



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011121613/15, 30.10.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.10.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
30.10.2008 US 61/109,649

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2012 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 7,435,419 B2, 14.10.2008. US 2007/
0037232 A1, 15.02.2007. US 2005/0208529 A1,
22.09.2005. WO 01/88181 A1, 22.11.2001(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 30.05.2011(86) Заявка РСТ:
EP 2009/064410 (30.10.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/049538 (06.05.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ДЕВО Иван (FR),
ВАГНЕР Даниэль Р. (LU),
АСУАХЕ Франсиско (LU),
ВОЗОР Мелани (LU)

(73) Патентообладатель(и):

САНТР ДЕ РЕШЕРШ ПЮБЛИК ДЕ ЛЯ
САНТЭ (LU)

(54) БИОМАРКЕРЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается способа идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих повышенный риск развития патологического состояния сердца, включающего исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и плацентарного фактора роста (PGF).

Также группа изобретений касается способа осуществления прогноза для пациента с инфарктом миокарда; системы для идентификации пациентов с инфарктом миокарда. Группа изобретений обеспечивает проведение надежной диагностики повышенного риска развития патологического состояния сердца у пациентов после инфаркта миокарда. 6 н. и 12 з.п. ф-лы, 2 пр., 9 ил., 7 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 545 757**⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011121613/15, 30.10.2009

(24) Effective date for property rights:
30.10.2009

Priority:

(30) Convention priority:
30.10.2008 US 61/109,649

(43) Application published: 10.12.2012 Bull. № 34

(45) Date of publication: 10.04.2015 Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: 30.05.2011

(86) PCT application:
EP 2009/064410 (30.10.2009)

(87) PCT publication:
WO 2010/049538 (06.05.2010)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

DEVO Ivan (FR),
VAGNER Daniehl' R. (LU),
ASUAKhE Fransisko (LU),
VOZOR Melani (LU)

(73) Proprietor(s):

SANTR DE REShERSh PJuBLIK DE LJ
SANTEh (LU)

(54) **BIOMARKERS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine and concerns a method for identifying the patients suffering myocardial infarction and a high risk of a cardiac pathology, involving a post-infarction examination of patient's biological fluids to measure vascular endothelium growth factor B (VEGFB), thrombospondin-1 (THBS1) and placental growth factor

(PGF) levels. Besides, the group of inventions concerns a method for prediction for the patients suffering myocardial infarction; a system for identifying the suffering myocardial infarction.

EFFECT: group of inventions provides the reliable diagnosing of the high risk of the post-infarction cardiac pathology in the patients.

18 cl, 2 ex, 9 dwg, 7 tbl

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к ряду новых биомаркеров для оценки риска или тяжести сердечной недостаточности (СН) или ремоделирования желудочков у пациента, особенно после перенесенного инфаркта миокарда (ИМ), и к диагностическим наборам для измерения уровней указанных биомаркеров.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сердечная недостаточность (СН) не является конкретным заболеванием, а представляет собой совокупность признаков и симптомов, которые вызываются неспособностью сердца при необходимости должным образом увеличивать минутный объем сердца. У пациентов обычно наблюдается одышка, отеки и утомляемость. СН стала заболеванием эпидемического масштаба, поскольку поражает 3% взрослого населения. Смертность от СН превышает смертность от многих форм рака при пятилетней выживаемости менее 30%. Инфаркт миокарда (ИМ) представляет собой одну из ведущих причин СН. У 63% пациентов развивается СН в течение 6 лет после ИМ. Ремоделирование левого желудочка вносит большой вклад в СН. Поскольку СН становится более распространенной среди людей старшего возраста, количество пораженных лиц будет продолжать расти в связи с наблюдающимся старением популяции.

За последнее десятилетие проводились масштабные исследования с задачей лучшего понимания патологической физиологии СН. В это же время было идентифицировано множество новых терапевтических мишеней, хотя лишь немногие из них потенциально могут использоваться в терапии. Некоторые из указанных мишеней получили название «прогностических биомаркеров» или «биомаркеров» после того, как была установлена их прогностическая ценность.

Биомаркеры можно классифицировать на три категории. Биомаркеры, которые могут помочь в медицинском наблюдении за предположительно здоровыми лицами, называют «скрининговыми биомаркерами». Биомаркеры, выявляемые у пациентов, подозрительных по заболеванию, называются «диагностическими биомаркерами», а биомаркеры, выявляемые у пациентов с очевидным заболеванием, называются «прогностическими биомаркерами». В то время как диагностические биомаркеры, такие как тропонин I и тропонин M для ИМ и мозговой натрийуретический пептид (BNP) для сердечной недостаточности, используются в клинической практике, возможное использование указанных биомаркеров в качестве прогностических биомаркеров для коррекции лечения индивидуального пациента («персонализированная медицина») все еще нуждается в подтверждении.

Следует отметить, что чем раньше можно идентифицировать склонность пациента к развитию СН после ИМ, тем более эффективно можно корректировать лечение. Однако главным ограничением для использования индивидуальных биомаркеров является то, что не все пациенты могут представлять указанные факторы риска независимым образом. Таким образом, стало очевидным, что ранняя идентификация пациентов, склонных к развитию СН после ИМ, значительно выигрывает от увеличения количества и интеграции биомаркеров.

Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), подсемейство факторов роста, представляет собой широкий термин, охватывающий ряд белков из ряда семейств. Указанные факторы роста изучали, главным образом, на предмет их ангиогенных свойств. Различные факторы роста идентифицированы на настоящий момент, наиболее известным из которых является VEGFA. VEGFA часто называют просто «VEGF» (Ferrara et al. "The biology of VEGF and its receptors" Nat. Med. 2003 jun.; 9(6): 669-676). Один из

предложенных биомаркеров по настоящему изобретению, VEGFB, представляет собой часть семейства сосудистых эндотелиальных факторов роста, но он отличается от VEGFA.

ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задачами настоящего изобретения являются:

1. Создание прогностического инструмента

Задачей настоящего изобретения является создание инструмента для раннего прогноза возникновения СН с задачей улучшения выживания и уменьшения ухудшения СН.

Другой задачей настоящего изобретения является использование указанного прогностического инструмента для идентификации пациентов, имеющих риск развития ремоделирования желудочков и сердечной недостаточности.

Еще одной задачей настоящего изобретения является использование указанного прогностического инструмента для подбора лечения с задачей более эффективного предотвращения развития ремоделирования желудочков и СН после ИМ.

2. Создание нового диагностического набора

Задачей настоящего изобретения является создание диагностического набора, способного измерять концентрации маркеров в биологических жидкостях для помощи при раннем прогнозе возникновения СН, с задачей улучшения выживания и уменьшения ухудшения СН.

Другой задачей настоящего изобретения является создание нового диагностического набора для идентификации пациентов, имеющих риск развития ремоделирования желудочков и сердечной недостаточности.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание нового диагностического набора для подбора лечения с целью более эффективного предотвращения развития ремоделирования желудочков и СН после ИМ.

Помимо этого задачей настоящего изобретения является разработка биомаркеров, которые можно использовать для скрининга пациентов после ИМ на склонность к развитию СН или ремоделирования желудочков.

Неожиданно заявителями было установлено, что мРНК и плазменные уровни следующих белков VEGFB, THBS1 и PGF различаются после ИМ и являются отличными показателями вероятности развития у пациента СН и/или ремоделирования желудочков.

Указанные биомаркеры, таким образом, можно использовать для скрининга пациентов с ИМ и, в частности, для создания раннего прогностического инструмента для идентификации указанных пациентов, которые, страдая от инфаркта миокарда, имеют также повышенный риск развития впоследствии СН и/или ремоделирования желудочков. Созданы также диагностические наборы для измерения уровней указанных трех биомаркеров, и они являются пригодными в контексте ИМ для прогнозирования возникновения СН и/или ремоделирования желудочков.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих повышенный риск развития патологического состояния сердца, который включает:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB),

тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF);

- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с соответствующими уровнями VEGFB, THBS1 и/или PGF из стандартного образца; указанный стандартный образец имеет известный клинический исход; и

- определение на основе указанного сравнения наличия у пациента повышенного риска развития патологического состояния сердца.

Также разработан способ идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих повышенный риск развития патологического состояния сердца, который включает:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF);
- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с соответствующими уровнями VEGFB, THBS1 и/или PGF с контролем; и

- определение на основе указанного сравнения наличия у пациента повышенного риска развития патологического состояния сердца.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один из следующих показателей указывает на повышенную вероятность, что указанный пациент страдает указанным патологическим состоянием сердца:

- более низкие уровни VEGFB в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем VEGFB;
- более высокие уровни THBS1 в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем THBS1; и/или
- более высокие уровни PGF в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем PGF.

Предпочтительно патологическое состояние сердца может представлять собой инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, ишемическую кардиомиопатию или неишемическую кардиомиопатию. Более предпочтительно у пациента может развиваться сердечная недостаточность, или он может страдать от сердечной недостаточности.

Предпочтительно у пациента может происходить ремоделирование желудочков. Следует понимать, что у многих пациентов с инфарктом миокарда происходит ремоделирование желудочков и впоследствии или в то же самое время развивается состояние, известное как сердечная недостаточность. Таким образом, существует четкая корреляция между ремоделированием желудочков и сердечной недостаточностью, и предпочтительно у пациентов с инфарктом миокарда, у которых происходит ремоделирование желудочков, также будет развиваться сердечная недостаточность.

Предпочтительно также, чтобы образец биологической жидкости, взятой у пациента, представлял собой образец крови, образец тканевой жидкости, образец плазмы, образец сыворотки или образец мочи.

Предпочтительно исследуемые уровни VEGFB, THBS1 и/или PGF представляют собой уровни мРНК. Последние можно измерять исследованием мРНК в красных и/или белых клетках крови. Предпочтительно клетки крови представляют собой лейкоциты, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, лимфоциты, моноциты, тромбоциты или эритроциты.

Предпочтительно VEGFB, THBS1 и/или PGF можно измерять по уровню мРНК из клеток крови с использованием любых методик, способных определять количество мРНК, наиболее предпочтительно с использованием количественной ПЦР, наиболее предпочтительно с использованием микроматриц. Также предпочтительно, чтобы VEGFB, THBS1 и/или PGF можно было измерять по уровню белка в плазме с использованием любых методик, способных определять количество белков, наиболее предпочтительно с использованием ELISA. Результаты исследования мРНК можно использовать в комбинации с результатами исследования белков плазмы для более точной оценки.

Предпочтительно определять только уровень PGF, который может предпочтительно представлять собой любую из последовательностей PGF, представленных в SEQ ID NO 7-9, или их фрагменты. Также предпочтительно определять только уровень THBS1, который может предпочтительно представлять собой любую из последовательностей THBS1, представленных в SEQ ID NO 4-6, или их фрагменты. Более предпочтительно, однако, определять уровни как THBS1, так и PGF.

