с произвольными праймерами; MSCC, чувствительный к метилированию метод подсчета разрезов; MSP, ПЦР, специфичную к метилированию; MS-SNuPE, чувствительное к

25 метилированию однонуклеотидное удлинение праймера; NGS, секвенирование нового поколения; RLGS, рестрикционно-ориентированное сканирование генома; RRBS, бисульфитное секвенирование со сниженным количеством нуклеотидов; -seq, методы с последующим секвенированием; WGSBS, полногеномное бисульфитное секвенирование методом дробовика. (Manel Esteller, Cancer epigenomics: DNA

30 methylomes and histone-modification maps, Nature, 2007, 8:286-298; Peter W. Laird, Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. Nature Review Genetics, 2010, 11: 191-203). Предпочтительно, статус метилирования определяют способами, описанными в примерах ниже в настоящей заявке, например, с помощью анализа метилирования на чипах Infinium 27K или способом на основе времяпролетной МАЛДИ

масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Статус метилирования конкретного остатка цитозина в конкретной молекуле полинуклеотида может, собственно, быть только «неметилированным» (что означает 0% метилирования) или «метилированным» (что означает 100% метилирования). В случае CpG-сайта в двухцепочечной молекуле ДНК, которая содержит два остатка цитозина, статус метилирования может быть представлен как «неметилированный» (что означает 0% метилирования, т.е. ни один из двух остатков цитозина не метилирован), «полуметилированный» (что означает 50% метилирования, т.е. один из двух остатков цитозина метилирован) или «метилированный» или «полностью метилированный» (что означает 100% метилирования, т.е. оба остатка цитозина метилированы). Однако, как понятно специалисту в данной области техники, при получении полинуклеотидов из множества клеток и определении статуса метилирования конкретного остатка цитозина в указанном множестве полинуклеотидов определяют усредненный статус метилирования, который может, например, предпочтительно выражаться в виде процента (% метилирования) и который может принимать любое значение от 0% до 100%. Также, как понятно специалисту в данной области техники, статус метилирования можно выразить в виде процента в том случае, если определяют усредненное метилирование различных популяций клеток. Например, клетки крови согласно настоящему изобретению представляют собой смесь различных типов клеток. Определенные типы клеток могут характеризоваться значительными уровнями метилирования, тогда как другие типы клеток характеризуются меньшими уровнями метилирования, и, наконец, достигают усредненного метилирования, составляющего, например, 50%.

В некоторых случаях статус метилирования нескольких CpG-сайтов может быть объединен в один уровень метилирования. Например, термин GeneX_CpG.1.2.3 относится к среднему уровню метилирования CpG 1, 2 и 3 в пределах гена GeneX.

В настоящей заявке термин «агент для детекции» относится к агенту, специфично взаимодействующему с геном, представляющим интерес, и таким образом распознающему уровень экспрессии гена, представляющего интерес, статус метилирования гена, представляющего интерес, или присутствие или количество микроРНК согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, агент для детекции представляет собой белок, полипептид, пептид, полинуклеотид или олигонуклеотид. Предпочтительно, агент для детекции метят способом, позволяющим проводить детекцию указанного агента для детекции подходящими способами. Мечение можно осуществлять путем применения различных методов, хорошо известных в данной

области техники и зависящих от используемой метки. Предпочтительные используемые метки представляют собой флуоресцентные метки, в том числе, среди прочего, флуорохромы, такие как флуоресцеин, родамин или тexasский красный. Однако метка может также представлять собой фермент или антитело. Предполагается, что фермент, используемый в качестве метки, будет генерировать детектируемый сигнал за счет реакции с субстратом. Подходящие ферменты, субстраты и методы хорошо известны в данной области техники. Агент для детекции, используемой в качестве метки, может специфично распознавать целевую молекулу, которую можно детектировать прямо (например, целевую молекулу, которая сама по себе является флуоресцентной) или опосредованно (например, целевую молекулу, которая генерирует детектируемый сигнал, такую как фермент). Меченные агенты для детекции для образца приводят в контакт с образцом, чтобы обеспечить специфичное взаимодействие. Может быть необходимо промывание, чтобы удалить неспецифично связавшийся агент для детекции, который в противном случае приведет к получению ошибочных значений. После завершения указанного этапа взаимодействия исследователь помещает устройство для детекции в считывающее устройство или сканер. Устройство для детекции флуоресцентных меток, предпочтительно, состоит из нескольких лазеров, предпочтительно специального микроскопа и фотокамеры. Флуоресцентные метки возбуждают лазером, и микроскоп и фотокамера согласованно функционируют для получения цифрового изображения образца. Затем эти данные можно сохранить на компьютере, и использовать специальную программу, например, для вычитания фоновых данных. Итоговые данные, предпочтительно, нормируют, и иногда преобразуют в числовой формат и формат общепризнанных единиц. Данные анализируют для сравнения образцов с референсами и идентифицировать значительные изменения.

«Сравнение» в настоящей заявке включает сравнение присутствия, отсутствия или количества индикатора, указанного в настоящей заявке, содержащегося в образце, анализ которого проводят, с присутствием, отсутствием или количеством указанного индикатора в подходящем референсном образце. Следует понимать, что сравнение в настоящей заявке означает сравнение соответствующих параметров или значений, например, абсолютного количества индикатора, указанного в настоящей заявке, по сравнению с абсолютным референсным количеством указанного индикатора; концентрации индикатора по сравнению с референсной концентрацией указанного индикатора; сигнала интенсивности, полученного от индикатора, указанного в

настоящей заявке, в образце по сравнению с сигналом интенсивности указанного индикатора того же типа в референсном образце. Указанное сравнение можно проводить вручную или компьютеризированным способом. Для сравнения компьютеризированным способом значение определенного количества можно сравнить со значениями в соответствии с подходящими референсами, которые хранятся в базе данных компьютерной программы. Затем компьютерная программа может оценить результат сравнения посредством экспертной системы. Соответственно, результат детекции, указанного в настоящей заявке, может быть автоматически предоставлен в подходящем выходном формате.

Термины «образец» или «образец, представляющий интерес», используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и означают часть или фрагмент ткани, органа или индивидуума, которые, как правило, являются меньшими, чем такая ткань, орган или индивидуум, и предназначены для представления целой ткани, органа или индивидуума. После проведения анализа образец обеспечивает информацию относительно статуса ткани или статуса здоровья или заболевания органа или индивидуума. Примеры образцов включают, не ограничиваясь указанными, жидкие образцы, такие как кровь, сыворотка, плазма, синовиальная жидкость, моча, слюна, лимфатическая жидкость, слезная жидкость и жидкость, получаемая из желез, таких как, например, молочная железа или предстательная железа, или образцы ткани, такие как, например, экстракты ткани, полученные из ткани опухоли или ткани, прилежащей к опухоли. Дополнительные примеры образцов представлены культурами клеток или культурами тканей, такими как, не ограничиваясь указанным, культуры различных раковых клеток.

Образцы можно получать с применением общеизвестных методов; такие образцы включают, предпочтительно, соскобы, мазки или биоптаты из пищеварительного тракта, печени, поджелудочной железы, анального канала, ротовой полости, верхних отделов ЖКТ и дыхательных путей и эпидермиса. Такие образцы можно получить с помощью щеток, (хлопковых) тампонов, шпателя, из жидкости, получаемой при смывах/промывании, с помощью устройства для панч-биопсии, проколов полостей иглами или хирургическими инструментами. Образцы ткани или органа можно получить из любой ткани или органа посредством, например, биопсии или других хирургических процедур. Более предпочтительно, образцы представляют собой образцы жидкостей организма, например, предпочтительно, крови, плазмы, сыворотки, мочи, слюны, слезной жидкости и жидкостей, получаемых из молочной железы, например, молока. Наиболее предпочтительно, образец жидкости организма содержит клетки субъекта.

Выделенные клетки можно получить из жидкостей организма или тканей или органов посредством методик выделения, таких как фильтрация, центрифугирование или сортировка клеток. Предпочтительно, образцы получают из тех жидкостей организма, которые описаны в настоящей заявке ниже. Более предпочтительно, клетки выделяют из указанных жидкостей организма, как описано в настоящей заявке ниже.

Анализ образца может быть проведен визуальным или химическим способом. Визуальный анализ включает, но не ограничен указанными, микроскопическую визуализацию или радиографическое сканирование ткани, органа или индивидуума, позволяющие проводить морфологическую оценку образца. Химический анализ включает, не ограничиваясь указанным, детекцию наличия или отсутствия специфичных индикаторов или изменений количества или уровня специфичных индикаторов.

Термин «референсный образец» в настоящей заявке означает образец, который анализируют по существу идентичным способом, как и образец, представляющий интерес, и информацию о котором сравнивают с таковой образца, представляющего интерес. Соответственно, референсный образец обеспечивает стандарт, позволяющий оценивать информацию, полученную из образца, представляющего интерес. Референсный образец может быть получен из здоровой или нормальной ткани, органа или индивидуума, посредством этого обеспечивая стандарт здорового статуса ткани, органа или индивидуума. Различия между статусом нормального референсного образца и статусом образца, представляющего интерес, могут свидетельствовать о риске развития заболевания или о присутствии или дальнейшем прогрессировании такого заболевания или нарушения. Референсный образец может быть получен из аномальной или подверженной болезни ткани, органа или индивидуума, посредством этого обеспечивая стандарт больного статуса ткани, органа или индивидуума. Различия между статусом аномального референсного образца и статусом образца, представляющего интерес, могут свидетельствовать о меньшем риске развития заболевания или об отсутствии или улучшении такого заболевания или нарушения. Референсный образец может быть также получен из той же ткани, органа или индивидуума, что и образец, представляющий интерес, но быть отобранным в более раннюю временную точку. Различия между статусом ранее отобранного референсного образца и статусом образца, представляющего интерес, могут свидетельствовать о прогрессировании заболевания, т.е. улучшении или ухудшении при заболевании в течение времени. Референсный образец был отобран в более раннюю или позднюю временную точку в случае, если между забором референсного образца и забором образца, представляющего интерес,

прошел некоторый период времени. Такой период времени может представлять собой годы (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 лет), месяцы (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев), недели (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель), дни (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 дней), часы (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 часов), минуты (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 минут) или секунды (например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 секунд).

Референсный образец можно «обрабатывать отличным способом» или «подвергать отличному воздействию», чем образец, представляющий интерес, в случае если оба образца обрабатывают по существу идентичным способом, за исключением одного фактора. Такой один фактор включает, но не ограничен указанными, время воздействия, концентрацию воздействия или температуру воздействия определенного вещества. Соответственно, образец, представляющий интерес, можно подвергнуть воздействию отличных доз определенного вещества, чем референсный образец, или можно подвергнуть воздействию в течение отличного интервала времени, чем референсный образец, или можно подвергнуть воздействию при отличной температуре, чем референсный образец. Отличные дозы, воздействию которых можно подвергнуть образец, представляющий интерес, включают, не ограничиваясь указанными, дозы, увеличенные или уменьшенные в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 100 раз и/или в 1000 раз по сравнению с дозами, воздействию которых подвергают референсный образец. Отличные времена экспозиции, воздействию которых можно подвергнуть образец, представляющий интерес, включают, не ограничиваясь указанными, в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 100 раз и/или в 1000 раз более длинный или более короткий период времени, чем референсное воздействие. Отличные температуры воздействия, воздействию которых можно подвергнуть образец, представляющий интерес, включают, не ограничиваясь указанными, температуру, увеличенную или уменьшенную в 2 раза, в 5 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 100 раз и/или в 1000 раз, чем референсное воздействие. В неограничивающем примере образец, представляющий интерес, можно подвергнуть воздействию в 10 раз увеличенной концентрации вещества, чем референсный образец. Затем проводят анализ обоих образцов по существу идентичным способом, позволяющим проводить определение воздействия, т.е. благоприятного или неблагоприятного влияния, увеличенных концентраций такого вещества на образец, представляющий интерес. Специалисту очевидно, что в данном примере вносят

соответствующие изменения в различные диапазоны концентраций, различные времена экспозиции и/или различные температуры воздействия.

Термины «пониженный» или «сниженный» уровень индикатора относится к уровню такого индикатора в образце ниже референсного значения или по сравнению с референсным образцом. Термины «повышенный» или «увеличенный» уровень индикатора означает уровень такого индикатора в образце, больший по сравнению с референсом или референсным образцом.

Референсные количества могут быть, теоретически, рассчитаны для группы или когорты субъектов, как указано в настоящей заявке, на основе усредненных или медианных значений для заданной микроРНК с применением стандартных методов статистики. В частности, точность теста, такого как способ диагностики события или отсутствия события, наилучшим способом описывается операционными характеристиками приемника («receiver-operating characteristics», ROC) (см., в частности, источник: Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577). График ROC представляет собой график всех пар чувствительность/ специфичность, возникающих вследствие непрерывно меняющегося порога принятия решения во всем наблюдаемом диапазоне данных. Клинические характеристики способа диагностики зависят от точности данного способа, т.е. его способности правильно определять для субъектов определенный прогноз или диагноз. График ROC демонстрирует перекрытие между двумя распределениями посредством откладывания на графике чувствительности в зависимости от 1-специфичности для полного диапазона порогов, подходящих для проведения разграничения. На оси «у» отложена чувствительность или фракция истинноположительных результатов, которая определена как соотношение количества истинноположительных результатов теста к сумме количества истинноположительных и количества ложноотрицательных результатов теста. Данный параметр также называют положительным результатом относительно наличия заболевания или состояния. Его рассчитывают исключительно в пораженной подгруппе. На оси «х» отложена ложноположительная фракция, или 1-специфичность, которая определена как соотношение количества ложноположительных результатов к сумме количества истинноотрицательных и количества ложноположительных результатов. Данный параметр представляет собой показатель специфичности и рассчитывается исключительно в непораженной подгруппе. Поскольку истинно- и ложноположительная фракции рассчитываются полностью отдельно, с применением результатов теста от двух различных подгрупп, график ROC является независимым от распространенности

события в группе. Каждая точка на графике ROC представляет пару чувствительность/-специфичность в соответствии с конкретным порогом принятия решения. Тест с превосходным разграничением (отсутствие перекрытия в двух распределениях результатов) характеризуется графиком ROC, который проходит через верхний левый угол, где фракция истинноположительных результатов составляет 1,0, или 100% (превосходная чувствительность), и ложноположительная фракция составляет 0 (превосходная специфичность). Теоретический график для теста без дискриминации (идентичные распределения результатов для двух групп) представляет собой диагональную линию, проведенную под углом 45° от нижнего левого угла до верхнего правого угла. Большинство графиков располагаются между данными двумя крайними значениями. Если график ROC полностью располагается ниже диагонали под углом 45° , это легко исправить посредством обращения критерия «положительности» с «более чем» на «менее чем», или наоборот. Применительно к качественным характеристикам, чем ближе график расположен к верхнему левому углу, тем выше общая точность теста. В зависимости от желаемого доверительного интервала из кривой ROC может быть получен порог, позволяющий ставить диагноз или прогноз данного события при надлежащем соотношении чувствительности и специфичности, соответственно. Соответственно, референс, используемый для способов согласно настоящему изобретению, может быть получен, предпочтительно, посредством установления ROC для указанной когорты, как описано выше, и выведения порогового количества из ROC. В зависимости от желаемой чувствительности и специфичности способа диагностики график ROC позволяет получать подходящие пороги. Предпочтительно, референсные количества лежат в пределах диапазона значений, представляющих чувствительность по меньшей мере 75% и специфичность по меньшей мере 45% или чувствительность по меньшей мере 80% и специфичность по меньшей мере 40%, или чувствительность по меньшей мере 85% и специфичность по меньшей мере 33%, или чувствительность по меньшей мере 90% и специфичность по меньшей мере 25%.

Предпочтительно, референсное количество в настоящей заявке получают из образцов субъектов, полученных до лечения, но о которых известно, страдали ли доноры данных образцов от РМЖ или МРМЖ, или нет. Данный референсный уровень количества может представлять собой дискретное число или может представлять собой диапазон чисел. Очевидно, что референсный уровень или количество могут варьировать для отдельных видов микроРНК. Вследствие этого систему измерения, предпочтительно, калибруют с помощью образца или серий образцов, содержащих

известные количества каждой конкретной микроРНК. Специалисту ясно, что в данном случае количества микроРНК можно, предпочтительно, выразить в виде условных единиц (У.Е.). Таким образом, предпочтительно, количества микроРНК определяют посредством сравнения сигнала, полученного из образца, и сигналов, содержащихся в калибровочной кривой. Референсное количество, применяемое для индивидуального субъекта, может варьировать в зависимости от различных физиологических параметров, таких как возраст или субпопуляция. Таким образом, подходящее референсное количество можно определить посредством способов согласно настоящему изобретению в результате анализа референсного образца, который проводят вместе, т.е. одновременно или последовательно, с исследуемым образцом. Более того, пороговое количество можно, предпочтительно, использовать в качестве референсного количества. Референсное количество можно, предпочтительно, получить из образца субъекта или группы субъектов, страдающих от РМЖ или МРМЖ, которые страдают от/о которых известно, что они страдают от РМЖ или МРМЖ. Референсное количество можно, предпочтительно, также получить из образца субъекта или группы субъектов, которые, как известно, не страдают от РМЖ или МРМЖ. Следует понимать, что вышеупомянутые количества могут варьировать в связи со статистикой и ошибками измерения. Отклонение, т.е. уменьшение или увеличение количеств микроРНК, указанных в настоящей заявке, является, предпочтительно, статистически значимым отклонением, т.е. статистически значимым уменьшением или статистически значимым увеличением.

В настоящей заявке термин «лечить» или «лечение» заболевания или нарушения означает достижение одного или более результатов из следующих: (а) уменьшения тяжести нарушения; (b) ограничения или предотвращения развития симптомов, характерных для нарушения (нарушений), лечение которых проводят; (c) ингибирования ухудшения симптомов, характерных для нарушения (нарушений), лечение которых проводят; (d) ограничения или предотвращения повторного проявления нарушения (нарушений) у индивидуума, который ранее страдал от нарушения (нарушений); и (e) ограничения или предотвращения повторного проявления симптомов у индивидуумов, у которых ранее наблюдались симптомы нарушения (нарушений).

В настоящей заявке термин «предотвращать», «предотвращение» или «профилактика» заболевания или нарушения означает предотвращение того, что такое заболевание или нарушение возникнет у пациента.

В настоящей заявке термин «терапия» означает все меры, применяемые в отношении субъекта для облегчения заболеваний или нарушений, указанных в

настоящей заявке, или симптомов, которыми сопровождаются указанные заболевания или нарушения, до значительной степени. Указанная терапия в настоящей заявке также включает меры, приводящие к полному восстановлению здоровья в отношении заболеваний или нарушений, указанных в настоящей заявке. Следует понимать, что

5 терапия, используемая согласно настоящему изобретению, может не являться эффективной у всех субъектов, лечение которых проводят. Однако этот термин подразумевает, что лечение успешно у статистически значимой части субъектов, страдающих заболеванием или нарушением, описанным в настоящей заявке. Специалист

10 в данной области техники может легко определить, является ли часть статистически значимой, с применением различных хорошо известных инструментов статистической оценки, которые обсуждаются в настоящей заявке выше.

Термин «терапия рака молочной железы» в настоящей заявке относится к применению у субъекта, страдающего раком молочной железы, включая метастазирующий рак молочной железы, мер по удалению раковых клеток из организма

15 субъекта, ингибированию роста раковых клеток, уничтожению раковых клеток или стимулированию организма пациента для ингибирования роста или уничтожения раковых клеток. Предпочтительно, терапия рака молочной железы представляет собой химиотерапию, антигормональную терапию, таргетную терапию, иммунотерапию или любые комбинации указанных вариантов терапии. Однако также предусмотрено, что

20 противораковая терапия представляет собой лучевую терапию или хирургию, саму по себе или в комбинации с другими режимами терапии. Специалист понимает, что выбор терапии рака молочной железы зависит от нескольких факторов, таких как возраст субъекта, стадия опухоли и статус рецепторов клеток опухоли. Однако специалист в данной области техники также понимает, что выбору терапии рака молочной железы

25 могут способствовать способы согласно настоящему изобретению: если, например, РМЖ диагностирован способом диагностики РМЖ, но МРМЖ не диагностирован способом диагностики МРМЖ, хирургического удаления опухоли может быть достаточно. Если, например, РМЖ диагностирован способом диагностики РМЖ, и МРМЖ диагностирован способом диагностики МРМЖ, помимо хирургии, могут

30 являться необходимыми терапевтические меры, например, химиотерапия и/или таргетная терапия. Аналогично, если, например, РМЖ диагностирован способом диагностики РМЖ, и нежелательный статус ЦОК определен способом определения статуса ЦОК, может потребоваться, например, дополнительное добавление иммунотерапии к режиму терапии.

В настоящей заявке термин «химиотерапия» относится к лечению субъекта противоопухолевым лекарственным препаратом. Предпочтительно, химиотерапия представляет собой лечение, включающее алкилирующие средства (например, циклофосфамид), платину (например, карбоплатин), антрациклины (например, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин или даунорубицин) и ингибиторы топоизомеразы II (например, этопозид, иринотекан, топотекан, камптотецин или VP16), ингибиторы киназы анапластической лимфомы (ALK) (например, кризотиниб или AP26130), ингибиторы аврора-киназы (например, N-[4-[4-(4-метилпиперазин-1-ил)-6-[(5-метил-1H-пиразол-3-ил)амино]пиримидин-2-ил]сульфанилфенил]циклопропанкарбоксамида (VX-680)), антиангиогенные средства (например, бевацизумаб) или иод131-1-(3-иодбензил)гуанидин (терапевтический метайодбензилгуанидин), ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), по отдельности или любую подходящую комбинацию указанных ингибиторов. Следует понимать, что химиотерапия, предпочтительно, относится к полному циклу лечения, т.е. серии из нескольких (например, четырех, шести или восьми) доз противоопухолевого лекарственного препарата или лекарственных препаратов, вводимых субъекту с интервалом в несколько дней или недель, в течение которых не происходит такого введения.

Термин «антигормональная терапия» относится к терапии рака молочной железы посредством блокирования рецепторов гормонов, например, рецептора эстрогена или рецептора прогестерона, которые экспрессируются на опухолевых клетках, или посредством блокирования биосинтеза эстрогена. Блокирования рецепторов гормонов можно, предпочтительно, достичь посредством введения соединений, например, тамоксифена, связывающихся специфично и посредством этого блокирующих активность рецепторов указанного гормона. Блокирования биосинтеза эстрогенов, предпочтительно, достигают посредством введения ингибиторов ароматазы, таких как, например, анастрозол или летрозол. Специалисту в данной области техники известно, что антигормональная терапия является целесообразной исключительно в тех случаях, когда опухолевые клетки экспрессируют рецепторы гормонов.

