



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009127774/15, 19.12.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.12.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

19.12.2006 GB 0625321.5

10.10.2007 GB 0719792.4

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2011 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 27.08.2012 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2006/071466 A2, 06.07.2006. MORGAN R., PANDHA H.S.: "Prostate cancer cells express and secrete the Engrailed transcription factor" Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, Vol.47, 2006-04, page 622, #2641. RUDNICK A. et al.: "Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes" PNAS, Vol.91, No.25, (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 20.07.2009

(86) Заявка РСТ:
GB 2007/004902 (19.12.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/075056 (26.06.2008)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

ПАНДХА Хардев (GB),**МОРГАН Ричард Джордж Леонард (GB)**

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ СУРРЕЙ (GB)**(54) БИОМАРКЕРЫ РАКА**

(57) Реферат:

Предложенная группа изобретений относится к области медицины. Предложен способ диагностики или мониторинга прогрессирования рака предстательной железы, включающий детекцию и/или количественное определение гомеодомен-

содержащего фактора транскрипции EN-2 или его фрагмента в моче, и сравнение количества указанного гомеодомен-содержащего фактора транскрипции в тестируемом образце мочи с количеством, присутствующим в контрольном образце мочи от нормального, не страдающего раком субъекта, где увеличение уровня

гемеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента, обнаруживаемое в тестируемом образце, является показателем того, что заболевание либо прогрессирует, либо началось. Предложено применение *in vitro* указанного гемеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента, поддающегося детекции в моче, в качестве

биомаркера для рака предстательной железы. Предложенная группа изобретений обеспечивает высоко специфичный и чувствительный способ диагностики или мониторинга прогрессирования рака предстательной железы, в два раза превосходящий по эффективности стандартный тест на основе PSA. 2 н. и 6 з.п. ф-лы, 8 ил., 4 табл., 8 пр.

(56) (продолжение):

1994-12-06, pages 12203-12207. WO 99/00498 A1, 07.01.1999. WO 03/053223 A2, 03.07.2003. EP 1676927 A2, 05.07.2006. RU 2234942 C2, 27.08.2004.

RU 2 4 6 0 0 7 5 C 2

RU 2 4 6 0 0 7 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)*G01N 33/96* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009127774/15, 19.12.2007**(24) Effective date for property rights:
19.12.2007

Priority:

(30) Convention priority:
19.12.2006 GB 0625321.5
10.10.2007 GB 0719792.4(43) Application published: **27.01.2011 Bull. 3**(45) Date of publication: **27.08.2012 Bull. 24**(85) Commencement of national phase: **20.07.2009**(86) PCT application:
GB 2007/004902 (19.12.2007)(87) PCT publication:
WO 2008/075056 (26.06.2008)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517

(72) Inventor(s):

PANDKhA Khardev (GB),
MORGAN Richard Dzhordzh Leonard (GB)

(73) Proprietor(s):

DZE JuNIVERSITI OF SURREJ (GB)**(54) CANCER BIOMARKERS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is presented is a diagnostic and monitoring technique for prostate cancer progression involving detection and/or evaluation of a homeodomain-containing transcription EN-2 factor or its urinary fragment, and comparison the amount of said homeodomain-containing transcription factor in a tested urine sample with that found in the reference sample taken from a normal healthy subject wherein increasing the level of homeodomain-

containing transcription factor or its fragment found in the tested sample is an indicator of the fact that the disease is progressing or has started. What is offered is using in vitro said homeodomain-containing transcription factor or its fragment to be detected in urine as a prostate cancer biomarker.

EFFECT: high-specific and sensitive diagnostic or monitoring technique for prostate cancer progression twice exceeding the standard PSA test in effectiveness.

8 cl, 8 dwg, 4 tbl, 8 ex

Настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одного гомеодоменсодержащего фактора транскрипции, такого как пептид НОХ или пептид EN-2, в качестве биомаркера рака предстательной железы.

5 Рак предстательной железы в настоящее время является ведущей причиной связанной с раком смертности у мужчин, убивающей 10000 мужчин ежегодно только в UK. Однако доступность в настоящее время биомаркеров для неинвазивной
10 детекции рака предстательной железы является по существу ограниченной простатическим специфическим антигеном (PSA). Уровни PSA в сыворотке значительно повышены у пациентов с раком предстательной железы, и тест PSA в настоящее время используют, чтобы следить за прогрессированием заболевания и его
15 ответом на лечение.

К сожалению, у теста PSA существует ряд существенных недостатков. Поскольку
15 уровни PSA также значительно повышены при других, не относящихся к раковым, состояниях предстательной железы, таких как простатит и доброкачественная гипертрофия, не всегда является несомненным, что детекция увеличения уровней PSA действительно является показателем рака предстательной железы у пациента. Более того, уровни PSA не обязательно коррелируют с объемом заболевания или с
20 развитием метастазов в узлах или кости.

Недавние попытки использовать такие признаки, как соотношение свободного PSA к общему и «прирост уровня концентрации PSA», показаны как большей частью
25 безуспешные, из-за очень высокого уровня ложноположительных результатов, что приводит к большому числу не являющихся необходимыми инвазивных биопсий.

Действительно, считают, что уровни PSA повышаются только очень медленно при
30 раке предстательной железы, так что заболевание часто успевает стать прогрессирующим до того, как получают положительный результат при измерении уровней PSA. Более того, уровни PSA необходимо нормализовать, так как они могут меняться с возрастом и размером предстательной железы.

Существует также ряд дополнительных потенциальных химических маркеров рака
35 предстательной железы, включая калликреины, и с более недавнего времени, 80 кДа фрагменты е-кадгерина (Kuefer et al., 2005). Снова, эти биомаркеры проявляют тенденцию обладать многими из существенных недостатков, обсуждаемых выше по отношению к PSA.

Таким образом, в данной области существует необходимость в надежном биомаркере рака предстательной железы.

Неожиданно, авторы изобретения обнаружили, что гомеозисный фактор
40 транскрипции, НОХС4, секретируется из опухолей предстательной железы, и его концентрация в сыворотке значительно повышена у пациентов с раком предстательной железы. Таким образом, присутствие НОХС4 в жидкостях организма, таких как сыворотка, является применимым показателем рака предстательной железы как на ранней, так и на поздней стадии.

45 Авторы настоящего изобретения обнаружили также, что второй НОХ белок, НОХВ6, и третий белок НОХВ5, также показывают сходные результаты. НОХА3 и НОХД9 также рассматривают как применимые в качестве биомаркеров.

Далее авторы настоящего изобретения идентифицировали гомеодоменсодержащий
50 фактор транскрипции *Engrailed 2* (EN-2) как экспрессирующийся на уровне и РНК, и белка в линиях клеток, происходящих от рака предстательной железы, LNCaP и PC3, а также в первичных клетках рака предстательной железы. Более того, белок EN-2 может секретироваться в окружающую клетки среду.

Неожиданно, повышенные уровни всех этих маркеров рака можно детектировать у пациентов с раком предстательной железы, даже когда обнаружено, что уровни PSA являются нормальными. Это дополнительно иллюстрирует, что маркеры по
 5 настоящему изобретению являются более надежными при диагностике рака предстательной железы при сравнении с другими маркерами, такими как PSA.

Таким образом, в первом аспекте, настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одного гомеодоменсодержащего фактора транскрипции, или его фрагмента, в качестве биомаркера рака предстательной железы. Примеры
 10 гомеодоменсодержащих факторов транскрипции включают пептиды NOX и EN-2. Изобретение также относится к способу диагностики заболевания раком предстательной железы, включающему детекцию по меньшей мере одного гомеодоменсодержащего фактора транскрипции в образце от пациента.

Является особенно предпочтительным, чтобы по меньшей мере один пептид NOX, или EN-2, или его фрагмент, можно было детектировать в жидкости организма.

Предпочтительно биомаркер представляет собой один NOXC4. Также является предпочтительным, чтобы биомаркер представлял собой один NOXB5 или, более предпочтительно, один NOXB6. Также является предпочтительным, чтобы биомаркер
 20 представлял собой один EN-2. Также является предпочтительным, чтобы биомаркер представлял собой один NOXA3. Также является предпочтительным, чтобы биомаркер представлял собой один NOXD9. Однако комбинации также являются предпочтительными. Такие комбинации включают NOXC4 и NOXB5; NOXC4 и NOXB6; NOXB5 и NOXB6; NOXC4, NOXB5 и NOXB6; EN-2 и NOXC4; EN-2 и NOXB5; EN-2
 25 и NOXB6; EN-2, NOXC4 и NOXB5; EN-2, NOXC4 и NOXB6; EN-2, NOXB5 и NOXB6; EN-2, NOXC4, NOXB5 и NOXB6. Такие комбинации могут также дополнительно содержать один или оба из NOXA3 и/или NOXD9. Дополнительные комбинации включают NOXA3 и NOXD9; NOXA3 и NOXC4; NOXA3 и NOXB5; NOXA3 и NOXB6;
 30 NOXA3 и EN-2; NOXD9 и NOXC4; NOXD9 и NOXB5; NOXD9 и NOXB6; NOXD9 и EN-2. Особенно предпочтительная комбинация маркеров содержит один или несколько из, предпочтительно, все из NOXC4, NOXB5, NOXB6 и EN-2.

Предпочтительно, жидкость организма представляет собой сыворотку или мочу. Другие предпочтительные жидкости организма обсуждают ниже.

Гены NOX представляют собой семейство гомеодоменсодержащих факторов транскрипции, которые определяют идентичность клеток и тканей в ходе раннего развития (обзор дан Morgan, 2006). В недавних публикациях, включая Miller et al., 2003, эффективно идентифицировали каждый отдельный белок, который экспрессируется и
 40 остается внутри клеток, в опухолевых клетках при раке предстательной железы. Естественно, это означает что идентифицировали всего приблизительно 10000-12000 белков, включая пептиды NOX.

Однако авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что среди этих тысяч белков, экспрессирующихся в клетках рака предстательной железы,
 45 белок NOXC4, например, обнаружен вне клеток и является отличным биомаркером рака предстательной железы.

Это является неожиданным по ряду причин. Во-первых, NOXC4 представляет собой фактор транскрипции, и, таким образом, обнаружение его в сыворотке является
 50 неожиданным. Во-вторых, хотя известны другие биомаркеры рака предстательной железы, обнаружение надежного биомаркера остается труднодостижимым, смотри, например, проблемы, описанные выше по отношению к PSA. Действительно, NOXC4 является биомаркером как для ранней стадии, так и, в частности, для поздней стадии,

как показано на фигуре 1.

Таким образом, этот белок не был идентифицирован ранее как биомаркер рака предстательной железы, хотя известно, что он экспрессируется в клетках рака предстательной железы, вместе с многими тысячами других белков, многие из которых нельзя описать как биомаркеры рака предстательной железы. Это также применимо к другим пептидам НОХ, включая НОХВ5 и НОХВ6.

Подобно пептидам НОХ, белки Engrailed (En) также представляют собой гомеодоменсодержащие факторы транскрипции, которые обладают очень высокой степенью функционального консерватизма в ходе развития (обзор дан Morgan, 2006). Исходный ген *En* охарактеризован у *Drosophila*, где мутант по *En* являлся неспособным формировать границу между передним и задним крылом (Garcia-Bellido and Santamaria, 1972). Подобным образом, гомологи *En* у позвоночных играют регуляторные роли в ходе развития, что включает развитие конечностей и как раннюю спецификацию, так и в последующие миграции аксонов нервной системы (Morgan, 2006).

В дополнение к регуляции транскрипции, белки EN обладают рядом других, по-видимому, несвязанных свойств, которые являются функционально важными. Первым из них является способность секретироваться из клеток и интернализироваться другими клетками (Cosgaya et al, 1998; Joliot et al., 1998, обзор дан Morgan, 2006). Точная механистическая основа этого явления неизвестна, хотя является ясным, что это зависит от консервативной последовательности для экспорта из ядра, локализованной в гомеодомене (Maizel et al., 1999; Chatelin et al., 1996; Derossi et al., 1996; Joliot et al., 1997).

Недавно показано, что в дополнение к его роли в развитии, EN-2 является потенциальным онкогеном при раке молочной железы (Martin et al., 2005). Для не вызывающих образование опухолей линий клеток молочной железы мыши, в которых вызывали экспрессию EN-2, впоследствии показали ряд злокачественных характеристик, включая укорачивание клеточного цикла и потерю контакта клетки с клеткой. Кроме того, сайленсинг *EN-2* с помощью РНКи показывает, что он является необходимым для поддержания трансформированного фенотипа в линии клеток рака молочной железы человека.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что экспрессия EN-2 повышена в линии клеток LNCaP, происходящих из рака предстательной железы, и в образцах тканей человека из аденокарциномы предстательной железы, и он секретируется оттуда. Более того, EN-2 секретируется из клеток протоков и опухолей - аденокарцином, и присутствует в моче пациентов с раком предстательной железы. Это первый случай, когда предположили, что EN-2 является маркером рака предстательной железы.

Предпочтительно, детектируют присутствие или отсутствие по меньшей мере одного гомеодоменсодержащего фактора транскрипции, такого как пептид НОХ, или пептид EN-2, или его фрагмента.

Предпочтительно, по меньшей мере один пептид НОХ выбран из любого пептида НОХ, как перечислено ниже, при условии, что пептид НОХ, или его фрагмент поддается детекции в жидкости организма, такой как сыворотка или моча.

Предпочтительно, по меньшей мере один пептид НОХ, или его фрагмент происходит из подсемейства НОХА, НОХВ, НОХС или НОХД. Если используют более одного пептида НОХ, тогда они могут происходить из одного и того же семейства или из комбинации семейств. Предусматривают также комбинации фрагментов, либо

фрагментов одного и того же белка, либо фрагментов различных белков. Комбинации различных пептидов могут обеспечивать более точные диагнозы. Является предпочтительным, чтобы пептид НОХ не представлял собой НОХА4, НОХА1, НОХА7, НОХВ3 или НОХВ9.

Является особенно предпочтительным, чтобы пептид НОХ представлял собой пептид НОХС4, и/или пептид НОХВ6, и/или пептид НОХВ5, и/или пептид НОХА3, и/или пептид НОХД9, или их фрагменты.