Особенно предпочтительно определять уровень VEGFB, который может предпочтительно представлять собой любую из последовательностей VEGFB, представленных в SEQ ID NO 1-3, или их фрагменты. Указанный уровень можно определять отдельно или в комбинации с THBS1 и/или PGF. Предпочтительно, чтобы VEGFB представлял собой сплайсинговый вариант VEGFB 186, сплайсинговый вариант VEGFB 167 или и то, и другое.

Предпочтительно уровень мРНК исследуют в день инфаркта миокарда. В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения образцы мРНК или белков плазмы для исследования получают от пациента на день 1, который представляет собой следующий день после инфаркта миокарда. Предпочтительно исследуют последующий образец, полученный от пациента позднее на день 1, или день 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или в любое время до 1 месяца после инфаркта миокарда.

Предпочтительно последующий образец получают от пациента на день 1 и полученную величину дня 1 сравнивают с стандартным образцом. Однако предпочтительно получать последующий образец от пациента на день 1 и полученную величину дня 1 сравнивать с полученными уровнями в образце в день инфаркта. Это наиболее предпочтительно касается VEGFB. Иными словами, особенно предпочтительно, чтобы контроль, первый после ИМ и последующие образцы исследовались на предмет уровней VEGFB и указанные уровни VEGFB сравнивались. Увеличение уровней VEGFB по сравнению с стандартным образцом на день 1 или 2 является особенно полезным для идентификации пациента как имеющего более низкий риск развития указанного состояния. Подобно этому, уменьшение уровней VEGFB по сравнению с контрольным образцом на день 1 или 2 является особенно полезным для идентификации пациента как имеющего более высокий риск развития указанного состояния.

Однако также предпочтительно сравнивать уровни VEGFB в первом образце после ИМ на день 0 или 1 с последующим образцом (после ИМ) на день 1 или 2, поскольку увеличение VEGFB от дня 0 или 1 к дню 1 или 2 является весьма показательным для пациента с пониженным риском развития настоящих состояний. Изменения VEGFB, измеренных между днем 0 и днем 2 или днем 1 и днем 3 являются особенно предпочтительными.

Действительно, заявители установили, что уровни VEGFB в плазме были сходными в группах высокой и низкой ФВ на день 0 и день 1 после ИМ. На день 2, однако, уровни VEGFB повышались у пациентов с высокой ФВ (в 2 раза по сравнению с днем 0), в то время как они падали у пациентов с низкой ФВ (в 2,5 раза по сравнению с днем 0) (фигура 9). Приведенные данные согласуются с повышающей регуляцией мРНК VEGFB у пациентов с высокой ФВ (фигура 8). Указанные результаты предполагают, что пациенты, способные увеличивать выработку VEGFB после ИМ, имеют большую склонность к благоприятному исходу.

Уменьшение VEGFB от дня 0 до дня 1 или 2 и, в частности, от дня 0 до дня 2 является весьма показательным для пациента с повышенным риском развития настоящих

состояний.

Настоящее изобретение измеряет скорее изменения уровней экспрессии или преобладание определенных биомаркеров, чем само их присутствие или отсутствие, как это иногда имеет место в данной области. Для того чтобы измерить изменения

5 указанных уровней, необходимо установить контрольную точку. Указанной точкой могут являться уровни в еще одном образце, в частности в более раннем образце, предпочтительно взятом в день инфаркта (день ноль) или на первый или второй день после инфаркта. Предпочтительно контрольный образец представляет собой базальный уровень VEGFB, THBS1 или PGF на день инфаркта соответственно.

10 Альтернативно, контроль может представлять собой стандартную величину, которую можно получить от популяции пациентов с инфарктом с известными пределами клинических исходов. Базу данных можно создать из данных пациентов с инфарктом после стандартизации по возрасту, полу и т.п.; средняя величина (мода, средняя или медиана, как представляется подходящим) или пределы величин могут устанавливаться

15 для пациентов, имеющих определенные критерии (например, пол, масса тела и возраст), измеренные в определенное время после инфаркта, и с известными клиническими исходами (т.е. с сердечной недостаточностью или без нее). Данные от обследованных пациентов затем можно сравнивать с стандартной величиной или стандартными пределами, чтобы определить вероятность у обследованного пациента одного или

20 другого из клинических исходов. Например, если установлено, что уровни VEGFB ниже, чем приблизительно «X» микрограммов/мл в плазме пациентов мужского пола с инфарктом в возрасте 55-60 лет, измеренные на день 1 после инфаркта, дают 50% вероятность сердечной недостаточности, то исследуемый образец можно брать у соответствующего мужчины на день 1 и сравнивать с указанной величиной, чтобы

25 определить, применима ли 50% вероятность к данному пациенту.

Этап определения может быть подходящим для статистического анализа, например, методика сравнения «ближайший сосед», такая как программы Kstar и SVM. Особенно предпочтительным примером является использование платформы добычи данных, такой как Weka. За этим может следовать иерархическая группировка, предпочтительно

30 осуществляемая с использованием метода невзвешенного попарного арифметического среднего и коэффициентов корреляции. Затем можно выполнить визуализацию кластеров с использованием GEPAS. Необязательно, можно получить корреляционные величины Пирсона и графики с использованием пакета Statistica (v. 6.0).

Способ может дополнительно включать сбор данных от одного или более пациентов

35 с ИМ; данные предпочтительно включают уровни или величины по меньшей мере одного или предпочтительно каждого из трех мРНК и/или белков плазмы (VEGFB, THBS1 и/или PGF) и связанный с ними клинический исход для данного пациента. Способ используется для создания данных признак/величина для VEGFB, THBS1 и/или PGF, связанных с конкретным клиническим исходом.

40 После этого базу данных можно пополнять данными от каждого отдельного пациента. На указанные известные величины можно ссылаться как на стандартные (или «рассмотренные») образцы.

«Запрашиваемые» или «нерассмотренные» данные образцов, например, от нового пациента с недавним инфарктом вводят и запрашивают в сравнении со стандартными

45 данными в базе данных. Запрашиваемые данные получают из образца, взятого у пациента, у которого имеется ИМ или для которого желательно установить вероятность развития сердечной недостаточности. Иными словами, клинический исход для данного пациента неизвестен, и оператор запрашивает программу для прогнозирования исхода

для данного пациента (повышенный или пониженный риск СН после ИМ).

Программа сравнивает нерассмотренные/запрашиваемые данные образца с рядом стандартных данных и делает свой прогноз, касающийся клинического исхода для пациента.

5 В случае когда выше упоминается мРНК, следует принять во внимание, что то же самое верно и в отношении уровней белков.

Классификатор является предпочтительным для определения прогноза.

Классификатор может включать программы, такие как РАМ, Kstar и SVM, которые хорошо известны для осуществления прогноза различными способами. Однако все
10 равно всегда имеет место сравнение данных по мРНК (или белку) в «нерассмотренном» образце с одним или более пунктов «рассмотренных» данных, например, в случае поиска «ближайшего соседа». Kstar и SVM, например, используют различные алгоритмы, но, в главном, работают сходным образом путем сравнения запрашиваемых данных или величин с ближайшим рядом величин.

15 Предпочтительно, таким образом, чтобы классификатор исследовал базу данных и сравнивал запрашиваемые/нерассмотренные данные и известными/рассмотренными данными. Обнаружив «наибольшее совпадение» (например, в пространственном отношении, при анализе уровней всех трех мРНК и белков плазмы) в базе данных, программа основывает свой прогноз клинического исхода у запрашиваемого пациента
20 на клиническом исходе пациента с указанным наибольшим совпадением.

Также разработан способ, включающий:

- исследование образца биологической жидкости пациента после ИМ на предмет уровней мРНК или плазменных белков VEGFB, THBS1 и/или PGF для определения параметрических данных пациента, с привязкой указанных параметрических данных
25 к конкретному клиническому исходу, относящемуся к заболеваемости сердечной недостаточностью указанного пациента, и внесение указанных параметрических данных в базу данных;

- повторение анализа для множества пациентов после ИМ для заполнения базы данных, содержащей стандартную информацию, касающуюся взаимоотношений между
30 заболеваемостью СН и уровнями VEGFB, THBS1 и/или PGF;

- определение параметрических данных пациента после ИМ с неизвестным прогнозом;
и

- обработка параметрических данных для уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF от пациента для их сравнения с параметрическими данными в базе данных; и

35 - осуществление вероятного прогноза для пациента после ИМ с неизвестным прогнозом, в зависимости от результата сравнения.

Указанные этапы также могут быть включены в способ по первому аспекту изобретения.

Вероятный прогноз может представлять собой повышенный или пониженный риск
40 СН, который затем может влиять на назначаемое клиницистом дальнейшее лечение пациента. Термины «прогноз» и «диагноз» можно использовать взаимозаменяемым образом, если не очевидно иное.

Также создана база данных, включающая параметрические данные от пациентов с ИМ; параметрические данные включают клинический исход у пациента,
45 соответствующий по меньшей мере одному из и предпочтительно всем трем из уровней VEGFB, THBS1 и PGF, исследованных после ИМ, как описано в настоящем документе. Изобретение относится также к сравнивающему устройству, такому как компьютер, для доступа к базе данных и/или обработки запроса. Изобретение относится также к

системе, включающей базу данных и по меньшей мере один компьютер для доступа и/или эксплуатации базы данных. Компьютер также можно использовать для обработки или осуществления запроса в базу данных с использованием параметрических данных пациента, подлежащего исследованию.

5 Базу данных можно хранить централизованно, например на сервере, или можно сохранять в лабораторном или полевом оборудовании, используемом для исследования уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF или в компьютере, связанном с указанным оборудованием, как обсуждается ниже. Компьютер также может располагаться централизованно, на сервере, или на отдалении, например в
10 промежуточной лаборатории, или располагаться в полевом оборудовании.

Также разработан набор, который может включать лабораторное или полевое оборудование для исследования образца от пациента. Оборудование может включать базу данных или может просто включать дисплей или считывание результатов анализа. Оборудование может обладать способностью контактировать с базой данных на
15 отдалении, например, через сеть Интернет или Интернет как проводной, так и беспроводной.

Изобретение относится также к способу получения параметрических данных от пациента, путем исследования уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF и предпочтительно ассоциирования данных об уровнях с пациентом, например, с использованием
20 идентификатора пациента, такого как код.

Также разработан способ получения параметрических данных для уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF у пациента для сравнения их с параметрическими данными в базе данных. Данные можно обрабатывать с использованием ресивера или передавать на процессор.

25 Таким образом, изобретение относится также к способу обработки параметрических данных для уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF у пациента и сравнения их с параметрическими данными в базе данных. Вероятный прогноз для пациента может осуществляться процессором в зависимости от результата сравнения и может, необязательно, передаваться на отдельный компьютер и/или набор или оборудование,
30 обсуждавшееся выше, через сеть Интернет и посредством проводной или беспроводной передачи.