Термин «таргетная терапия» в настоящей заявке относится к введению пациенту химического вещества, которое, как известно, блокирует рост раковых клеток посредством препятствования специфичным молекулам, которые, как известно, необходимы для опухолеобразования или роста рака или раковых клеток. Примеры, известные специалисту в данной области техники, представляют собой малые молекулы,

такие как, например, ингибиторы PARP – поли-АДФ-рибозополимеразы (например, инипариб) или моноклональные антитела, такие как, например, трастузумаб.

Термин «иммунотерапия» в настоящей заявке относится к лечению рака посредством модулирования иммунного ответа у субъекта. Указанное модулирование может вызывать, усиливать или подавлять указанный иммунный ответ. Термин «клеточная иммунотерапия» относится к терапии рака молочной железы, включающей введение субъекту иммунных клеток, например, Т-клеток, предпочтительно, опухолевых специфичных клеток NK (природных киллеров).

Термины «лучевая терапия» или «радиотерапия» известны специалисту в данной области техники. Данные термины относятся к применению ионизирующего излучения для лечения или контроля рака. Специалисту также известен термин «хирургия», который относится к оперативному вмешательству для лечения рака молочной железы, например, вырезанию ткани опухоли.

В настоящей заявке термин «мониторинг терапии» относится к получению показателя влияния противоракового лечения на статус рака субъекта, страдающего от указанного рака. Предпочтительно, мониторинг терапии включает применение способа согласно настоящему изобретению на двух образцах от одного субъекта, причем первый образец получают во временную точку, предшествующую моменту получения второго образца. Предпочтительно, временная точка получения первого образца отделена от временной точки получения второго образца приблизительно на одну неделю, приблизительно на две недели, приблизительно на три недели, приблизительно на четыре недели, приблизительно на пять недель, приблизительно на шесть недель, приблизительно на семь недель, приблизительно на два месяца, приблизительно на три месяца, приблизительно на пять месяцев, приблизительно на шесть месяцев или более чем приблизительно на шесть месяцев. Однако настоящим изобретением также предусмотрено, что способ мониторинга терапии используют для долгосрочного мониторинга субъектов, например, мониторинга времени безрецидивной выживаемости или т.п. В данном случае, временная точка получения первого образца отделена от временной точки получения второго образца, предпочтительно, по меньшей мере на шесть месяцев, по меньшей мере на один год, по меньшей мере на два года, по меньшей мере три года, по меньшей мере на четыре года, по меньшей мере на пять лет или по меньшей мере на шесть лет. Специалисту в данной области техники известно, что первый образец, предпочтительно, получают до начала противораковой терапии, в то время как второй образец, предпочтительно, получают после начала терапии. Однако

настоящим изобретением также предусмотрено, что оба образца получают после начала терапии. Специалист в данной области техники также понимает, что согласно способу мониторинга терапии согласно настоящему изобретению можно получить более чем два последовательных образца и что в данном случае образец, полученный в первой точке времени, можно использовать в качестве первого образца относительно второго образца, а также для третьего образца. Внося соответствующие изменения, образец, полученный во второй точке времени, можно, тем не менее, использовать в качестве первого образца относительно третьего образца и т.п.

Термин «успех лечения» в настоящей заявке, предпочтительно, относится к облегчению заболеваний или нарушений, указанных в настоящей заявке, или симптомов, которыми сопровождаются указанные заболевания или нарушения, в значительной степени. Более предпочтительно, данный термин относится к полному излечиванию указанного субъекта, т.е. предотвращению прогрессирования и/или рецидива метастазирующего рака молочной железы в течение по меньшей мере пяти лет.

Соответственно, «определение успеха лечения» относится к оценке вероятности того, что субъект будет успешно вылечен. Предпочтительно, данный термин относится к предсказанию выживаемости без прогрессирования заболевания и/или общей выживаемости субъекта, более предпочтительно, в течение конкретного периода времени. Термин «предсказание выживаемости без прогрессирования заболевания» относится к определению вероятности того, что субъект выживет без рецидива и/или прогрессирования метастатического рака молочной железы в течение конкретного периода времени. Соответственно, термин «предсказание общей выживаемости» относится к определению вероятности того, что субъект выживет в течение конкретного периода времени. Предпочтительно, указанный период времени составляет по меньшей мере 12 месяцев, более предпочтительно, по меньшей мере 24 месяца.

Термины «фармацевтический препарат», «медицинский препарат» и «лекарственный препарат» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо и означают вещество и/или комбинацию веществ, используемых для идентификации, предотвращения или лечения статуса ткани или заболевания.

Термин «набор» в настоящей заявке означает совокупность вышеупомянутых компонентов, предпочтительно, предоставленных отдельно или в одном контейнере. Контейнер, также предпочтительно, содержит инструкции по осуществлению способа согласно настоящему изобретению. Примеры таких компонентов набора, а также способы их применения, были приведены в настоящем описании. Набор,

предпочтительно, содержит вышеупомянутые компоненты в готовой к использованию форме. Предпочтительно, набор может дополнительно содержать инструкции, например, руководство для пользователя по корректировке компонентов, например, концентраций средств для детекции, и по интерпретации результатов любого

5 определения (определений) в отношении диагноза, обеспечиваемого способами согласно настоящему изобретению. В частности, такое руководство может содержать информацию для соотнесения количеств определенного продукта гена с типом диагноза. Подробное описание приведено в тексте настоящей заявки. Дополнительно в таком

10 руководстве для пользователя могут быть предоставлены инструкции относительно надлежащего применения компонентов набора для определения количества (количеств) соответствующего биомаркера. Руководство для пользователя может быть предоставлено в бумажной или электронной форме, например, может храниться на диске CD или CD-ROM. Настоящее изобретение также относится к применению указанного

набора в любом из способов согласно настоящему изобретению.

15 Термины «сТ», «сN», «сМ», «рТ», «рN» и «рМ» относятся к классификации злокачественных опухолей (TNM) Международного союза по борьбе с раком (UICC). Три основных параметра Т, N и М описывают первичный очаг опухоли (Т), вовлеченность регионарных лимфатических узлов (N) и распространение отдаленных метастазов (М). Эти параметры могут быть объединены с такими префиксами, как «с»,

20 что указывает на определение стадии на основании данных, полученных в клинических условиях до лечения (например, на основании обследования, лабораторных анализов, визуализации или биопсии). Префикс «р» указывает на результаты подробной послеоперационной патологической классификации TNM.

Термин «Qubit» означает тип флуоресцентного способа, способного обеспечить

25 точное количественное определение концентрации нуклеиновых кислот в заданном образце. В Qubit используются специфичные флуоресцентные красители для количественного определения ДНК, РНК, микроРНК или белков. Эти красители имеют чрезвычайно низкую флуоресценцию до связывания с молекулой-мишенью, что обеспечивает специфичность и точность количественного определения нуклеиновых

30 кислот. Показатель Qubit предпочтительно относится к уровням бесклеточной микроРНК.

В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явным образом не подразумевает обратное.

Термин «приблизительно» при использовании в сочетании с числовым значением включает числовые значения в пределах диапазона, нижняя граница которого на 5% ниже, чем указанное числовое значение, а верхняя граница на 5% выше, чем указанное числовое значение.

5

Варианты реализации

Ниже более подробно определены различные аспекты настоящего изобретения. Каждый аспект, определенный таким образом, может быть объединен с любым другим аспектом или аспектами, если явным образом не указано иное. В частности, любой признак, указанный как предпочтительный или благоприятный, может быть

10 скомбинирован с любым другим признаком или признаками, указанными как предпочтительные или благоприятные.

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к способу диагностики или прогнозирования рака у субъекта, причем указанный способ включает

15 этапы определения *in vitro* в образце, полученном от указанного субъекта:

а) метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из *HYAL2*, *MGRN1*, *RPTOR*, *SLC22A18*, *FUT7*, *RAPSN* и *SI00P* и/или

б) уровня экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, которая выбрана из

20 группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, при условии, что по меньшей мере одна микроРНК содержит по меньшей мере одну микроРНК, которая выбрана из группы, состоящей из miR-200c-3p, miR-375 и miR-320b,

при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение уровня

25 экспрессии miR-451a,

причем сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена и измененный уровень экспрессии по меньшей мере одной микроРНК служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания у указанного субъекта.

30 Другими словами, в заявленном способе используют уровень метилирования ДНК выборки биомаркеров и/или уровень экспрессии выборки микроРНК в образце, полученном от субъекта, для детекции или предсказания рака у указанного субъекта. Все вышеуказанные динуклеотиды CpG и микроРНК можно использовать в качестве одномерных маркеров или в качестве многомерных маркеров.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения термин miR-148b относится к последовательности цепи -3p или 5-p (предпочтительно цепи -3p), термин miR-409 относится к последовательности цепи -3p или -5p (предпочтительно цепи -3p), термин miR-652 относится к последовательности цепи -3p или -5p (предпочтительно цепи -3p), термин miR-200c относится к последовательности цепи -3p или -5p (предпочтительно цепи -3p), термин miR-375 относится к последовательности цепи -3p или -5p (предпочтительно цепи -3p), а термин miR-320b относится к последовательности цепи -3p или -5p (предпочтительно цепи -3p).

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения изменение статуса метилирования HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и/или S100P свидетельствует об изменении статуса ткани или статуса ракового заболевания, таком как ухудшение или улучшение статуса ткани или статуса ракового заболевания. В частности, сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, свидетельствует о наличии рака. В частности, сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, свидетельствует о повышении вероятности развития рака. В частности, уменьшение уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, свидетельствует о наличии рака и свидетельствует о повышении вероятности развития рака. Повышенная вероятность развития рака используется в значении развития рака *de novo* или развития новых опухолей.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения изменение уровня экспрессии miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и/или miR-141 свидетельствует об изменении статуса ткани или заболевания, такого как ухудшение или улучшение статуса ткани или заболевания, в частности, рака.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения микроРНК с этапа b) выбраны из miR-200c, miR-375, miR-148b, miR-409 и miR-652, предпочтительно для диагностики рака. Более предпочтительно микроРНК выбраны из или представляют собой miR-200c и miR-375, предпочтительно для

диагностики рака, предпочтительно рака яичников. Более предпочтительные микроРНК выбраны из или представляют собой miR-148b, miR-375, miR-409 и miR-652, предпочтительно для диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения гены, полученные на этапе а), выбраны из *HYAL2*, *SLC22A18*, *RAPSN* и *FUT7*, предпочтительно для диагностики рака. Более предпочтительные гены выбраны из или представляют собой *HYAL2* и *SLC22A18*, предпочтительно для диагностики рака, предпочтительно рака яичников. Более предпочтительные гены выбраны из или представляют собой *RAPSN* и *FUT7*, предпочтительно для диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы. Гены, указанные в качестве предпочтительных генов, могут быть скомбинированы с микроРНК, указанными в качестве предпочтительных микроРНК, для той же цели. Примерами указанных комбинаций являются микроРНК, выбранные из miR-200c и miR-375, вместе с генами, выбранными из или представляющими собой *HYAL2* и *SLC22A18*, предпочтительно для диагностики рака, предпочтительно рака яичников. Другой пример представлен микроРНК, выбранными из или представляющими собой miR-148b, miR-375, miR-409 и miR-652, в комбинации с генами, выбранными из или представляющими собой *RAPSN* и *FUT7*, предпочтительно для диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения микроРНК с этапа b) выбраны из miR-375, miR-652, miR-200c, miR-320b, miR-141, предпочтительно для прогнозирования рака. Более предпочтительно микроРНК выбраны из или представляют собой miR-375, miR-652 и miR-200c, еще более предпочтительные miR-375, предпочтительно для прогнозирования рака, предпочтительно рака яичников.

Более предпочтительно микроРНК выбраны из или представляют собой miR-200c, miR-320b, miR-141, еще более предпочтительно miR-200c, предпочтительно для прогнозирования рака, предпочтительно рака молочной железы.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения гены с этапа а) выбраны из генов с этапа а), выбранных из *HYAL2*, *S100P*, *FUT7*, *SLC22A18*, *MGRN1* и *RPTOR*, предпочтительно для прогнозирования рака. Более предпочтительно гены выбраны из или представляют собой *HYAL2*, *S100P*, *FUT7*, *SLC22A18* и *MGRN1*, еще более предпочтительно *HYAL2* и *S100P*, предпочтительно для прогнозирования рака, предпочтительно рака яичников. Более предпочтительно гены выбраны из или представляют собой *HYAL2*, *S100P* и *RPTOR*, предпочтительно для

прогнозирования рака, предпочтительно рака молочной железы. Гены, указанные в качестве предпочтительных генов, могут быть скомбинированы с микроРНК, указанными в качестве предпочтительных микроРНК, для той же цели. Примерами указанных комбинаций являются микроРНК, выбранные из или представляющие собой

5 miR-652 и miR-200с, в комбинации с генами, выбранными из или представляющими собой HYAL2, S100P, FUT7, SLC122A18 и MGRN1, предпочтительно для прогнозирования рака, предпочтительно рака яичников. Другой пример представлен микроРНК miR-375, в комбинации с генами, выбранными из или представляющими собой HYAL2 и S100P, предпочтительно для прогнозирования рака, предпочтительно

10 рака яичников. Еще одним примером являются микроРНК, выбранные из или представляющие собой miR-200с, miR-320b и miR-141, в комбинации с генами, выбранными из или представляющими собой HYAL2, S100P и RPTOR. Еще одним примером являются микроРНК, выбранные из или представляющие собой miR-200с, miR-320b и miR-375, в комбинации с генами, выбранными из или представляющими собой HYAL2, S100P и RPTOR.

15

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень метилирования по меньшей мере одного CpG, выбранного из HYAL2_CpG4, S100P_CpG4; SLC22A18 CpG3, RPTOR_CpG2, RPASN_CpG5; MGRN1_CpG12 и FUT7_CpG7 определяют на этапе а), и уровень экспрессии по меньшей

20 мере одной из следующих микроРНК определяют на этапе b): miR-148b, miR-409, предпочтительно -409-3p, miR-652, предпочтительно miR-652-3p, miR-200с, предпочтительно -200с-3p, miR-375, miR-320b и необязательно miR-451a. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения определяют S100P_CpG7 вместо или дополнительно к S100P_CpG4.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень метилирования по меньшей мере двух CpG, выбранных из HYAL2_CpG4, S100P_CpG4; SLC22A18 CpG3, RPTOR_CpG2, RPASN_CpG5; MGRN1_CpG12 и FUT7_CpG7 определяют на этапе а), и уровень экспрессии по меньшей

25 мере двух из следующих микроРНК определяют на этапе b): miR-148b, miR-409, предпочтительно -409-3p, miR-652, предпочтительно miR-652-3p, miR-200с, предпочтительно -200с-3p, miR-375, miR-320b и необязательно miR-451a. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения определяют S100P_CpG7 вместо или дополнительно к S100P_CpG4.

30

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень метилирования HYAL2_CpG4, S100P_CpG4; SLC22A18 CpG3, RPTOR_CpG2, RPASN_CpG5; MGRN1_CpG12 и FUT7_CpG7 определяют на этапе а), и уровень экспрессии следующих микроРНК определяют на этапе б): miR-148b, miR-409, предпочтительно -409-3p, miR-652, предпочтительно miR-652-3p, miR-200c, предпочтительно -200c-3p, miR-375, miR-320b и необязательно miR-451a. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения определяют S100P_CpG7 вместо или дополнительно к S100P_CpG4.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения в дополнение к метилированию цитозина на этапе а) и/или уровню экспрессии микроРНК на этапе б) определяют по меньшей мере один клинический маркер, предпочтительно выбранный из возраста пациента, CA125, Qubit, тяжести заболевания, типа рака молочной железы, стадии, сТ, сN, сМ, "pT (хирургия)", "pN (хирургия)", pM, химиотерапии (проводилась/не проводилась), национальности, роста [см], массы тела [кг], возраста первой менструации, высокого уровня холестерина, диабета, эндометриоза, миомы, кисты яичников, СПКЯ, аутоиммунного заболевания, медикаментозного лечения, беременности, возраста на момент первой беременности, контрацептивов или гормонов, курения, вегетарианства и занятий спортом. Наиболее предпочтительными клиническими маркерами являются возраст, CA125, сТ, сN, сМ, «pT (хирургия)», «pN (хирургия)», pM и Qubit.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения в дополнение к метилированию цитозина на этапе а) и/или уровню экспрессии микроРНК на этапе б) определяют клинический маркер «возраст пациента».

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения в дополнение к метилированию цитозина с этапа а) и/или уровню экспрессии микроРНК с этапа б) определяют клинический маркер CA125.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения изменение уровня экспрессии miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375 и/или miR-320b свидетельствует об изменении статуса ткани или статуса рака, таком как ухудшение или улучшение статуса ткани или статуса рака. В частности, увеличение уровня экспрессии микроРНК, выбранной из miR-148b, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-320b свидетельствует о наличии рака и/или повышении вероятности развития рака. Снижение уровня экспрессии miR-375 свидетельствует о наличии рака и/или повышении вероятности развития рака.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень экспрессии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, определяют в дополнение к метилированию цитозина, определенному на этапе а), причем

5 повышенный уровень экспрессии служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания. Повышенный уровень экспрессии свидетельствует о наличии рака и/или повышенной вероятности развития рака.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень экспрессии по меньшей мере одного гена, выбранного из группы,

10 состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, определяют в качестве альтернативы определению метилирования цитозина на этапе а), причем увеличенный уровень экспрессии служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания. Повышенный уровень экспрессии свидетельствует о наличии рака и/или повышенной вероятности развития рака.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения определение статуса метилирования включает определение метилирования по меньшей мере одного CpG-сайта в гене HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и/или S100P. В частности, определяют статус метилирования области промотора, интрона и/или экзона указанных генов.

В частности, ген HYAL2 представляет собой ген HYAL2 человека, расположенный на хромосоме 3 человека (№ доступа Genbank: NC_000003.11 GI: 224589815). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 50334760 и положением 50335700 на хромосоме 3 человека. Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома

25 человека, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных в положении 50335694 (cg27091787), 50335584 (HYAL_CpG_1), 50335646 (HYAL_CpG_2), or 50335671 (HYAL_CpG_3), 50335166 (HYAL-is-310 CpG_1), 50335180 (HYAL-is-310 CpG_2), 50335192 (HYAL-is-310 CpG_3), 50335195 (HYAL-is-310 CpG_4), 50335227 (HYAL-is-310 CpG_5), 50335233 (HYAL-is-310 CpG_6), 50335300 (HYAL-is-310 CpG_7), 50335315 (HYAL-is-310 CpG_8), 50335375 (HYAL-is-310 CpG_9),

30 50335392 (HYAL-is-310 CpG_10), 50335401 (HYAL-is-310 CpG_11), 50334744 (HYAL2-is-325_CpG_1), 50334761 (HYAL2-is-325_CpG_2), 50334804 (HYAL2-is-325_CpG_3), 50334844 (HYAL2-is-325_CpG_4), 50334853 (HYAL2-is-325_CpG_5), 50334862 (HYAL2-is-325_CpG_6), 50334880 (HYAL2-is-325_CpG_7), 50334906 (HYAL2-is-325_CpG_8),

50334913 (HYAL2-is-325_CpG_9), 50334917 (HYAL2-is-325_CpG_10), 0334928 (HYAL2-is-325_CpG_11), 50334944 (HYAL2-is-325_CpG_12), 50334956 (HYAL2-is-325_CpG_13), 50334980 (HYAL2-is-325_CpG_14), 50334982 (HYAL2-is-325_CpG_15), 50335010 (HYAL2-is-325_CpG_16) 50335014 (HYAL2-is-325_CpG_17), 50331237 (cg08776109) и
5 50330420 (cg06721473).

Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из перечня, состоящего из HYAL2_CpG_2 в положении 50335646, HYAL2_CpG_3 в положении 50335671 и HYAL2_CpG_4 в положении 50335195. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех,
10 по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалисту в данной области техники понятно, что
15 точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора HYAL2, содержащейся в образце для анализа, например, ген HYAL2 в версии 37/hg19 расположен на хромосоме 3 в положениях 50355221–50360337, но в версии 36/hg18 он расположен на хромосоме 3 в положениях 50330244–50335146.

Согласно предпочтительному варианту реализации измеряют все CpG в пределах
20 расстояния 100 п.о., 80 п.о., 70 п.о., 60 п.о., 50 п.о., 40 п.о., 30 п.о., 20 п.о., 10 п.о., 5 п.о. от определенных в настоящей заявке CpG с получением среднего значения метилирования для указанной области. Этот вариант реализации изобретения основан на явлении совместного метилирования соседних CpG, известном, в частности, у онкологических пациентов. Наиболее распространено совместное метилирование в
25 районах CpG-островков и/или CpG-берегов.

В частности, ген MGRN1 представляет собой ген MGRN1 человека, расположенный на хромосоме 16 человека (№ доступа Genbank: NC_000016.10, диапазон: 4624824–4690974, референсная первичная сборка GRCh38; № доступа Genbank: NC_018927.2, диапазон: 4674882–4741756, альтернативная сборка CHM1_1.1;
30 № доступа Genbank: AC_000148.1, диапазон: 4641815–4707494, альтернативная сборка HuRef). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 4654000 и положением 4681000 на хромосоме 16 человека. В частности, CpG-сайт (сайты) расположен (расположены) в одной или более из следующих областей хромосомы 16: 4670069–4670542, 4654000–

4655000, 4669000–4674000 и 4678000–4681000. Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома человека определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-сайта, расположенного в положении: 4670487 (MGRN1_CpG_1), 4670481 (MGRN1_CpG_2), 4670466 (MGRN1_CpG_3), 4670459 (MGRN1_CpG_4), 4670442 (MGRN1_CpG_5), 4670440 (MGRN1_CpG_6), 4670435 (MGRN1_CpG_7), 4670433 (MGRN1_CpG_8), 4670422 (MGRN1_CpG_9), 4670414 (MGRN1_CpG_10), 4670411 (MGRN1_CpG_11), 4670402 (MGRN1_CpG_12), 4670393 (MGRN1_CpG_13), 4670357 (MGRN1_CpG_14), 4670352 (MGRN1_CpG_15), 4670343 (MGRN1_CpG_16), 4670341 (MGRN1_CpG_17), 4670336 (MGRN1_CpG_18), 4670313 (MGRN1_CpG_19), 4670310 (MGRN1_CpG_20), 4670301 (MGRN1_CpG_21), 4670292 (MGRN1_CpG_22), 4670287 (MGRN1_CpG_23), 4670281 (MGRN1_CpG_24), 4670276 (MGRN1_CpG_25), 4670264 (MGRN1_CpG_26), 4670234 (MGRN1_CpG_27), 4670211 (MGRN1_CpG_28), 4670180 (MGRN1_CpG_29), 4670174 (MGRN1_CpG_30), 4670157 (MGRN1_CpG_31), 4670137 (MGRN1_CpG_32), 4670123 (MGRN1_CpG_33), 4670117 (MGRN1_CpG_34). Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из перечня, состоящего из MGRN1_CpG_2 в положении 4670481, MGRN1_CpG_4 в положении 4670459, MGRN1_CpG_12 в положении 4670402 и MGRN1_CpG_26 в положении 4670264. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалист понимает, что точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора MGRN1, содержащейся в образце для анализа.