Предпочтительно, пептид НОХС4 представляет собой пептид, представленный в последовательности ID NO. 1 (инвентарный по. в NCBI P09017, gi: 123279), или его фрагмент. Предпочтительно, пептид НОХВ6 представляет собой пептид, представленный в последовательности ID NO. 2 (инвентарный по. в NCBI P17509, gi: 116242515), или его фрагмент. Предпочтительно, пептид НОХВ5 представляет собой пептид, представленный в последовательности ID NO. 3 (инвентарный по. в NCBI P09067, gi: 400000), или его фрагмент. Предпочтительно, пептид EN-2 представляет собой пептид, представленный в последовательности ID NO. 4 (инвентарный по. в NCBI P19622, gi: 21903415) или его фрагмент. Предпочтительно, пептид НОХА3 представляет собой пептид, представленный в последовательности ID NO.5 (инвентарный по. мРНК в NCBI NM_030661, gi: 84043946), или его фрагмент. Предпочтительно, пептид НОХД9 представляет собой пептид, представленный в последовательности ID NO.6 (инвентарный по. мРНК в NCBI NM_014213, gi: 23397673), или его фрагмент.

В то время как приведена ссылка на НОХС4, пептид НОХС4 или его фрагмент, следует понимать, что эти термины можно использовать взаимозаменяемо, если не очевидно иное. Тому же самому подчиняются другие пептиды НОХ и EN-2.

Более того, когда здесь приведена ссылка на НОХС4, НОХВ6, НОХВ5, НОХА3 или НОХД9, это также применимо к другим пептидам НОХ, или их комбинациям, если не очевидно иное.

Подобным образом, когда здесь приведена ссылка на конкретную последовательность, такую как контрольная последовательность или последовательность ID NO, это применимо ко всем последовательностям ID NO и к любой из последовательностей НОХ, представленных ниже, если не очевидно иное.

Предпочтительно, фрагмент содержит по меньшей мере 80% гомологии последовательности с контрольной последовательностью (например, НОХС4, НОХВ6, НОХВ5, НОХА3, НОХД9 или EN-2), более предпочтительно, 85%, более предпочтительно, 90%, более предпочтительно, 95%, более предпочтительно, 97%, более предпочтительно, 99% и, наиболее предпочтительно, 99,9% гомологии последовательности с контрольной последовательностью, или является настолько близким к ней, насколько необходимо. Подходящие способы для определения гомологии последовательности включают использование программы BLAST.

Предпочтительно, фрагмент содержит по меньшей мере 80% идентичности последовательности с контрольной последовательностью (например, НОХС4, НОХВ6, НОХВ5, НОХА3, НОХД9 или EN-2), более предпочтительно, 85%, более предпочтительно, 90%, более предпочтительно, 95%, более предпочтительно, 97%, более предпочтительно, 99% и, наиболее предпочтительно, 99,9% идентичности последовательности с контрольной последовательностью или является настолько близким к ней, насколько необходимо. Подходящие способы для определения гомологии последовательности включают использование программы BLAST.

Говорят, что два полипептида являются «гомологичными», в том смысле, в

котором этот термин используют в настоящем описании, если последовательность одного из полипептидов обладает достаточно высокой степенью идентичности или сходства с последовательностью другого полипептида. «Идентичность» означает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях

5 аминокислотный остаток является идентичным между последовательностями. «Сходство» обозначает, что в любом конкретном положении в выровненных последовательностях аминокислотный остаток принадлежит к сходному типу между последовательностями. Степени идентичности и сходства можно легко

10 вычислить (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M

15 Stockton Press, New York, 1991). Процентная идентичность, на которую ссылаются здесь, является такой, как определено с использованием BLAST версии 2.1.3 с использованием параметров по умолчанию, указанных в NCBI (Национальный центр биотехнологической информации; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [Матрица Blosum 62; штраф за внесение делеции=11 и штраф за продолжение делеции=1].

Предпочтительно, фрагмент содержит по меньшей мере четыре последовательных аминокислоты из контрольной последовательности, более предпочтительно, по меньшей мере 5, более предпочтительно, по меньшей мере 6, более предпочтительно, по меньшей мере 7, более предпочтительно, по меньшей мере 8 последовательных

25 аминокислот из контрольной последовательности, такой как последовательность ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 или 6, хотя более длинные фрагменты по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 225 и вплоть до по меньшей мере 250 аминокислот также являются предпочтительными. Фрагменты также включают усеченные пептиды,

30 обладающие х аминокислотами, делетированными с N-конца и/или C-конца. В таких усечениях х может представлять собой 1 или более (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более), но предпочтительно менее чем 150.

Без связи с теорией, считают, что НОХС4 секретируется через неклассический путь, без необходимости в сигнальной последовательности. Таким образом, считают, что последовательность, приведенная в последовательности ID NO. 1, является такой же

35 самой, как белок, обнаруженный в сыворотке. Это подтверждается наблюдением, что детектируемая полоса обладает размером (Mw), соответствующим предсказанному размеру, основанному на последовательности гена. Белки НОХ могут также покидать

40 клетки посредством других механизмов, например, лизиса клеток.

Термин «биомаркер» используют повсеместно в данной области, и он означает отличительный биологический или имеющий биологическое происхождение показатель процесса, события или состояния. Иными словами, биомаркер является

45 показателем конкретного биологического состояния, такого как присутствие раковой ткани. В некоторых случаях различные формы биомаркеров могут являться показателями конкретных состояний заболевания, однако, без связи с теорией, считают, что просто присутствие повышенных уровней пептида НОХС4 или его

фрагмента в жидкостях организма, таких как сыворотка, является показателем рака предстательной железы. Хотя в настоящее время не предусмотрено, что различные гликоформы, например, пептида НОХС4 секретируются, тем не менее, они охвачены

50 настоящим изобретением. Например, различные гликоформы, такие как с измененной структурой гликоформы или содержанием сахара, могут еще определить для НОХС4,

но они также являются охваченными и даже могут также являться показателями прогрессирования рака предстательной железы. Усечения, мутации или делеции пептида НОХС4 или его фрагмента или присоединения к нему или его фрагменту, также предусмотрены.

Однако принципиальным открытием, лежащим в основе настоящего изобретения, является то, что существует значительное увеличение уровня НОХС4, которое можно детектировать в жидкостях организма, таких как сыворотка. Считают, что НОХС4 секретируется, но предусматривают, что это может быть обусловлено тем, что белок НОХС4 вытекает из умирающих клеток. Подобным образом, EN-2 может секретироваться, или его можно детектировать в жидкостях организма из-за вытекания из разрушенных или мертвых клеток. Такие увеличенные уровни являются показателями рака предстательной железы как на ранней стадии, так и на поздней стадии. В то время как существует значительное повышение между контрольным или нормальным уровнями и ранней стадией рака предстательной железы, существует также очень значительное увеличение между ранней и поздней стадией рака предстательной железы. В широком смысле, представляет собой преимущество по настоящему изобретению то, что можно детектировать вещество, а также состояние рака предстательной железы. Это облегчает прогноз и обеспечение соответствующих видов терапии.

Преимуществом настоящего изобретения является то, что оно способно отличать такие состояния, как доброкачественная гиперплазия предстательной железы ВТН (ВРН). Такие состояния, которые приводят к увеличению предстательной железы, можно неправильно интерпретировать как рак предстательной железы с использованием разработанных способов для определения наличия рака предстательной железы, таких как пальцевое ректальное исследование (DRE). Другим преимуществом настоящего изобретения является то, что точный диагноз можно предоставить без обращения к неприятным и потенциально опасным инвазивным процедурам, которые также могут являться неточными. Более того, настоящее изобретение является особенно чувствительным. Предпочтительно, способами по настоящему изобретению можно детектировать появление рака предстательной железы ранее любого другого способа детекции и ранее появления выраженных симптомов рака предстательной железы. Таким образом, рак можно лечить на ранней стадии, когда он является более чувствительным к такому лечению и менее вероятно войдет в стадию метастазирования.

Известны различные типы рака предстательной железы. Наиболее распространенный начинается в клетках предстательной железы и является известным как аденокарцинома предстательной железы. Однако существуют другие формы рака предстательной железы, такие как саркомы, мелкоклеточные карциномы и переходноклеточные карциномы. Способы по изобретению можно использовать для детекции появления любого из этих типов рака, хотя детекция аденокарциномы является предпочтительной.

Прогрессирование рака мониторируют способом разделения на стадии. Это показывает, насколько хорошо развился рак и распространился ли он. Баллы продвигаются от одного до четырех, где прогноз постепенно ухудшается на каждой стадии.

Стадия один: Злокачественные клетки заключены в предстательной железе; они не распространяются до лимфатических узлов или других органов; баллы по шкале Глисона составляют между двумя и четырьмя, и менее пяти процентов предстательной

железы состоит из растущей опухоли.

Стадия два: Баллы по шкале Глисона составляют пять или выше, или для более чем пяти процентов железы показан аномальный рост; рак еще ограничен предстательной железой.

Стадия три: Злокачественные клетки распространяются до семенных пузырьков, но не до лимфатических узлов или других органов.

Стадия четыре: Поражены лимфатические узлы, ткани таза или более отдаленные органы.

Предпочтительно, способами по изобретению детектируют появление рака предстательной железы до или во время стадии один или стадии два, более предпочтительно, стадии один.

Пептидные биомаркеры по настоящему изобретению можно использовать в способах диагностики, например, для клинического скрининга и в способах прогностической оценки, мониторинга результатов терапии, идентификации пациентов, с наиболее вероятным ответом на конкретное терапевтическое лечение, для скрининга и разработки лекарственных средств. Более того, биомаркеры по настоящему изобретению и их применения являются полезными для идентификации новых видов лечения лекарственными средствами и для обнаружения новых мишеней для лечения лекарственными средствами.

Таким образом, в следующем аспекте, изобретение относится к способу диагностики или мониторинга прогрессирования рака предстательной железы, включающему детекцию и/или количественное определение по меньшей мере одного гомеодоменсодержащего фактора транскрипции, такого как пептид NOX или пептид EN-2 или их фрагмент. Предпочтительно, пептид содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или состоит из нее. Предпочтительно, по меньшей мере один пептид NOX, пептид EN-2, или их фрагмент, присутствует в биологическом образце от тестируемого субъекта. Указанный биологический образец предпочтительно представляет собой образец жидкости организма.

Жидкость организма может представлять собой любую жидкость организма человека, включая клеточную жидкость, цереброспинальную жидкость (CSF), сперму, мочу, кровь, лимфу или слюну. Однако является особенно предпочтительным, чтобы жидкость организма представляла собой цельную кровь, в частности сыворотку крови, или мочу. Является предпочтительным также, чтобы жидкость организма в основном или полностью не содержала целых/интактных клеток. Предпочтительно, жидкость организма не содержит тромбоцитов и клеточного дебриса (такого как полученный при лизисе клеток). Предпочтительно, жидкость организма не содержит как прокариотических, так и эукариотических клеток.

Такие жидкости можно получать посредством любого числа способов, известных в данной области, таких, какие будут очевидными специалисту в данной области.

Например, образец мочи легко доступен, в то время как образцы крови или сыворотки можно получить парентерально, например, с использованием иглы и шприца. Не содержащие клеток или в основном не содержащие клеток образцы можно получить, подвергая жидкость организма обработке различными способами, известными специалистам в данной области, которые включают в качестве неограничивающих примеров центрифугирование и фильтрацию.

Хотя, как правило, предпочтительно не использовать инвазивных способов для получения образца, тем не менее, может быть предпочтительным получение таких

образцов, как гомогенаты тканей, срезы тканей и биоптаты.

Способы мониторинга по настоящему изобретению можно использовать для детекции появления, прогрессирования, стабилизации, улучшения и/или ремиссии рака предстательной железы. Таким образом, детекцию по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагмента, можно использовать для определения прогрессирования заболевания, чтобы указывать врачу на конкретное лечение.

Предпочтительно, обеспечивают по меньшей мере две стадии детекции и/или количественного определения, предпочтительно, разделенные по времени, например несколькими сутками, неделями, годами или, более предпочтительно, месяцами, для определения, изменились ли уровни по меньшей мере одного пептида НОХ, или EN-2, или их фрагмента, таким образом, показывая, присутствовало ли изменение в прогрессировании рака. Это позволяет делать сравнения между уровнем биомаркера в образцах, взятых на двух или более приемах, так как увеличение уровня пептида в течение времени является показателем появления или прогрессирования рака, в то время как уменьшение уровня пептида может указывать на улучшение и/или ремиссию рака.

Предпочтительно, способ диагностики или мониторинга в соответствии с настоящим изобретением включает сравнение уровня пептида, присутствующего в тестируемом образце, с уровнем в одном или нескольких контролях.

Предпочтительно, контроли могут происходить от того же самого пациента, из предыдущего образца, чтобы таким образом мониторировать появление или прогрессирование. Однако является предпочтительным также, чтобы контроли можно было нормализовать для популяции, в частности здоровой или нормальной популяции, без рака предстательной железы. Иными словами, контроль может состоять из уровня биомаркера, обнаруженного в нормальном контрольном образце от нормального субъекта.

Таким образом, представлен способ диагностики рака предстательной железы, включающий количественное определение или детекцию количества по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагмента, и сравнение количества указанного пептида в указанном тестируемом образце с количеством, присутствующим в нормальном биологическом образце от нормального субъекта или от того же самого субъекта задолго до возникновения заболевания. Если значительное увеличение уровня по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагмента обнаружено в тестируемом образце, это является показателем того, что заболевание либо прогрессирует, либо началось.

Как указано выше, этот способ детекции по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагмента является особенно полезным для детекции ранней стадии рака предстательной железы и является более чувствительным, чем общепринятый тест детекции уровней PSA. Таким образом, способы по изобретению являются особенно полезными для подтверждения рака, когда пациента тестируют как отрицательного по раку с использованием общепринятых способов, таких как детекция PSA.

В общем, уровень секреции по меньшей мере одного пептида НОХ или пептида EN-2 в жидкости организма лежит в диапазонах, описанных ниже.