Базу данных можно хранить также на программном носителе, таком как диск или запоминающее устройство. Таким образом, изобретение относится также к программному носителю, включающему базу данных, организованную таким образом,
35 чтобы компьютер определял вероятность развития у пациента СН после ИМ, после того, как введены параметрические данные по уровням VEGFB, THBS1 и/или PGF у пациента.

Уровни VEGFB, THBS1 и/или PGF можно рассматривать как величины или соотношения, и они не обязательно должны представлять собой объемы или массу на
40 единицу объема и т.п.

Предпочтительно стандартный образец получают от пациента из сходной с данным пациентом демографической, генотипической или фенотипической группы. Стандартный образец можно рассматривать как принадлежащий к той же демографической группе, что и пациент с инфарктом, если удовлетворяется любое количество следующих
45 критериев: пол, возраст, раса или этническая принадлежность и анамнез. Подходящие генотипические или фенотипические контрольные образцы можно выбирать на основе любого количества подходящих критериев отбора, таких как определение генотипа пациента в одном или более локусов, в частности тех, о которых известно, что они

связаны с пациентами с инфарктом, сердечной недостаточностью и/или ремоделированием желудочков.

Определение генотипа может включать выявление наличия аминокислотного изменения в последовательности гомопексинового домена MMP-9 (матриксной металлопротеиназы 9); наличие аминокислотного изменения в указанном домене является показателем склонности к указанному патологическому состоянию сердца после инфаркта миокарда. Предпочтительно последовательность, которая выявлена, включает или кодирует аминокислотный остаток глутамина (Gln) или аргинина (Arg) на позиции, соответствующей позиции 148 гомопексиновому домену MMP-9.

Предпочтительно выявленная последовательность представляет собой SEQ ID NO 13, которая представляет собой аминокислотную последовательность гомопексинового домена MMP-9 из группы риска (склонности) (демонстрирующую Arg на позиции 148), или кодирующую ее полинуклеотидную последовательность. Полиморфизм одного нуклеотида (SNP), присутствующий в кодирующей последовательности гена MMP-9, находят с различной частотой у пациентов с хорошим или плохим прогнозом развития сердечной недостаточности после инфаркта миокарда, и он может приводить к изменению одной аминокислоты в гомопексиновом домене транскрибированного и активного белка MMP-9, что ведет к электростатическому изменению на сайте в MMP-9, который связывает тканевый ингибитор металлопротеиназы-1 (TIMP-1). Это важно, поскольку TIMP-1 представляет собой главный ингибитор активности MMP-9. Таким образом, может быть полезным определять, имеет ли пациент описанный выше SNP, а затем, если он его имеет, сравнивать уровни VEGFB, THBS1 и/или PGF (в исследованных образцах по настоящему изобретению) с уровнями в образцах от пациентов, о которых также известно, что они имеют описанный выше SNP, или наоборот.

Предпочтительно определение пониженного риска патологического состояния сердца соотносится с риском стандартных пациентов с инфарктом, имеющих относительно высокие уровни мРНК VEGFB ($>-1,4$), относительно низкие уровни THBS1 (<0) и/или относительно низкие уровни PGF ($<-0,1$) соответственно. Указанные величины выражают как log соотношение (РНК пациента/стандартная РНК). Обратное верно и для повышенного риска развития патологического состояния сердца.

Приведенные выше величины получены из таблицы 4, хотя предпочтительно, что указанные величины могут варьировать по меньшей мере на 1 или 2%, более предпочтительно по меньшей мере на 5%, более предпочтительно по меньшей мере на 7%, более предпочтительно по меньшей мере на 10%, более предпочтительно по меньшей мере на 15%, более предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40% и даже до 50%.

Поскольку единственным установленным биомаркером СН (сердечной недостаточности) является про-BNP (мозговой натрийуретический пептид), прогностическую эффективность 3 биомаркеров, представленных в настоящем документе, сравнивали с прогностической эффективностью NT-pro-BNP. Прогностическая эффективность уровня NT-pro-BNP в плазме, измеренного на 1 день после ИМ, была умеренной (AUC=0,63, таблица 5). Таким образом, совокупность 3 биомаркеров, описанных в настоящем документе, отчетливо превосходила прогностическую величину NT-pro-BNP. Тем не менее предпочтительно, чтобы BNP можно было исследовать в настоящем способе, чтобы повысить точность или подтвердить определенный прогноз. Указанный исследованный уровень BNP можно

сравнивать с исходным или стандартным уровнем BNP, как обсуждается в настоящем документе.

Нуклеотидные и протеиновые последовательности для про-BNP представлены в SEQ ID NO 10-11.

5 Также разработан способ осуществления прогноза для пациента с инфарктом миокарда, включающий:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB) и уровней тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF);

10 - сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с соответствующими уровнями VEGFB, THBS1 и/или PGF из стандартного образца; указанный стандартный образец имеет известный клинический исход; и

- осуществление на основе указанного сравнения прогноза для указанного пациента.

Уровни тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF)

15 предпочтительно представляют собой низкие уровни в плазме.

Также разработан способ осуществления прогноза для пациента с инфарктом миокарда, включающий:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB) и уровней

20 тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF);

- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с контролем; и

- осуществление на основе указанного сравнения прогноза для указанного пациента.

Это может быть осуществлено сравнением уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с

25 соответствующим уровнем VEGFB, THBS1 и/или PGF из стандартного образца; по меньшей мере один из следующих показателей указывает на повышенную вероятность неблагоприятного прогноза для указанного пациента:

- более низкие уровни VEGFB в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем VEGFB;

- более высокие уровни THBS1 в исследованном образце пациента по сравнению с

30 контрольным уровнем THBS1; и/или

- более высокие уровни PGF в исследованном образце пациента по сравнению с

контрольным уровнем PGF.

Также разработан способ осуществления прогноза для пациента с инфарктом миокарда, включающий:

35 - исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB) и уровней тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF); и

- запрос ранее созданной статистической программы (также называемой «классификатором») на уровни VEGFB, THBS1 и PGF;

40 в котором

- высокий уровень VEGFB и низкие уровни THBS1 и PGF связаны с повышенной вероятностью развития указанного патологического состояния сердца; и

- классификатор будет указывать, имеет ли пациент повышенную вероятность развития указанного патологического состояния сердца.

45 Уровни тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF) предпочтительно представляют собой низкие уровни в плазме.

Неблагоприятный прогноз предпочтительно заключается в том, что у пациента имеется высокая вероятность развития указанного патологического состояния сердца.

Изобретение относится также к способу определения вероятности развития у пациента с инфарктом миокарда патологического состояния сердца, включающему описанные выше этапы.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации

пациентов с инфарктом миокарда, имеющих пониженный риск развития патологического состояния сердца, включающему:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF);

- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с соответствующими уровнями VEGFB, THBS1 и/или PGF из стандартного образца; указанный стандартный образец имеет известный клинический исход; и

- определение на основе указанного сравнения имеет ли пациент пониженный риск.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации

пациентов с инфарктом миокарда, имеющих пониженный риск развития патологического состояния сердца, включающему:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF);

- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с соответствующими уровнями VEGFB, THBS1 и/или PGF из контроля; и

- определение на основе указанного сравнения имеет ли пациент пониженный риск.

Указанный способ можно модифицировать таким образом, чтобы он включал

сравнение уровней VEGFB, THBS1 и/или PGF с соответствующим уровнем VEGFB, THBS1 и/или PGF в стандарте; в котором по меньшей мере один из показателей указывает на пониженную вероятность возникновения у указанного пациента указанного патологического состояния сердца:

более высокие уровни VEGFB в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем VEGFB;

- более низкие уровни THBS1 в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем THBS1; и/или

- более низкие уровни PGF в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем PGF.

Указанный способ можно модифицировать таким образом, чтобы он включал:

- запрос ранее созданной статистической программы (также называемой «классификатором») на уровни VEGFB, THBS1 и PGF;

в котором

- высокий уровень VEGFB и низкие уровни THBS1 и PGF связаны с пониженной вероятностью развития указанного патологического состояния сердца; и

- классификатор будет указывать, имеет ли пациент пониженную вероятность развития указанного патологического состояния сердца.

Изобретение относится также к способу скрининга пациентов с инфарктом миокарда для оценки риска вероятности развития патологического состояния сердца. Указанный риск может быть повышенным или пониженным.

Способы по настоящему изобретению коррелируют измерение одного или более биомаркеров с более благоприятным клиническим исходом после ИМ. Наиболее предпочтительно биомаркер представляет собой VEGFB, и если его уровень является высоким на день 1 после ИМ, то данный пациент имеет более благоприятный

клинический исход после ИМ. Наиболее предпочтительно биомаркер представляет собой THBS1, и если его уровень является низким на день 1 после ИМ, то данный пациент имеет более благоприятный клинический исход после ИМ. Наиболее предпочтительно биомаркер представляет собой PGF, и если его уровень является

5 низким на день 1 после ИМ, то данный пациент имеет более благоприятный клинический исход после ИМ.

Следует понимать, что настоящие способы являются пригодными для осуществления прогноза для пациентов с ИМ путем коррелирования комбинированной оценки множества биомаркеров, которые в зависимости от их уровней могут показывать более

10 благоприятный клинический исход после ИМ.

Изобретение также можно использовать в разработке персонализированных медицинских мероприятий. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу разработки или улучшения терапевтической стратегии для пациентов после ИМ, на основе идентификации у указанных пациентов риска развития патологического

15 состояния сердца. Это может осуществляться посредством исследования уровней мРНК в клетках крови или уровней белка VEGFB, THBS1 и/или PGF в плазме.

Диагностические наборы для использования в настоящем изобретении доступны для THBS1 и PGF, например, такие как наборы от R&D Systems Inc. Однако для VEGFB заявителям было необходимо разработать собственный диагностический набор, как

20 обсуждается ниже. Действительно, единственный коммерчески доступный набор VEGFB (от USCNLIFE, VEGFB E0144h) не был достаточно чувствительным для обнаружения низких уровней VEGFB в плазме. При использовании усиленной хемотропной флуоресценции в качестве способа обнаружения и этапа амплификации с биотин-стрептавидином пределы обнаружения набора заявителей составили 10 пг/мл, в то время как пределы

25 обнаружения набора USCNLIFE, в котором используется классическое колориметрическое обнаружение, составляли, как было установлено, приблизительно 100 пг/мл.

Таким образом, изобретение относится также к способу определения уровней VEGFB в образце, включающему:

30 (a) контактирование образца по меньшей мере с одним захватывающим реагентом, иммобилизованным на носителе, с образованием иммобилизованного комплекса захватывающий реагент-образец;

(b) отделение образца от по меньшей мере одного иммобилизованного захватывающего реагента;

35 (c) контактирование иммобилизованного комплекса захватывающий реагент-образец с вторичным антителом, специфичным для VEGFB, и, необязательно, контактирование вторичного антитела с третичным антителом, специфичным для вторичного антитела;

(d) контактирование вторичного или третичного антитела со связывающей молекулой, такой как стрептавидин, конъюгированной со средством обнаружения; и

40 (e) измерение уровня вторичного или третичного антитела, связанного с захватывающими реагентами, с использованием средства обнаружения.