В частности, ген RPTOR представляет собой ген RPTOR человека, расположенный на хромосоме 17 человека (№ доступа Genbank: NC_000017.11, диапазон: 80544825–80966373, первичная сборка GRCh38; № доступа Genbank: NG_013034.1, диапазон: 5001–426549, RefSeqGene; № доступа Genbank: NC_018928.2, диапазон: 78604958–79026514, альтернативная сборка CHM1_1.1; № доступа Genbank: NG_013034.1; № доступа Genbank: AC_000149.1, диапазон: 73954508–74378467, альтернативная сборка HuRef). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 76297000 и положением 76416000 на хромосоме 17 человека. В частности, CpG-сайт (сайты)

расположен (расположены) в одной из следующих областей хромосомы 17: 76369937–76370536, 76297000–76310000, 76333000–76341000, 76360000–76380000 и 76411000–76416000. Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома человека, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных в положении: 76370001 (RPTOR_CpG_1), 76370037 (RPTOR_CpG_2), 76370073 (RPTOR_CpG_3), 76370092 (RPTOR_CpG_4), 76370172 (RPTOR_CpG_5), 76370199 (RPTOR_CpG_6), 76370220 (RPTOR_CpG_7), 76370253 (RPTOR_CpG_8). Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из перечня, состоящего из RPTOR_CpG_2 в положении 76370037, RPTOR_CpG_5 в положении 76370172 и RPTOR_CpG_8 в положении 76370253. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалист понимает, что точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора RPTOR, содержащейся в образце для анализа.

В частности, ген SLC22A18 представляет собой ген SLC22A18 человека, расположенный на хромосоме 11 человека (№ доступа Genbank: NC_000011.10, диапазон: 2899721–2925246, референсная первичная сборка GRCh38; № доступа Genbank: NG_011512.1, диапазон: 5001–30526, RefSeqGene; № доступа Genbank: NT_187585.1, диапазон: 131932–157362, референс: GRCh38 ALT_REF_LOCI_1; № доступа Genbank: AC_000143.1, диапазон: 2709509–2734907, альтернативная сборка HuRef; № доступа Genbank: NC_018922.2, диапазон: 2919878–2945340, альтернативная сборка CHM1_1.1). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 2876000 и положением 2883000 на хромосоме 11 человека. В частности, указанные CpG-сайты расположены в положении 2877113–2877442. Более конкретно, chr11: 2876000 – chr11: 2883000, область дифференциального метилирования размером 7000 п.о., связанная с раком, в частности, РМЖ, РЯ и/или РПЖ, захватывающая промоторную область, CpG-островок и часть области «тела гена» SLC22A18 (варианты транскриптов). Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома человека, определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-сайта, расположенного в положении: 2877395 (SLC22A18_CpG_1), 2877375

(SLC22A18_CpG_2), 2877365 (SLC22A18_CpG_3), 2877341 (SLC22A18_CpG_4), 2877323 (SLC22A18_CpG_5), 2877311 (SLC22A18_CpG_6), 2877193 (SLC22A18_CpG_7), 2877140 (SLC22A18_CpG_8). Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из перечня, состоящего из SLC22A18_CpG_3 в положении 2877365, SLC22A18_CpG_4 в положении 2877341 и SLC22A18_CpG_8 в положении 2877140. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалист понимает, что точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора SLC22A18, содержащейся в образце для анализа.

В частности, ген FUT7 представляет собой ген FUT7 человека, расположенный на хромосоме 9 человека (№ доступа Genbank: NC_000009.12, диапазон: 137030174–137032840, референсная первичная сборка GRCh38; № доступа Genbank: NG_007527.1, диапазон: 5001–7667, RefSeqGene; № доступа Genbank: AC_000141.1, диапазон: 109383478–109386144, Альтернативная сборка HuRef; № доступа Genbank: NC_018920.2, диапазон: 140073389–140076055, альтернативная сборка CHM1_1.1). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 139046000 и положением 139048000 на хромосоме 9 человека. Более конкретно, область дифференциального метилирования, связанная с раком, в частности, связанная с РМЖ, РЯ и/или РПЖ, размером 2000 п.о. расположена в области промотора FUT7. В частности, указанные CpG-сайты расположены в положении 139047218–139047610, 139046000–139048000 и 139045065–139045817. Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома человека, определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-сайта, расположенного в положении: 139047253 (FUT_CpG_1), 139047314 (FUT_CpG_2), 139047346 (FUT_CpG_3), 139047427 (FUT_CpG_4), 139047445 (FUT_CpG_5), 139047467 (FUT_CpG_6), 139047483 (FUT_CpG_7), 139047566 (FUT_CpG_8). Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из FUT7_CpG_3 в положении 139047346 и FUT7_CpG_7 в положении 139047483. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по

меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалист понимает, что точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора FUT7, содержащейся в образце для анализа.

В частности, ген RAPSN представляет собой ген RAPSN человека, расположенный на хромосоме 11 человека (№ доступа Genbank: NC_000011.10, диапазон: 47437757–47449178, референсная первичная сборка GRCh38; № доступа Genbank: NG_008312.1, диапазон: 5001–16423, RefSeqGene; № доступа Genbank: NC_018922.2, диапазон: 47458570–47469991, альтернативная сборка CHM1_1.1; № доступа Genbank: AC_000143.1, диапазон: 47159075–47170494, альтернативная сборка HuRef). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 47427500 и положением 47428500 на хромосоме 11 человека. Предпочтительно, указанные CpG-сайты расположены в положениях 47427500–47428300. Более конкретно, область дифференциального метилирования, связанная с раком, предпочтительно, связанная с РМЖ, РЯ и/или РПЖ, размером 1000 п.о., расположена в области промотора RAPSN. Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома человека, определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-сайта, расположенного в положении: 47427787 (RAPSN_CpG_1), 47427825 (RAPSN_CpG_2), 47427883 (RAPSN_CpG_3), 47427915 (RAPSN_CpG_4), 47427930 (RAPSN_CpG_5), 47427976 (RAPSN_CpG_6), 47428029 (RAPSN_CpG_7), 47428110 (RAPSN_CpG_8). Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из RAPSN_CpG_2 в положении 47427825, RAPSN_CpG_4 в положении 47427915, RAPSN_CpG_5 в положении 47427930, RAPSN_CpG_7 в положении 47428029 и RAPSN_CpG_8 в положении 47428110. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалист понимает, что точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора RAPSN, содержащейся в образце для анализа.

В частности, ген S100P представляет собой ген S100P человека, расположенный на хромосоме 4 человека (№ доступа Genbank: NC_000004.12, диапазон: 6693839–6697170, референсная первичная сборка GRCh38; № доступа Genbank: AC_000136.1, диапазон: 6627254–6630595, альтернативная сборка HuRef; № доступа Genbank: NC_018915.2, диапазон: 6693944–6697285, альтернативная сборка CHM1_1.1). В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере одного из CpG-сайтов, расположенных между положением 6746000 и положением 6747000 на хромосоме человека 4. Более конкретно, область дифференциального метилирования, связанная с раком (предпочтительно, связанная с РМЖ, РЯ и/или РПЖ), размером 1000 п.о., расположена в пределах от области промотора до первого экзона S100P. В частности, указанные CpG-сайты расположены в положении 6.746.537–6.746.823. Более конкретно, в частности, в версии 36.1/hg18 генома человека, определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-сайта, расположенного в положении: 6746565 (S100P_CpG_1), 6746599 (S100P_CpG_2), 6746609 (S100P_CpG_3), 6746616 (S100P_CpG_4), 6746623 (S100P_CpG_5), 6746634 (S100P_CpG_6), 6746710 (S100P_CpG_7), 6746728 (S100P_CpG_8), 6746753 (S100P_CpG_9), 6746779 (S100P_CpG_10), 6746788 (S100P_CpG_11), 6746791 (S100P_CpG_12). Наиболее конкретно, по меньшей мере один CpG-сайт выбран из S100P_CpG_2 в положении 6746599, S100P_CpG_3 в положении 6746609, S100P_CpG_4 в положении 6746616 и S100P_CpG_7 в положении 6746710. В частности, определяют статус метилирования по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти, по меньшей мере шести, по меньшей мере семи, по меньшей мере восьми, по меньшей мере девяти, по меньшей мере десяти, по меньшей мере одиннадцати, по меньшей мере двенадцати или по меньшей мере пятнадцати CpG-сайтов согласно настоящему изобретению. Специалист понимает, что точное количество указанных CpG-сайтов может зависеть от конкретной геномной последовательности и от конкретной последовательности области промотора S100P, содержащейся в образце для анализа.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения способ прогнозирования и/или диагностики рака также включает этап сравнения статуса метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG и присутствия, в частности, уровня экспрессии, по меньшей мере одного маркера микроРНК, у указанного субъекта, со статусом метилирования по меньшей мере одного динуклеотида CpG и присутствием, в частности, уровнем экспрессии по меньшей мере одного маркера микроРНК в одном

или более референсах. В частности, референс представляет собой пороговое значение, референсное значение или референсный образец.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, где референс представляет собой пороговое значение, статус метилирования по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, ниже порогового значения свидетельствует о том, что субъект страдает раком, о повышенном риске развития рака или ухудшении при заболевании; тогда как статус метилирования, который эквивалентен пороговому значению или превышает пороговое значение, свидетельствует о том, что субъект не страдает раком, имеет пониженный риск развития рака, или об улучшении при заболевании. Следует понимать, что вышеупомянутый уровень может варьировать в зависимости от используемых методов статистики и ошибок измерения.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, где референс представляет собой пороговое значение, уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, который эквивалентен пороговому значению или превышает пороговое значение, свидетельствует о том, что субъект страдает раком, о повышенном риске развития рака или ухудшении при заболевании; тогда как уровень экспрессии, ниже порогового значения свидетельствует о том, что субъект не страдает раком, о пониженном риске развития рака или об улучшении при заболевании. Следует понимать, что вышеупомянутый уровень может варьировать в зависимости от используемых методов статистики и ошибок измерения.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, в которых референс представляет собой пороговое значение, количество по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, которое эквивалентно пороговому значению или превышает пороговое значение, свидетельствует о том, что субъект страдает раком, о повышенном риске развития рака или ухудшении при заболевании; тогда как количество меньше порогового значения свидетельствует о том, что субъект не страдает раком, о пониженном риске развития рака или об улучшении при заболевании. Следует понимать, что вышеупомянутый уровень может варьировать в зависимости от используемых методов статистики и ошибок измерения.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения, где референс представляет собой референсное значение, указанное референсное значение

представляет собой репрезентативное значение для отсутствия рака, наличия рака, или для повышенного или пониженного риска развития рака.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения референсный образец выбран из группы, состоящей из референсного образца, 5 происходящего от здорового индивидуума, референсного образца, происходящего от больного индивидуума, референсного образца, происходящего от того же индивидуума, что и образец, представляющий интерес, отобранного в более ранней или поздней временной точке, и референсного образца, репрезентативного для здорового индивидуума или репрезентативного для наличия или отсутствия рака, или 10 репрезентативного для повышенного или пониженного риска развития рака.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения рак представляет собой рак молочной железы и/или рак яичников. Согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения указанный способ 15 предназначен для прогнозирования рака молочной железы. Согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения указанный способ предназначен для прогнозирования рака яичников. Согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения указанный способ предназначен для диагностики рака молочной железы. Согласно другому предпочтительному варианту реализации изобретения указанный способ предназначен для диагностики рака яичников.

20 Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения определяют статус метилирования по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 разных динуклеотидов CpG. CpG может быть расположен в одном и том же гене или в разных генах.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего 25 изобретения определяют уровень экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 различных микроРНК.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения определяют статус метилирования по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 разных 30 динуклеотидов CpG и уровень экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 разных микроРНК.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-динуклеотида в пределах HYAL2 и S100P.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения определяют по меньшей мере уровень экспрессии микроРНК miR-200с и miR-375.

5 Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-динуклеотида в HYAL2 и S100P и по меньшей мере уровень экспрессии микроРНК miR-200с и miR-375.

10 Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения субъект имеет повышенный риск возникновения или развития рака, предпочтительно рака молочной железы и/или рака яичников.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения образец представляет собой образец жидкости организма или образец ткани, причем образец жидкости организма предпочтительно выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, синовиальной жидкости, мочи, слюны, лимфатической жидкости, слезной жидкости и жидкости, получаемой из желез, и более предпочтительно представляет собой периферическую кровь.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения способ дополнительно включает этап

20 (с) определения *in vitro* уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в указанном по меньшей мере одном гене и/или уровня экспрессии указанного по меньшей мере одного гена и уровня экспрессии указанной по меньшей мере одной микроРНК в одном или более референсных образцах.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения CpG с этапа а) выбраны из HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, S100P_CpG_2.3, S100P_CpG4, S100P_CpG7, S100P_CpG8, S100P_CpG9, S100P_CpG10.11.12, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, SLC22A18_CpG8, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG3, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6, RPTOR_CpG8, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG2, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG5, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4, FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, MGRN1_CpG2, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG5.6.7.8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG_16.17.18, MGRN1_CpG19.20, MGRN1_CpG22.23, MGRN1_CpG26.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения на этапе а) определяют следующие CpG: HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, S100P_CpG_2.3, S100P_CpG4, S100P_CpG7, S100P_CpG8, S100P_CpG9, S100P_CpG10.11.12, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, SLC22A18_CpG8, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG3, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6, RPTOR_CpG8, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG2, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG5, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4, FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, MGRN1_CpG2, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG5.6.7.8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG_16.17.18, MGRN1_CpG19.20, MGRN1_CpG22.23, MGRN1_CpG26.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения на этапе а) определяют следующие CpG: HYAL2_CpG1, HYAL2_CpG2, HYAL2_CpG3, HYAL2_CpG4, S100P_CpG2,3, S100P_CpG7, S100P_CpG8, S100P_CpG9, S100P_CpG10,11,12, SLC22A18_CpG1, SLC22A18_CpG3, SLC22A18_CpG4, SLC22A18_CpG6, RPTOR_CpG1, RPTOR_CpG2, RPTOR_CpG3, RPTOR_CpG5, RPTOR_CpG6, RPTOR_CpG8, RAPSN_CpG1, RAPSN_CpG4, RAPSN_CpG6, RAPSN_CpG7, RAPSN_CpG8, FUT7_CpG1, FUT7_CpG2, FUT7_CpG3, FUT7_CpG4, FUT7_CpG6, FUT7_CpG7, MGRN1_CpG4, MGRN1_CpG5,6,7,8, MGRN1_CpG12, MGRN1_CpG15, MGRN1_CpG16,17,18, MGRN1_CpG19,20, MGRN1_CpG22,23, MGRN1_CpG26. Указанную выборку маркеров предпочтительно используют для диагностики или прогнозирования рака молочной железы, в частности, диагностики и прогнозирования BRCA+ рака молочной железы.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень экспрессии по меньшей мере miR-200с определяют на этапе b), а отбор генов на этапе а) включает HYAL2.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень экспрессии по меньшей мере miR-200с определяют на этапе b), а отбор генов на этапе а) включает HYAL2 и S100P.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень экспрессии по меньшей мере miR-200с определяют на этапе b), а отбор генов на этапе а) включает HYAL2, S100P и MGRN1.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения уровень экспрессии по меньшей мере miR-200c, miR-320b и miR-375 определяют на этапе b), а отбор генов на этапе а) включает HYAL2, S100P и MGRN1.

5 Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения указанный способ предназначен для диагностики или прогнозирования раннего рака, предпочтительно раннего рака яичников.

Термин «ранний рак» в настоящей заявке означает рак на ранних стадиях. В данной области техники известны несколько систем стадирования, которые могут быть использованы согласно настоящему изобретению для определения раннего рака или рака на ранней стадии. Например, общеиспользуемой системой стадирования рака яичников является система FIGO (Международной федерации гинекологии и акушерства) (см. www.figo.org). В указанной системе используют 3 фактора для стадирования (классификации) указанного рака: Степень (размер) опухоли (T), распространение на близлежащие лимфатические узлы (N) и распространение (метастазирование) в 10 отдаленные участки (M). Цифры или буквы после T, N и M дают более подробную информацию о каждом из указанных факторов. Соответствующие более высоким значениям цифры означают, что рак является более распространенным. После того как для пациента определены категории T, N и M, эту информацию объединяют в ходе процесса, называемого *группировкой стадий*, чтобы определить общую стадию.

20 В системе стадирования, представленной в таблице ниже, используют патологическую стадию (также называемую хирургической стадией). Ее определяют путем исследования ткани, извлеченной во время операции. Также такое стадирование известно как хирургическое стадирование. Иногда, если немедленная операция невозможна, для рака определяют клиническую стадию. Указанное стадирование 25 основано на результатах физикального обследования, биопсии и визуализационных тестов, выполненных до операции.

Группировка стадий	Стадия FIGO	Описание стадии *
T1 N0 M0	I	Рак присутствует только в яичнике (или яичниках) или фаллопиевой трубе (трубах) (T1). Рак не распространился на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T1a N0 M0	IA	Рак присутствует в одном яичнике, и опухоль ограничена внутренней частью яичника; или рак присутствует в одной фаллопиевой трубе и присутствует только внутри фаллопиевой трубы. На внешних поверхностях яичника или

		фаллопиевой трубы рак отсутствует. В жидкости (асцит) или смывах из брюшной и тазовой полостей (T1a) раковых клеток не обнаружено. Рак не распространился на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T1b N0 M0	IB	Рак присутствует в обоих яичниках или фаллопиевых трубах, но не на их наружных поверхностях. В жидкости (асцит) или смывах из брюшной и тазовой полостей (T1b) раковых клеток не обнаружено. Рак не распространился на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T1c N0 M0	BKY	Рак присутствует в одном или обоих яичниках или фаллопиевых трубах, и имеет место что-либо из следующего: • Ткань (капсула), окружающая опухоль, прорвалась в ходе хирургической операции, что может позволить раковым клеткам проникнуть в брюшную и тазовую полости (так называемая хирургическая утечка). Это стадия IC1. • Рак присутствует на внешней поверхности по крайней мере одного из яичников или фаллопиевых труб, или капсула (ткань, окружающая опухоль) разорвалась (лопнула) до хирургической операции (что может позволить раковым клеткам попадать в брюшную и тазовую полости). Это стадия IC2. • Раковые клетки обнаруживаются в жидкости (асцит) или смывах из брюшной и тазовой полостей. Это стадия IC3. Рак не распространяется на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T2 N0 M0	II	Рак присутствует в одном или обоих яичниках или фаллопиевых трубах и распространился на другие органы (такие как матка, мочевого пузырь, сигмовидная кишка или прямая кишка) в тазовой полости, или присутствует первичный перитонеальный рак (T2). Рак не распространился на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T2a N0 M0	IIA	Рак распространился на матку, или фаллопиевы трубы, или яичники или инвазировал (пророс) в них. (T2a). Рак не распространился на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T2b N0 M0	IIB	Рак присутствует на внешней поверхности или пророс в другие близлежащие органы тазовой полости, такие как мочевого пузырь, сигмовидная кишка или прямая кишка (T2b). Рак не распространился на близлежащие лимфатические узлы (N0) или на отдаленные участки (M0).
T1 или T2 N1 M0	IIIA1	Рак присутствует в одном или обоих яичниках, или в одной или обеих фаллопиевых трубах, или присутствует первичный перитонеальный рак (T1), который может распространяться или прорасти в близлежащие органы

		тазовой полости (T2). Рак распространился только на забрюшинные (тазовые и/или парааортальные) лимфатические узлы. Рак не распространился на отдаленные участки (M0).
T3a N0 или N1 M0	IIIA2	Рак присутствует в одном или обоих яичниках или фаллопиевых трубах, или присутствует первичный перитонеальный рак, который распространился или пророс в органы за пределами таза. Во время хирургической операции рак в брюшной полости (за пределами тазовой области) невооруженным глазом не виден, но в слизистой оболочке брюшной полости при лабораторном исследовании обнаруживаются микроскопические метастазы рака (T3a). Рак может распространяться или не распространяться на забрюшинные лимфатические узлы (N0 или N1), но не распространяется на отдаленные участки (M0).
T3b N0 или N1 M0	IIIB	Рак присутствует в одном или обоих яичниках или фаллопиевых трубах, или присутствует первичный перитонеальный рак, и он распространился или пророс в органы за пределами тазовой полости. Метастазы рака достаточно велики, чтобы хирург мог их увидеть, но их поперечный диаметр не превышает 2 см (около 3/4 дюйма). (T3b). Рак может распространяться или не распространяться на забрюшинные лимфатические узлы (N0 или N1), но не распространяется во внутренние области печени или селезенки или на отдаленные участки (M0).
T3c N0 или N1 M0	IIIC	Рак присутствует в одном или обоих яичниках или фаллопиевых трубах, или существует первичный перитонеальный рак, и рак распространился или пророс в органы за пределами таза. Метастазы рака имеют поперечный диаметр более 2 см (около 3/4 дюйма) и могут находиться снаружи (в капсуле) печени или селезенки (T3c). Рак может распространяться или не распространяться на забрюшинные лимфатические узлы (N0 или N1), но не распространяется внутрь печени или селезенки или на отдаленные участки (M0).
Любое значение T Любое значение N M1a	IVA	Раковые клетки обнаруживаются в жидкости вокруг легких (называемой злокачественным плевральным выпотом) без распространения на другие участки, такие как печень, селезенка, кишечник или лимфатические узлы за пределами брюшной полости (M1a).
Любое значение T Любое значение N M1b	IVB	Рак распространился во внутренние области селезенки или печени, на лимфатические узлы, отличные от забрюшинных лимфатических узлов, и/или на другие органы или ткани за пределами брюшной полости, такие как легкие и кости (M1b).

В приведенной выше таблице представлен пример системы стадирования рака, которая может быть использована для рака яичников. Ранний рак яичников в контексте настоящего изобретения относится к I и II стадиям FIGO (т.е. I, IA, IB, IC, II, IIA и IIB).

Другие системы стадирования разных типов рака хорошо известны в данной области техники.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения для диагностики или прогнозирования раннего рака, предпочтительно раннего рака яичников, определяют уровень экспрессии микроРНК miR-148b, miR-652, miR-409, miR200c, miR-375 и miR-320b, и, необязательно, определяют клинический маркер CA125.