Будет понятно, что термины «пептид» и «белок» являются взаимозаменяемыми, как используют их в настоящем описании, если не очевидно иное.

Например, в таблице 1 и на фигуре 1 показано очень значительное увеличение концентраций белка НОХС4 в сыворотке. В таблице 2 и на фигуре 2 показаны сходные

результаты для НОХВ6. Авторы настоящего изобретения также показали, что НОХВ6 является биомаркером поздней стадии рака предстательной железы (данные не представлены). НОХВ5 также является биомаркером, однако он является менее предпочтительным, чем НОХВ6 или НОХС4 (Таблица 3 и фигура 7). Другие

альтернативные биомаркеры включают НОХА3 и НОХД9 (смотри фигуру 8).
Предпочтительно, увеличение является статистически значимым, определенным с использованием общепринятых способов, таких как «t-тест» при условии доверительных интервалов предпочтительно, по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 85%, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95%, более предпочтительно, по меньшей мере 97%, более предпочтительно, по меньшей мере 99%, более предпочтительно, по меньшей мере 99,5%, более предпочтительно, по меньшей мере 99,95% и, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 99,99%.

Предпочтительно, увеличение между контролем и образцом, показательное для ранней стадии рака предстательной железы, составляет приблизительно 110-200%, более предпочтительно, приблизительно 120-180%, более предпочтительно, приблизительно 130-160%, более предпочтительно, приблизительно 140-150%, более предпочтительно, приблизительно 110-140%, более предпочтительно, 115-130%, более предпочтительно, приблизительно 120-130%, более предпочтительно, приблизительно 120-140% и, наиболее предпочтительно, приблизительно 125%.
Предусматривают также другие комбинации вышеуказанных конечных точек.

По отношению к определению рака на поздней стадии или прогрессирующего рака, увеличение между контролем и образцом, показательное для указанной поздней стадии рака предстательной железы, составляет приблизительно 400-800%, более предпочтительно, приблизительно 450-750%, более предпочтительно, приблизительно 500-700%, более предпочтительно, приблизительно 520-680%, более предпочтительно, приблизительно 540-640%, более предпочтительно, приблизительно 550-620%, более предпочтительно, приблизительно 560-600%, более предпочтительно, приблизительно 570-590% и, наиболее предпочтительно, приблизительно 580%. Увеличение может также лежать в диапазоне 550-800% или 400-600%.
Предусматривают также другие комбинации вышеуказанных конечных точек.

Увеличение между раком на ранней и на поздней стадии можно измерять по сравнению с нормальным (т.е. свободным от рака) контролем или с образцом на ранней стадии или контролем от того же самого пациента. По отношению к образцу на ранней стадии, предпочтительным является увеличение приблизительно между 100% и 300%, более предпочтительно, приблизительно между 150% и 250%, более предпочтительно, приблизительно между 175% и 225%, более предпочтительно, приблизительно между 185% и 215%, более предпочтительно, приблизительно между 100% и 220%, более предпочтительно, приблизительно между 170% и 300% и, наиболее предпочтительно, приблизительно 200%.

Как упомянуто выше, когда в настоящем документе ссылаются на по меньшей мере один гомеодоменсодержащий пептид, это относится к пептидам НОХ, таким как НОХС4, НОХВ6, НОХВ5, НОХА3 и НОХД9, и к пептиду EN-2, если не очевидно иное.

Когда в настоящем документе ссылаются на по меньшей мере один пептид НОХ или пептиды НОХ, это относится к НОХС4, НОХВ6, НОХВ5, НОХА3 и НОХД9, в частности, так же как к другим пептидам НОХ, перечисленным ниже, если не очевидно иное.

В терминах абсолютных количеств по меньшей мере одного белка НОХ или EN-2 на мл жидкости организма, предпочтительно, сыворотки, это составляет предпочтительно приблизительно 0,5-1,5 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 0,75-1,25 нг/мл и, наиболее предпочтительно, приблизительно 1,0 нг/мл для контрольных образцов. Для образцов на ранней стадии рака, предпочтительные диапазоны составляют приблизительно 2,0-5,0 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 2,5-4,5 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 2,5-4,0 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 2,75-3,5 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 2,75-3,0 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 2,0-3,5 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 2,0-3,0 нг/мл и, наиболее предпочтительно, приблизительно 3,0 нг/мл.

Для образцов на поздней стадии рака предпочтительные диапазоны составляют приблизительно 6,0-20 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 8,0-15 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 8,5-13 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 9,0-12 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 9,5-11 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 7-13 нг/мл, более предпочтительно, приблизительно 8,5-16 нг/мл и, наиболее предпочтительно, приблизительно 10 нг/мл.

Термин «диагноз» относится к идентификации, подтверждению, и/или характеристике присутствия или отсутствия рака предстательной железы, вместе со стадией его развития, такой как ранняя стадия или поздняя стадия, или доброкачественной или метастазирующей опухоли предстательной железы.

Следует понимать, что характер состояний ракового заболевания «на ранней стадии» и «на поздней стадии» может определить врач. Предусматривают также, что они могут относиться к неметастазирующим и метастазирующим соответственно.

Изобретение относится также к способу мониторинга эффективности лечения рака предстательной железы, включающему детекцию и/или количественное определение по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагмента, присутствующих в биологическом образце от субъекта. Как указано выше, может являться предпочтительным получение двух образцов, разделенных по времени, например парой месяцев, чтобы определить, присутствует ли какой-либо прогресс в лечении, иными словами, увеличились или уменьшились ли уровни по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагмента. Уменьшение уровней указанных по меньшей мере одного пептида НОХ или пептида EN-2 показывает, что заболевание регрессирует и, таким образом, режим лечения является успешным. Такой мониторинг заболевания будет быстро показывать, отвечает ли пациент на лечение или является устойчивым к лечению. В последнем случае можно обеспечить альтернативное лечение. Таким образом, такой способ обеспечивает быстрые показатели того, является ли режим лечения эффективным, и позволяет врачу изменять такой режим, если эффекта для пациента не наблюдают.

В способе по настоящему изобретению является предпочтительным, чтобы количество пептида или его фрагмента в тестируемом образце сравнивали с количеством, присутствующим в одном или нескольких контролях(контроле) и/или в одном или нескольких предыдущих тестируемых образцах(образце), взятых в более раннее время от указанного одного и того же тестируемого субъекта. Промежуток времени между более ранними и более поздними образцами может составлять только несколько суток, однако может составлять вплоть до нескольких месяцев или даже нескольких лет, и его может определить врач на основании прогрессирования заболевания и истории болезни пациента. Альтернативно, контроль может

представлять собой тестируемый образец от не имеющего заболевания пациента.

Пептид или его фрагмент детектируют посредством подтверждения присутствия указанного биомаркера. Количественное определение количества биомаркера, присутствующего в образце, предпочтительно, включает определение концентрации пептидного биомаркера в образце. Стадии детекции и/или количественного определения можно проводить непосредственно в образце или опосредованно в экстракте из него или в его разведении.

Настоящее изобретение относится к биомаркерам, и следует понимать, что необходимо, чтобы они поддавались детекции в жидкости организма. Некоторые члены семейства НОХ могут не поддаваться детекции в жидкости организма и, таким образом, не являются биомаркерами в соответствии с настоящим изобретением.

Поддающиеся детекции уровни по меньшей мере одного пептида НОХ, пептида EN-2 или их фрагментов обсуждают в других местах, однако следует понимать, что может существовать ряд причин, почему пептид НОХ, пептид EN-2 или их фрагменты не поддаются детекции. Без связи с теорией, одной причиной может являться то, что пептид деградирует в жидкости организма, т.е. не является «стабильным».

Таким образом, является предпочтительным, чтобы по меньшей мере один пептид НОХ, пептид EN-2 или их фрагменты по существу не деградировали и/или еще поддавались детекции (т.е. присутствовали в поддающихся детекции концентрациях) на периферии организма, т.е. в вене близко к поверхности кожи, предпочтительно, на руке, откуда можно более легко получить их образец.

Пептид может высвобождаться в жидкость организма, либо посредством разрушения клеток или вытекания из них, либо посредством секреции.

Детекцию и/или количественное определение по меньшей мере одного пептида НОХ, или пептида EN-2, или их фрагментов можно осуществлять любым способом, подходящим для детекции присутствия и/или количества специфического белка или пептида в биологическом образце. Это можно осуществлять прямой детекцией биомаркера, например, посредством MALDI-TOF или SELDI.

Однако является также предпочтительным, чтобы по меньшей мере один пептид НОХ, или пептид EN-2, или их фрагмент детектировали напрямую или опосредованно через взаимодействие с лигандом или лигандами. Такие лиганды могут включать антитело против НОХ или против EN-2 или его связывающий фрагмент, аптамер или олигонуклеотид. Следует понимать, что эти лиганды должны являться способными специфически связывать пептид НОХ, или пептид EN-2, или их фрагмент. Они могут являться подходящим образом мечеными и содержать аффинную метку. Подходящие метки могут являться флуоресцентными, радиоактивными или люминесцентными. Метки можно присоединять к антителу напрямую или через линкер.

Например, детекцию и/или количественное определение можно осуществлять одним или несколькими способами, выбранными из группы, состоящей из: MALDI-TOF, SELDI, систем анализа на основе 1-D или 2-D гелей, жидкостной хроматографии, способов объединенной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Последние могут включать, предпочтительно, ICAT®, или iTRAQ® (оба доступны из Applied Biosystems, USA).

Способы жидкостной хроматографии могут включать HPLC (жидкостную хроматографию высокого давления) или даже жидкостную хроматографию низкого давления (LPLC). Более того, предпочтительными являются также такие способы, как тонкослойная хроматография, ЯМР-спектроскопия и любой другой способ,

описанный здесь.

Пептид или его фрагмент можно детектировать и/или оценивать количественно с использованием иммунологических способов, таких как сэндвич-иммуноанализы, например твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунные анализы (RAI), иммуноферментные анализы (EIA), Вестерн-блоттинг, иммунопреципитация. Предпочтительными являются также иммуноанализы на основе частиц, которые могут включать, например, использование частиц золота, серебра или латекса, магнитных частиц или Q-dot. Такие способы можно осуществлять, например, в формате планшета для микротитрования или полосы или на «чипе».

Особенно предпочтительными являются ELISA, включающие антитела, специфичные по меньшей мере для одного пептида НОХ или EN-2. Антитело или антитела против НОХ или против EN-2 предпочтительно являются связанными, либо непосредственно, либо через линкер, с репортерной молекулой, такой как радиоактивный изотоп, флуоресцентная молекула, люминесцентная молекула или фермент. Одним примером предпочтительного фермента является щелочная фосфатаза, доступная из Invitrogen, UK, хотя в данной области известны другие репортеры.

Пример антитела против НОХС4 человека доступен из Abeam, UK, каталожный no. ab24338. Это антитело кролика против НОХС4 человека, и, таким образом, может являться предпочтительным использовать вторичное антитело против IgG кролика, связанное с репортером, таким как щелочная фосфатаза, для детекции комплекса НОХС4-антитело. Примером антитела против НОХВ6 является антитело из Abeam, каталожный no. ab26077. Примером антитела против НОХВ5 является антитело из Abeam, каталожный no. ab26079. Примером антитела против НОХА3 является антитело из Abeam, каталожный no. ab28771. Примером антитела против НОХД9 является антитело из Abeam, каталожный no. ab60708. Известны примеры других антител против НОХ. Примером антитела против EN-2 является антитело из Abeam, каталожный no. ab45867.

Способы Вестерн-блоттинга также являются предпочтительными, в частности, из-за того, что они могут предоставлять данные денситометрии.

Подходящие сравнительные уровни присутствия по меньшей мере одного пептида НОХ или EN-2, достаточные для различения между контролем, раком на ранней стадии и на поздней стадии или их сочетаниями обсуждают выше.

Когда используют антитела, они могут представлять собой поликлональные, моноклональные, биспецифические, гуманизированные или химерные антитела. Антитела могут состоять из одной цепи, однако будут предпочтительно состоять из по меньшей мере легкой цепи или тяжелой цепи, однако следует понимать, что по меньшей мере одна определяющая комплементарность область (CDR) является необходимой, чтобы связывать эпитоп НОХ или эпитоп EN-2.

Конечно, следует также понимать, что эпитоп или эпитопы должны являться доступными для связывания или узнавания лигандом, таким как антитело. Антитела против НОХ и против EN-2 уже известны, однако, если потребуются другие антитела или связывающие лиганды с различными специфичностями, их можно получить. Способы получения антител известны в данной области. Например, если поликлональные антитела являются желательными, тогда выбранного млекопитающего, такого как мышь, кролик, коза или лошадь, можно иммунизировать выбранным антигеном, таким как НОХ или EN-2 человека. Затем сыворотку от иммунизированного животного собирают и обрабатывают для получения антитела,

например, посредством иммуноаффинной хроматографии. НОХ или EN-2 человека можно, например, инъектировать кроликам, запуская иммунный ответ кролика, вызывающий образование антител против НОХ или против EN-2, которые таким образом можно выделить с использованием общепринятых способов.

Конечно, моноклональные антитела можно получить способами, известными в данной области, и они, как правило, являются предпочтительными. Хорошо известен общий способ получения моноклональных антител с использованием способа гибридомы (смотри, например, Kohler, G. and Milstein, C, Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor et al, Immunology Today 4: 72 (1983); Cole et al, 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Таким образом, антитело, как обозначают здесь, должно состоять из связывающей эпитоп области, такой как CDR. Как используют в настоящем описании, термин «антитело» относится к интактным молекулам, так же как к их фрагментам, таким как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, которые являются способными связывать эпитоп. Предпочтительно, антитело содержит также эффекторную часть, такую как область Fc.

Антитело может принадлежать к любому подходящему классу, включая IgE, IgM, IgD, IgA и, в частности, IgG. Предусматривают также различные подклассы этих антител.