Предпочтительно захватывающий реагент представляет собой антитело, наиболее предпочтительно антитело, которое распознает тот же эпитоп, что и мышинное моноклональное антитело клон 58013 против человеческого VEGFB; указанное

45 моноклональное антитело предпочтительно специфичным образом связывается с VEGFB 167 и/или VEGFB 186.

Предпочтительно вторичное антитело представляет собой антитело, которое распознает тот же эпитоп, что и козье поликлональное антитело, которое специфичным

образом связывается с VEGFB 167 и/или VEGFB 186. Предпочтительно третичное антитело представляет собой конъюгированное с биотином антитело, специфичное в отношении вторичного антитела, например ослиное антикозье Ab. Предпочтительно средство обнаружения включает активность щелочной фосфатазы.

5 В предпочтительном варианте осуществления, таким образом, изобретение относится к способу определения уровней VEGFB в образце, включающему:

(a) контактирование, и, необязательно, инкубирование, образца с захватывающим реагентом, иммобилизованным на твердом носителе; захватывающий реагент представляет собой антитело, которое распознает тот же эпитоп, что и мышинное
10 моноклональное антитело клон 58013 против человеческого VEGFB; указанное моноклональное антитело специфичным образом связывается с VEGFB 167 и VEGFB 186 с образованием иммобилизованного комплекса захватывающий реагент-VEGFB;

(b) отделение образца от иммобилизованных захватывающих реагентов;

(c) контактирование иммобилизованного комплекса захватывающий реагент-VEGFB
15 с вторичным антителом; указанное антитело представляет собой антитело, которое распознает тот же эпитоп, что и козье поликлональное антитело, которое специфичным образом связывается с VEGFB 167 и VEGFB 186;

(d) контактирование вторичного антитела с третичным антителом; третичное антитело представляет собой конъюгированное с биотином ослиное антикозье антитело,
20 специфичное в отношении вторичного антитела;

(e) контактирование третичного антитела со стрептавидином, конъюгированным с щелочной фосфатазой;

(f) измерение уровня VEGFB 186 или VEGFB 167, связанного с захватывающими реагентами, с использованием средства обнаружения обнаруживаемого антитела.

25 Помимо этого заявители разработали набор ELISA для измерения уровней VEGFB 186 и VEGFB 167 в биологических жидкостях и его применение в качестве диагностического инструмента для идентификации пациентов, имеющих риск развития СН после ИМ.

Набор предпочтительно включает:

30 (a) по меньшей мере один захватывающий реагент, иммобилизованный на носителе;

(b) вторичное антитело, специфичное в отношении VEGFB 186 и/или VEGFB 167;

(c) необязательно, третичное антитело, специфичное в отношении вторичного антитела;

(d) связывающую молекулу, такую как стрептавидин, конъюгированную со средством
35 обнаружения; и

(e) средство для измерения уровня вторичного или третичного антитела, связанного с захватывающими реагентами, с использованием средства обнаружения.

Как описано выше, предпочтительно захватывающий реагент представляет собой антитело, наиболее предпочтительно антитело, которое распознает тот же эпитоп, что
40 и мышинное моноклональное антитело клон 58013 против человеческого VEGFB; указанное моноклональное антитело, предпочтительно специфичным образом связывается с VEGFB 167 и/или VEGFB 186. Предпочтительно, вторичное антитело представляет собой антитело, которое распознает тот же эпитоп, что и козье поликлональное антитело, которое специфичным образом связывается с VEGFB 167
45 и/или VEGFB 186. Предпочтительно третичное антитело представляет собой конъюгированное с биотином антитело, специфичное в отношении вторичного антитела, например ослиное антикозье Ab. Предпочтительно средство обнаружения включает активность щелочной фосфатазы.

Указанный биологический образец может быть предпочтительно выделен от человека и может представлять собой плазму или сыворотку. Предпочтительно также, чтобы иммобилизованные захватывающие реагенты были нанесены в виде покрытия на микротитрационный планшет. Предпочтительно обнаружение амплифицируется хемилюминесцентным реагентом. Очищенный человеческий VEGFB 167 можно использовать в качестве антигенного стандарта.

Заявители сравнили свой набор VEGFB с единственным имеющимся в продаже набором VEGFB, который они обнаружили (USCNLIFE, VEGFB E0144h). Набор заявителей является более чувствительным и, таким образом, позволяет измерять VEGFB у большего количества пациентов, чем набор USCNLIFE.

Согласно еще одному аспекту настоящее изобретение относится к способу идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих пониженный риск развития патологического состояния сердца, включающему:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и/или плацентарного фактора роста (PGF); и
- запрос ранее созданной статистической программы (также называемой классификатором) на уровне VEGFB, THBS1 и PGF;

в котором

- высокий уровень VEGFB и низкие уровни THBS1 и PGF связаны с пониженной вероятностью развития указанного патологического состояния сердца; и
- классификатор будет указывать, имеет ли пациент пониженную вероятность развития указанного патологического состояния сердца.

У заявителей имеется большая база данных о пациентах с острым ИМ с более чем 20 клиническими параметрами и 4-месячным и 1-летним периодами дальнейшего наблюдения. Среди других клинических параметров фракция выброса (ФВ) сердца, которая представляет собой способность сердца перекачивать кровь в периферические артерии, измеряли посредством эхо-кардиографии в день инфаркта, спустя 4 месяца и 1 год. Предполагали, что пациенты, имеющие ФВ через 4 месяца $\leq 40\%$, страдают от ремоделирования, в то время как пациенты, имеющие ФВ через 4 месяца $>40\%$, выздоравливают нормально. В нескольких протоколах, которые осуществили в лаборатории заявителей, использовали базу данных для идентификации ранних маркеров возникновения СН после ИМ посредством различных подходов. Биомаркеры, идентифицированные посредством двух фундаментально различающихся подходов, объединяли и комбинацию наиболее прогностически надежных биомаркеров определяли как «прогностический ряд».

Первый подход включал технологию ДНК микроматриц. Биоподписи или профили экспрессии генов циркулирующих в крови клеток анализировали из образцов крови, отобранных в день ИМ. Указанная технология позволяла осуществлять идентификацию дифференциально регулируемых генов между двумя группами пациентов с крайними фенотипами, т.е. одной группой пациентов, имеющих благоприятный клинический исход после ИМ (группа высокой ФВ, ФВ $>40\%$) и одной группой, имеющей неблагоприятный исход после ИМ (группа низкой ФВ, ФВ $\leq 40\%$). Заявители охарактеризовали биоподписи клеток крови от 32 пациентов, по 16 из группы высокой ФВ и низкой ФВ). С использованием алгоритма SAM (статистический анализ микроматриц) и коэффициента изменения 1,3 было установлено, что 525 генов дифференциально экспрессируются между 2 группами пациентов (коэффициент ложного обнаружения 24,5%). Среди указанных генов 9 обладали прогностической ценностью

в отношении СН.

Второй подход был основан на биоинформационном описании сети белок-белкового взаимодействия для ангиогенеза при ИМ у человека. Действительно, ангиогенез представляет собой один из благоприятных процессов заживления, которые имеют место в сердце после ИМ, и дефект ангиогенеза может привести к СН. Сеть была создана с использованием аннотированных белок-белковых взаимодействий из базы данных человеческих белков. Указанная глобальная сеть состояла из 556 узлов (т.е. белков) и 686 ребер (т.е. взаимодействий). После дальнейшего анализа на основе сети и экспрессии генов 38 полученных из сети генов показали значительную прогностическую ценность. Интересно, что объединение классификационных моделей на основе экспрессии генов с классификационными моделями на основе сети дало сокращенное количество биомаркеров-кандидатов со значительно улучшенной прогностической ценностью, чем каждый подход, рассматриваемый отдельно. Площадь под кривой (AUC), которая представляет прогностическую способность биомаркеров, составляла от 0,56 до 0,72 для классификационной модели на основе экспрессии генов, и от 0,56 до 0,73 для классификационной модели на основе сети. Когда две модели были объединены, был создан ряд из 3 биомаркеров с AUC 0,82 (т.е. с большой прогностической ценностью в отношении возникновения СН): указанный ряд называется в настоящем документе «прогностическим рядом». Указанными 3 биомаркерами были: тромбоспондин-1 (THBS1), плацентарный фактор роста (PGF или PlGF) и сосудистый эндотелиальный фактор роста В (VEGFB). В то время как THBS1 обладает антиангиогенными свойствами, VEGFB и PGF проявляют свои проангиогенные свойства, стимулируя рост и размножение клеток сосудистого эндотелия.

Затем заявители подтвердили, что различия в экспрессии генов, наблюдающиеся на уровне мРНК при использовании микроматриц, являются эффективными на белковом уровне. Для данной задачи измеряли уровни 3 биомаркеров в плазме посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Указанные эксперименты подтвердили, что белковые уровни THBS1 и PGF достоверно различались у пациентов с высокой и низкой ФВ.

Поскольку, как было установлено, наборы ELISA для VEGFB, имеющиеся в продаже, не являются достаточно чувствительными для обнаружения VEGFB в исследованных заявителями образцах плазмы, заявители разработали собственный набор, который позволяет осуществлять количественное определение VEGFB в биологических жидкостях, таких как плазма человека.

Под «благоприятным исходом» следует понимать более низкий риск развития у пациента патологического состояния сердца, такого как сердечная недостаточность и/или ремоделирование левого желудочка. Полагают, что ремоделирование правого желудочка является менее релевантным, поэтому оно не является предпочтительным.

Под «неблагоприятным исходом» следует понимать более высокий риск развития у пациента патологического состояния сердца, такого как сердечная недостаточность и/или ремоделирование левого желудочка.

Следует понимать также, что, хотя риски сердечной недостаточности и ремоделирования левого желудочка связаны между собой, они представляют собой отдельные состояния и, следовательно, пациент может страдать одним состоянием и не страдать другим. Таким образом, повышенный риск сердечной недостаточности или ремоделирования левого желудочка является неблагоприятным.

Следует понимать, что последовательности РНК, приведенные в перечне последовательностей, включают тимин (Т) в таком виде, в каком они представлены на

вебсайте NCBI. В каждом случае очевидно, что предполагается замена Т урацилом (U).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг.1 представляет собой иллюстрацию данных микроматриц, интерпретированные с использованием алгоритма SAM.

5 Фиг.2 показывает сеть белок-белковых взаимодействий для ангиогенеза при ИМ человека.

Фиг.3 иллюстрирует стратегию, использовавшуюся для комбинированного анализа классификационных моделей на основе экспрессии генов и классификационных моделей на основе сети.