Согласно предпочтительному варианту реализации первого аспекта настоящего изобретения для диагностики или прогнозирования рака, предпочтительно рака молочной железы, определяют уровень экспрессии микроРНК miR-148b, miR-652, miR-409, miR200c, miR-375 и miR-320b, и определяют метилирование цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в каждом из генов HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P; указанный способ необязательно дополнительно включает клинические маркеры «возраст» и/или «Qubit».

Согласно альтернативному первому аспекту настоящего изобретения способ диагностики или прогнозирования рака у субъекта включает этапы определения *in vitro* в образце, полученном от указанного субъекта:

а) уровня экспрессии по меньшей мере трех микроРНК, выбранных из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375 и miR-320b и miR-141, при условии, что по меньшей мере три микроРНК содержат по меньшей мере микроРНК miR-200c, miR-375 и miR-320b,

б) необязательно, метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P и/или

при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение уровня экспрессии miR-451a,

при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение по меньшей мере одного клинического маркера, предпочтительно выбранного из возраста пациента, CA125, cT, cN, cM, pT (хирургия), pN (хирургия), pM и Qubit,

при этом измененный уровень экспрессии по меньшей мере трех микроРНК и, если определено, сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного

динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания у указанного субъекта.

Варианты реализации первого аспекта, указанные выше, также относятся к альтернативному первому аспекту настоящего изобретения.

5 Согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к способу диагностики рака или скрининга рака, включающему предсказание или детекцию рака согласно первому аспекту изобретения. Детекцию рака следует понимать как определение статуса уже существующего рака. Сюда включены, например, диагностика и прогнозирование. Предсказание рака не требует, чтобы рак уже присутствовал, и
10 включает, например, обеспечение меры для определения подверженности раку или вероятности развития рака. Способ согласно первому аспекту также может быть использован для предсказания рака.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложен способ мониторинга субъекта, имеющего повышенный риск развития рака, включающий
15 предсказание или детекцию рака неоднократно в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Согласно четвертому аспекту настоящее изобретение относится к способу мониторинга лечения рака у субъекта, включающему предсказание или детекцию рака согласно первому аспекту изобретения неоднократно на протяжении всего периода
20 лечения.

Согласно пятому аспекту настоящего изобретения предложен способ оценки ответа субъекта на лечение рака, включающий предсказание или детекцию рака согласно первому аспекту настоящего изобретения во время и/или после лечения.

Согласно шестому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения
25 субъекта, у которого детектирован рак способом согласно первому аспекту настоящего изобретения, дополнительно включающий проведение у указанного субъекта противораковой терапии.

Согласно седьмому аспекту настоящее изобретение относится к набору, содержащему олигонуклеотиды для специфичной детекции:

- 30
- уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в группе, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, и/или
 - уровня экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, выбранной из группы, состоящей из 148B, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-375, miR-320b,

miR-451a и miR-141, при условии, что по меньшей мере одна микроРНК содержит по меньшей мере одну микроРНК, выбранную из группы, состоящей из miR-200c-3p, miR-375, miR-320b и miR-451a.

Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения

5 указанный набор содержит олигонуклеотиды для специфичной детекции:

- уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в генах группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, и/или
- уровня экспрессии микроРНК из группы, состоящей из 148B, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-375, miR-320b, miR-451a и miR-141.

10

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения указанный набор также содержит

(a) контейнер и/или

(b) информационный носитель, который содержит такую информацию, как

15

(i) инструкции относительно способов идентификации риска развития и/или идентификации присутствия и/или мониторинга прогрессирования рака

(ii) инструкции по применению средств для детекции статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одной микроРНК, в частности, в образце, более конкретно, в образце от индивидуума и/или из набора,

20

(iii) информация о качестве, такая как информация относительно номера серии/партии средства для детекции статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количестве по меньшей мере одного маркера микроРНК и/или набора, месте производства или сборки или дате окончания срока годности или даты срока реализации, информация относительно надлежащего хранения или использования набора,

25

(iv) информацию относительно состава буфера (буферов), разбавителя (разбавителей), реактива (реактивов) для детекции статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК и/или средств детекции статуса метилирования и/или уровня

30

экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК,

(v) информацию относительно интерпретации информации, полученной при осуществлении вышеуказанных способов идентификации и/или мониторинга прогрессирования рака,

(vi) предупреждение относительно возможной ошибочной интерпретации или неверных результатов при применении неподходящих способов, и/или неподходящих средств, и/или

(vii) предупреждение относительно возможной ошибочной интерпретации или неверных результатов при применении неподходящего реактива (реактивов) и/или буфера (буферов).

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения указанный набор предназначен для применения в способе, подробно описанном выше.

В частности, указанный набор предназначен для применения в способе, выбранном из группы, состоящей из:

(i) способа диагностики и/или прогнозирования рака, в частности, рака молочной железы и/или рака яичников, у субъекта, включающего (а) определение статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, и (b) определение уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, у субъекта, причем статус метилирования и/или уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и присутствие по меньшей мере одной микроРНК служат для прогноза и/или диагноза у указанного субъекта,

(ii) способа определения дозировки фармацевтического средства для изменения рака или предотвращения или лечения рака у субъекта, включающего этапы (а) определения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, как подробно описано выше, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, как подробно описано выше, в образце от субъекта, и необязательно определения статуса метилирования и/или

уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в референсе для сравнения со статусом метилирования и/или уровнем экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количеством по меньшей мере одного маркера микроРНК в образце, представляющем интерес, и (b) определения дозировки фармацевтического средства в зависимости от статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в образце, представляющем интерес, необязательно в зависимости от сравнения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в образце, представляющем интерес, и в референсе или в референсном образце,

(iii) способа адаптации дозировки фармацевтического средства для изменения рака, или предотвращения или лечения рака, включающего этапы (a) определения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, как подробно описано выше, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, как подробно описано выше, в образце, и (b) определения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в одном или более референсах или референсных образцах, (c) изучения исследуемого образца на предмет отличия статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, присутствующего в указанном образце, представляющем интерес, от указанного уровня в одном или более референсах или референсных образцах, и (d) адаптации дозировки фармацевтического средства в зависимости от того, отличается ли статус метилирования и/или уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в образце, представляющем интерес, от уровня в одном или более референсах или референсных образцах,

(iv) способа определения благоприятного и/или неблагоприятного воздействия вещества на рак или развитие рака, включающего этапы (a) определения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR,

SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, как подробно описано выше, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, как подробно описано выше, в образце, представляющем интерес, (b) определения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в одном или более референсах или референсных образцах, и (c) изучения образца, представляющего интерес, на предмет отличия статуса метилирования и/или экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК в указанном образце, который представляет интерес, от указанного уровня в одном или более референсах, причем указанный представляющий интерес образец подвергался воздействию указанного вещества иным образом, чем один или более референсов или референсных образцов.

(v) способа идентификации пациента как отвечающего на лечение рака, включающего определение статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, как подробно описано выше, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141 и, как подробно описано выше, в первом образце и в одном или более следующих образцах, отобранных последовательно после первого образца, причем повышенный статус метилирования по меньшей мере одного маркера метилирования и/или сниженный уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, и отсутствие или уменьшенное количество по меньшей мере одного маркера микроРНК свидетельствует об ответе на лечение,

(vi) способа идентификации пациента как не отвечающего на лечение рака, включающего определение статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, как подробно описано выше, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, как подробно описано выше, в первом образце и в одном или более следующих образцах, взятых после первого образца, причем сниженный статус метилирования по меньшей мере одного маркера метилирования и/или увеличенный уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, и присутствие или увеличенное количество по

меньшей мере одного маркера микроРНК свидетельствует об отсутствии ответа на лечение, и

- (vii) способа лечения рака, включающего этапы: (i) определения статуса метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN, S100P, как подробно описано выше, и количества по меньшей мере одного маркера микроРНК, выбранного из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375, miR-320b и miR-141, как подробно описано выше, в первом образце от субъекта; (ii) начало лечения указанного пациента в соответствии с первым режимом лечения, который включает один или несколько противораковых агентов или методов лечения, (iii) определение статуса метилирования по меньшей мере одного маркера метилирования и/или уровня экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и количества по меньшей мере одной микроРНК в одном или более последующих образцах, отобранных у указанного субъекта; (iv) необязательно, повторение этапов (ii) и (iii) один или несколько раз; (v) продолжение лечения пациента по первой схеме лечения, если наблюдается значительное повышение статуса метилирования по меньшей мере одного маркера метилирования и/или более низкий уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования, и пониженное количество или отсутствие по меньшей мере одного маркера микроРНК, или (vi) изменение лечения или прекращение лечения указанного пациента в соответствии с первым режимом лечения и вместо этого лечение указанного пациента в соответствии со вторым режимом лечения, который включает один или несколько противораковых агентов или методов лечения, не включенных в первый режим лечения, если наблюдается сниженный статус метилирования по меньшей мере одного маркера метилирования и/или увеличенный уровень экспрессии по меньшей мере одного маркера метилирования и увеличенное количество или присутствие по меньшей мере одного маркера микроРНК.

Согласно восьмому аспекту настоящее изобретение относится к применению набора по седьмому аспекту изобретения для предсказания, прогнозирования и/или диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы и рака яичников.

Приведенные ниже примеры предназначены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения. Приведенные примеры никоим образом не должны быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1: Анализ метилирования с применением времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF/MS).

Высокопроизводительный количественный анализ метилирования ДНК проводят с помощью анализа MassARRAY (Agena BioScience, Inc., Германия), в котором используют специфичное расщепление по основаниям и MALDI-TOF/MS, и которое было описано в источнике: Ehrich et al. (Ehrich M. et al., Nucleic Acid Res, 2005. 33(4):ре38). 500 нг геномной ДНК, выделенной из 200 мкл цельной крови, используют для бисульфитной конверсии с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research, Фрайбург, Германия). 1 мкл ДНК, обработанной бисульфитом, используют в качестве матрицы для амплификации с помощью ступенчатой ПЦР с использованием бисульфит-специфичных праймеров (Таблица 1). Программа, используемая для проведения ступенчатой ПЦР, указана в Таблице 2. После контроля качества продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза их обрабатывают в соответствии со стандартным протоколом теста MassARRAY EpiTYPER (Agena BioScience Inc., Гамбург, Германия). Вкратце, продукты ПЦР дефосфорилируют щелочной фосфатазой креветок (SAP), транскрибируют *in vitro* и расщепляют РНКазой А. Расщепленные продукты разбавляют ddH₂O до конечного объема 27 мкл. Затем к образцам добавляют 6 мг смолы CLEAN Resin (Agena BioScience Inc., Гамбург, Германия) для подготовки фосфатного остова фрагментов нуклеиновых кислот для масс-спектрометрического анализа. Затем 384-луночный планшет центрифугируют при 2000 об/мин в течение 2 минут и вращают в течение 30 минут.

Для проведения масс-спектрометрии MALDI-TOF 22 нл каждого продукта расщепления роботизированным способом распределяют в планшет 384-луночного формата SpectroCHIP (Agena BioScience Inc., Гамбург, Германия) с предварительно нанесенной матрицей из 3-гидрокси-пиколиновой кислоты с использованием нанодиспенсера Spectropoint. Чипы считывают с помощью масс-спектрометра (Agena BioScience Inc., Гамбург, Германия). Данные собирают с помощью программного обеспечения SpectroACQUIRE v3.3.1.3 и визуализируют с помощью программного обеспечения MassARRAY EpiTYPER v1.0. Это программное обеспечение автоматически предоставляет количественные результаты для нескольких или одного сайта CpG в различных целевых последовательностях.

Таблица 1. Бисульфит-специфичные праймеры

Ампликоны	Праймеры	ID праймеров	Последовательности
S100P	смысловой	S100P_F	aggaagagagGGAAGGTGGGTTTGAATTTAGTATT (SEQ ID NO: 16)
	антисмысловой	S100P_R	cagtaatacactcactataggagaaggctCTATCCCTCTTACCTCTAAACCCCT (SEQ ID NO: 17)
SLC22A18	смысловой	SLC22A18_F	aggaagagagTAAGTGGGAATTTTGGTATTTTGGGA (SEQ ID NO: 18)
	антисмысловой	SLC22A18_R	cagtaatacactcactataggagaaggctCACTCCAAACCTAAACTCACCTCTA (SEQ ID NO: 19)
FUT7	смысловой	FUT7_F	aggaagagGAAGAGGAAGGGATTAGTTGAAG (SEQ ID NO: 20)
	антисмысловой	FUT7_R	cagtaatacactcactataggagaaggctACAAACCTTAACCTCCCAAATACT (SEQ ID NO: 21)
RPTOR	смысловой	RPTOR_F	aggaagagagGTGGGTTTTGTAGTAGTTGAGAGA (SEQ ID NO: 22)
	антисмысловой	RPTOR_R	cagtaatacactcactataggagaaggctTAATAACCCAAAACCAAACCTAAC (SEQ ID NO: 23)
MGRN1:	смысловой	MGRN1_F	aggaagagTTTTGGGGTATAAGGGAAGTTTAAG (SEQ ID NO: 24)
	антисмысловой	MGRN1_R	cagtaatacactcactataggagaaggctCCTAACCAACAAAAAACCTAAAAAA (SEQ ID NO: 25)
RAPSN	смысловой	RAPSN_F	aggaagagagGATTTTGTAGTTGGTGAGAGGTTTGA (SEQ ID NO: 26)
	антисмысловой	RAPSN_R	cagtaatacactcactataggagaaggctAAAACCACTAAATTACCCAACCAAA (SEQ ID NO: 27)
HYAL2:	смысловой	HYAL2_F	aggaagagagTTTAAATTTAGTAGGGTGTGAGAGGA (SEQ ID NO: 28)
	антисмысловой	HYAL2_R	cagtaatacactcactataggagaaggctCTCATCCATATTATAAAAAACCCCT (SEQ ID NO: 29)

Таблица 2. Программа для ступенчатой ПЦР

95°C, 5 мин
 94°C, 30 сек
 59°C, 30 сек
 72°C, 1 мин
 переход к
 этапу 2, 4х
 94°C, 30 сек
 57°C, 30 сек
 72°C, 1 мин
 переход к
 этапу 2, 4х
 94°C, 5 сек
 55°C, 30 сек
 72°C, 1 мин

переход к
 этапу 2, 4х
 94°C, 5 сек
 53°C, 30 сек
 72°C, 1 мин
 переход к
 этапу 2, 35 х
 72°C, 5 мин
 4°C,
 окончательная
 температура

Пример 2: Анализ микроРНК с использованием количественной ПЦР (кПЦР)

Обработка крови и выделение микроРНК из плазмы

5 Образцы крови с EDTA брали у индивидуумов со случаями заболевания и контрольных и обрабатывали для получения плазмы в тот же день. Пробирки с ЭДТА сначала центрифугировали при 1300 g в течение 20 минут при комнатной температуре (КТ). Супернатант (плазму) переносили в пробирки для микроцентрифугирования объемом 2 мл с последующим вторым этапом высокоскоростного центрифугирования
 10 при 12 000 g в течение 10 минут (КТ) для удаления клеточного дебриса и фрагментов. Аликвоты плазмы распределяли по криофлаконам и хранили при температуре -80°C. Циркулирующие микроРНК экстрагировали из 300 мкл плазмы с использованием набора для выделения микроРНК NucleoSpin miRNA Plasma (Machery Nagel, Германия) в соответствии с протоколом производителя. МиРНК элюировали в 30 мкл воды без
 15 РНКаз. Концентрацию микроРНК измеряли с помощью флуорометра Qubit (ThermoFischer Scientific, Германия).

Валидация выбранных кандидатных маркеров

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MIRCURY LNA
 20 (Qiagen, Германия) в конечном объеме 10 мкл. Каждая реакция содержала 2 мкл буфера для ОТ, 1 мкл смеси ферментов для ОТ, 2 мкл микроРНК-матрицы и 5 мкл воды без РНКаз. ОТ проводили при 42°C в течение 1 часа, а затем в течение 5 минут при 95°C, как рекомендовано производителем. Полученную кДНК хранили при -20°C и разбавляли в соотношении 1:30 непосредственно перед использованием.

25 Реакции кПЦР в реальном времени проводили в двух повторностях, с 2,5 мкл мастермикса PrimaQuant SYBR Mastermix (Штайнбрэннер, Германия), 0,5 мкл реагентов для специфичного ПЦР-анализа miRCURY LNA (Qiagen, Германия), 0,4 мкл воды без

нуклеаз и 1,6 мкл разбавленной кДНК. ПЦР в реальном времени проводили на инструменте qTOWER (Analytik Jena, Германия) в следующих условиях:

Таблица 3: Программа кПЦР в реальном времени

02:00	95°C	Начальная денатурация
00:10	95°C	40x
01:00	56°C	
непрерывно	60–95°C	Кривая плавления

5

Пример 3: Статистический анализ

На первом этапе были выбраны релевантные переменные (т.е. микроРНК и CpG-сайты метилирования). Соответственно, использовали метод с гибкими штрафами (H. Zou and T. Hastie. Journal of the Royal Statistical Society, Series B, 67:301–3) для выбора переменных (C. De Mol et al.; Journal of Complexity, 25(2):201–230, Apr. 2009). Метод с гибкими штрафами зависит от двух гиперпеременных, которые выбирали с использованием 5-кратной перекрестной проверки.

В случае, когда переменные, выбранные с помощью метода с гибкими штрафами (т.е. микроРНК и CpG-сайты метилирования), не могут быть надежно определены, их заменяли переменными с более низким рангом.

На втором этапе определяли классификацию для различения «случая» и «контроля». Предпочтительными методами были методы на основе деревьев, такие как «случайные леса» (L. Breiman, Random forests. In Machine Learning, pages 5–32, 2001). Базовые гиперпеременные были выбраны с использованием 5-кратной перекрестной проверки.

На третьем этапе была проведена оценка моделей. Во избежание «переаппроксимации» все параметры (т.е. чувствительность, специфичность, AUC и точность) определяли с использованием 5-кратной перекрестной проверки.

Все статистические анализы проводили с помощью программного пакета «R» (R Core Team (2018). R A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>). Некоторые анализы дополнительно включали использование Python 3.

Пример 4: Панель маркеров рака яичников (РЯ)

Панель маркеров РЯ («набор для РЯ») основана на уровнях экспрессии циркулирующих miR-148b, -652, -409, -200c, -375 и -320b и может быть использована для детекции рака яичников с AUC 0,89 (Таблица 4: контроль / случай заболевания).

5 Для рака яичников на ранней стадии СА-125 (текущий общепринятый стандарт) получали только AUC 0,916. В комбинации с маркерами набора для РЯ была достигнута AUC 0,94. При диагностике РЯ на ранних стадиях выживаемость значительно увеличивается (Таблица 4: контроль / ранний рак).

10 Результаты рассчитывают с использованием строгого метода машинного обучения с использованием двух различных алгоритмов (Лассо-регрессия и усиленные деревья («Xgboost»)) и сравнением их наилучшей производительности для определенной когорты. Данные случайным образом разделяют на группы тестирования и обучения и далее проверяют путем 10-кратного выполнения процедуры 5-кратной перекрестной проверки для достижения надежных результатов. Полученная общая кривая ROC

15 соответствует объединению всех 10 перекрестных проверок (рис. 29). В этом анализе Лассо-регрессия показала лучшие результаты, чем алгоритм Xgboost, поэтому окончательные результаты, представленные в Таблице 4, основаны на этом алгоритме. Кроме того, конкретная комбинация переменных, используемых в модели, может оказывать влияние на конечный результат. Все статистические анализы проводили с

20 использованием Python (версия 3.6.8)

Таблица 4: AUC, чувствительность, специфичность, положительные прогностические и отрицательные прогностические значения представлены для шести маркеров микроРНК набора для РЯ, маркеров набора в комбинации с СА-125 и только СА-125. Значения AUC рассчитывали на основе 90% специфичности.

ГРУППА	Модель	AUC	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
<i>Контроль / случай заболевания (n=57 / 100)</i>	Набор	0,892	0,74	0,90	0,93	0,66
	Набор_СА 125	0,959	0,90	0,90	0,94	0,84
	СА125	0,960	0,87	0,90	0,94	0,80
<i>Контроль / ранний рак (n=57 / 31)</i>	Набор	0,818	0,69	0,90	0,79	0,84
	Набор_СА 125	0,942	0,84	0,90	0,82	0,91
	СА125	0,916	0,82	0,90	0,82	0,90
<i>контроль / рак на поздней стадии (n=57 / 68)</i>	Набор	0,925	0,82	0,90	0,91	0,80
	Набор_СА 125	0,984	0,95	0,90	0,92	0,94
	СА125	0,982	0,91	0,90	0,92	0,90

Пример 5: Статистические методы (Лассо-регрессия и Xgboost)

1. Обработка данных

Все анализы проводили с использованием Python, версия 3.6.8. Основные пакеты: numpy-1.17.2, pandas-0.25.1, matplotlib-3.1.2, scikit-learn-0.22, xgboost-0.90. Определенные признаки, такие как экспрессия микроРНК, уровни метилирования и/или эпидемиологические признаки (т.е. количество беременностей, возраст на момент постановки диагноза, ИМТ и т.д.), были предварительно определены для каждого анализа. Отсутствующие значения признаков (NA) подставляли (после поискового анализа и до прогностического моделирования) путем случайной подстановки вменением, чтобы оставить их полностью неинформативными. Случайные начальные

числа последовательно используют на протяжении всего анализа, чтобы сделать каждый результат воспроизводимым.

Для когорты рака яичников данные дополнительно стандартизировали («Z-показатель») в соответствии с алгоритмом Лассо (см. раздел 3 ниже).

5

2. Выбор модели

Сравнивали два алгоритма по наилучшей прогностической эффективности: Лассо-регрессия и усиленные деревья («Xgboost»). Сравнение проводили путем 10-кратного выполнения стратифицированной 5-кратной перекрестной проверки (объединение прогнозов 5-кратной проверки). Для когорты рака молочной железы Xgboost стабильно превосходил Лассо-регрессию, за исключением одной подгруппы (из-за малого количества пациентов в этой подгруппе). Таким образом, для когорты рака молочной железы все окончательные анализы в отношении прогностической эффективности и важности признаков основаны на Xgboost.

С другой стороны, для когорты рака яичников Лассо-регрессия последовательно превосходила или была по крайней мере настолько же производительной, как Xgboost, при этом, как правило, имела меньшую дисперсию прогностической эффективности. Это может быть связано с низким числом записей для большинства когорт. Таким образом, все окончательные анализы применительно к прогностической эффективности и значимости признаков для когорты рака яичников основаны на Лассо-регрессии с использованием фиксированного значения параметра настройки штрафов.