Таким образом, является также предпочтительным использовать биосенсор для детекции по меньшей мере одного пептидного биомаркера или его фрагмента. Биосенсор может включать иммунологический способ, как описано выше, например, для детекции биомаркера, или электрические, термические, магнитные, оптические, например голограмму, или акустические средства или способы. Предусматривают, что с использованием таких биосенсоров биомаркер детектируют и/или определяют количественно. Таким образом, в следующем аспекте, настоящее изобретение относится к использованию биосенсора для детекции и/или количественного определения пептида или его фрагмента.

Предпочтительно, по меньшей мере один биомаркер НОХ или EN-2 можно детектировать с использованием биосенсора на основе «умных» голограмм или высокочастотных акустических систем, в частности, поскольку такие системы пригодны для конфигураций массива. Например, с помощью сенсоров с умными голограммами, доступными из Smart Holograms Limited, Cambridge UK, голографическое изображение сохраняют на тонкой полимерной пленке, которую сенсibiliзируют для специфической реакции с биомаркером. При экспонировании биомаркер реагирует с полимером, приводя к изменению изображения, отображаемого на голограмме. На выводе данных теста можно видеть изменение видимой яркости, изображения, цвета и/или положения изображения. Это можно считать даже визуально.

Следует понимать, что является предпочтительным, чтобы биосенсоры, способные детектировать и/или количественно определять по меньшей мере один биомаркер НОХ или EN-2, сочетали биомолекулярное узнавание с подходящими средствами для перевода детекции присутствия или количественного определения указанного биомаркера в образце в поддающийся детекции сигнал. Например, печатные узнающие элементы, тонкопленочные транзисторные технологии, магнитоакустические резонаторные устройства и другие новые акустико-электрические системы можно предпочтительно использовать в существующем биосенсоре для детекции и/или количественного определения по меньшей мере одного

биомаркера НОХ или EN-2. Предпочтительно, биосенсор по изобретению будет детектировать один или несколько из предпочтительно, двух, трех, четырех, пяти или всех шести из НОХС4, НОХВ5, НОХВ6, НОХА3, НОХД9 и EN-2. Дополнительные предпочтительные биосенсоры могут также дополнительно детектировать другие

биомаркеры НОХ, как указано выше.

Предпочтительно, биосенсор включает лиганд и/или антитело, как обсуждают выше. Биосенсор можно предоставлять на подходящем массиве или «чипе», так что биосенсор является способным специфически связывать по меньшей мере один пептид НОХ, или пептид EN-2, или их фрагмент и предоставлены средства для детекции. Подходящие средства для детекции обсуждают выше, однако они могут включать репортерные системы, такие как щелочная фосфатаза, или умные голограммы, способные предоставлять пользователю поддающийся детекции сигнал, чтобы показать, что достигнуто специфическое связывание по меньшей мере одного пептида НОХ, или EN-2, или его фрагмента и, предпочтительно, показатель концентрации НОХ или EN-2 или число событий специфического связывания, которое произошло на указанном массиве или чипе.

Кроме того, настоящее изобретение относится к наборам для указанной детекции и/или количественного определения. Такие наборы являются применимыми для диагностики и/или мониторинга рака предстательной железы. Таким образом, такие наборы будут предпочтительно содержать биосенсор, такой как лиганд, предпочтительно, антитело, способный специфически связывать по меньшей мере один пептид или его фрагмент, и средства, чтобы показывать указанное специфическое связывание пользователю, например, с использованием репортерной системы, как описано в настоящем описании. В частности, указанные наборы включают массив или чип.

В дополнительном аспекте изобретение относится к использованию биосенсора, предпочтительно, лиганда и, наиболее предпочтительно, антитела, способного к специфическому связыванию и узнаванию по меньшей мере одного пептида НОХ, или EN-2, или их фрагмента для идентификации вещества, способного супрессировать образование по меньшей мере одного пептида НОХ, или EN-2, или его фрагмента. Предпочтительно, это вещество способно супрессировать продукцию биомаркера при раке предстательной железы. Иными словами, лиганд можно использовать для определения, по эффективности или иным образом, предполагаемого или разработанного лечения против рака предстательной железы.

Таким образом, способ детекции эффективности предполагаемого лечения против рака может включать стадии:

- (a) инкубации целой клетки, экспрессирующей пептид НОХ или пептид EN-2, и детекции количества высвободившегося пептида НОХ или пептида EN-2,
- (b) обработки клетки с помощью предполагаемого лечения против рака,
- (c) детекции количества пептида НОХ или пептида EN-2, высвободившегося после обработки, и
- (d) сравнения количества пептида НОХ или пептида EN-2, высвободившегося как до, так и после обработки, чтобы увидеть, оказало ли предполагаемое лечение против рака эффект на количество высвободившегося пептида.

Альтернативно, способ может включать стадии:

- (a) инкубации меченого лиганда с целой клеткой, экспрессирующей пептид НОХ или пептид EN-2 на поверхности клетки, или с мембраной клетки, содержащей пептид НОХ или пептид EN-2,

(b) измерения количества меченого лиганда, связанного с целой клеткой или с мембраной клетки;

(с) добавления предполагаемого противоракового средства к смеси меченого лиганда и целой клетки или мембраны клетки со стадии (а) и позволения смеси

(d) измерения количества меченого лиганда, связанного с целой клеткой или с мембраной клетки после стадии (с); и

(е) сравнения разницы в количестве меченого лиганда, связавшегося на стадии (b) и (d), так что соединение, которое вызывает уменьшение связывания на стадии (d), считают ингибитором экспрессии НОХ или EN-2 и, таким образом, противораковым средством.

Например, в таком анализе можно использовать линию клеток, такую как линия клеток карциномы предстательной железы LNCaP. Клетки LNCaP можно выращивать в присутствии или в отсутствие предполагаемого или разработанного противоракового средства и сравнивать относительную экспрессию EN-2. Более низкий уровень экспрессии EN-2 будет указывать на лучшую противораковую активность. Уровни экспрессии можно детектировать посредством детекции продуцированного белка (т.е. конечного продукта) или посредством детекции продуцированной РНК (т.е. промежуточного продукта). Способы детекции белкового продукта обсуждают выше. РНК можно детектировать с использованием, например, количественной ПЦР или массива олигонуклеотидов.

Вышеуказанное также относится к способам и наборам по настоящему изобретению.

Другие способы или наборы для использования в соответствии с настоящим изобретением будут очевидны специалисту в данной области. Они могут включать, например, системы детекции биомаркеров, описанные в US-2006-014301, US-2004-063216, WO 01/92879 и WO 02/054936.

Таким образом, настоящее изобретение можно использовать для идентификации новых способов лечения против рака предстательной железы, где уровни по меньшей мере одного пептида НОХ, или EN-2, или их фрагмента детектируют и/или определяют количественно в присутствии или в отсутствие предположительного противоракового средства, чтобы определить его эффективность. Настоящее изобретение можно использовать также в способе технологий высокопроизводительного скрининга, например, в формате конфигурированного массива, такого как чип или многолуночный массив.

Поскольку рак предстательной железы представляет собой связанное с мужским полом заболевание, следует понимать, что субъект или пациент является мужчиной.

Описание фигур

Фигура 1: Пример Вестерн-блоттинга для поиска белка НОХС4 в сыворотке. Результаты проанализированы также денситометрией и представлены как среднее для всех шести образцов из каждой группы. Планки погрешностей представляют стандартную ошибку среднего. Эти данные показывают, что НОХС4 потенциально является специфическим и точным диагностическим маркером рака предстательной железы как на ранних, так и на поздних стадиях заболевания.

Фигура 2: Детекция НОХВ6 у шести пациентов на ранней стадии рака предстательной железы, опухоли которых являются небольшими и ограниченными предстательной железой, и у шести совпадающих по возрасту контролей.

Фигура 3: (а) Анализ RT-QPCR экспрессии EN-2 в LNCaP и первичных клетках

опухоли (уровень транскрипта как процент от β -актина). (b,c) Пункционный биоптат аденокарциномы предстательной железы, окрашенный антителом против En2.

Положительное по En2 окрашивание (коричневое) присутствует в цитоплазме опухолевых клеток, с наиболее сильным окрашиванием на границе просвета (1).

Видны положительные по En2 пузырьки, присоединенные к границе просвета (2) или свободные внутри просвета (3). Ядра окрашены голубым. Увеличение: (a) x100, (b) x60.

Фигура 4: Срезы через пункционные биоптаты ТМА (a) нормальной ткани предстательной железы, (b) доброкачественной гипертрофии предстательной железы, и (c и d) злокачественной опухоли предстательной железы. Окрашивание EN-2 (коричневое) присутствует в стромальных клетках (закрашенные белым стрелки) и в железах, где наиболее сильное окрашивание наблюдается на границе просвета (закрашенное острие стрелки). Ядра окрашены голубым. Увеличение: (a-c) x60, (d) x100.

Фигура 5: Детекция белка EN-2 в культуральной среде Вестерн-блоттингом.

Фигура 6: Белок EN-2 в моче. Мочу собирали от индивидуумов, обследуемых по симптомам, соответствующим раку предстательной железы, и подвергаемых скринингу по присутствию белка EN-2. Присутствие или отсутствие рака тестировали биопсией. Предсказанная MW EN-2 составляет 30 кДа, однако вторую полосу 33 кДа также детектировали в положительном контроле (экстракт мозжечка мыши).

Полоса 30 кДа присутствует исключительно в моче 50% пациентов с наличием клеток рака предстательной железы в их биоптатах (C Ra), она не присутствует у пациентов с отрицательными биоптатами или с доброкачественной гипертрофией предстательной железы (BHP) или с интраэпителиальной неоплазией высокой степени злокачественности (HGPIN).

Фигура 7: Детекция NOXB5 у трех пациентов с раком предстательной железы на ранней стадии, где опухоли являются небольшими и ограниченными предстательной железой, у трех пациентов с раком предстательной железы на поздней стадии и у трех совпадающих по возрасту контролей.

Фигура 8: Уровни экспрессии различных генов NOXA и NOXD в опухолевой ткани по сравнению с нормальной прилегающей тканью. DU145 и PC3 представляют собой линии клеток, происходящих из опухолей предстательной железы.

Пример 1 **НОХС4**

Сыворотку получали от шести пациентов с прогрессирующим, устойчивым к гормонам раком предстательной железы, шести пациентов с раком предстательной железы на ранней стадии, опухоли которых являются небольшими и ограничены предстательной железой, и от шести совпадающих по возрасту контролей. Ее обессоливали и фракционировали с использованием 12,5% геля PAGE/SDS. Белок НОХС4 человека (UniProtKB/Swiss-Prot, входной номер P09017) детектировали с использованием вестерн-блоттинга с антителом кролика против НОХС4 человека (Abcam, UK, каталожный номер ab24338), вместе с вторичным антителом против IgG кролика, связанным с щелочной фосфатазой (Invitrogen, UK). С использованием этого способа авторы настоящего изобретения детектировали высокие уровни белка НОХС4 в сыворотке всех пациентов с раком предстательной железы, но только очень низкие уровни в сыворотке совпадающих по возрасту контролей (Фиг. 1).

Результаты показаны ниже в таблице 1.

НОХС4 можно использовать как основу диагностического и/или прогностического

теста для рака предстательной железы с использованием стандартного способа анализа, такого как ELISA. Тест будет включать использование антитела против НОХС4, связанного с репортером, таким как щелочная фосфатаза, для количественного определения количества белка НОХС4 в образцах сыворотки пациентов. Можно использовать также другие способы, включая Вестерн-блоттинг. Количество белка НОХС4 будет предоставлять показатель как для того, присутствует ли заболевание, так и для стадии, какой оно достигло.

Таблица 1						
Наименование геля: НохС4 blot 131006 (Raw 1-D Изображение)						
Индекс	Наименование	Пациент	Диагноз	Объем OD*мм ²	Прилегающий объем OD*мм ²	% прилегающего объема
1	U1	HR29	Рак	6,844796	0,272431	24,320686
2	U2	HR28	Рак	6,460027	0,092836	8,2877258
3	U3	HR27	Рак	9,731784	0,393355	35,115964
4	U4	SR5	Рак на ранней стадии	6,108735	0,086538	7,7255409
5	U5	SR2	Рак на ранней стадии	6,26387	0,01121	1,0007083
6	U6	SRI	Рак на ранней стадии	8,427193	0,15222	13,589161
7	U7	VR30	Здоровый	6,459172	0,045458	4,0581642
8	U8	VR23	Здоровый	9,760506	0,062926	5,6175665
9	U9	VR21	Здоровый	6,740683	0,003187	0,2844833
Мембраны инкубировали с первичным антителом в течение только 1 часа						
Средние значения						% увеличен ия
				sd	sem	
Контроль			0,037190112	0,030716	0,0177548	0
Рак на ранней стадии			0,08332277	0,07056	0,0407864	124,0455
Рак на поздней стадии			0,252873795	0,151211	0,0874053	579,949

SEQ ID NO. 1:

НОХС4 NCBI Инвентарный # P09017

```

1  MIMSSYLMDN NYIDPKFPFC EEYSQNSYIP EHSPEYYGRT RESGFQNNHQ ELYPPFPFRP
61  SYPERQYSCT SLQGPNGSRG HGPAQAGNNH PEKSQSLCEP APLSGASASP SPAPPACSQP
121 APDHPSSAAS KQPIVYPWMK KIHVSTVNPV YNGGEPKRSR AAYTRQVLE LEKEFHYNRY
181 LTRRRRIEIA HSLCLSERQI KIWFQNRMRK WKDHRPNT KVRSAAPPAGA APSTLSAATP
241 GTSEDHSQSA TPPEQQRAED ITRL

```

Пример 2

НОХВ6

Детекцию НОХВ6 в этих образцах осуществляли точно так же, как для НОХС4, за исключением того, что первичное антитело представляло собой антитело кролика против НОХВ6 человека (от Abeam, каталожный no. ab26077). Относительные значения для белка НОХВ6 оценивали денситометрией рентгеновской пленки (с использованием полос, локализованных с предсказанной для них молекулярной массой). Эти значения представляют собой оптическую плотность полосы относительно оптической плотности локального фона. Таким образом, следует понимать, что возможно отрицательное значение сравнительной денситометрии, как показано для совпадающих по возрасту контролей (АМС), хотя следует понимать, что это нельзя переносить на отрицательное количество белка НОХВ6.