10 Фиг.4 показывает теплокарту, иллюстрирующую различия в экспрессии (микроматрицы) биомаркеров среди пациентов с высокой (H) и низкой (L) фракцией выброса.

Фиг.5 показывает квантиль-квантильные графики, иллюстрирующие взаимоотношения между фракцией выброса и экспрессией биомаркеров по оценке с использованием микроматриц и ELISA.

Фиг.6 показывает диаграммы разброса данных, иллюстрирующие взаимоотношения между фракцией выброса и экспрессией биомаркеров по оценке с использованием микроматриц и ELISA.

Фиг.7 представляет эволюцию уровней VEGFB в плазме от дня инфаркта (день 0) до 20 следующего дня (день 1). В то время как VEGFB в плазме уменьшается от дня 0 до дня 1 у пациентов с низкой ФВ (-10%), у пациентов с высокой ФВ наблюдается повышение уровней VEGFB (+15,4%).

Фиг.8А показывает экспрессию величин VEGFB с использованием количественной ПЦР и микроматриц у пациентов с высокой ФВ и низкой ФВ.

25 Фиг.8В показывает значимую корреляцию, наблюдавшуюся между экспрессией VEGFB и фракцией выброса.

Фиг.9 показывает уровни VEGFB между группами высокой и низкой ФВ на день 0, день 1 и день 2 после ИМ.

Таблица 1 представляет собой краткое изложение прогностического поведения 30 классификационных моделей на основе уровней мРНК VEGFB, THBS1 и PGF.

Таблица 2 представляет собой краткие выводы, полученные в результате экспериментов, лежащих в основе настоящего изобретения.

Таблица 3 представляет собой краткое изложение статистики, произведенной с 35 задачей сравнения уровней VEGFB, THBS1 и PGF среди пациентов с высокой ФВ и пациентов с низкой ФВ.

Таблица 4 представляет собой краткое изложение статистики, произведенной с задачей сравнения уровней мРНК 3 биомаркеров в двух группах.

Таблица 5 представляет собой краткое изложение прогностического поведения NT-pro-BNP.

40 Таблица 6 представляет собой перечень 28 ангиогенных генов, дифференциально экспрессированных между группами с высокой и низкой ФВ.

Таблица 7 представляет собой краткое изложение прогностического поведения с использованием моделей машинного обучения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

45 Сердечная недостаточность (СН) представляет собой главное осложнение инфаркта миокарда (ИМ). Недавние данные показали, что у 63% пациентов развивается СН в течение 6 лет после ИМ. Ангиогенез представляет собой ключевой феномен, участвующий в восстановлении миокарда после ИМ. Ангиогенез строго регулируется

балансом, управляемым большим числом ангиогенных факторов, некоторые из которых являются проангиогенными, а некоторые - антиангиогенными. Дисрегуляция указанного баланса может привести к неправильному ангиогенезу и стать основой для развития СН после эпизода ИМ.

5 Недавние сообщения ясно указывают, что ранняя идентификация пациентов, склонных к развитию СН после ИМ, значительно улучшает разработку терапевтической стратегии для отдельного пациента («персонализированная медицина»). Подобно многим другим сердечно-сосудистым расстройствам, СН является многофакторным заболеванием. Таким образом, использование отдельных биомаркеров для
10 прогнозирования возникновения СН после ИМ обладает ограниченной ценностью. Увеличение числа прогностических биомаркеров может, следовательно, представлять интерес для окончательного прогнозирования СН.

 Во-первых, заявители предположили, что ряд прогностических биомаркеров можно идентифицировать посредством анализа биоподписей циркулирующих клеток крови.
15 Во-вторых, заявители предположили, что подход на основе сети белок-белкового взаимодействия также может обладать возможностью для выявления прогностических маркеров СН. И, в-третьих, заявители изучили, позволяет ли комбинация данных, полученных с использованием указанных двух независимых подходов, достичь более высокого уровня прогноза, чем каждый из подходов в отдельности.

20 Для указанной задачи заявители отобрали две группы пациентов (в группе $n=16$) с ИМ; одна группа пациентов имела благоприятный исход после ИМ (фракция выброса (ФВ) $>40\%$), а другая группа пациентов имела неблагоприятный исход (ФВ $\leq 40\%$). Указанная стратегия отбора «крайних фенотипов» была избрана, чтобы увеличить шансы обнаружения дифференциально экспрессируемых генов в двух группах без
25 необходимости большого размера выборки. РНК экстрагировали из интактных клеток, выделенных из периферической крови указанных пациентов. Биоподписи определяли с использованием анализа профилей микроматриц. После нескольких стандартизаций, фильтрования и статистических процедур было установлено, что ряд из 525 генов дифференциально экспрессируется в двух группах пациентов (коэффициент изменения
30 1,3; коэффициент ложного обнаружения 24,5%). Среди них группа из 47 генов, обладающих умеренной прогностической ценностью, была идентифицирована с помощью классификационных моделей с максимальной AUC 0,72. Дальнейшее фильтрование указанных генов дало группу из 9 генов с эквивалентной прогностической ценностью (AUC 0,68).

35 В попытке повысить эффективность прогноза, обеспечиваемого генами, полученными в результате экспериментов с микроматрицами, и принимая во внимание важность ангиогенеза в восстановлении сердца после ИМ, была изображена сеть белок-белковых взаимодействий при ангиогенезе. Указанную сеть сконструировали путем
40 экстрагирования генов, известных как участвующие в указанном процессе, и соответствующих (курируемых) белок-белковых взаимодействий из общественных баз данных. Кластерный анализ указанной сети обнаружил модуль, достоверно связанный с ростом клеток и регуляцией роста. Было установлено, что внутри указанного кластера 38 генов достоверно дифференциально экспрессируются между двумя классами ФВ. Различные, независимые классификаторы, выстроенные с использованием указанных
45 38 генов, представляют умеренную прогностическую ценность (макс. AUC=0,73), эквивалентную полученной с использованием микроматриц. Интересно, что дальнейшее фильтрование указанных генов (отбор признаков на основе корреляции) дало ряд из 3 генов с большей прогностической ценностью (AUC=0,82 с использованием обучения

на примерах, таблица 1). Указанные три гена, VEGFB, THBS1 и PGF, рассматриваются в настоящем документе как новый «прогностический ряд» биомаркеров СН.

Дифференциальная экспрессия указанных 3 генов была подтверждена с помощью количественной ПЦР. Помимо этого измеряли уровни 3 биомаркеров в плазме.

Заявители показали, что пациенты, способные давать значительный ответ на ИМ, характеризующийся высокими уровнями мРНК или белков сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB) и низкими уровнями тромбоспондина-1 (THBS1) и плацентарного фактора роста (PGF) в плазме, имеют малую склонность к развитию СН и/или ремоделированию желудочков. Измерение уровней указанных трех биомаркеров в плазме может, следовательно, служить полезным инструментом для прогнозирования возникновения СН и/или ремоделирования желудочков после ИМ.

Таблица 1

Прогностическое поведение классификационных моделей на основе уровней мРНК 3 биомаркеров

Тип ввода	Классификационная модель	Типичная точность* (%)	AUC*
Только биомаркеры на основе SAM	K*	65	0,63
Биомаркеры на основе сети	K*	84	0,82
Только биомаркеры на основе SAM	SVM	68	0,68
Биомаркеры на основе сети	SVM	75	0,75

* На основе перекрестной проверки с исключением объектов по одному.

Использованные потенциальные биомаркеры: полученные с использованием SAM (9 генов) и полученные на основе сети (3 гена). AUC: Площадь под кривой (ROC); SVM: Support Vector Machine.

Таким образом, заявители предлагают новую стратегию для идентификации пациентов, имеющих риск развития СН после ИМ, на основе измерения группы из 3 биомаркеров, VEGFB, THBS1 и PGF. Указанные измерения можно осуществлять по РНК, экстрагированной из клеток крови или по уровням соответствующих белков в плазме.

В таблице 2 кратко изложены конкретные открытия, лежащие в основе настоящего изобретения.

Таблица 2

Связь между мРНК и уровнями 3 биомаркеров в плазме и ФВ

	Высокая ФВ (благоприятный исход)		Низкая ФВ (неблагоприятный исход)	
	мРНК	Плазма	мРНК	Плазма
VEGFB	Высокая	Высокая	Низкая	Низкая
THBS1	Низкая	Низкая	Высокая	Высокая
PGF	Низкая	Низкая	Высокая	Высокая

Уровни мРНК измеряли с использованием микроматриц в образцах крови, взятых в день ИМ.

Уровни в плазме измеряли с использованием ELISA спустя день после ИМ.

Все ссылки, процитированные в настоящем документе, включены в него задачиком в тех пределах, в которых они не конфликтуют с настоящим изобретением.

Изобретение далее будет описано более подробно с помощью следующих неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

Пациентов с острым ИМ лечили с использованием первичного чрескожного коронарного вмешательства. Острый ИМ диагностировали по наличию боли в груди <12 часов со значительным подъемом сегмента ST и положительным анализом на

сердечные ферменты. Образцы крови получали во время механической реперфузии (для микроматриц и анализов количественной ПЦР) и спустя день после ИМ (для определения уровней в плазме). Все пациенты подписывали согласие на основе предоставленной полной информации.

Микроматрицы

Для повышения шансов заявителей на выявление релевантных биомаркеров в контексте ремоделирования желудочков заявители отобрали две группы пациентов, имеющих «крайние» фенотипы после ИМ, а именно пациентов, которые эволюционировали благоприятным образом после инфаркта ($ФВ \geq 45\%$, в среднем 61%), и пациентов, которые эволюционировали неблагоприятным образом после инфаркта ($ФВ \leq 40\%$, в среднем 33%). Каждая группа включала 16 пациентов.

Общую РНК экстрагировали из клеток цельной крови с использованием технологии RAXgene™. Кровь, изъятую в пробирки для РНК крови RAXgene™ (PreAnalytix®, BD Europe, Erembodegem, Бельгия), хранили при -20°C до процедуры экстракции РНК. Экстракцию осуществляли с использованием набора RAXgene™ Blood RNA (Qiagen, Courtaboeuf, Франция), согласно инструкциям производителя. Количество РНК измеряли с использованием спектрофотометра ND-1000 (NanoDrop® Technologies, Wilmington, США). Качество РНК оценивали с использованием аппарата 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, Франция) с чипами RNA 6000 Nano. Только РНК высокого качества ($ОП_{260}/ОП_{280} > 1,9$ и $ОП_{260}/ОП_{230} > 1,7$) и РНК более низкого качества рассматривали для дальнейшего анализа.

Общепринятую стандартную РНК (Universal Human Reference RNA, Stratagene Europe, Amsterdam, Нидерланды), смесь РНК из 11 клеточных линий, использовали в сочетании с РНК пациента на следующих этапах, с задачей обеспечения внутреннего стандарта для сравнений относительных уровней экспрессии генов в матрицах.