20

3. Прогнозируемая производительность

Прогностическую эффективность оценивают путем 10-кратного выполнения процедуры 5-кратной перекрестной проверки, объединяя все прогнозы в одном цикле. Таким образом получают 10 значений AUC и используют их для расчета стандартного отклонения (SD; см. Фиг. 29 и 30). Для получения общей кривой ROC также объединяют прогнозы всех 10 циклов.

Поскольку чувствительность, специфичность, PPV (положительное прогностическое значение) и NPV (отрицательное прогностическое значение) зависят от пороговой концентрации (выше которой прогнозируется заболевание для пациента), а также от распространенности, все указанные показатели рассчитывают на основании масштабированной распространенности заболевания, равной 0,011 для рака молочной

30

железы (при использовании байесовской логики) для различных пороговых значений. Кроме того, эти показатели рассчитывают на основе фиксированной специфичности 0,9.

Пример 6: Панель маркеров рака молочной железы (РМЖ)

5 Для диагностики рака молочной железы были протестированы две панели маркеров. «Набор из 15 маркеров РМЖ» состоит из комбинации маркеров: возраста, общего количества циркулирующих микроРНК, измеренного с помощью Qubit, уровня экспрессии шести циркулирующих маркеров микроРНК, состоящих из miR-148b, -652, -409, -200c, -375 и -320b, и метилирования в крови цитозина 7 динуклеотидов CpG в
10 следующих генах *HYAL2*, *MGRN1*, *RPTOR*, *SLC22A18*, *FUT7*, *RAPSN* и *S100P* (т.е. *HYAL2* CpG4, *S100P* CpG7, *SLC22A18* CpG3, *RPTOR* CpG2, *RAPSN* CpG4, *FUT7* CpG7, *MGRN1* CpG12; см. Фиг. 1). В «наборе из 14 маркеров РМЖ» исключен возраст в качестве маркера, но в остальном он идентичен «набору из 15 маркеров РМЖ».

В когорте рака молочной железы, состоящей из 216 впервые диагностированных
15 случаев рака молочной железы, которые сравнивали с 242 здоровыми контролями, набор из 15 маркеров РМЖ имел AUC 0,8 для детекции РМЖ (Таблица 5).

Были протестированы три дополнительные подгруппы (возраст: женщины младше или старше 50 лет, женщины, имевшие беременности или не имевшие беременностей, и индекс массы тела (ИМТ) более или менее 24), как показано в Таблице
20 2. Только в подгруппе <1 для беременностей был обнаружен лучший результат. AUC рассчитывали, как и для рака яичников выше, с использованием алгоритмов машинного обучения для когорт тестирования и обучения и 10-кратного выполнения процедуры 5-кратной перекрестной проверки. Алгоритм XGboost в этом анализе превосходил модель Лассо, поэтому все результаты основаны на указанном алгоритме.

25 **Таблица 5:** AUC, чувствительность, специфичность, положительные прогностические и отрицательные прогностические значения представлены для комбинации шести маркеров микроРНК, количества циркулирующих микроРНК, измеренного с помощью Qubit, и семи сайтов метилирования, с включением возраста в качестве переменной (набор из 15 маркеров РМЖ) или исключением возраста (набор из
30 14 маркеров РМЖ); значения AUC были рассчитаны на основе 90% специфичности

Модель	Подгруппа	AUC	SENS	Спецификац ия	PPV	NPV
Набор для РМЖ из 15 маркеров	Все пациенты	0,8	0,504	0,9	0,817	0,672
	Возраст <50	0,708	0,175	0,9	0,421	0,725
	Возраст >50	0,752	0,338	0,9	0,846	0,456
	Беременности <1	0,87	0,571	0,9	0,724	0,82

	Беременности_>1	0,757	0,501	0,9	0,843	0,627
	BMI_<24	0,771	0,313	0,9	0,711	0,624
	BMI_>24	0,768	0,502	0,9	0,833	0,646
Набор для РМЖ из 14 маркеров	Все пациенты	0,644	0,207	0,9	0,646	0,562
	Возраст_<50	0,594	0,116	0,9	0,326	0,711
	Возраст_>50	0,663	0,165	0,9	0,728	0,399
	Беременности_<1	0,661	0,206	0,9	0,486	0,712
	Беременности_>1	0,638	0,171	0,9	0,647	0,503
	BMI_<24	0,592	0,158	0,9	0,555	0,576
	BMI_>24	0,606	0,169	0,9	0,626	0,522
Набор для РМЖ из 15 маркеров (логистическая Лассо-регрессия)	Все пациенты	0,772	0,425	0,9	0,789	0,639

Эффективность другой панели маркеров сравнивали с 15-маркерной панелью применительно к AUC, чувствительности и специфичности с целью идентификации основной маркерной панели (см. Таблицу 6). Как и ранее, использовали модель Xgboost в качестве способа анализа, который наилучшим образом подходит для этой цели.

Таблица 6: Сравнение эффективности различных наборов маркеров

Набор маркеров	AUC	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
<i>Набор из 15 маркеров для РК</i>	0,8	0,504	0,9	0,817	0,672
<i>miR-200c, miR-375, miR-320b + Возраст</i>	0,753	0,438	0,9	0,795	0,645
<i>miR-200c, miR-375, miR-320b, HYAL2 CpG4, S100P CpG7, SLC22A18 CpG3, RPTOR CpG2, RAPSN CpG4, FUT7 CpG7, MGRN1 CpG12 + Возраст</i>	0,773	0,39	0,9	0,775	0,625
<i>miR-200c, miR-375, miR-320b, miR-652, HYAL2 CpG4, S100P CpG7,</i>	0,774	0,38	0,9	0,774	0,62

<i>SLC22A18 CpG3, RPTOR CpG2, RAPSN CpG4, FUT7 CpG7, MGRN1 CpG12 + Возраст</i>					
--	--	--	--	--	--

Наилучшая AUC была получена при применении 15-маркерной панели, однако была идентифицирована основная панель маркеров, состоящая из miR-200c, miR-375 и miR-320b. Эта панель обеспечивала только незначительно более низкую AUC по сравнению с полной 15-маркерной панелью. Основная панель маркеров с вышеупомянутыми тремя микроРНК, таким образом, по-видимому, представляет собой основную панель с хорошим прогностическим качеством, которая может быть дополнительно улучшена путем добавления других маркеров.

Объекты

1. Способ диагностики или прогнозирования рака у субъекта, включающий этапы определения *in vitro* в образце, полученном от указанного субъекта,
 - а) уровня экспрессии по меньшей мере трех микроРНК, выбранных из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375 и miR-320b и miR-141, при условии, что указанные по меньшей мере три микроРНК включают по меньшей мере микроРНК miR-200c, miR-375 и miR-320b,
 - б) необязательно, метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в каждом гене из по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P и/или

при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение уровня экспрессии miR-451a,

при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение по меньшей мере одного клинического маркера, предпочтительно выбранного из возраста пациента, CA125, cT, cN, cM, pT (хирургия), pN (хирургия), pM и Qubit, при этом измененный уровень экспрессии по меньшей мере трех микроРНК и, если определено, сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания у указанного субъекта.
2. Способ согласно объекту 1, отличающийся тем, что показателем наличия рака и/или повышенной вероятности развития рака является следующее:
 - сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, и/или
 - повышение уровня экспрессии микроРНК, выбранной из miR-148b, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-320b и miR-141 и/или
 - снижение уровня экспрессии miR-375.

3. Способ по объекту 1 или 2, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак молочной железы и/или рак яичников, предпочтительно ранний рак яичников.

- 5 4. Способ по любому из объектов 1–3, отличающийся тем, что
 - i) определяют статус метилирования по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 разных динуклеотидов CpG и/или
 - ii) определяют уровень экспрессии по меньшей мере 3, 4, 5, 6 или 7 разных микроРНК.

- 10 5. Способ по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-динуклеотида в пределах HYAL2 и S100P.

- 15 6. Способ по любому из объектов 1–5, отличающийся тем, что субъект имеет повышенный риск возникновения или развития рака.

- 20 7. Способ по любому из объектов 1–6, где образец представляет собой образец жидкости организма или образец ткани, где образец жидкости организма предпочтительно выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, синовиальной жидкости, мочи, слюны, лимфатической жидкости, слезной жидкости и жидкости, получаемой из желез, и более предпочтительно представляет собой периферическую кровь.

- 25 8. Способ по любому из объектов 1–7, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает этап
 - (с) определения *in vitro* уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в указанном по меньшей мере одном гене и/или уровня экспрессии указанных по меньшей мере трех микроРНК в одном
 - 30 или более референсных образцах.

9. Способ диагностики рака или скрининга рака, включающий предсказание или детекцию рака согласно любому из объектов 1–8.

10. Способ мониторинга субъекта, имеющего повышенный риск развития рака, включающий предсказание или детекцию рака неоднократно в соответствии с любым из объектов 1–8.
- 5 11. Способ мониторинга лечения рака у субъекта, включающий предсказание или детекцию рака в соответствии с любым из объектов 1–8 неоднократно на протяжении всего периода лечения.
12. Способ оценки ответа субъекта на лечение рака, включающий предсказание или
10 детекцию рака согласно любому из объектов 1–8 во время и/или после лечения.
13. Способ лечения субъекта, у которого детектирован рак способом согласно любому из объектов 1–8, дополнительно включающий проведение у субъекта противораковой терапии.
- 15 14. Набор, содержащий олигонуклеотиды для специфичной детекции:
 - уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из HYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, и/или
 - 20 - уровня экспрессии по меньшей мере трех микроРНК, выбранных из группы, состоящей из 148B, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-375, miR-320b, miR-451a и miR-141, при условии, что указанные по меньшей мере три микроРНК включают микроРНК miR-200c-3p, miR-375, miR-320b.
- 25 15. Применение набора по объекту 15 для предсказания, прогнозирования и/или диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы и рака яичников.

Формула изобретения

1. Способ диагностики или прогнозирования рака у субъекта, включающий этапы определения *in vitro* в образце, полученном от указанного субъекта,
 - а) метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из *HYAL2*, *MGRN1*, *RPTOR*, *SLC22A18*, *FUT7*, *RAPSN* и *S100P*, и/или
 - б) уровня экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, которая выбрана из группы, состоящей из miR-148b, miR-409, miR-652, miR-200c, miR-375 и miR-320b и miR-141, при условии, что указанная по меньшей мере одна микроРНК содержит по меньшей мере одну микроРНК, которая выбрана из группы, состоящей из miR-200c, miR-375 и miR-320b,
 при этом указанный способ необязательно дополнительно включает определение уровня экспрессии miR-451a,

 причем сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах указанного по меньшей мере одного гена и измененный уровень экспрессии указанной по меньшей мере одной микроРНК служит показателем течения настоящего и/или будущего ракового заболевания у указанного субъекта.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что показателем наличия рака и/или повышенной вероятности развития рака является следующее:
 - сниженный уровень метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из *HYAL2*, *MGRN1*, *RPTOR*, *SLC22A18*, *FUT7*, *RAPSN* и *S100P*, и/или
 - повышение уровня экспрессии микроРНК, выбранной из miR-148b, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-320b и miR-141, и/или
 - снижение уровня экспрессии miR-375.
3. Способ по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак молочной железы и/или рак яичников.
4. Способ по любому из пп. 1–3, отличающийся тем, что

- i) определяют статус метилирования по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 различных динуклеотидов CpG и/или
- ii) определяют уровень экспрессии по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7 различных микроРНК.

5

5. Способ по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что
 - (i) определяют статус метилирования по меньшей мере одного CpG-динуклеотида в пределах HYAL2 и S100P и/или
 - (ii) определяют по меньшей мере уровень экспрессии микроРНК miR-200c и miR-375.

10

6. Способ по любому из пп. 1–5, отличающийся тем, что указанный субъект имеет повышенный риск наличия или развития рака.

15

7. Способ по любому из пп. 1–6, отличающийся тем, что указанный образец представляет собой образец жидкости организма или образец ткани, причем указанный образец жидкости организма предпочтительно выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, синовиальной жидкости, мочи, слюны, лимфатической жидкости, слезной жидкости и жидкости, получаемой из желез, и более предпочтительно представляет собой периферическую кровь.

20

8. Способ по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает этап
 - (с) определения *in vitro* уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в указанном по меньшей мере одном гене и/или уровня экспрессии указанного по меньшей мере одного гена и уровня экспрессии указанной по меньшей мере одной микроРНК в одном или более референсных образцах.

25

9. Способ диагностики рака или скрининга рака, включающий предсказание или детекцию рака по любому из пп. 1–8.

30

10. Способ мониторинга субъекта, имеющего повышенный риск развития рака, включающий предсказание или детекцию рака неоднократно по любому из пп. 1–8.

35

11. Способ мониторинга лечения рака у субъекта, включающий предсказание или детекцию рака по любому из пп. 1–8 неоднократно на протяжении всего периода лечения.
- 5
12. Способ оценки ответа субъекта на лечение рака, включающий предсказание или детекцию рака по любому из пп. 1–8 во время и/или после лечения.
13. Способ лечения субъекта, у которого присутствует рак, который детектирован способом по любому из пп. 1–8, дополнительно включающий введение указанному субъекту противораковой терапии.
- 10
14. Набор, содержащий олигонуклеотиды для специфичной детекции:
 - уровня метилирования цитозина по меньшей мере одного динуклеотида CpG в пределах по меньшей мере одного гена, выбранного из группы, состоящей из NYAL2, MGRN1, RPTOR, SLC22A18, FUT7, RAPSN и S100P, и/или
 - уровня экспрессии по меньшей мере одной микроРНК, выбранной из группы, состоящей из 148B, miR-409-3p, miR-652-3p, miR-200c-3p, miR-375, miR-320b, miR-451a и miR-141, при условии, что по меньшей мере одна микроРНК
 - 15
 - 20
 - содержит по меньшей мере одну микроРНК, выбранную из группы, состоящей из miR-200c-3p, miR-375, miR-320b и miR-451a.
15. Применение набора по п. 15 для предсказания, прогнозирования и/или диагностики рака, предпочтительно рака молочной железы и рака яичников.
- 25

Фиг. 1

Клинический маркер	Возраст
<i>HYAL2</i>	CpG 4
<i>SIOOP</i>	CpG 4, как вариант, CpG 7
<i>SLC22A18</i>	CpG 3
<i>RPTOR</i>	CpG 2
<i>RAPSN</i>	CpG 5, как вариант, CpG4
<i>MGRN1</i>	CpG 12
<i>FUT7</i>	CpG 7
микроРНК	148b, 409-3p, 652-3p 200c-3p, 375, 320b 451a *контроль гемолиза
Общее кол-во циркулирующих микроРНК	Измерено Qubit

Фиг. 2

Набор данных состоит из $n = 189$ субъектов, разделенных на 91 случай заболевания, 59 контрольных субъектов и 39 случаев доброкачественного заболевания

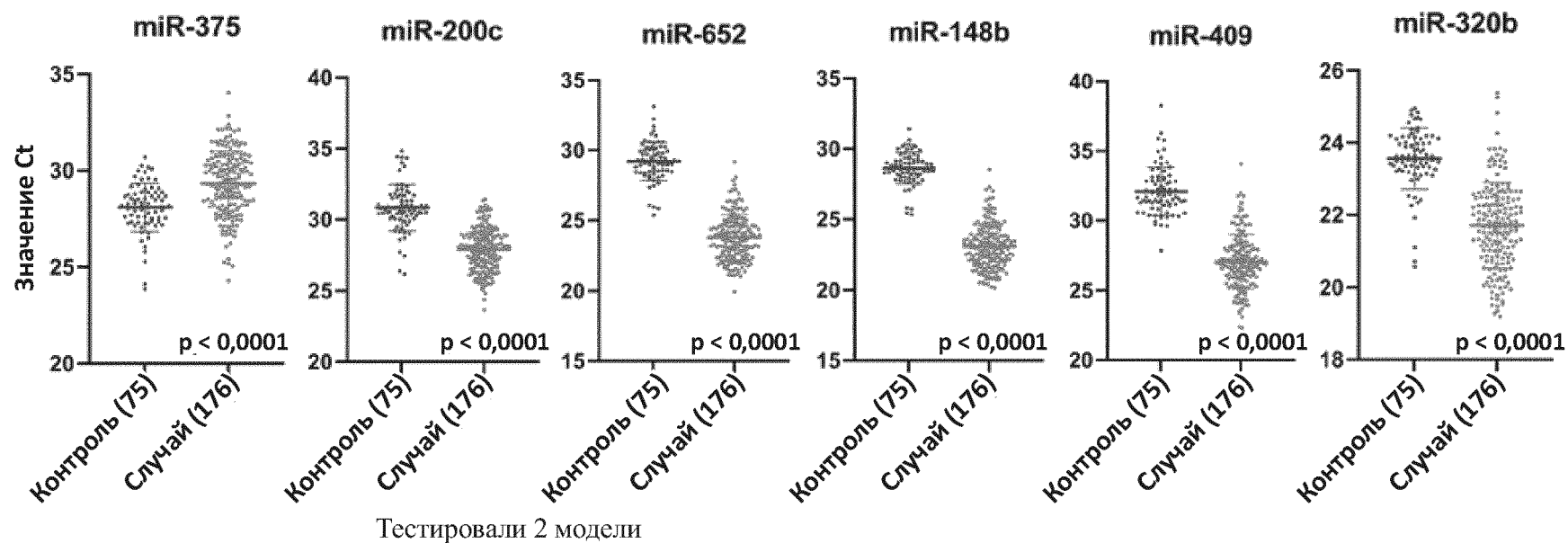
Тестировали 6 моделей:

1. Все маркеры ($p = 49$)
2. Все маркеры, за исключением CA 125 ($p = 48$)
3. Все сайты метилирования и возраст ($p = 41$)
4. Только NYAL2 и SLC22A18 ($p = 9$)
5. Все микроРНК и возраст ($p = 7$)
6. Только miR-200c и miR-375 ($p = 2$)

Результаты Случай / Контроль

Модель	1	2	3	4	5	6
Точность	0,88	0,85	0,67	0,64	0,88	0,78
AUC	0,97	0,93	0,71	0,66	0,94	0,81
Чувствительность	0,98	0,95	0,75	0,67	0,93	0,78
Специфичность	0,77	0,75	0,61	0,55	0,74	0,65





1. Все микроРНК ($p = 6$)
2. Только miR-200c и miR-375 ($p = 2$)

Результаты

Модель	$n = 251, p = 6$	$n = 251, p = 2$
Точность	0,97	0,89
AUC	1,00	0,95
Чувствительность	0,75	0,73
Специфичность	1,00	0,97

ФИГ. 3

Фиг. 4

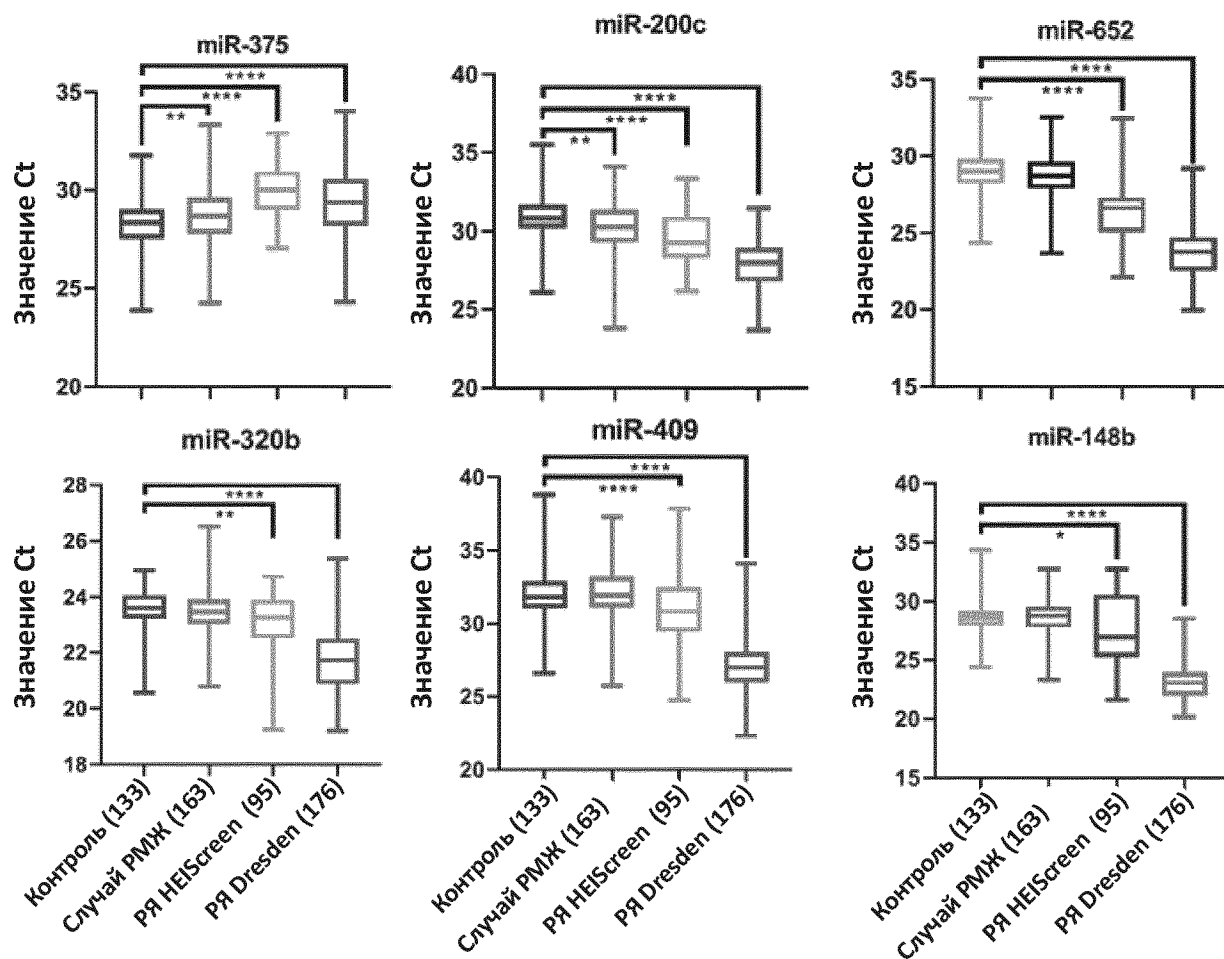
Тестировали 2 модели

1. Все микроРНК ($p = 6$)
2. Только miR-200c и miR-375 ($p = 2$)