Эти данные показаны графически на фигуре 2.

Таблица 2					
НОХВ6 в сыворотке					
Значения представляют собой относительную оптическую плотность полос					
			Среднее	sd	sem
AMC1	-0,02671	AMC	-0,09016	0,064043	0,036977
AMC2	-0,08899	Рак на ранней стадии	0,261033	0,076253	0,044026
AMC3	-0,15478				
Ранний1	0,182775				
Ранний2	0,33511				
Ранний3	0,265214				

SEQ ID NO. 2: НОХВ6 NCBI Инвентарный # P17509

```

1  MSSYFVNSTF PVTLASGOES FLGQLPLYSS GYADPLRHYP APYGPFGQD KGFATSSYYF
61  PAGGGYGRAA PCDYGPAPAF YREKESACAL SGADEQPPFH PEPRKSDCAQ DKSVFGETEE
121 QKCSTPVYPW MQRMNSCNSS SFGPSGRRGR QTYTRYQTLE LEKEFHYNRY LTRRRRIETA
181 HALCLTERQI KIWFQNRMK WKESKLLSA SQLSAEEEE KQAE

```

Пример 3

EN-2

С использованием количественной ПЦР (QPCR) тестировали уровни экспрессии EN-2 в линии клеток карциномы предстательной железы человека LNCaP (Horoszewicz et al., 1983). Это линия клеток, полученная из очага метастазирования аденокарциномы предстательной железы человека, и ее широко используют в качестве модели этого рака *in vitro*. Более того, экспрессию EN-2 тестировали в ткани, полученной из биоптатов опухолей предстательной железы. Оба образца экспрессировали EN-2. Первичные клетки опухоли экспрессировали также EN-2 в виде белка. Это можно детектировать на срезах аденокарцином предстательной железы (фиг. 3а). Окрашивание по EN-2 в этих срезах присутствует как в цитоплазматических, так и в ядерных компартментах, однако оно является наиболее интенсивным на границах просвета и в секреторных пузырьках, входящих в просвет (Фиг. 3b,c).

Для дополнительной проверки степени, в которой EN-2 присутствует в ткани из нормальной предстательной железы, доброкачественной гипертрофии и злокачественных опухолей, авторы настоящего изобретения окрашивали микромассив тканей (ТМА), содержащий репрезентативные срезы из каждой, с помощью антител против EN-2. Это подтвердило, что EN-2 сильно экспрессируется в озлокачествленных железах, особенно на границах просвета (Фиг. 4), хотя присутствует некоторое окрашивание в железах с нормальной и гипертрофированной тканью. Для всех тканей показали также окрашивание по EN-2 в стромальных клетках (Фиг. 4). Для количественного окрашивания в железах каждую ткань оценивали в баллах от 0 до 3, где 0 представляет отсутствие окрашивания, а 3 - наиболее сильное окрашивание. На этом основании железы с нормальной тканью (Фиг. 4а) оценивали со средним значением 0,5 (n=10, sd=0,52), с доброкачественной гиперплазией (Фиг. 4b) 0,67 (n=6, sd=0,51) и со злокачественными опухолями (Фиг. 4c&d) 2,3 (n=6, sd=0,52).

Эти данные ясно показывают, что EN-2 является экспрессированным в этих клетках рака предстательной железы.

Пример 4

Исследовали среду, окружающую LNCaP и первичные клетки опухоли

предстательной железы, для определения, может ли EN-2 секретироваться из этих клеток. Среду, использованную для культивирования обоих типов клеток в течение двух часов, обессоливали и концентрировали. Затем белки, содержащиеся в этом концентрате, разделяли в акриламидном геле. Вестерн-блоттинг выявил присутствие специфических для EN-2 полос в среде, окружающей оба типа клеток (Фиг. 5), и количественное определение с использованием стандартных количеств транскрибированного *in vitro* белка EN-2 показало, что количество EN-2 в среде, использованной для культивирования клеток LNCaP, составляло 3 нг/мл, в то время как первичные клетки опухоли продуцировали 1,75 нг/мл в течение 48 часов.

Пример 5

Образцы мочи получали от 17 индивидуумов, которых недавно подвергали биопсии и массажу предстательной железы. Обнаружили, что из этих индивидуумов 10 обладали раком по биопсии. Из других, двое обладали интраэпителиальной неоплазией высокой степени злокачественности (HGPIN), трое показали признаки доброкачественной гипертрофии, и двое не обладали злокачественными клетками в срезе биоптата. Пять из пациентов с диагнозом рак обладали большими количествами EN-2 в моче, в то время как ни один из образцов мочи индивидуумов без диагноза рак не содержал значительного количества белка EN-2 (Фиг. 6).

Пример 6

НОХВ5

Детекцию НОХВ5 в этих образцах осуществляли точно так же, как для НОХС4 и НОХВ6, за исключением того, что первичное антитело представляло собой антитело кролика против НОХВ5 человека (из Abcam, каталожный no. ab26079). Относительные количества для белка НОХВ5 оценивали по денситометрии рентгеновской пленки (с использованием полос, локализованных с предсказанной для них молекулярной массой). Эти значения представляют собой оптическую плотность полосы относительно оптической плотности локального фона.

Таблица 3
% увеличения

Средние
значения

		sd	sem	
АМС	0,006597	0,005948	0,003438	0
Рак на ранней стадии	0,244012	0,055004	0,031794	3598,808
Рак на поздней стадии	0,471597	0,154221	0,089145	7048,621

Эти данные представлены графически на фигуре 7.

Пример 7

Образцы мочи получали от 17 индивидуумов, у которых подозревали наличие рака предстательной железы и которым впоследствии поставили диагноз заболевания. Уровни белка EN2 в образцах мочи оценивали, как описано выше. Для образцов мочи 8 (47%) из этих индивидуумов показали увеличенные уровни EN2. В отличие от этого, в образцах мочи, полученных от 15 пациентов, у которых подозревали наличие рака предстательной железы, но у которых рак впоследствии не подтвердили, ни один (0%) не обладал увеличенными уровнями EN2. Заслуживает внимания тот факт, что 3 из пациентов с диагнозом рак предстательной железы, которые показали увеличенные уровни EN2 в образцах мочи, не обладали увеличенными уровнями PSA. Это иллюстрирует, что способы по изобретению являются эффективными для детекции рака при неудаче общепринятых способов детекции.

Пример 8

Детекция экспрессии генов НОХ в нормальной и опухолевой ткани.

Выделение РНК: РНК опухолевой и нормальной соседней ткани закупали из Ambion, USA. РНК из культур клеток выделяли с использованием мини-набора RNeasy (Qiagen, UK).

Синтез кДНК: Сначала РНК денатурировали нагреванием до 65°C в течение пяти минут. 1-5 мг РНК инкубировали в объеме 50 мкл при 37°C в течение одного часа с конечными концентрациями 10 мМ DTT, 1 мМ смеси dNTP, так же как 100 мкг/мл полиТ-праймеров, 200 единиц обратной транскриптазы (Invitrogen, USA) и 40 единиц RNASEout (Invitrogen, USA). Реакцию синтеза кДНК останавливали помещением пробирок на 65°C на пять минут.

ПЦР с детекцией в реальном времени: Полуколичественную RT-ПЦР осуществляли с использованием прибора для ПЦР с детекцией в реальном времени Stratagene MX4000. Stratagene MX4000 измеряет накопление продукта ПЦР во время экспоненциальной фазы реакции, до того как амплификация становится чувствительной к ограничению реагентов и изменчивости циклирования. Флуоресценция увеличивается в соответствии с увеличивающимися уровнями продукта ПЦР. Относительное количество каждого транскрипта определяли как соотношение с количеством транскрипта бета-актина в каждом образце.

Используемые праймеры перечислены в таблице 4 ниже.

Таблица 4

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
HOXA1	CTGGCCCTGGCTACGTATAA (SEQ ID NO: 7)	TCCAACCTTCCCTGTTTGG (SEQ ID NO: 8)
HOXA2	TTCAGCAAAATGCCCTCTCT (SEQ ID NO: 9)	TAGGCCAGCTCCACAGTTCT (SEQ ID NO: 10)
HOXA3	ACCTGTGATAGTGGGCTTGG (SEQ ID NO: 11)	ATACAGCCATTCCAGCAACC (SEQ ID NO: 12)
HOXA4	CCCTGGATGAAGAAGATCCA (SEQ ID NO: 13)	AATTGGAGGATCGCATCTTG (SEQ ID NO: 14)
HOXA5	CCGGAGAATGAAGTGGAAAA (SEQ ID NO: 15)	ACGAGAACAGGGCTTCTTCA (SEQ ID NO: 16)
HOXA6	AAAGCACTCCATGACGAAGG (SEQ ID NO: 17)	TCCTTCTCCAGCTCCAGTGT (SEQ ID NO: 18)
HOXA7	TGGTGTAATCTGGGGGTGT (SEQ ID NO: 19)	TCTGATAAAGGGGGCTGTTG (SEQ ID NO: 20)
HOXA9	AATAACCCAGCAGCCAACTG (SEQ ID NO: 21)	ATTTTCATCCTGCGGTTCTG (SEQ ID NO: 22)
HOXA10	ACACTGGAGCTGGAGAAGGA (SEQ ID NO: 23)	GATCCGGTTTTTCTCGATTCA (SEQ ID NO: 24)
HOXA11	CGCTGCCCCCTATACCAAGTA (SEQ ID NO: 25)	GTCAAGGGCAAAATCTGCAT (SEQ ID NO: 26)
HOXA13	GGATATCAGCCACGACGAAT (SEQ ID NO: 27)	ATTATCTGGGCAAAGCAACG (SEQ ID NO: 28)
HOXD1	TTCAGCACCAAGCAACTGAC (SEQ ID NO: 29)	TAGTGGGGGTGTTCCAGAG (SEQ ID NO: 30)
HOXD3	CAGCCTCCTGGTCTGAACTC (SEQ ID NO: 31)	ATCCAGGGGAAGATCTGCTT (SEQ ID NO: 32)
HOXD4	TCAAATGTGCCATAGCAAGC (SEQ ID NO: 33)	TCCATAGGGCCCTCCTACTT (SEQ ID NO: 34)
HOXD8	TCAAATGTTTCCGTGGATGA (SEQ ID NO: 35)	GCTCTTGGGCTTCCTTTTTTC (SEQ ID NO: 36)
HOXD9	TCCCCCATGTTTCTGAAAAG (SEQ ID NO: 37)	GGGCTCCTCTAAGCCTCACT (SEQ ID NO: 38)
HOXD10	GCTCCTTCACCACCAACATT (SEQ ID NO: 39)	AAATATCCAGGGACGGGAAC (SEQ ID NO: 40)
HOXD11	GGGGCTACGCTCCCTACTAC (SEQ ID NO: 41)	GCTGCCTCGTAGAACTGGTC (SEQ ID NO: 42)
HOXD12	CGCTTCCCCCTATCTCCTAC (SEQ ID NO: 43)	CTTCGGGCGCATAGAACTTA (SEQ ID NO: 44)
HOXD13	GGGGATGTGGCTCTAAATCA (SEQ ID NO: 45)	AACCTGGACCACATCAGGAG (SEQ ID NO: 46)

Результаты показаны на фигуре 8. С использованием этого способа HOXA3 и HOXD9 идентифицировали как потенциальные биомаркеры рака предстательной железы, так как эти гены обладают явно повышенной экспрессией в образцах опухолевых тканей.

Последовательность ID NO. 5 (HOXA3 полипептид)

MQKATYYDSSAIYGGYPYQAANGFAYNANQQPYPASAAALGADGE
 YHRPACSLQSPSSAGGHPKAHELSEACLRSLAPPSPPSLGEPLHPPPPQAAPPAP
 QPPQAPQPPAPTPAAPPSSASPPQNASNNPTPANAAKSPLLNSPTVAKQIFPWMK
 5 ESRQNTKQKTSSTSSSGESCAGDKSPPGQASSKRARTAYTSAQLVELEKEFHFNRYLCR
 PRRVEMANLLNLTERQIKIWFQNRMMKYKKDQKGKMLTSSGGQSPSRSPVPPGAGGY
 LNSMHSVLNSVPYEPQSPPPFSKPPQGTYGLPPASYPASLPSCAPPPPPQKRYTAAGA
 GAGGTPDYDPHAHGLQGNGSYGTPHIQGGSPVFGGSYVEPMSNSGPALFGLTHLPHAA
 SGAMDYGGAGPLGSGHHHGPGGPEPHPTYTDLTGHHPSQGRIQEAPKLTHL

Последовательность ID NO. 6 (HOXD9 полипептид)

MSSSGTSLNYYVDSLIGHEGDEVFAARFGPPGPGAQGRPAGVAD
 GPAATAAEFASCSFAPRSVFSASWSAVPSQPPAAAAMSGLYHPYVPPPLAASASEP
 GRYVRSWMEPLPGFPGGAGGGGGGGGGGPGRGPSPGPGPANGRHYGIKPETRAAPAP
 ATAASTTSSSTSLSSSSKRTECSVARESQGSSGPEFSCNSFLQEKAAAATGGTGPGA
 15 GIGAATGTGGSSEPSACSDHPIPGCSLKEEEKQHSQPQQQLDPNNPAANWIHARSTR
 KKRCPTYKYQTLELEKEFLFNMYLTRDRRYEVARILNLTERQVKIWFQNRMMKMKMS
 KEKCPKGD

Ссылки

20 Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A.H., Perez, F. and Prochiantz, A. (1996) Transcription factor hoxa-5 is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. *Mech. Dev.* 55, 111-117.

Cosgaya, J.M., Aranda, A., Graces, J. and Martin-Bianco, E. (1998) Neuronal differentiation of PC 12 cells induced by engrailed homeodomain is DNA-binding specific and independent of
 25 MAP kinases. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 16), 2377-2384.

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188-18193.

30 Garcia-Bellido, A. and Santamaria, P. (1972) Developmental analysis of the wing disc in the mutant Engrailed of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 72, 87-104.

Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M. and Prochiantz, A. (1998) Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr. Biol.* 8, 856-863.