Информационные РНК амплифицировали с использованием набора Amino Allyl MessageAmp™ (Ambion®, Cambridgeshire, Соединенное Королевство), согласно протоколу производителя, начиная с одного мкг общей РНК. Пять мкг каждой аминокислоты аРНК метили с использованием $\text{Cu}3$ или $\text{Cu}5$ (Amersham, Buckinghamshire, Соединенное Королевство). Краску, связывающуюся с аминокислотой аРНК, измеряли с использованием спектрофотометра ND-1000 NanoDrop®. Выход связавшейся краски $> 5\%$ представлял собой необходимое предварительное условие для дальнейшего анализа. 750 нг каждой аминокислоты аРНК, меченной $\text{Cu}3$ или $\text{Cu}5$ (стандартная РНК или донорская РНК), объединяли и гибридизировали на пангеномных олигонуклеотидных микроматрицах, содержащих 25000 генов (Genomic Platform, Illkirch, Франция). Четыре микроматрицы для каждого пациента гибридизировали и осуществляли обменное окрашивание (2 микроматрицы пациент- $\text{Cu}3$ /стандарт- $\text{Cu}5$ и 2 микроматрицы пациент- $\text{Cu}5$ /стандарт- $\text{Cu}3$). Этапы гибридизации осуществляли с использованием системы Agilent Technologies. Вкратце, РНК фрагментировали с использованием фрагментационного буфера, а затем смешивали с гибридизационным буфером. Микроматрицы блокировали с использованием 50 мМ этаноламина в 50 мМ боратном буфере с $\text{pH } 9,0$.

Гибридизационные камеры Agilent и вращающуюся печь использовали для гибридизации при 60°C в течение 17 часов при 4 об/мин. Микроматрицы промывали в течение 10 минут в 6X SSC, 0,005% Triton X-102, в течение 5 минут в 0,1X SSC, 0,005% Triton X-102, а затем сушили центрифугированием и сканировали с использованием сканера для микроматриц Axon 4000B и компьютерной программы GenePix Pro 6® (Molecular Devices, Berks, UK). Фотоумножитель достигал настройки, и во время сканирования получали 0,1% насыщенные пятна.

Обнаружение пятен и количественное определение исходных данных по всем четырем микроматрицам для каждого пациента осуществляли в ходе пакетного анализа с использованием бесплатно распространяемого программного обеспечения MAIA® (Institut Curie, Франция). Указанная компьютерная программа определяет каждое пятно по девяти качественным параметрам, что позволяет выявлять «пятна хорошего качества» в четырех микроматрицах. Только хорошие пятна сохраняли для дальнейшего анализа. Этап нелинейной стандартизации Lowess осуществляли с использованием компьютерной программы Acuity® (Molecular Devices) для компенсации неравномерного распределения Cy3-Cy5. На последующих этапах использовали стандартизированное log соотношение Cy3/Cy5. Затем осуществляли этап фильтрации для удаления генов, которые не присутствовали по меньшей мере в трех микроматрицах из четырех. Качество и воспроизводимость каждой из четырех микроматриц для каждого пациента оценивали с использованием ANOVA, коэффициентов корреляции и самоорганизующихся карт, полученных с использованием компьютерной программы Acuity®. Данные хранили с использованием основанной на интернет-технологии управляющей программы для данных микроматриц MEDIANTE.

Перед статистическим анализом гены, не присутствовавшие по меньшей мере у 50% пациентов, отфильтровывали. Контролируемый анализ осуществляли с использованием двух комплементарных подходов. Первый подход включает компьютерную программу анализа значимости микроматриц (SAM), которая коррелирует экспрессию генов с внешней переменной, такой как величина ФВ. Использовали непарный двухвыборочный критерий. Внесение величин пропуска генов осуществляли с использованием алгоритма K-ближайших соседей с использованием 10 соседей.

Сеть белок-белковых взаимодействий

Ряд основных генов, о которых известно, что они связаны с ангиогенезом при инфаркте миокарда, получали из базы данных Entrez-Gene; запрос: «человек И сердце И ангиогенез И инфаркт И миокарда». Аннотированные белок-белковые взаимодействия, связанные с указанными основными генами, получали из базы данных стандартных человеческих белков Human Protein Reference Database (HPRD).

Кластерный анализ сети осуществляли для идентификации потенциально функциональных сетевых модулей. Кластеры идентифицировали с использованием алгоритма кластеризации MCODE (дополнительный программный модуль Cytoscape).

Биохимические исследования THBS1, PGF и NT-pro-BNP

Уровни THBS1 и PGF в плазме измеряли в образцах от 46 пациентов посредством ELISA с использованием наборов Quantikine DTSP10 и DPG00 соответственно (R&D Systems, Oxon, UK). Пределы обнаружения анализов составляли 0,35 нг/мл для THBS1 и 7 пг/мл для PGF. Уровень pro-BNP (N-терминальный -про-BNP, NT-pro-BNP) измеряли с использованием иммунологического устройства Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Meylan, Франция). Пределы обнаружения анализа составляли 20 пг/мл.

Создание диагностического набора VEGFB

Сандвич ELISA был разработан для обнаружения VEGFB 167 и VEGF-B 186. Микротитрационные планшеты (Lumitrac 600, Greiner, Бельгия) покрывали 100 мкл мышинового анти-VEGF-B моноклонального антитела (2 мкг/мл в PBS, MAB751, R&D systems, UK) в течение ночи при 4°C. После трех промываний планшеты блокировали в течение 1 часа с использованием 300 мкл 6% BSA-PBS при 500 об/мин и комнатной температуре. Стандартную кривую получали с использованием человеческого VEGFB 167 в количестве от 2000 пг/мл до 15,6 пг/мл (751-VE, R&D Systems) в 1% BSA-PBS. После блокирования планшет трижды промывали и инкубировали в течение 2 часов с

100 мкл плазмы, контроля или стандартов при 500 об/мин и комнатной температуре. После трех промываний 100 мкл козьего поликлонального VEGF-B антитела (400 нг/мл в 1% BSA-PBS, AF751, R&D Systems) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 1 часа при 500 об/мин и комнатной температуре. После трех промываний 100 мкл конъюгированного с биотином антикозьего антитела (1:275000 в 1% BSA-PBS, 705-065-147, Jackson, США) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 1 часа при 500 об/мин и комнатной температуре. После трех промываний 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой (2 мкг/мл в 1% BSA-PBS, 016-050-084, Jackson) добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 1 часа при 500 об/мин и комнатной температуре. Планшеты промывали четыре раза физиологическим раствором с Tris буфером с добавлением Tween 20 (pH 7,5) перед инкубацией с 100 мкл на лунку Lumiphos 530TM (Lumigen, США) в течение 30 минут при 500 об/мин, комнатной температуре и с защитой от света. Хемолюминесценцию выявляли с использованием Polarstar Optima (BMG Labtech, Paris, Франция).

Статистический анализ

Для каждой группы вводов оценивали различные стандартные статистические и машинные классификаторы самообучения, например методики Prediction Analysis for Microarrays (PAM), Support Vector Machine (SVM) и K*. K* представляет собой модель на основе примеров, которая классифицирует новый образец на основе информации о классах, предоставляемой его наиболее схожими (или ближайшими) соседями в наборе данных самообучения. K* использует меру на основе энтропии для оценки ряда соседей. Модели использовали с глобальной смесью $\alpha=20$, а также кривых средней колоночной энтропии для оценки пропущенных величин.

Дальнейшее фильтрование данных по генам на основе сети осуществляли с помощью алгоритма отбора характеристик на основе корреляции (CFS) с использованием стратегии «лучшего первого поиска» (BF) (фиг.3). CFS представляет собой способ фильтра отбора характеристик, который находит подгруппы характеристик (т.е. генов), которые максимизируют корреляцию ген-класс, в то же время минимизируя корреляцию ген-ген. Способы фильтра отбора характеристик применяют независимо от какой бы то ни было классификационной модели. Стратегия BF основывалась на энергичном поиске максимума, дополненном перебором подгруппы с возвратами.

Результаты классификационной оценки оценивали с использованием стратегии перекрестной проверки с исключением объектов по одному (LOO), а также с 10-кратной перекрестной проверки. Расчетные площади под кривой (AUC) перекрестной проверки ROC (характеристической кривой обнаружения) использовали для суммирования расчетной классификационной характеристики классификаторов.

Статистические различия между группами ФВ (на основе каждого из биомаркеров) использовали для критерия Стьюдента и подтверждали непараметрическими критериями. Корреляции между указанными биомаркерами и величинами ФВ оценивали с использованием стандартных коэффициентов Пирсона (таблица 2).

Компьютерные программы

Исполнение машинных моделей обучения и статистическую оценку осуществляли с использованием платформы извлечения информации Weka (v. 3.4). Иерархическую кластеризацию осуществляли с использованием метода невзвешенных парных групп с арифметическими средними и коэффициентами корреляции. Кластеризованную визуализацию осуществляли с использованием GEPAS. Статистические критерии значимости, корреляционные величины Пирсона и графические построения получали

с использованием пакета Statistica (v. 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. График статистического анализа микроматриц (SAM), показывающий, что 525 генов дифференциально экспрессируются между группами с низкой и высокой ФВ (фигура 1). Был выбран порог для коэффициента изменения 1,3 и получен FDR 24,5%. Красные точки представляют гены с повышающей регуляцией в группе с низкой ФВ, зеленые гены с повышающей регуляцией в группе с высокой ФВ, и черные точки представляют гены с коэффициентом изменения $<1,3$ между двумя группами.

2. Сеть белок-белковых взаимодействий для ангиогенеза при ИМ человека (фигура 2). Полученная сеть состояла из 556 узлов (белков) и 686 ребер (взаимодействий). Кластерный анализ последовательно выдвигал на первый план существование в сети кластера (53 белка) с высокосignимой сверхрепрезентацией (онтология генов) биологических процессов, относящихся к росту клеток и регуляции роста.

3. Фигура 3 показывает, что комбинированный анализ классификационных моделей на основе экспрессии генов и классификационных моделей на основе сети позволяет идентифицировать 3 гена с более высокой прогностической ценностью (макс. AUC=0,82), чем только классификационных моделей на основе экспрессии генов ($0,56 < AUC < 0,72$) или только классификационных моделей на основе сети ($0,56 < AUC < 0,73$). Наиболее высокая прогностическая ценность (на основе 3 генов) в настоящее время получена с использованием модели самообучения на основе примеров K*.

4. Теплокарта иллюстрирует различия в экспрессии (полученной с использованием микроматриц) биомаркеров среди пациентов с высокой (H) и низкой (L) фракцией выброса (фигура 4). Цвета (красный, розовый, светло-синий, темно-синий) показывают пределы величин экспрессии (высокая, умеренная, низкая, самая низкая). Белый цвет обозначает не поддающиеся обнаружению величины. VEGFB отчетливо больше экспрессировался в группе пациентов, имеющих высокую ФВ, в то время как THBS1 и PGF больше экспрессировались в группе с низкой ФВ.