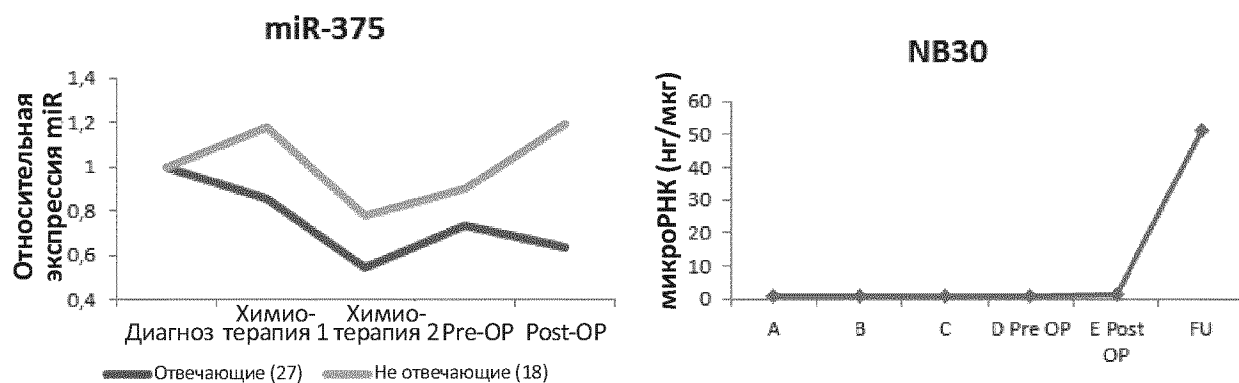
Результаты

Модель	$n = 251, p = 6$	$n = 251, p = 2$	$n = 401, p = 6$	$n = 401, p = 2$
Точность	0,97	0,89	0,94	0,83
AUC	1,00	0,95	0,98	0,91
Чувствительность	0,75	0,73	0,77	0,74
Специфичность	1,00	0,97	0,99	0,94

Фиг. 5

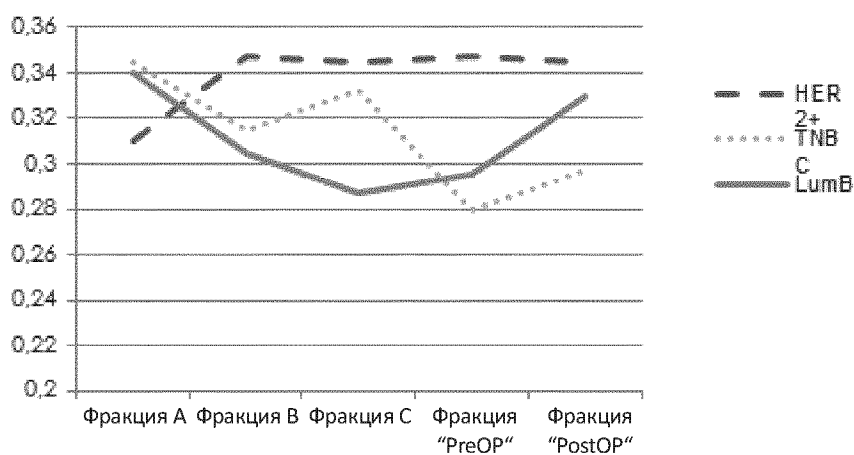


Фиг. 6

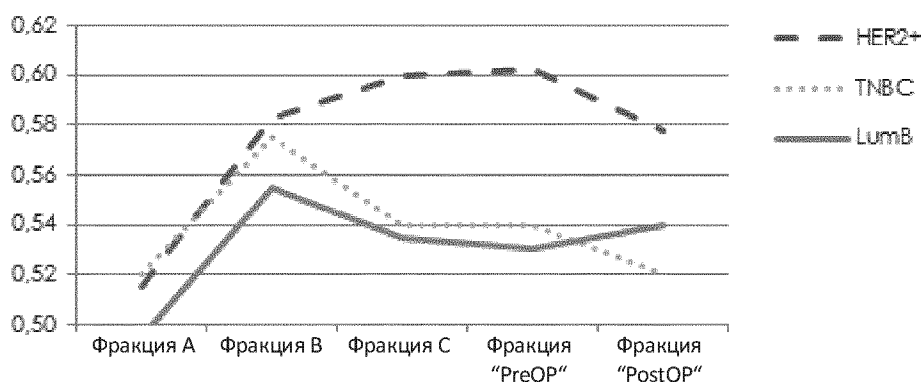


Фиг. 7

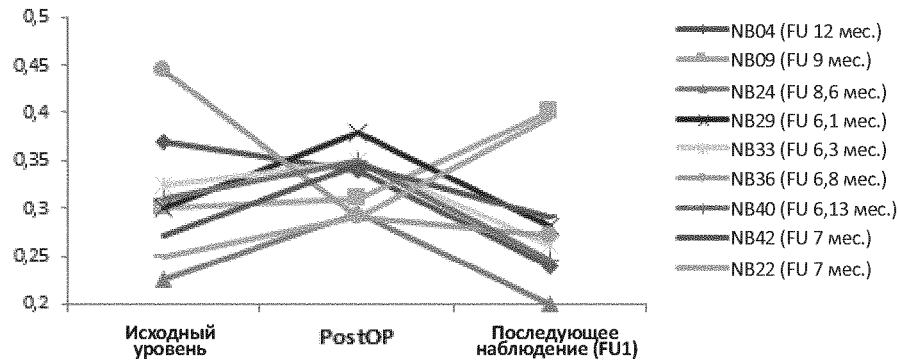
Метилирование *HYAL2* по субтипам
Без формирования подгрупп по ответу



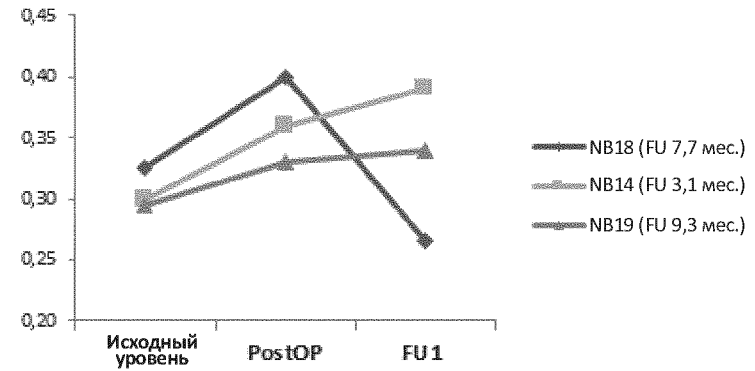
Метилирование *S100P* по субтипам
Без формирования подгрупп по ответу



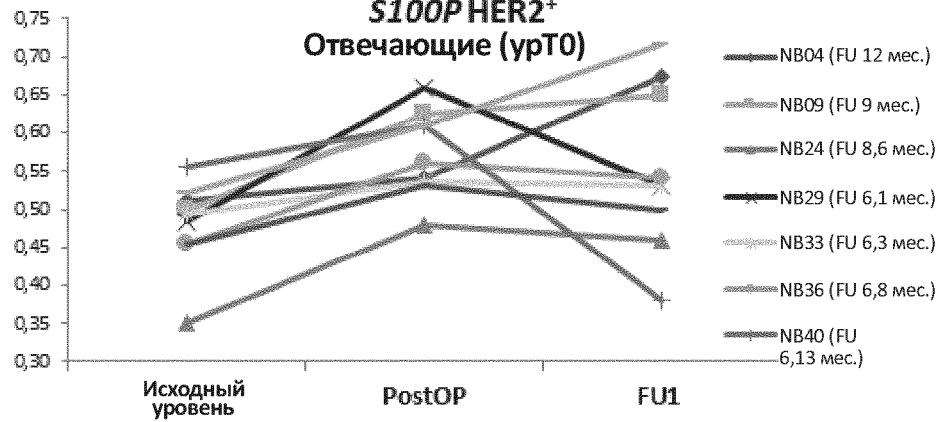
**HYAL2 HER2⁺
Отвечающие (ypT0)**



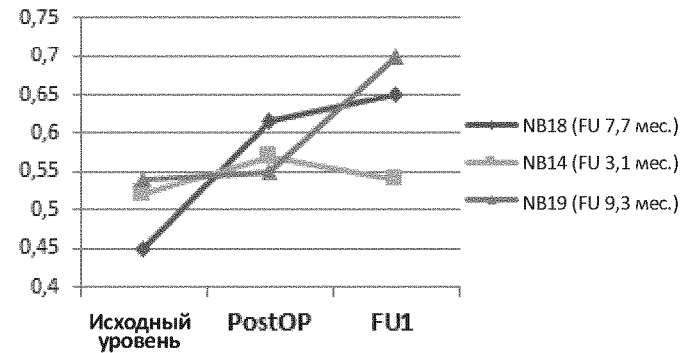
**HYAL2 HER2⁺
Не отвечающие**



**S100P HER2⁺
Отвечающие (ypT0)**



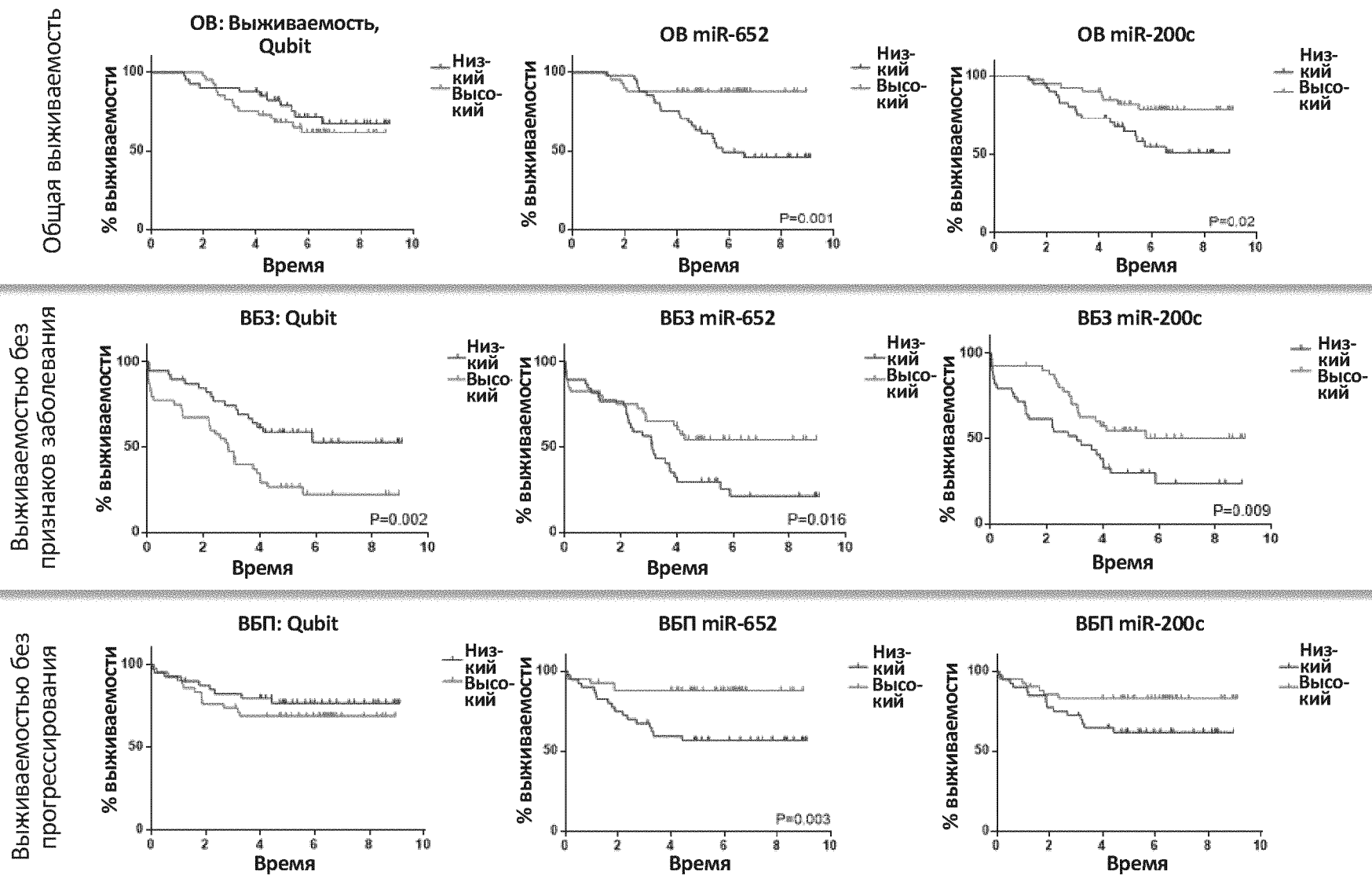
**S100P HER2⁺
Не отвечающие**



Фиг. 8

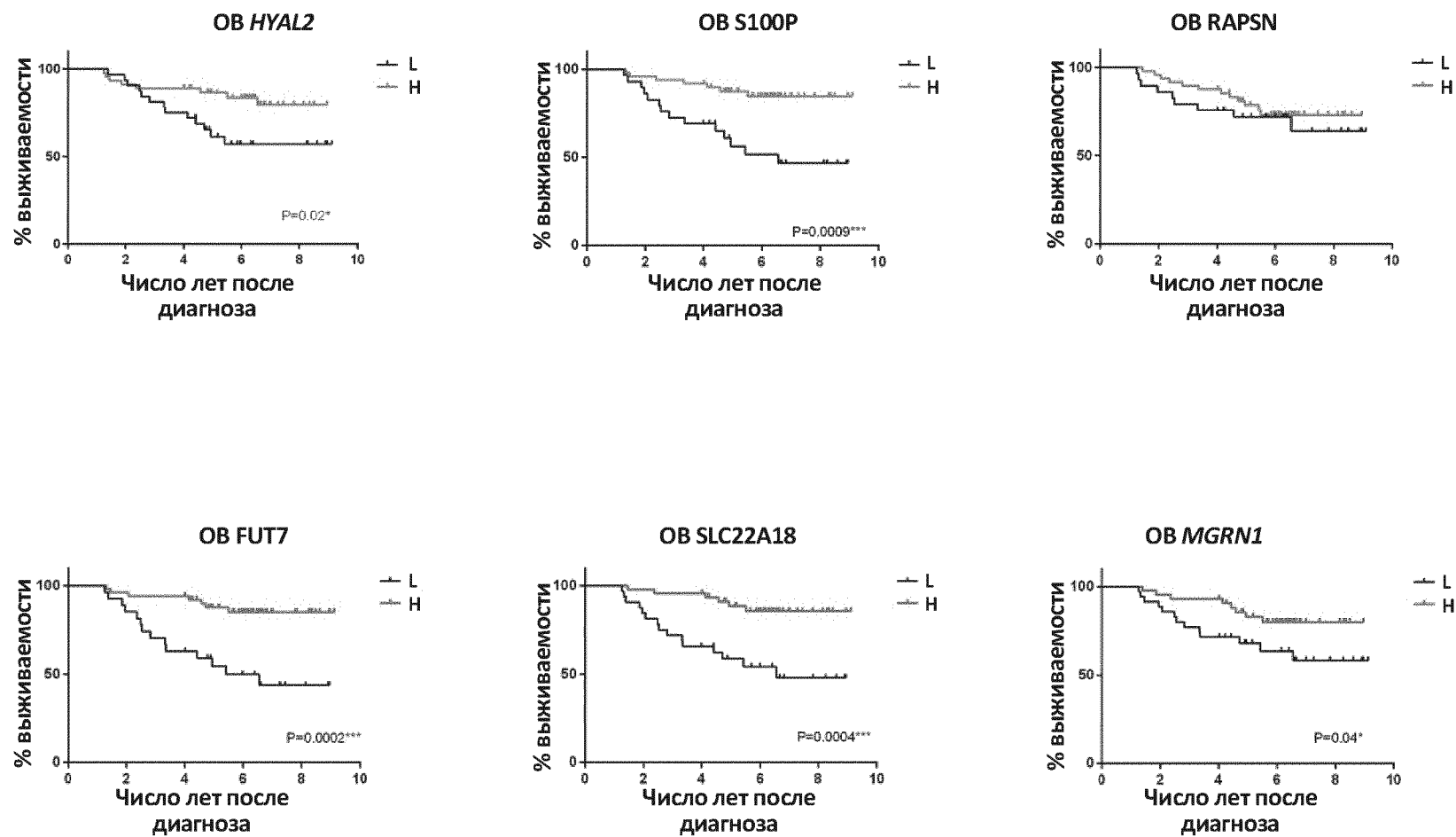
Фиг. 9

Тип РМЖ	n	средний возраст	метастазы	рецидив
Lum A	30	57,25	8	2
Lum B	45	54,99	25	6
HER2+/HR+	4	55,84	3	0
HER2+/HR-	4	63,01	2	0
TNBC	16	58,84	8	4



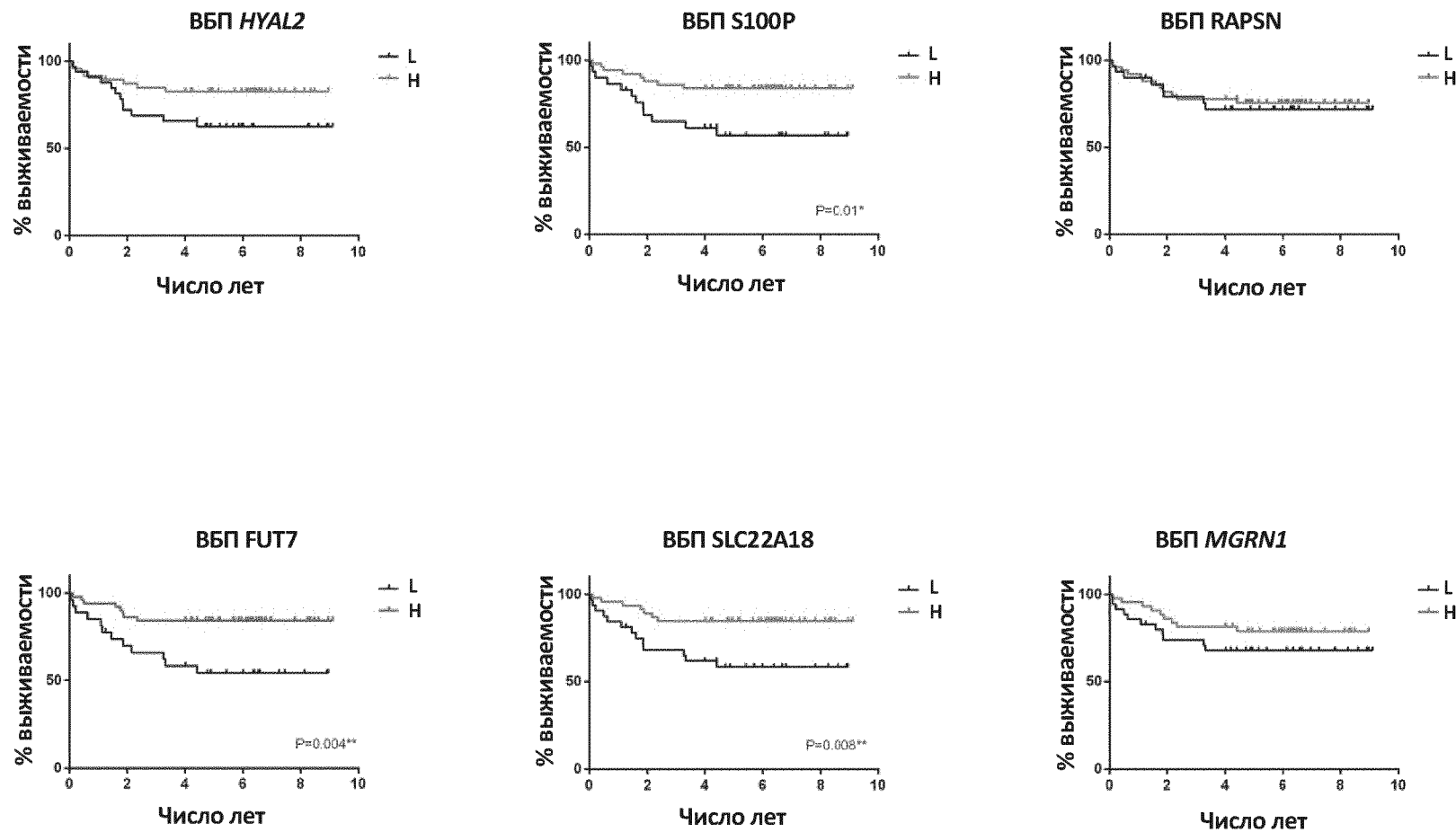
Фиг. 10

Фиг. 11

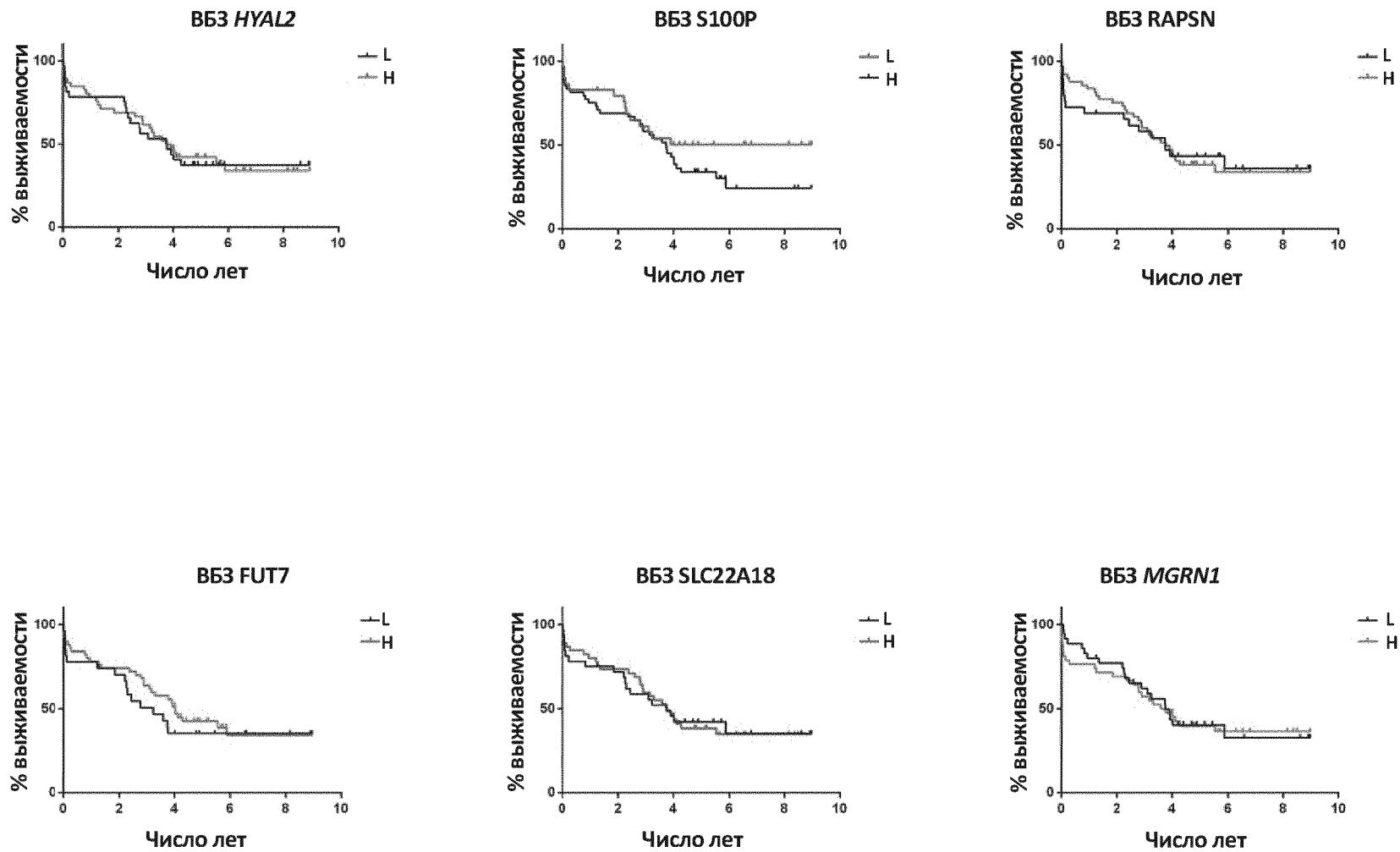


* L: Низкий уровень метилирования, H: Высокий уровень метилирования

Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14**Новые вычисления для всех измерений к настоящему времени (n = 550)**