35 Kuefer R, Hofer MD, Zorn CS, Engel O, Volkmer BG, Juarez-Brito MA, Eggel M, Gschwend JE, Rubin MA, Day ML. Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. *Br J Cancer.* 2005 Jun 6; 92(11): 2018-23.

40 Maizel, A., Bensaudé, O., Prochiantz, A. and Joliot, A. (1999) A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. *Development* 126, 3183-3190.

Martin, N.L., Saba-El-Leil, M.K., Sadekova, S., Meloche, S. and Sauvageau, G. (2005) EN-2 is a candidate oncogene in human breast cancer. *Oncogene* 24, 6890-6901.

45 Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, Lucia MS, Nordeen SK. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cancer Res.* 2003 Sep 15; 63(18): 5879-88.

Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? *Trends Genet.* 2006 Feb; 22(2): 67-9.

50 Morgan R. Engrailed: complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Lett.* 2006 May 15; 580(11): 2531-3.

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 2002 Feb 16; 359(9306): 572-7.

Формула изобретения

1. Способ диагностики или мониторинга прогрессирования рака предстательной железы, включающий детекцию и/или количественное определение гомеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента, поддающегося детекции в моче, и сравнение количества указанного гомеодомен-содержащего фактора транскрипции в тестируемом образце мочи с количеством, присутствующим в нормальном контрольном образце мочи от нормального, не страдающего раком субъекта, где гомеодомен-содержащий фактор транскрипции представляет собой пептид EN-2, содержащий SEQ ID NO:4, и где фрагмент обладает по меньшей мере 80% гомологией последовательности с SEQ ID NO:4, более предпочтительно 85%, более предпочтительно 90%, более предпочтительно 95%, более предпочтительно 97%, более предпочтительно 99%, и наиболее предпочтительно 99,9% гомологией последовательности с указанной SEQ ID NO:4, где увеличение уровня гомеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента, обнаруживаемое в тестируемом образце, является показателем того, что заболевание либо прогрессирует, либо началось.

2. Способ по п.1, где

(А) увеличение является статистически значимым, определенным с использованием «t-теста» при условии доверительных интервалов предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 99%, более предпочтительно по меньшей мере 99,5%, более предпочтительно по меньшей мере 99,95%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99,99%, и/или

(В) (i) увеличение между контролем и образцом, являющееся показателем ранней стадии рака предстательной железы, составляет приблизительно 110-200%, и наиболее предпочтительно приблизительно 125%, или

(ii) увеличение между контролем и образцом, являющееся показателем указанной поздней стадии рака предстательной железы, составляет приблизительно 550-620%, более предпочтительно приблизительно 560-600%, более предпочтительно приблизительно 570-590%, и наиболее предпочтительно приблизительно 580%, или

(iii) увеличение, по сравнению с образцом на ранней стадии или контролем, составляющее приблизительно между 100% и 300%, и предпочтительно приблизительно 200%, является показателем прогрессирования рака от ранней к поздней стадии заболевания.

3. Способ по п.1 или 2 для детекции появления, прогрессирования, стабилизации, улучшения и/или ремиссии рака предстательной железы или эффективности лечения рака предстательной железы, необязательно где представлены по меньшей мере две стадии детекции и/или количественного определения, разделенных по времени.

4. Способ по п.1 или 2, где детекцию и/или количественное определение гомеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента, поддающегося детекции в моче, осуществляют посредством одного или нескольких из группы, состоящей из: MALDI-TOF, SELDI, через взаимодействие с лигандом или лигандами, посредством систем анализа на основе 1-D или 2-D гелей, жидкостной хроматографии, способов объединенной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, включая ICAT[®] или iTRAQ[®], тонкослойной хроматографии и ЯМР-спектроскопии.

5. Способ по п.1 или 2, где детекцию и/или количественное определение гомеодомен-

содержащего фактора транскрипции или его фрагмента осуществляют посредством одного или нескольких из группы, состоящей из: сэндвич-иммуноанализов, твердофазных иммуноферментных анализов (ELISA), радиоиммунных анализов (RAI), иммуноферментных анализов (EIA), Вестерн-блоттинга, иммунопреципитации и иммуноанализов на основе частиц, включая использование частиц золота, серебра или латекса, магнитных частиц или Q-dot, необязательно где детекцию и/или количественное определение гомеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента осуществляют в формате планшета для микротитрования, полосы, массива или на чипе, необязательно где детекцию и/или количественное определение гомеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента осуществляют посредством ELISA, включающего антитела, специфические в отношении пептида EN-2 или его фрагмента, предпочтительно связанные с репортером.

6. Способ по п.1 или 2, где детекцию и/или количественное определение пептида EN-2 или его фрагмента осуществляют посредством биосенсора.

7. Применение *in vitro* гомеодомен-содержащего фактора транскрипции или его фрагмента, поддающегося детекции в моче, в качестве биомаркера для рака предстательной железы, где гомеодомен-содержащий фактор транскрипции представляет собой пептид EN-2, содержащий SEQ ID NO:4, и где фрагмент обладает по меньшей мере 80% гомологией последовательности с SEQ ID NO:4, более предпочтительно 85%, более предпочтительно 90%, более предпочтительно 95%, более предпочтительно 97%, более предпочтительно 99%, и наиболее предпочтительно 99,9% гомологией последовательности с указанной SEQ ID NO:4.

8. Применение по п.7, где указанное применение присутствует в способе, выбранном из группы, состоящей из: клинического скрининга, способов оценки прогноза, мониторинга результатов терапии, способа идентификации пациентов, которые наиболее вероятно будут отвечать на конкретное терапевтическое лечение, и скрининга и разработки лекарственных средств, необязательно где указанных пациентов ранее диагностировали как отрицательных по раку с использованием анализа, детектирующего PSA.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> The University of Surrey

<120> Биомаркеры рака

<130> P048286WO

<140> PCT/GB2007/004902

<141> 2007-12-19

<150> GB0625321.5

<151> 2006-12-19

<150> GB0719792.4

<151> 2007-10-10

<160> 46

<170> SeqWin99, версия 1.02

<210> 1

<211> 264

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ile Met Ser Ser Tyr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Ile Asp Pro Lys

1 5 10 15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Asn Ser Tyr Ile Pro Glu His

20 25 30

RU 2 460 075 C2

Ser Pro Glu Tyr Tyr Gly Arg Thr Arg Glu Ser Gly Phe Gln His His

35

His Gln Glu Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ser Tyr Pro Glu

50

Arg Gln Tyr Ser Cys Thr Ser Leu Gln Gly Pro Gly Asn Ser Arg Gly

65

His Gly Pro Ala Gln Ala Gly His His His Pro Glu Lys Ser Gln Ser

85

Leu Cys Glu Pro Ala Pro Leu Ser Gly Ala Ser Ala Ser Pro Ser Pro

100

Ala Pro Pro Ala Cys Ser Gln Pro Ala Pro Asp His Pro Ser Ser Ala

115

Ala Ser Lys Gln Pro Ile Val Tyr Pro Trp Met Lys Lys Ile His Val

130

Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Asn Gly Gly Glu Pro Lys Arg Ser Arg

145

Ala Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His

165

Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ser

180

Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg

195

200

205

Met Lys Trp Lys Lys Asp His Arg Leu Pro Asn Thr Lys Val Arg Ser

210

215

220

Ala Pro Pro Ala Gly Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ala Thr Pro

225

230

235

240

Gly Thr Ser Glu Asp His Ser Gln Ser Ala Thr Pro Pro Glu Gln Gln

245

250

255

Arg Ala Glu Asp Ile Thr Arg Leu

260

<210> 2

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Ser Tyr Phe Val Asn Ser Thr Phe Pro Val Thr Leu Ala Ser

1

5

10

15

Gly Gln Glu Ser Phe Leu Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Ser Ser Gly Tyr

20

25

30

Ala Asp Pro Leu Arg His Tyr Pro Ala Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Gly

35

40

45

Gln Asp Lys Gly Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Tyr Pro Pro Ala Gly Gly

50

55

60

RU 2 460 075 C2

Gly Tyr Gly Arg Ala Ala Pro Cys Asp Tyr Gly Pro Ala Pro Ala Phe			
65	70	75	80
Tyr Arg Glu Lys Glu Ser Ala Cys Ala Leu Ser Gly Ala Asp Glu Gln			
	85	90	95
Pro Pro Phe His Pro Glu Pro Arg Lys Ser Asp Cys Ala Gln Asp Lys			
	100	105	110
Ser Val Phe Gly Glu Thr Glu Glu Gln Lys Cys Ser Thr Pro Val Tyr			
	115	120	125
Pro Trp Met Gln Arg Met Asn Ser Cys Asn Ser Ser Ser Phe Gly Pro			
	130	135	140
Ser Gly Arg Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr Leu Glu			
145	150	155	160
Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg			
	165	170	175
Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr Glu Arg Gln Ile Lys Ile			
	180	185	190
Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Ser Lys Leu Leu			
	195	200	205
Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Glu Glu Glu Glu Glu Lys Gln Ala Glu			
210	215	220	
<210>	3		

<211> 269

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Ser Tyr Phe Val Asn Ser Phe Ser Gly Arg Tyr Pro Asn Gly
1 5 10 15

Pro Asp Tyr Gln Leu Leu Asn Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Arg Asp Pro Ala Ala Met His Thr Gly Ser Tyr Gly Tyr Asn
35 40 45

Tyr Asn Gly Met Asp Leu Ser Val Asn Arg Ser Ser Ala Ser Ser Ser
50 55 60

His Phe Gly Ala Val Gly Glu Ser Ser Arg Ala Phe Pro Ala Pro Ala
65 70 75 80

Gln Glu Pro Arg Phe Arg Gln Ala Ala Ser Ser Cys Ser Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Glu Ser Leu Pro Cys Thr Asn Gly Asp Ser His Gly Ala Lys Pro
100 105 110

Ser Ala Ser Ser Pro Ser Asp Gln Ala Thr Ser Ala Ser Ser Ser Ala
115 120 125

Asn Phe Thr Glu Ile Asp Glu Ala Ser Ala Ser Ser Glu Pro Glu Glu
130 135 140

RU 2 460 075 C2

Ala Ala Ser Gln Leu Ser Ser Pro Ser Leu Ala Arg Ala Gln Pro Glu
145 150 155 160

Pro Met Ala Thr Ser Thr Ala Ala Pro Glu Gly Gln Thr Pro Gln Ile
165 170 175

Phe Pro Trp Met Arg Lys Leu His Ile Ser His Asp Met Thr Gly Pro
180 185 190

Asp Gly Lys Arg Ala Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr Leu Glu
195 200 205

Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
210 215 220

Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile
225 230 235 240

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp Asn Lys Leu Lys
245 250 255

Ser Met Ser Leu Ala Thr Ala Gly Ser Ala Phe Gln Pro
260 265

<210> 4
<211> 333
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Glu Glu Asn Asp Pro Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ala Ala Val Glu
1 5 10 15

RU 2 460 075 C2

Gly	Gln	Arg	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
20						25						30			
Gly	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Asp	Thr	Gly	Arg	Arg	Arg	Ala	Leu
35						40						45			
Met	Leu	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	His	Gln	His	Pro	His
50						55						60			
Arg	Ile	Thr	Asn	Phe	Phe	Ile	Asp	Asn	Ile	Leu	Arg	Pro	Glu	Phe	Gly
65			70						75			80			
Arg	Arg	Lys	Asp	Ala	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Arg
			85						90			95			
Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Glu	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly
100						105						110			
Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Leu	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Glu
115						120						125			
Pro	Arg	Gln	Asn	Pro	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro
130						135						140			
Ala	Ala	Gly	Ser	Asp	Ser	Pro	Gly	Asp	Gly	Glu	Gly	Gly	Ser	Lys	Thr
145			150						155			160			
Leu	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Gly	Pro
			165						170			175			
Leu	Asp	Gly	Ser	Leu	Lys	Ala	Arg	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Ser

RU 2 460 075 C2

180	185	190
Val Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Gln Ala Gly Ala Asn Leu Gly Ala		
195	200	205
Gln Pro Met Leu Trp Pro Ala Trp Val Tyr Cys Thr Arg Tyr Ser Asp		
210	215	220
Arg Pro Ser Ser Gly Pro Arg Ser Arg Lys Pro Lys Lys Lys Asn Pro		
225	230	235
Asn Lys Glu Asp Lys Arg Pro Arg Thr Ala Phe Thr Ala Glu Gln Leu		
245	250	255
Gln Arg Leu Lys Ala Glu Phe Gln Thr Asn Arg Tyr Leu Thr Glu Gln		
260	265	270
Arg Arg Gln Ser Leu Ala Gln Glu Leu Ser Leu Asn Glu Ser Gln Ile		
275	280	285
Lys Ile Trp Phe Gln Asn Lys Arg Ala Lys Ile Lys Lys Ala Thr Gly		
290	295	300
Asn Lys Asn Thr Leu Ala Val His Leu Met Ala Gln Gly Leu Tyr Asn		
305	310	315
His Ser Thr Thr Ala Lys Glu Gly Lys Ser Asp Ser Glu		
325	330	
<210>	5	
<211>	443	
<212>	PRT	

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gln Lys Ala Thr Tyr Tyr Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Gly Gly Tyr

1 5 10 15

Pro Tyr Gln Ala Ala Asn Gly Phe Ala Tyr Asn Ala Asn Gln Gln Pro

20 25 30

Tyr Pro Ala Ser Ala Ala Leu Gly Ala Asp Gly Glu Tyr His Arg Pro

35 40 45

Ala Cys Ser Leu Gln Ser Pro Ser Ser Ala Gly Gly His Pro Lys Ala

50 55 60

His Glu Leu Ser Glu Ala Cys Leu Arg Thr Leu Ser Ala Pro Pro Ser

65 70 75 80

Gln Pro Pro Ser Leu Gly Glu Pro Pro Leu His Pro Pro Pro Pro Gln

85 90 95

Ala Ala Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Gln Pro Ala Pro Gln Pro Pro