5. Квантиль-квантильные графики (фигура 5) и диаграммы разброса данных (фигура 6) иллюстрируют статистическую зависимость между фракцией выброса и экспрессией биомаркеров по оценке с использованием микроматриц и ELISA. Показанное линейное отношение предполагает, что указанные переменные следуют сходным распределениям данных. Результаты t-критерия Стьюдента и линейные коэффициенты корреляции, соответствующие указанным диаграммам, суммированы в таблице 3. VEGFB положительно коррелировал с ФВ, в то время как THBS1 и PGF отрицательно коррелировали с ФВ. Конкордантные результаты были получены с использованием микроматриц и ELISA для THBS1 и PGF. Было установлено, что уровень мРНК VEGFB является достоверно более высоким у пациентов с низкой ФВ, чем у пациентов с низкой ФВ при использовании методики микроматриц.

Таблица 3

Ген	Микроматрицы	Белки плазмы
THBS1	t=2,4, p=0,02 r=-0,3, p=0,2	t=2,1, p=0,04 r=-0,2, p=0,1
PGF	t=2,8, p=0,01 r=-0,2, p=0,2	t=2,2, p=0,04 r=-0,2, p=0,2
VEGFB	t=3,1, p=0,004 r=0,3, p=0,05	t=-1,3, p=0,20 r=0,2, p=0,3

t: t-статистика
r: линейный коэффициент корреляции

Статистика по уровням мРНК, измеренным с использованием микроматриц, в

образцах крови касалась дня ИМ, а по уровням в плазме, измеренным с использованием ELISA, касалась дня после ИМ.

6. Количественный показатель распределения уровней мРНК 3 биомаркеров в двух группах пациентов с СН показывает более высокий уровень мРНК VEGFB и более низкие уровни мРНК THBS1 и PGF у пациентов с высокой ФВ по сравнению с пациентами с низкой ФВ (таблица 4). В указанной таблице приводятся также теоретические пороги для уровней мРНК, связанных как с более высокой ФВ (>40%), так и с более низкой ФВ ($\leq 40\%$), как определяется на фигурах 5 и 6. Например, в популяции пациентов с СН, участвовавших в настоящем исследовании, пациент, имеющий уровень мРНК VEGFB выше -1,4, а уровень мРНК THBS1 ниже 0 и уровень мРНК PGF ниже -0,1, является более склонным к тому, чтобы иметь высокую ФВ. Наоборот, пациент, имеющий уровень мРНК VEGFB ниже -1,4, а уровень мРНК THBS1 выше 0 и уровень мРНК PGF выше -0,1, является более склонным к тому, чтобы иметь низкую ФВ. Иными словами, уровни биомаркеров сравнивали со стандартным образцом после того, как стандартный образец был откалиброван по диапазону клинических исходов. Важно отметить, что комбинация 3 биомаркеров, а не каждый биомаркер в отдельности или комбинация 2 биомаркеров является более точно связанной с ФВ.

Таблица 4 Количественный показатель распределения уровней мРНК 3 биомаркеров в двух группах					
	Высокая ФВ (благоприятный исход)		Низкая ФВ (неблагоприятный исход)		
	Среднее \pm СО (мин./макс.)	Порог	Среднее \pm СО (мин./макс.)	Порог	t-стат
VEGFB	-1,05 \pm 0,42 (-1,78/-0,20)	>-1,4	-1,46 \pm 0,32 (-2,07/-1,09)	<-1,4	t=3,1 p=0,004
THBS1	-0,13 \pm 0,28 (-0,57/0,33)	<0	0,29 \pm 0,58 (-0,66/1,97)	>0	t=2,4 p=0,02
PGF	-0,19 \pm 0,10 (-0,34/-0,03)	<-0,1	-0,07 \pm 0,15 (-0,34/0,15)	>-0,1	t=2,8 p=0,01
t: t-статистика p: значение вероятности СО: стандартное отклонение					

7. Дополнительное тестирование классификатора с использованием уровней VEGFB, THBS1 и PGF в плазме, измеренных на 1 день после ИМ у тех же 32 пациентов, которых использовали для создания классификатора, дало AUC 0,75. Это предполагает, что прогностическое поведение классификатора является хорошим, даже если используется другой ряд данных, кодирующих другие типы измерений (например, уровни в плазме).

8. Поскольку единственным общепризнанным биомаркером СН является pro-BNP, прогностическое поведение ряда из 3 биомаркеров, представленных в настоящем документе, сравнивали с прогностическим поведением NT-pro-BNP. Прогностическое поведение уровня NT-pro-BNP в плазме, измеренного на 1 день после ИМ, было умеренным (AUC=0,63, таблица 5). Таким образом, ряд из 3 биомаркеров, описанный в настоящем документе, отчетливо превосходит прогностическую ценность NT-pro-BNP.

Таблица 5 Прогностическое поведение NT-pro-BNP			
Тип ввода	Классификационная модель	Типичная точность* (%)	AUC*
NT-pro-BNP	K*	50	0,52
NT-pro-BNP	SVM	63	0,63

* На основе перекрестной проверки с исключением объектов по одному.
AUC: Площадь под кривой (ROC); SVM: Support Vector Machine.

ПРИМЕР 2 ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациентов с острым ИМ регистрировали в национальном реестре ИМ и лечили с использованием первичного чрескожного коронарного вмешательства. Острый ИМ диагностировали по наличию боли в груди <12 часов со значительным подъемом сегмента ST и повышением креатинкиназы и тропонина I более чем в два раза по сравнению с верхней границей нормы. Образцы крови получали во время механической реперфузии (для РНК и выделения плазмы) и спустя один или два дня после ИМ (для плазмы). Протокол был одобрен местным комитетом по этике, и у всех пациентов получали согласие на основе предоставленной полной информации.

Утвержденная группа из 290 пациентов с ИМ была взята из проспективного исследования, осуществленного в университетских клиниках Leicester NHS Trust (UK). Электрокардиографию осуществляли при выписке THBS1 спустя 6 месяцев после ИМ. Конечного-диастолический объем ЛЖ (КДОЛЖ) оценивали с использованием бипланарного модифицированного правила Симпсона с верхушечных двух и четырех видов полости. Степень ремоделирования ЛЖ оценивали по изменению КДОЛЖ (ΔКДО) между выпиской и последующим наблюдением.

Микроматрицы

Транскриптомные профили клеток цельной крови получали с использованием олигонуклеотидных микроматриц, представляющих 25000 генов. Данные доступны из базы данных Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) под номером доступа GSE8723. Контролируемый анализ осуществляли с использованием компьютерной программы анализа значимости микроматриц (SAM). Статистическую значимость сверхрепрезентации членов Gene Ontology (GO) в рядах генов оценивали с использованием базы данных DAVID. Изображали теплокарту с использованием компьютерной программы Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).

Измерение экспрессии VEGFB

Экспрессию мРНК VEGFB в клетках крови, полученных в день ИМ, определяли с помощью количественной ПЦР. Сэндвич ELISA собственного изготовления разработали для измерения уровней VEGFB в плазме.

Классификационные модели пациентов

Support Vector Machine (SVM) и классификационные модели вычислений K* оценивали для исследования прогностической значимости уровней экспрессии VEGFB. Алгоритм SMO (последовательной минимальной оптимизации) для тренировки классификаторов SVM использовали со следующими параметрами: параметр сложности C=1,0, эpsilon=1.0E-12, экспонента полиномиального kernel=1,0. Модели использовали с глобальной смесью =20, а также кривых средней колоночной энтропии для оценки пропущенных величин. Результаты классификационной оценки оценивали с использованием стратегии перекрестной проверки с исключением объектов по одному, а также с 10-кратной перекрестной проверки. Площадь под характеристической кривой обнаружения кривой (AUC) использовали для суммирования расчетной классификационной характеристики классификаторов.

Статистический анализ

Сравнение между средними величинами двух групп пациентов осуществляли с использованием двустороннего непарного t-критерия для гауссовских данных и критерия Манна-Уини для негауссовских данных. Категориальные переменные сравнивали с использованием точного критерия Фишера. Корреляцию между уровнями биомаркеров и классом ФВ оценивали с использованием критерия Спермена. Исполнение машинных моделей обучения осуществляли с использованием платформы извлечения информации Weka (v. 3.4). Иерархическую кластеризацию осуществляли с использованием метода

невзвешенных парных групп с арифметическими средними и коэффициентами корреляции. Кластеризованную визуализацию осуществляли с использованием GEPAS. Статистические критерии значимости получали с использованием пакета Statistica (v. 6.0). Величину $P < 0,05$ рассматривали как статистически значимую.

Результаты

Отбор и характеристики пациентов

Заявители включили в исследование пациентов с острым ИМ с подъемом ST, которых лечили механической реперфузией. Для транскриптомных анализов отобрали две группы по 16 пациентов с острым ИМ, на основе их ФВ спустя 1 месяц после ИМ. У одной группы пациентов имелась сохраненная систолическая функция ЛЖ с высокой ФВ после ИМ ($>40\%$, медиана 63% , разброс $45-73$), а у другой группы имелось нарушение функции ЛЖ с низкой ФВ ($\leq 40\%$, медиана 35% , разброс $20-40$).

Транскриптомный анализ клеток крови

Профили экспрессии генов клеток цельной крови, выделенных во время реперфузии, получали с использованием микроматриц 25000 генов. Было установлено, что из них 525 генов дифференциально экспрессируются, по SAM, среди пациентов с высокой ФВ и низкой ФВ с порогом коэффициента изменения 1,3 и коэффициентом ложного обнаружения $24,5\%$. 226 генов имели повышающую регуляцию в группе с высокой ФВ, и 299 имели повышающую регуляцию в группе с низкой ФВ. Из 525 генов GSEA обнаружил 50 генов, наиболее достоверно связанных с одной или другой группой пациентов.

Ангиогенные гены, связанные с клиническим исходом после ИМ

Следуя своей рабочей гипотезе о том, что ангиогенез может играть значительную роль в восстановлении сердца после ИМ, заявители поставили задачей идентифицировать из 525 генов, дифференциально экспрессирующихся среди пациентов с высокой и низкой ФВ, гены, которые связаны с ангиогенезом. Для указанной задачи заявители нашли в базе данных Entrez Gene список из 494 генов, о которых известно, что они связаны с ангиогенезом у человека, по следующему запросу: «ангиогенез» И «homo sapiens». Из 525 дифференциально экспрессирующихся генов в данном ряду из 494 ангиогенных генов было обнаружено 28 генов: 20 с повышающей регуляцией в группе с низкой ФВ и 8 с повышающей регуляцией в группе с высокой ФВ (таблица 6).