312 контролей: Средн. возраст 45,7

238 случаев РМЖ: Средн. возраст 55,3

	Контроль	Случаи РМЖ
<50	180	75
>50	130	163

Выбранные маркеры из маркеров Марча и эпидемиологических характеристик**Маркеры**

FUT7.CpG.3

SLC22A18.CpG.3

miR.148b

miR.375

miR.409

miR.652

miR.801

RAPSN.CpG.4

Возраст

Возраст при первой беременности

Миома

Диабет

Результаты

Точность:	0.69
AUC:	0.76
Чувствительность:	0.73
Специфичность:	0.66
Положительные прогностические значения	0.024
Отрицательные прогностические значения	0.995

< 50

**Выбранные маркеры из маркеров Марча
и эпидемиологических характеристик**

Маркеры

FUT7.CpG.3	RAPSN.CpG4
miR.200c	Возраст
miR.148b	СПКЯ
miR.320b	Миома
miR.409	Курение
miR.801	Диабет

Результаты

Точность:	0.73
AUC:	0.78
Чувствительность:	0.83
Специфичность:	0.62
Положительные прогностические значения	0.025
Отрицательные прогностические значения	0.997

> 50

**Выбранные маркеры из маркеров Марча
и эпидемиологических характеристик**

Маркеры

FUT7.CpG.3	miR.320b
RPTOR.CpG.2	miR.409
SLC22A18.CpG.3	miR.652
miR.200c	miR.801
miR.375	Беременности

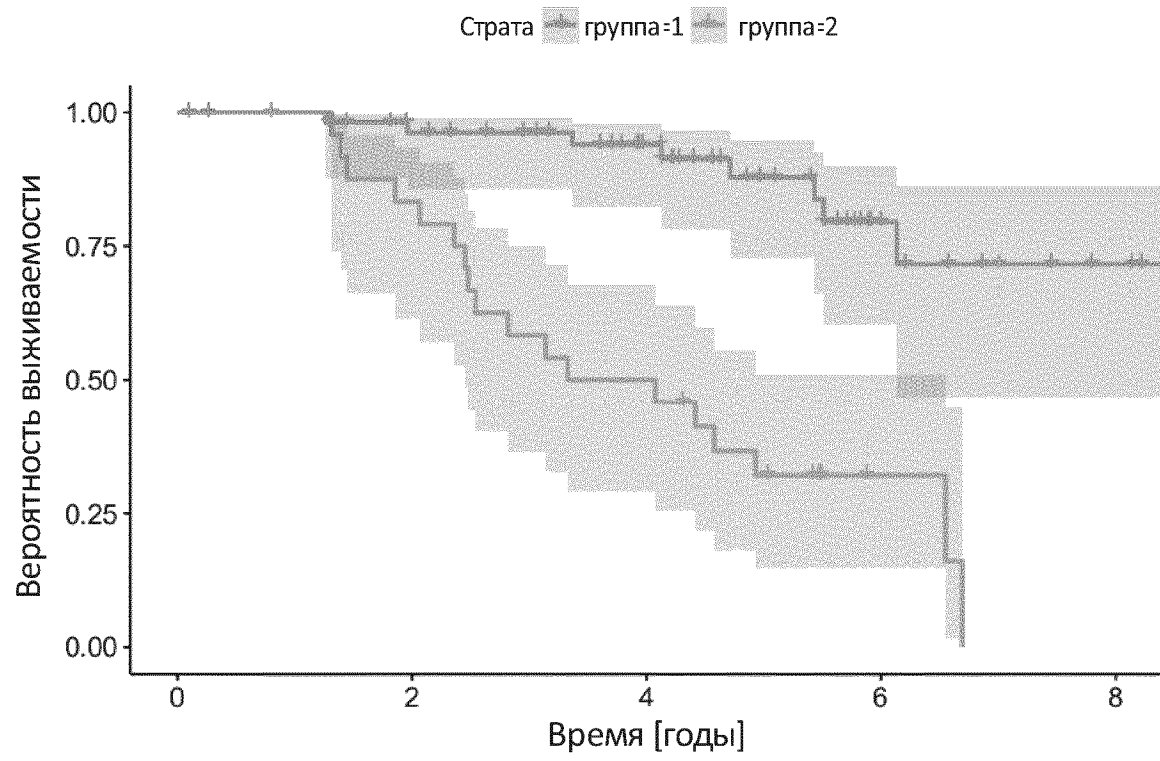
Результаты

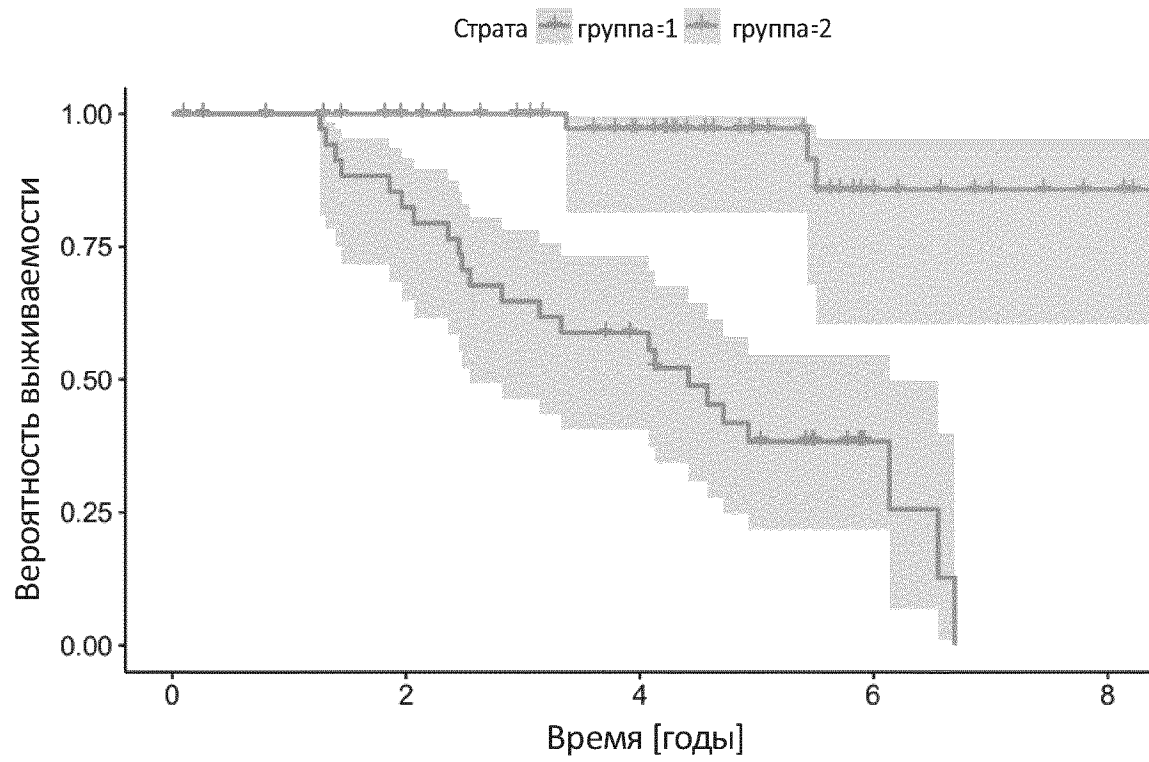
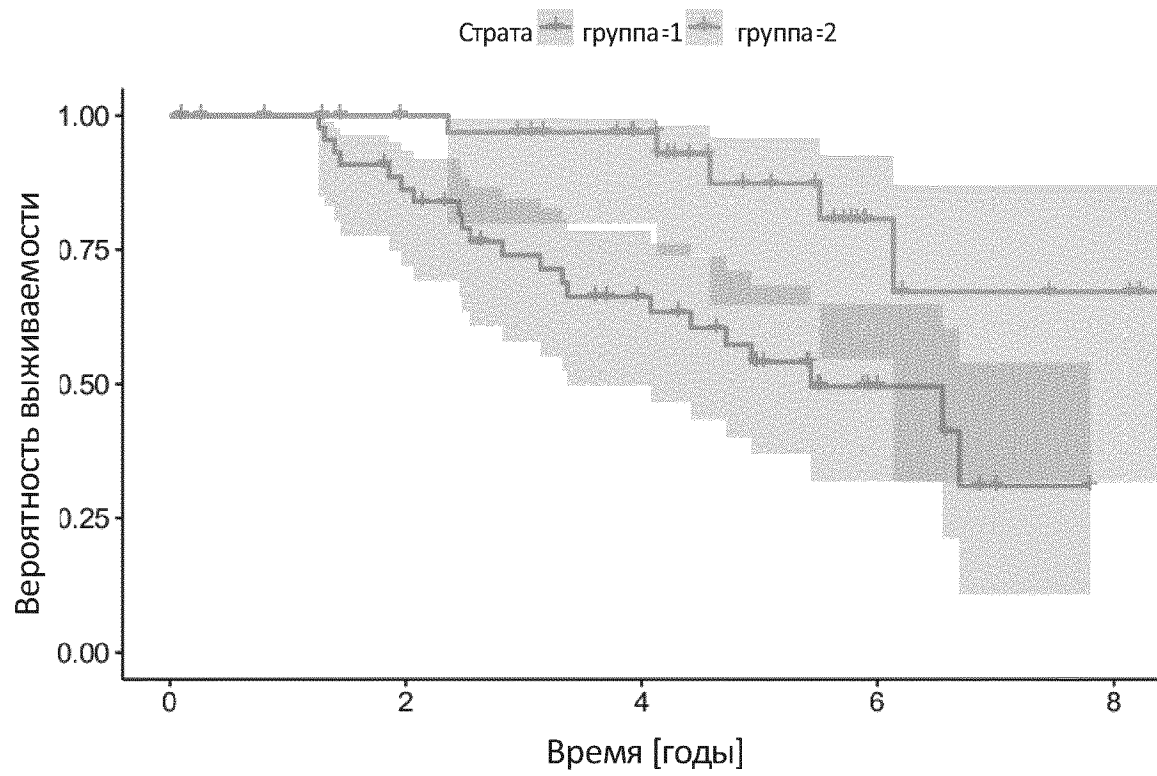
Точность:	0.59
AUC:	0.66
Чувствительность:	0.61
Специфичность:	0.61
Положительные прогностические значения	0.018
Отрицательные прогностические значения	0.993

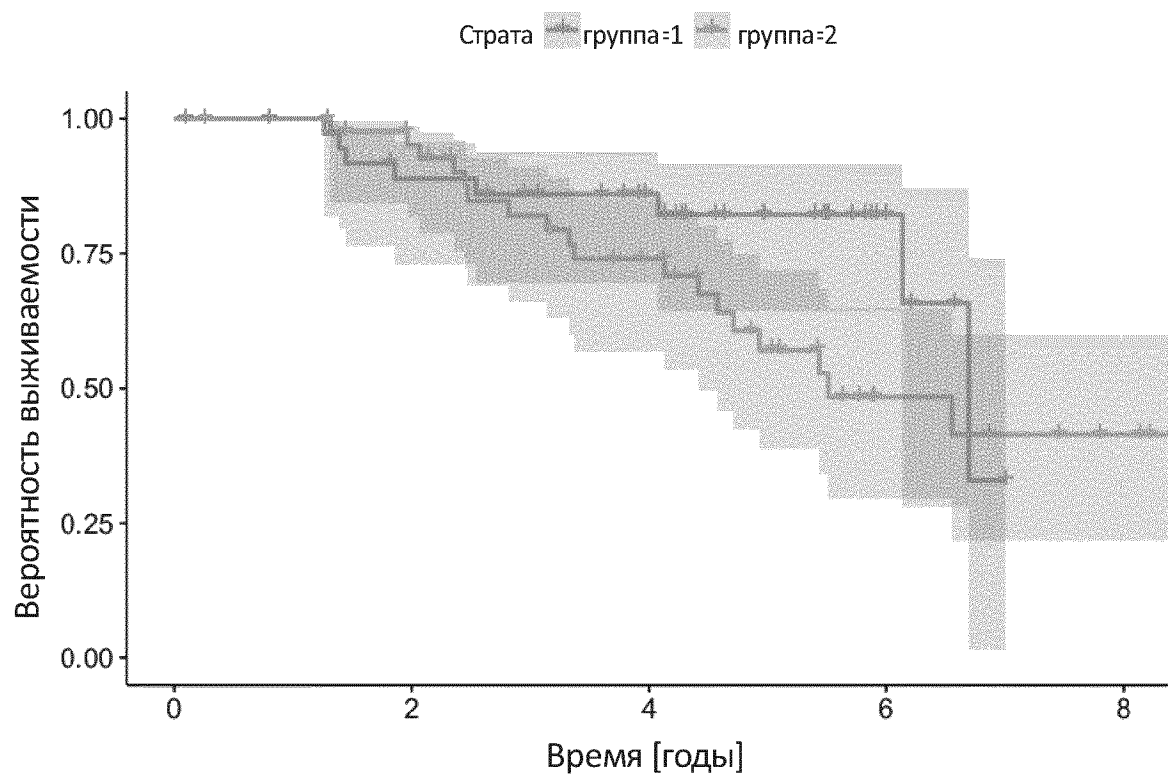
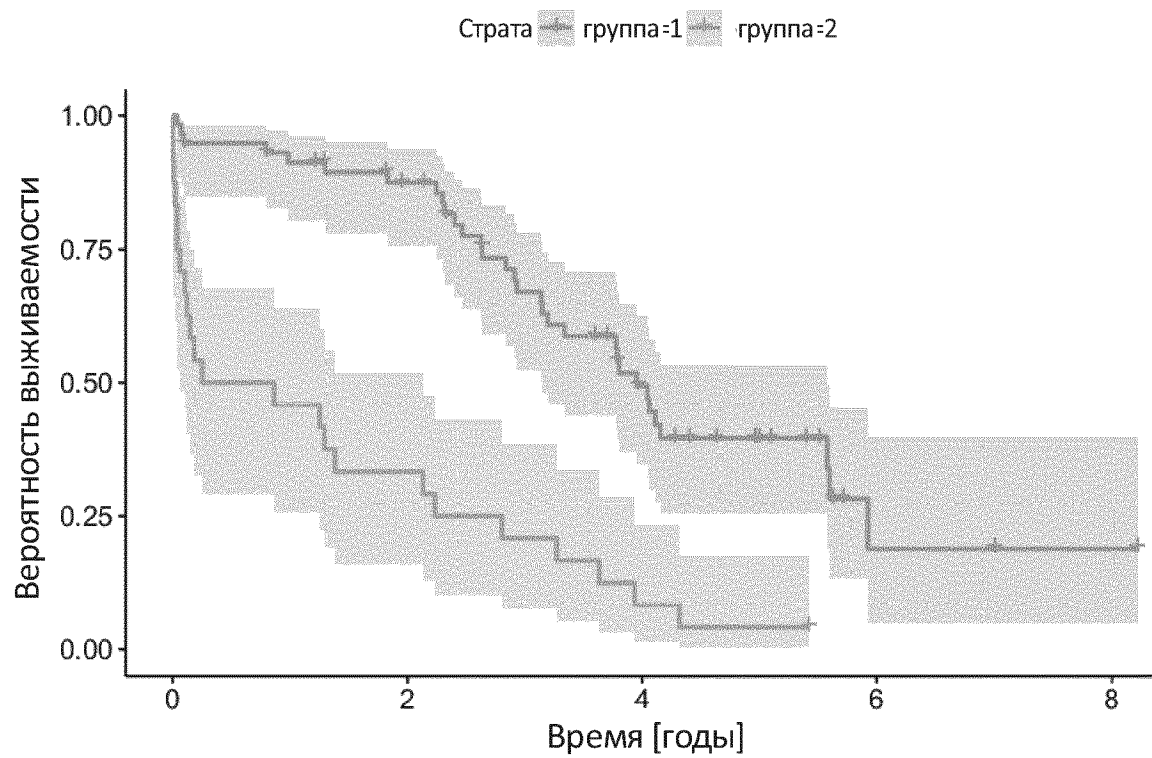
Фиг. 15

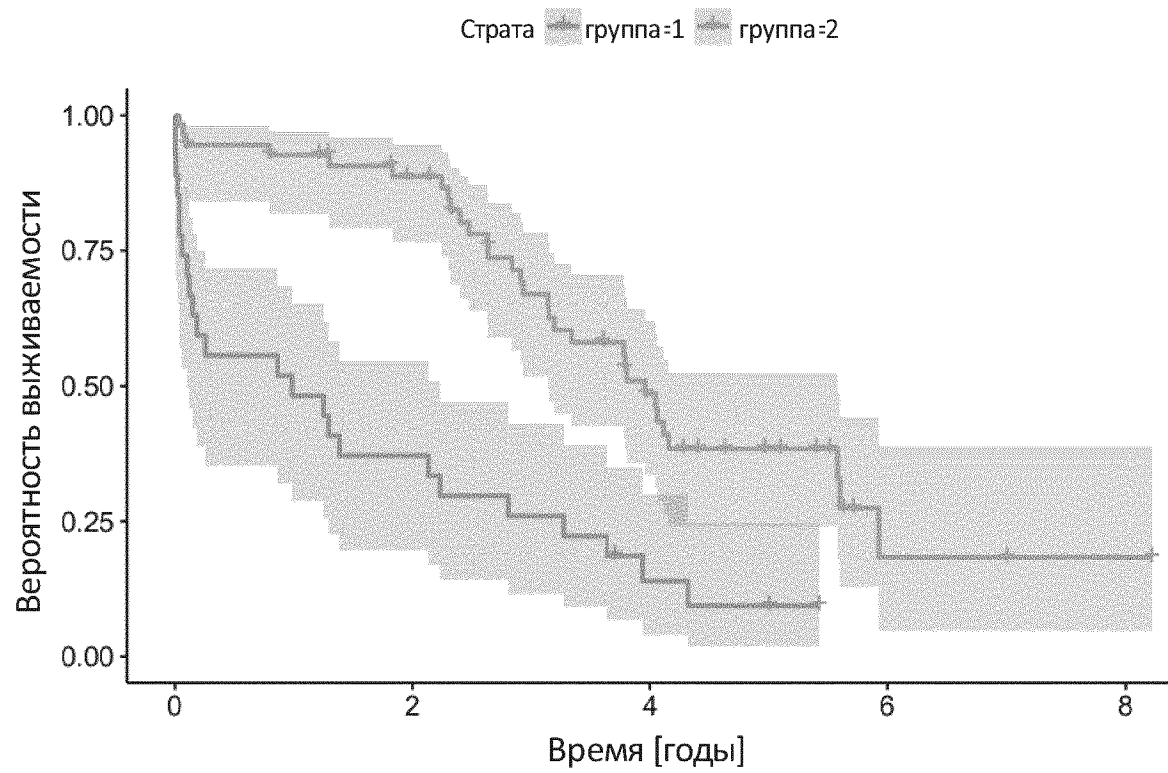
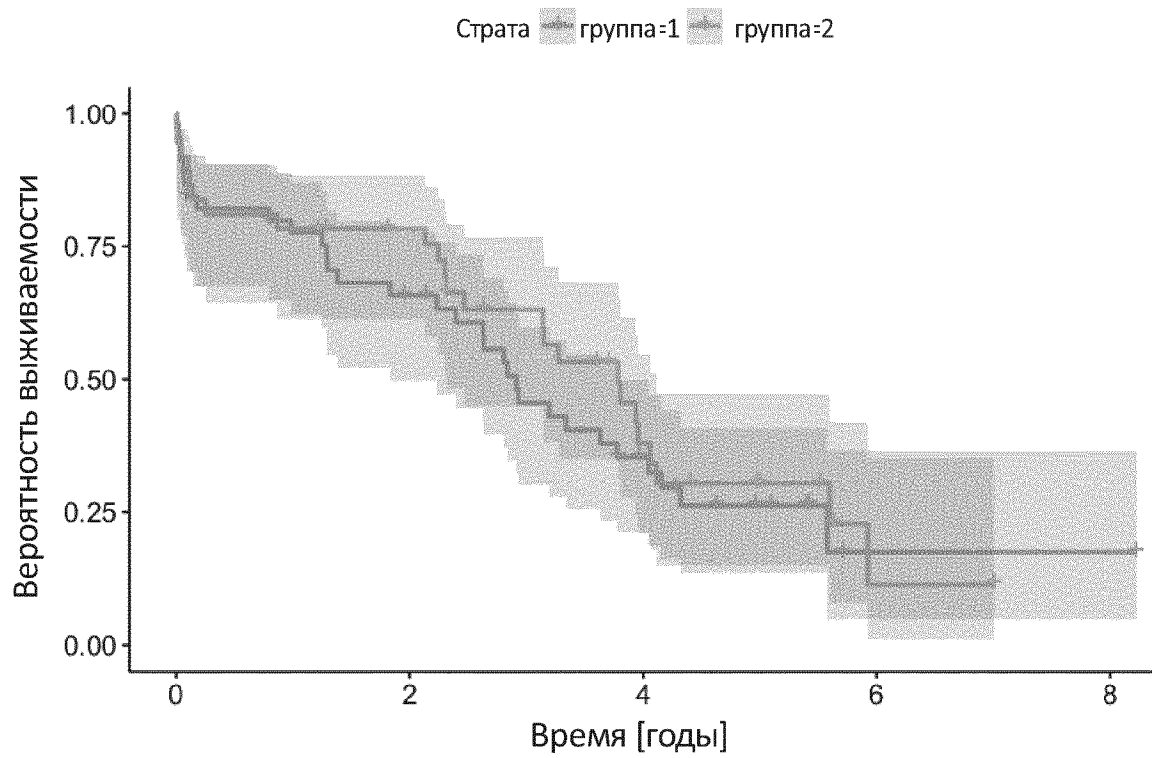
13/22