100 105 110

Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Ser Pro Pro

115 120 125

Gln Asn Ala Ser Asn Asn Pro Thr Pro Ala Asn Ala Ala Lys Ser Pro

130 135 140

Leu Leu Asn Ser Pro Thr Val Ala Lys Gln Ile Phe Pro Trp Met Lys

145 150 155 160

RU 2 460 075 C2

Glu	Ser	Arg	Gln	Asn	Thr	Lys	Gln	Lys	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	
				165			170				175					
Glu	Ser	Cys	Ala	Gly	Asp	Lys	Ser	Pro	Pro	Gly	Gln	Ala	Ser	Ser	Lys	
				180			185				190					
Arg	Ala	Arg	Thr	Ala	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gln	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	
				195			200				205					
Glu	Phe	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Cys	Arg	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Met	
				210			215				220					
Ala	Asn	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	
				225			230				235				240	
Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gln	Lys	Gly	Lys	Gly	Met	Leu	
				245			250				255					
Thr	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Ser	Arg	Ser	Pro	Val	Pro	Pro	Gly	
				260			265				270					
Ala	Gly	Gly	Tyr	Leu	Asn	Ser	Met	His	Ser	Leu	Val	Asn	Ser	Val	Pro	
				275			280				285					
Tyr	Glu	Pro	Gln	Ser	Pro	Pro	Pro	Phe	Ser	Lys	Pro	Pro	Gln	Gly	Thr	
				290			295				300					
Tyr	Gly	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Tyr	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Cys	Ala	
				305			310				315				320	
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Lys	Arg	Tyr	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	

	325		330		335
Gly Gly Thr Pro Asp Tyr Asp Pro His Ala His Gly Leu Gln Gly Asn					
	340		345		350
Gly Ser Tyr Gly Thr Pro His Ile Gln Gly Ser Pro Val Phe Val Gly					
	355		360		365
Gly Ser Tyr Val Glu Pro Met Ser Asn Ser Gly Pro Ala Leu Phe Gly					
	370		375		380
Leu Thr His Leu Pro His Ala Ala Ser Gly Ala Met Asp Tyr Gly Gly					
385		390		395	400
Ala Gly Pro Leu Gly Ser Gly His His His Gly Pro Gly Pro Gly Glu					
	405		410		415
Pro His Pro Thr Tyr Thr Asp Leu Thr Gly His His Pro Ser Gln Gly					
	420		425		430
Arg Ile Gln Glu Ala Pro Lys Leu Thr His Leu					
	435		440		
<210>	6				
<211>	342				
<212>	PRT				
<213>	Homo sapiens				
<400>	6				
Met Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Asn Tyr Tyr Val Asp Ser Leu Ile					
1	5		10		15

RU 2 460 075 C2

Gly	His	Glu	Gly	Asp	Glu	Val	Phe	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly	Pro	Gly	
		20						25					30		
Pro	Gly	Ala	Gln	Gly	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Ala
		35					40					45			
Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Ala	Ser	Cys	Ser	Phe	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Val
	50					55					60				
Phe	Ser	Ala	Ser	Trp	Ser	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala
65					70					75					80
Ala	Met	Ser	Gly	Leu	Tyr	His	Pro	Tyr	Val	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Ala
				85					90					95	
Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Arg	Tyr	Val	Arg	Ser	Trp	Met	Glu	Pro
			100					105					110		
Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120						125		
Gly	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Ala	Asn
	130					135						140			
Gly	Arg	His	Tyr	Gly	Ile	Lys	Pro	Glu	Thr	Arg	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro
145					150					155					160
Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser
				165					170					175	
Ser	Ser	Lys	Arg	Thr	Glu	Cys	Ser	Val	Ala	Arg	Glu	Ser	Gln	Gly	Ser
		180						185					190		

RU 2 460 075 C2

Ser Gly Pro Glu Phe Ser Cys Asn Ser Phe Leu Gln Glu Lys Ala Ala
195 200 205

Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Gly Ala Ala Thr
210 215 220

Gly Thr Gly Gly Ser Ser Glu Pro Ser Ala Cys Ser Asp His Pro Ile
225 230 235 240

Pro Gly Cys Ser Leu Lys Glu Glu Glu Lys Gln His Ser Gln Pro Gln
245 250 255

Gln Gln Gln Leu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Ala Asn Trp Ile His Ala
260 265 270

Arg Ser Thr Arg Lys Lys Arg Cys Pro Tyr Thr Lys Tyr Gln Thr Leu
275 280 285

Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Met Tyr Leu Thr Arg Asp Arg
290 295 300

Arg Tyr Glu Val Ala Arg Ile Leu Asn Leu Thr Glu Arg Gln Val Lys
305 310 315 320

Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Met Lys Lys Met Ser Lys Glu
325 330 335

Lys Cys Pro Lys Gly Asp
340

<210> 7

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА1 прямой

<400> 7

ctggccctgg ctacgtataa

20

<210> 8

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА1 обратный

<400> 8

tccaactttc cctgttttgg

20

<210> 9

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА2 прямой

<400> 9

ttcagcaaaa tgccctctct

20

<210> 10

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА2 обратный

<400> 10

taggccagct ccacagttct

20

<210> 11

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА3 прямой

<400> 11

acctgtgata gtgggcttgg

20

<210> 12

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА3 обратный

<400> 12

atacagccat tccagcaacc

20

<210> 13
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА4 прямой

<400> 13

ccctggatga agaagatcca

20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА4 обратный

<400> 14

aattggagga tcgcatcttg

20

<210> 15
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА5 прямой

<400> 15

ccggagaatg aagtggaaaa

20

<210> 16

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА5 обратный

<400> 16

acgagaacag ggcttcttca

20

<210> 17

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА6 прямой

<400> 17

aaagcactcc atgacgaagg

20

<210> 18

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА6 обратный

<400> 18

tcctttctcca gctccagtg

20

<210> 19

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА7 прямой

<400> 19

tggtgtaaat ctgggggtgt

20

<210> 20

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА7 обратный

<400> 20

tctgataaag ggggctgttg

20

<210> 21

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА9 прямой

<400> 21

aataacccag cagccaactg

20

<210> 22

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА9 обратный

<400> 22

attttcatcc tgcggttctg

20

<210> 23

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА10 прямой

<400> 23

acactggagc tggagaagga

20

<210> 24

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА10 обратный

<400> 24

gatccgggttt tctcgattca

20

<210> 25

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА11 прямой

<400> 25

cgctgcccc ataccaagta

20

<210> 26

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА11 обратный

<400> 26

gtcaagggca aaatctgcat

20

<210> 27

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА13 прямой

<400> 27

ggatatcagc caccgacgaat

20

<210> 28

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХА13 обратный

<400> 28

attatctggg caaagcaacg

20

<210> 29

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер НОХD1 прямой

<400> 29

ttcagcaccg agcaactgac

20

<210> 30

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD1 обратный

<400> 30

tagtgggggt tgttccagag

20

<210> 31

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD3 прямой

<400> 31

cagcctcctg gtctgaactc

20

<210> 32

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD3 обратный

<400> 32

atccagggga agatctgctt

20

<210> 33

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD4 прямой

<400> 33

tcaaatgtgc catagcaagc

20

<210> 34

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD4 обратный

<400> 34

tccatagggc cctcctactt

20

<210> 35

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD8 прямой

<400> 35

tcaaatgttt ccgtggatga

20

<210> 36

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD8 обратный

<400> 36

gctcttgggc ttcctttttc

20

<210> 37

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD9 прямой

<400> 37

tcccccatgt ttctgaaaag

20

<210> 38

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD9 обратный

<400> 38

gggctcctct aagcctcact

20

<210> 39

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD10 прямой

<400> 39

gctccttcac caccacatt

20

<210> 40

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD10 обратный

<400> 40

aaatatccag ggacgggaac

20

<210> 41

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD11 прямой

<400> 41

ggggctacgc tccctactac

20

<210> 42

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD11 обратный

<400> 42

gctgcctcgt agaactggtc

20

<210> 43

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD12 прямой

<400> 43

cgcttcccc tatctctac

20

<210> 44

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Праймер HOXD12 обратный

<400> 44

cttcgggcgc atagaactta

20

<210> 45
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

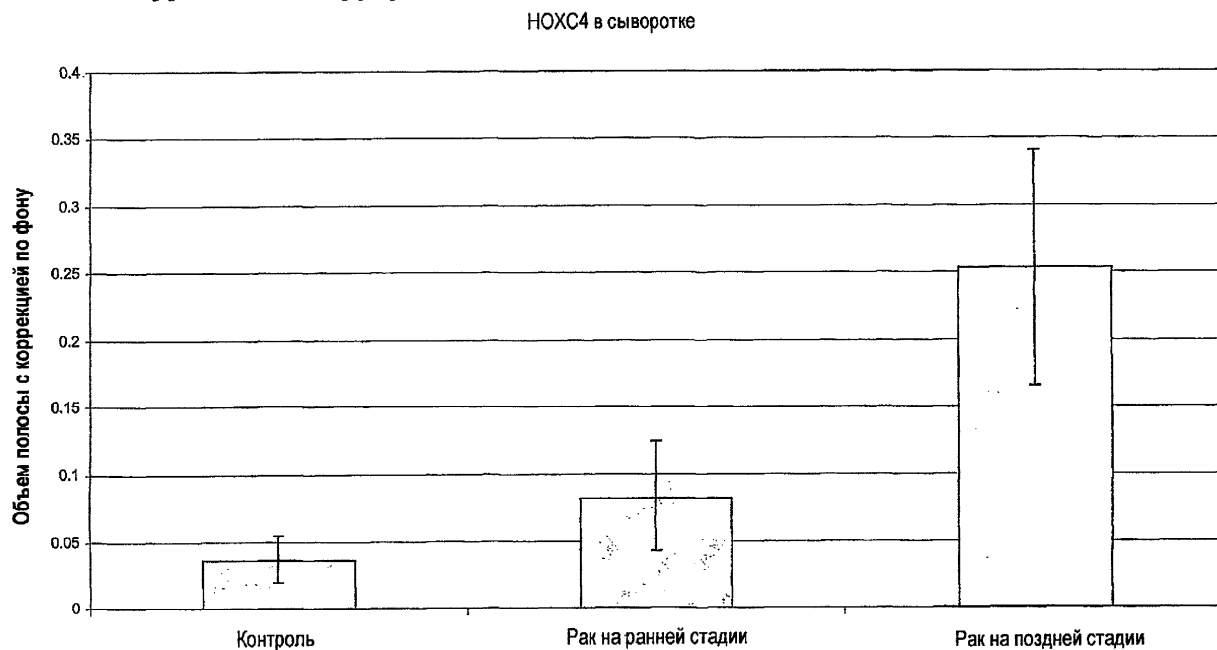
<220>
 <223> Праймер HOXD13 прямой

<400> 45
 ggggatgtgg ctctaaatca 20

<210> 46
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

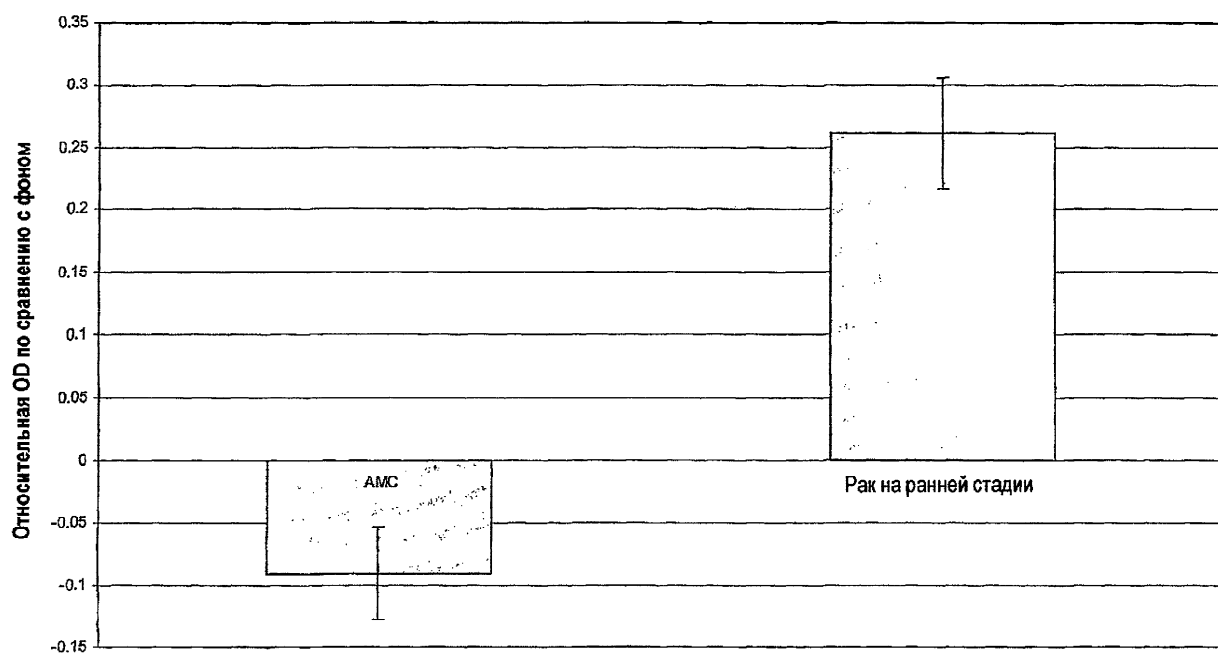
<220>
 <223> Праймер HOXD13 обратный

<400> 46
 aacctggacc acatcaggag 20

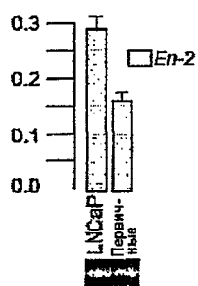


Фиг. 1

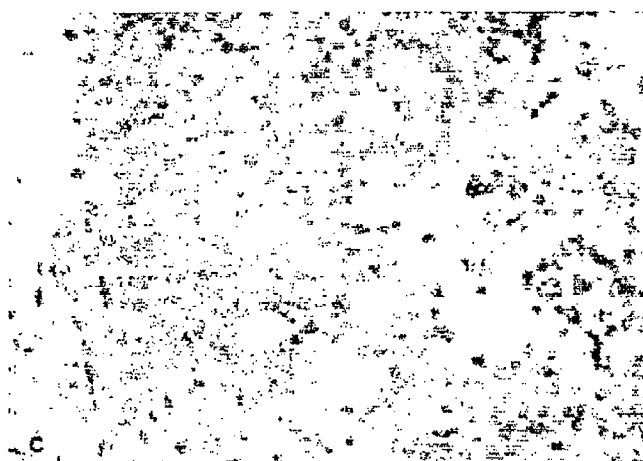
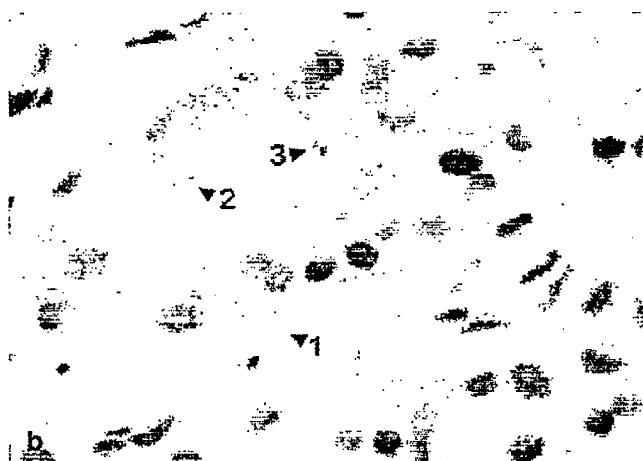
НОХВ6 в сыворотке