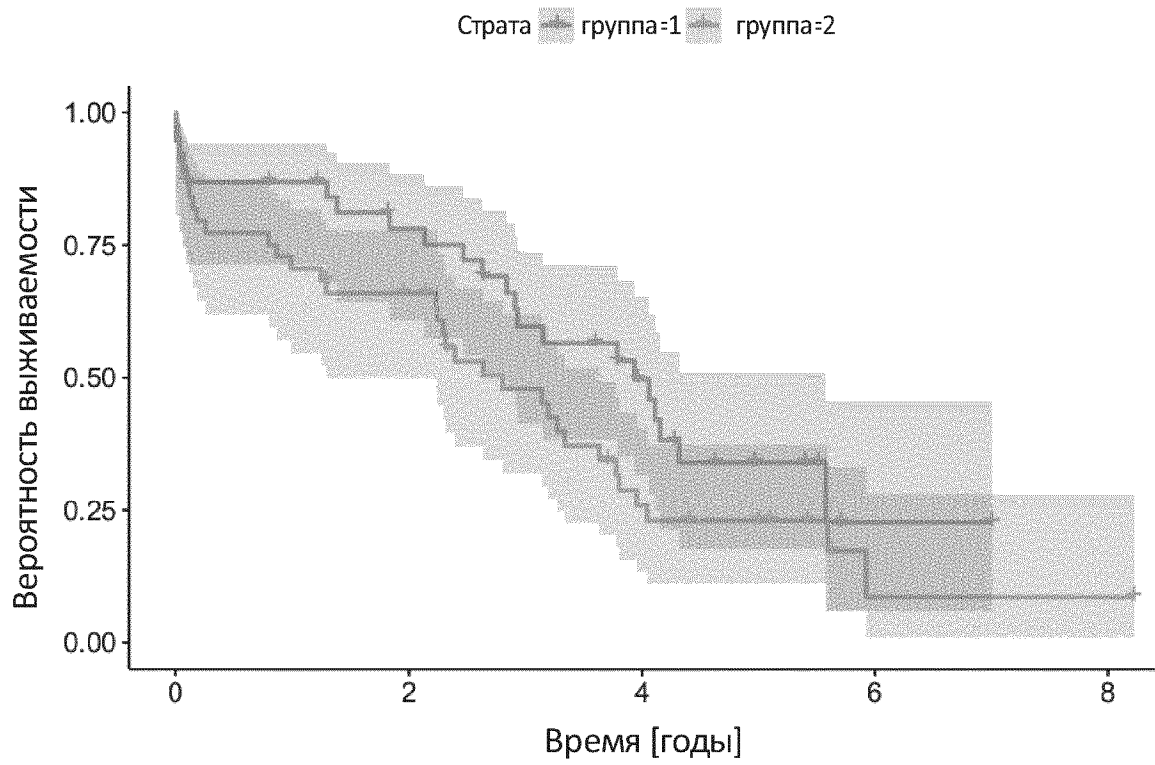
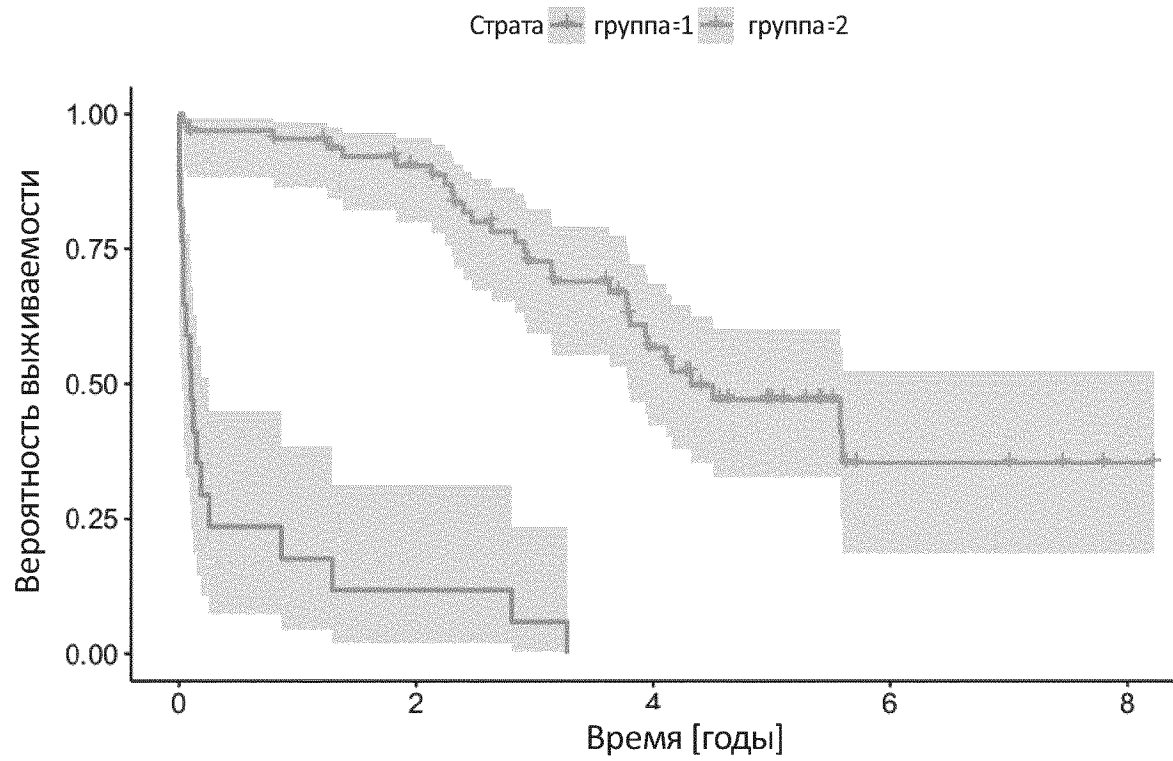
Фиг. 16

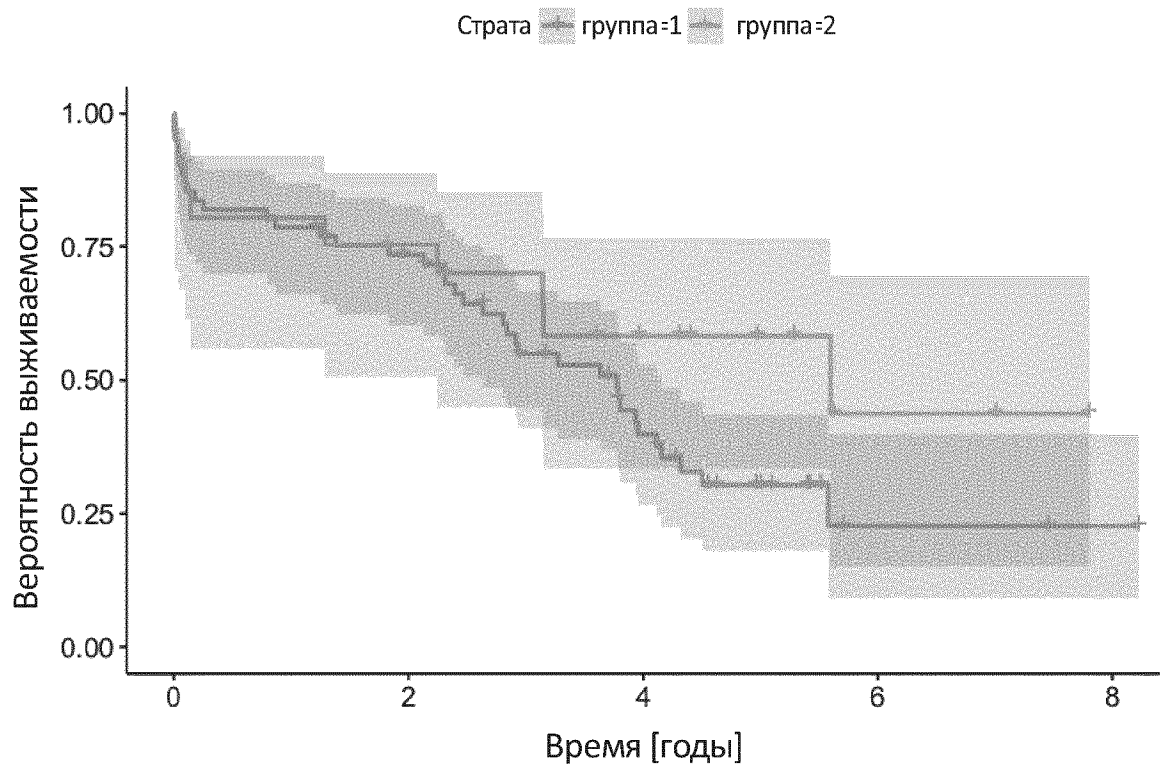
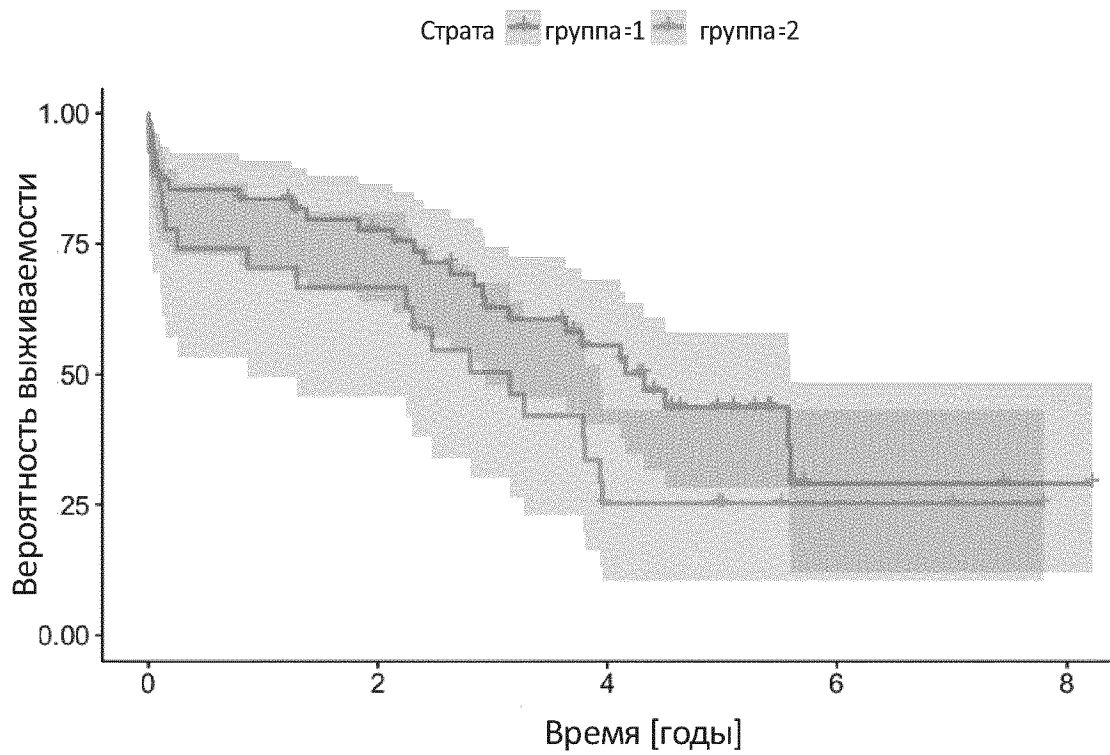


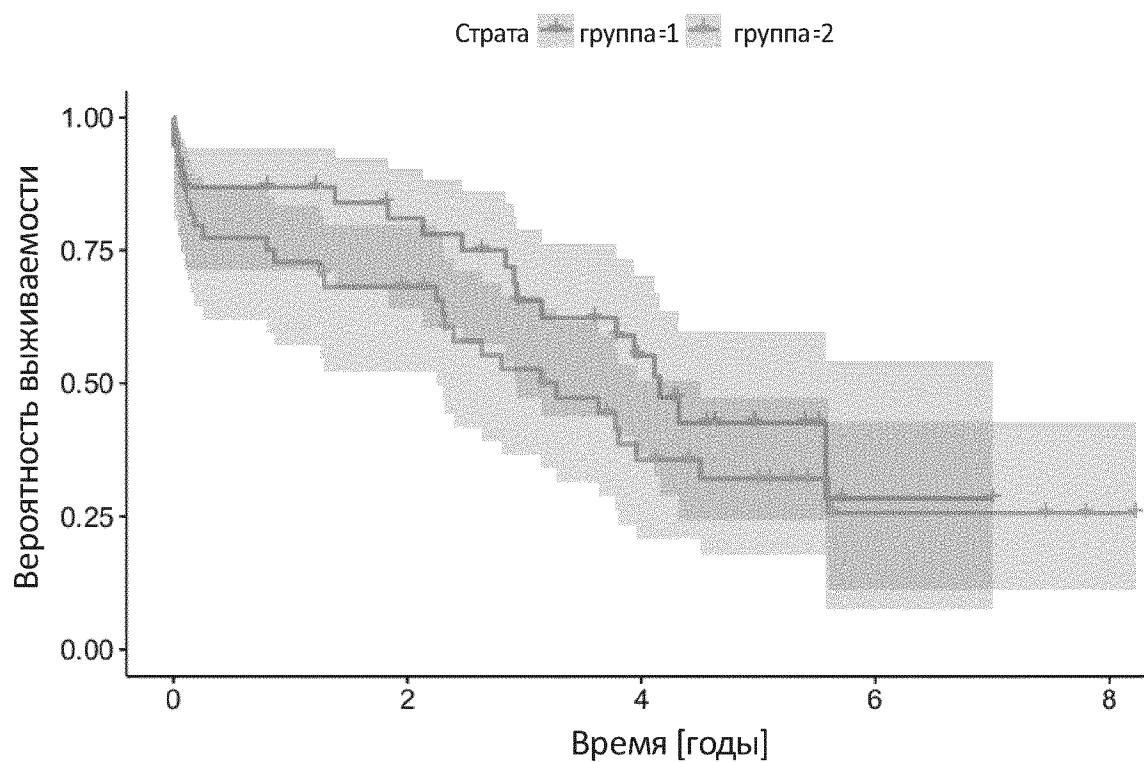
Фиг. 17**Фиг. 18**

Фиг. 19**Фиг. 20**

Фиг. 21**Фиг. 22**

Фиг. 23**Фиг. 24**

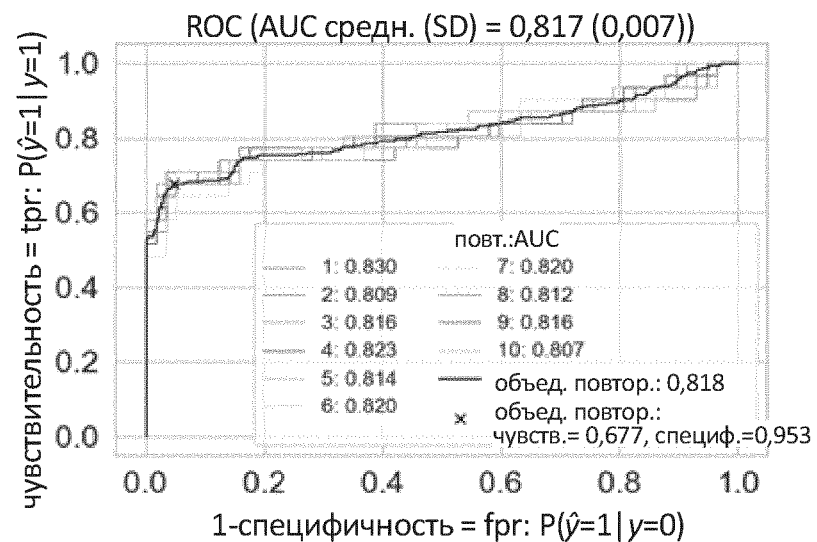
Фиг. 25**Фиг. 26**

Фиг. 27**Фиг. 28**

	AUC	Точность	Чувствительность	Специфичность
РМЖ, все пациенты (n=647)	0.72	0.66	0.75	0.54
РМЖ, возраст < 50 (n = 285)	0.76	0.75	0.86	0.45
РМЖ, возраст > 50 (n = 362)	0.67	0.61	0.57	0.73
РМЖ, высокий риск /BRCA+ (n = 486)	0.82	0.81	0.90	0.47

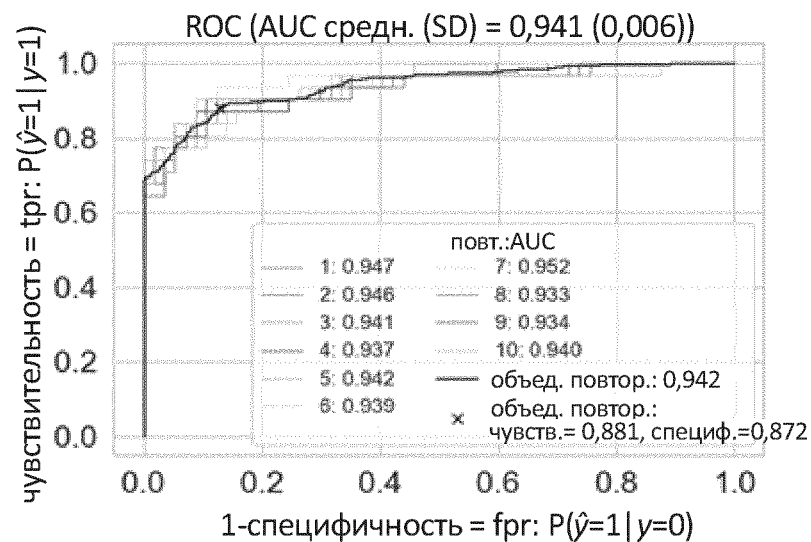
A.

Набор



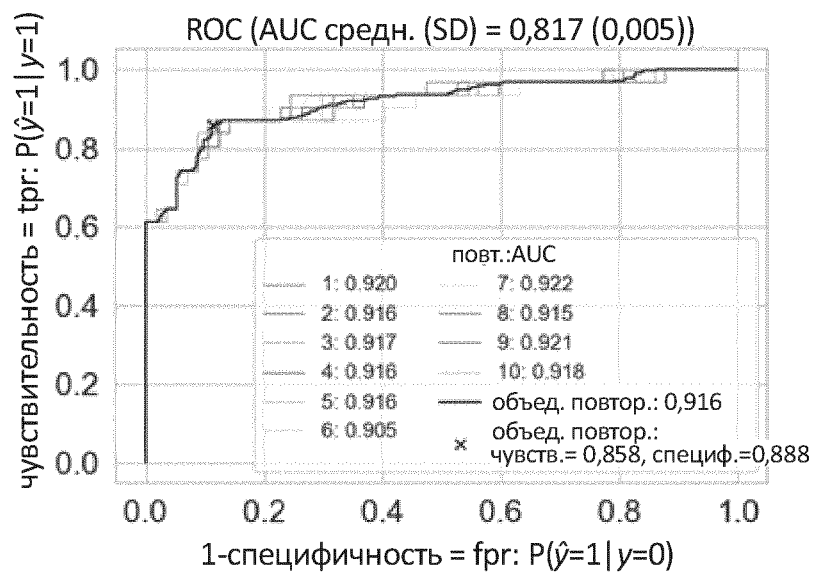
B.

Набор + CA125



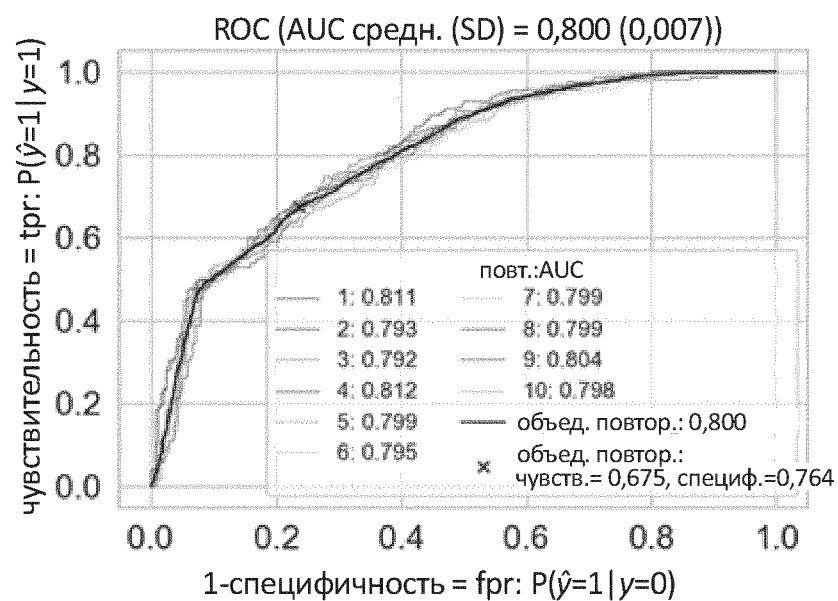
C.

CA125

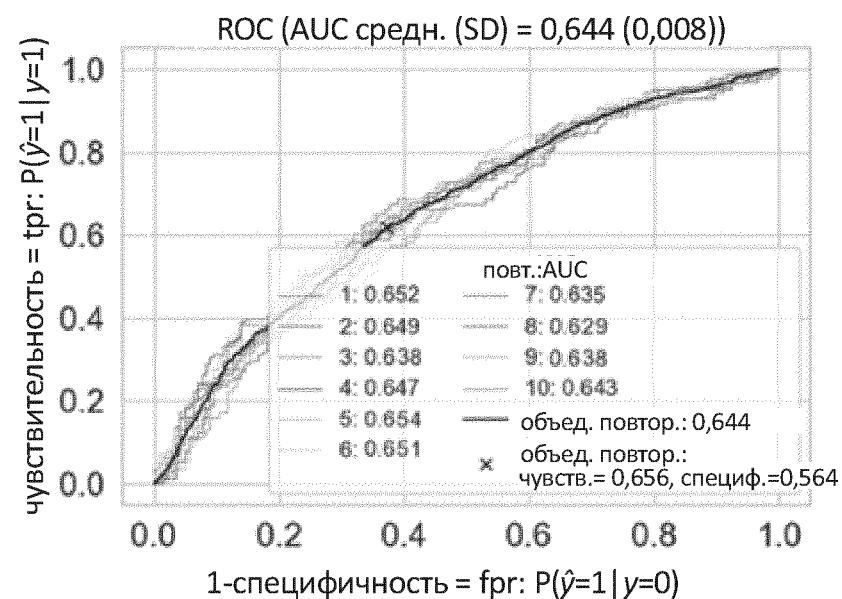


Фиг. 29

А. Набор из 15 маркеров РМЖ



В. Набор из 14 маркеров РМЖ



Фиг. 30