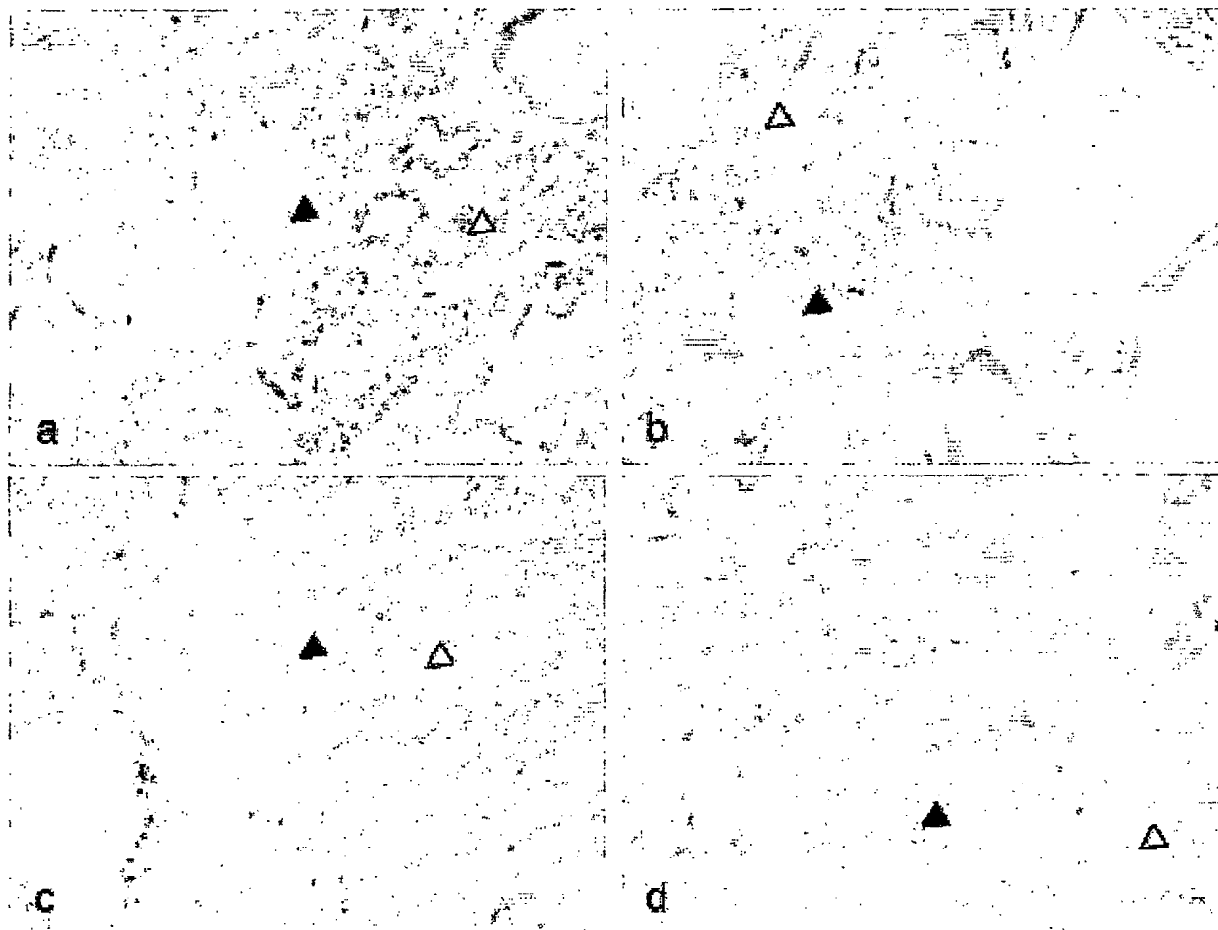
Фиг. 2



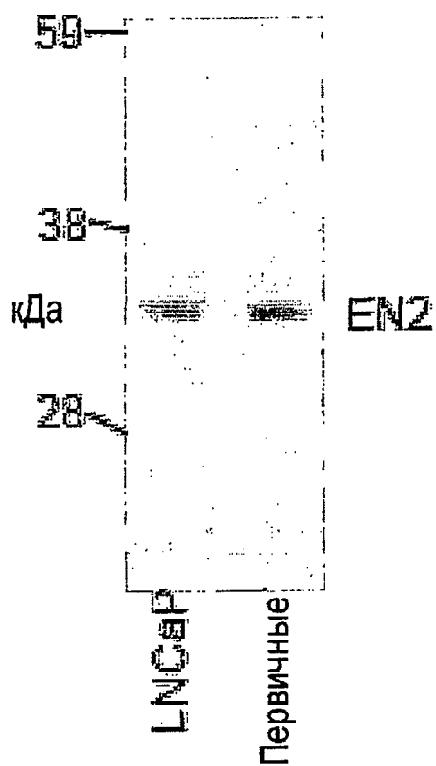
a



Фиг. 3

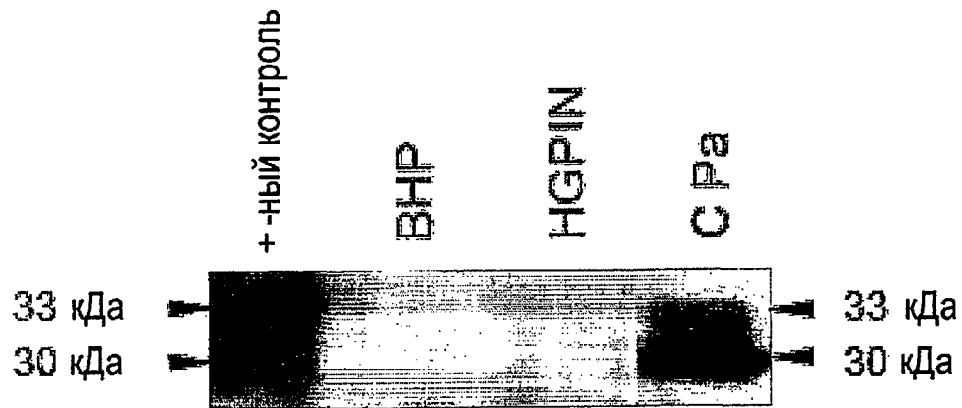


Фиг. 4

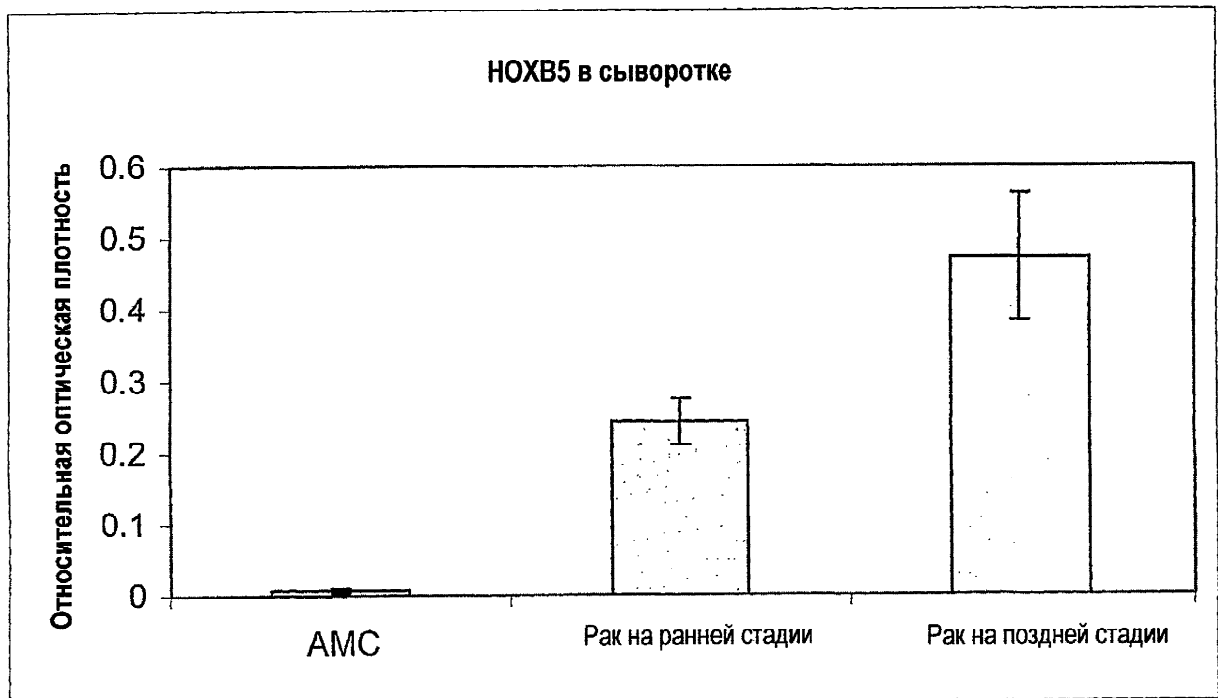


Фиг. 5

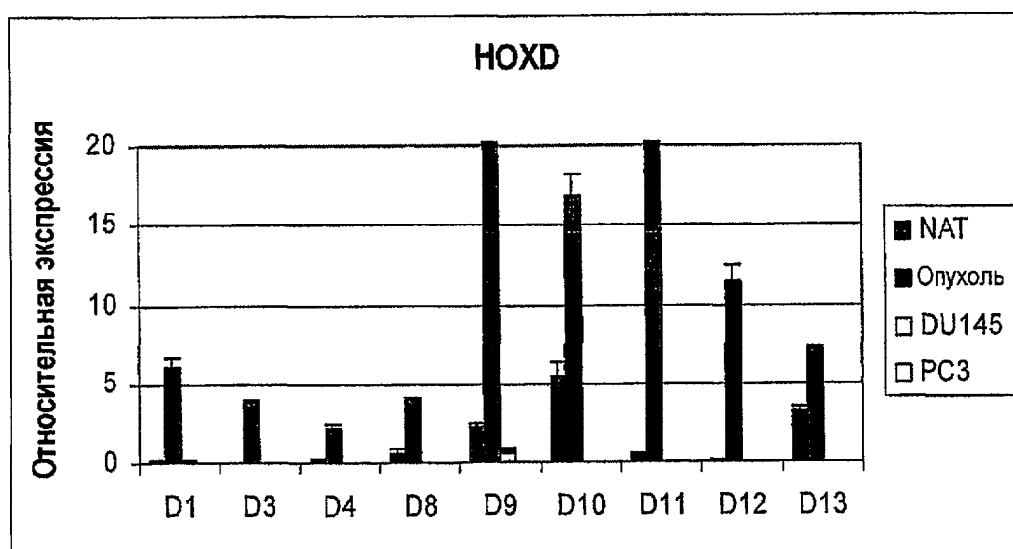
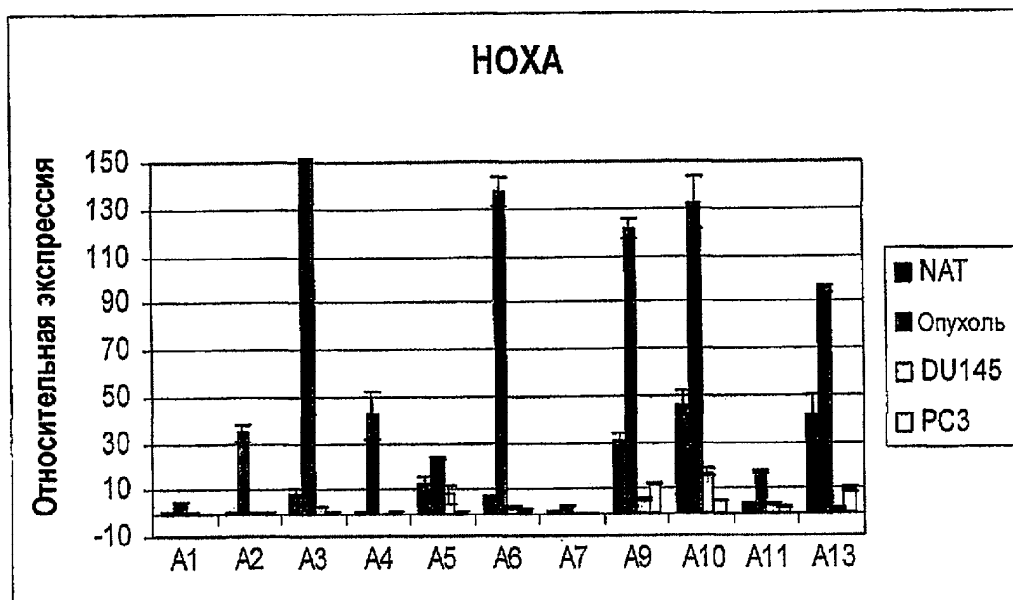
Обнаружение по биопсии



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8