Таблица 6 Перечень 28 ангиогенных генов, дифференциально экспрессирующихся между группами с высокой и низкой ФВ					
Избыточная экспрессия в группе с низкой ФВ					
Проангиогенные (n=15)	Коэффициент изменения	Величина q (%)	Антиангиогенные (n=6)	Коэффициент изменения	Величина q (%)
BMX	1,90	11,36	CLU	1,50	4,97
PBEF1	1,73	20,21	THBS1	1,44	5,88
FOS	1,66	4,09	ITGB1	1,34	25,29
PFKFB3	1,65	0,00	MAPK14	1,31	24,72
CD55	1,65	5,53	STAT1	1,31	25,56
HIF1A	1,63	0,00	MME	1,31	20,21
IL8	1,59	7,51			
PTGS2	1,55	11,36			
TGFBR1	1,50	9,87			
THBS1	1,44	5,88			
SLC2A3	1,40	0,00			
ERO1L	1,32	28,34			
PLAUR	1,31	5,88			
ADM	1,31	25,06			
B2M	1,30	28,12			

Низкая экспрессия в группе с низкой ФВ					
Проангиогенные (n=4)	Коэффициент изменения	Величина q (%)	Антиангиогенные (n=4)	Коэффициент изменения	Величина q (%)
VEGFB	0,74	4,97	SOD1	0,70	11,36
RHOC	0,74	8,70	MAGED1	0,75	9,31
CX3CR1	0,76	17,27	ANXA2	0,76	17,27
ATP5B	0,80	21,32	BAI1	0,76	17,27

величина q: самый низкий коэффициент ложного обнаружения, при котором ген называют значимым (подобно «величине p», адаптированной для анализа большого количества генов). Заметьте: общее количество генов в данной таблице составляет 28, поскольку тромбоспондин 1 (THBS1) является как про-, так и антиангиогенным.

Теплокарта, изображенная по указанным 28 генам, показала, что клинический исход после ИМ связан с отчетливой биоподписью, связанной с ангиогенезом.

Пытаясь оценить, была ли связана указанная биоподпись со стимуляцией или подавлением ангиогенеза, заявители запросили базу данных Entrez Gene на предмет про- или антиангиогенных свойств 28 ангиогенных генов, которые, как было установлено, дифференциально экспрессируются между 2 группами пациентов с ИМ. Как показано в таблице 6, баланс между известными про- и антиангиогенными факторами имеет тенденцию склоняться в проангиогенную сторону у пациентов с низкой ФВ, хотя можно всего лишь предполагать, что это связано со стимуляцией ангиогенеза.

Заявители далее сузили свои изыскания в отношении VEGFB, поскольку: (1) из 4 проангиогенных генов, экспрессирующихся в избыточных количествах в группе с высокой ФВ (и, таким образом, потенциально участвующих в благоприятном ремоделировании сердца), только VEGFB был получен из базы данных Entrez Gene по запросу: «ангиогенез И homo sapiens И сердце»; и (2) разница в экспрессии VEGFB между пациентами с высокой и низкой ФВ была наиболее значимой среди проангиогенных генов (таблица 6).

Экспрессия VEGFB коррелирует с исходом после ИМ

Количественную ПЦР использовали для подтверждения данных о VEGFB, полученных с использованием микроматриц. Величины экспрессии между 2 группами из 16 пациентов с ИМ сравнивали между микроматрицами и количественной ПЦР. Обе методики выявили более высокие уровни экспрессии мРНК VEGFB у пациентов с высокой ФВ по сравнению с пациентами с низкой ФВ: кратность 1,3 ($t=3,35$; $P=0,004$) для микроматриц и кратность 1,7 ($t=3,35$; $P=0,003$) для количественной ПЦР (фигура 8А). Фигура 8В изображает достоверную корреляцию, наблюдающуюся между экспрессией VEGFB и ФВ ($r=0,39$; $P=0,03$). Таким образом, экспрессия VEGFB в клетках крови, как представляется, коррелирует с исходом после ИМ.

Уровни VEGFB в плазме связаны с исходом после ИМ

Затем заявители измерили VEGFB в плазме у 140 пациентов с ИМ, разделенных на две группы, а именно на пациентов с сохраненной (медиана ФВЛЖ 57%, разброс 45-89) и нарушенной (медиана ФВЛЖ 37%, разброс 17-44) функцией ЛЖ спустя 1 месяц после ИМ. Отбор образцов крови осуществляли в день ИМ ($n=77$), спустя 1 день после ИМ ($n=65$) или спустя 2 дня после ИМ ($n=12$). Уровни VEGFB в плазме были сходными в группах с высокой и низкой ФВ на день 0 и на день 1 после ИМ. На день 2, однако, уровни VEGFB повышались у пациентов с высокой ФВ (в 2 раза по сравнению с днем 0), в то время как они падали у пациентов с низкой ФВ (в 2,5 раза по сравнению с днем 0) (фигура 9). Указанные данные согласуются с повышающей регуляцией мРНК VEGFB у пациентов с высокой ФВ (фигура 8). Указанные результаты предполагают, что пациенты, способные к увеличению выработки VEGFB после ИМ, являются более склонными к благоприятному исходу.

Независимая проверка

Независимую группу из 290 пациентов с ИМ использовали для дальнейшего изучения связи между уровнями VEGFB в плазме и ремоделированием ЛЖ после ИМ. Клинические характеристики указанной популяции пациентов были опубликованы. Средний уровень VEGFB в плазме составлял 64% (U-статистика=8128, $P<0,001$) для пациентов, у которых ΔКДО (n=138) показало падение в течение указанного периода (n=138), по сравнению с пациентами, у которых ΔКДО увеличивалось (n=152). Указанные данные подтверждают наблюдение заявителей, которое заключается в том, что VEGFB связан с ремоделированием ЛЖ после ИМ.

Прогностическое поведение VEGFB

Результаты, полученные заявителями, предполагают, что VEGFB может представлять собой потенциальный биомаркер ремоделирования после ИМ. Две машинные модели самообучения, выстроенные с использованием нескольких наборов данных, полученных с использованием микроматриц, количественной ПЦР или определения в плазме, использовали для изучения прогностического поведения VEGFB. Результаты представлены в таблице 7. Самое лучшее поведение получали, когда модель самообучения на основе примеров K^* выстраивали с использованием уровней экспрессии VEGFB, измеренных в клетках крови посредством микроматриц, от 32 пациентов изучаемой группы. Указанная модель достигала специфичности 75% (12 из 16 пациентов с низкой ФВ были корректно классифицированы), чувствительности 50% (8 из 16 пациентов с высокой ФВ были корректно классифицированы) и общей точности 62% (20 из 16 пациентов были корректно классифицированы). AUC составляла 0,75. При выстраивании с использованием уровней VEGFB в плазме группы проверки (290 пациентов) максимальная прогностическая достоверность давала AUC 0,52.

Таблица 7 Прогностическое поведение VEGFB							
		n	Классификационная модель	AUC	Специфичность (%)	Чувствительность (%)	Точность (%)
VEGFB (микроматрицы)	День 0	32	SVM K^*	0,56 0,75	56 75	56 50	56 62
				0,68 0,68	94 56	44 56	69 56
				0,5 0,51	0 0	1 92	66 60
VEGFB (ПЦР)	День 0	32	SVM K^*	0,5 0,47	0 0	1 87	66 57
				0,5 0,07	0 0	1 1	66 66
				0,5 0,07	0 0	1 1	66 66

AUC: Площадь под характеристической кривой обнаружения (ROC).

Специфичность показывает процентную долю корректно классифицированных пациентов с низкой ФВ; чувствительность показывает процентную долю корректно классифицированных пациентов с высокой ФВ; точность показывает процентную долю корректно классифицированных пациентов с высокой и низкой ФВ.

Формула изобретения

1. Способ идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих повышенный риск развития патологического состояния сердца, включающий:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и плацентарного фактора роста (PGF);
- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и PGF с контролем; и
- определение на основе указанного сравнения наличия у пациента повышенного

риска развития патологического состояния сердца, при этом контроль представляет собой стандартную величину, которую можно получить из популяции пациентов с инфарктом миокарда, имеющей ряд клинических исходов, или контроль представляет собой соответствующий уровень VEGFB, THBS1 и PGF из дополнительного образца от указанного пациента, при этом следующие показатели указывают на повышенную вероятность того, что указанный пациент страдает указанным патологическим состоянием сердца:

- более низкие уровни VEGFB в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным образцом VEGFB;
- более высокие уровни THBS1 в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным образцом THBS1; и
- более высокие уровни PGF в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным образцом PGF.

2. Способ по п.1, в котором патологическое состояние сердца представляет собой инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, ишемическую кардиомиопатию или неишемическую кардиомиопатию или в котором у пациента развивается сердечная недостаточность или ремоделирование желудочков или пациент страдает сердечной недостаточностью или ремоделированием желудочков.

3. Способ по п.1, в котором образец биологической жидкости, взятый у пациента, представляет собой образец крови, образец тканевой жидкости, образец сыворотки или образец мочи.

4. Способ по п.1, в котором исследуемые уровни VEGFB, THBS1 и PGF представляют собой уровни мРНК или уровни белков в плазме.

5. Способ по п.1, в котором уровни VEGFB, THBS1 и PGF исследуют в день инфаркта миокарда.

6. Способ по п.1, в котором определение осуществляют с использованием методики статистического анализа сравнения «ближайший сосед».

7. Способ по п.1, дополнительно включающий сбор данных об одном или более пациентах с инфарктом миокарда, включая анализ уровней или величин по меньшей мере одного из VEGFB, THBS1 и PGF и связанный с ними клинический исход для указанного пациента, для создания параметрических данных для VEGFB, THBS1 и PGF, связанных с конкретным клиническим исходом.

8. Способ по п.1, в котором классификатор используют для осуществления прогноза; классификатор включает такие программы, как PAM, Kstar и SVM.

9. Способ по п.1, в котором определение повышенного риска патологического состояния сердца относится к тем стандартным образцам с инфарктом миокарда, которые имеют относительно высокие уровни мРНК VEGFB или белка плазмы (\log соотношение $>-1,4$), относительно низкие уровни мРНК THBS1 или белка плазмы (\log соотношение <0) и относительно низкие уровни мРНК PGF или белка плазмы (\log соотношение $<-0,1$) по сравнению с запрашиваемым образцом соответственно.

10. Способ по п.9, в котором значения соотношений варьируют на количество, выбранное из группы, состоящей из: по меньшей мере 1 или 2%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% и до 50%.

11. Способ по п.1, дополнительно включающий исследование уровня BNP и сравнение его со стандартным образцом BNP.

12. Способ идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих повышенный риск развития патологического состояния сердца, включающий:

- исследование образца биологической жидкости пациента после инфаркта миокарда на предмет уровней мРНК или белков VEGFB, THBS1 и PGF в плазме для определения параметрических данных пациента, связывающих указанные параметрические данные с конкретным клиническим исходом, связанным с частотой сердечной недостаточности у указанного пациента, и введение указанных параметрических данных в базу данных;
- повторение анализа для множества пациентов после инфаркта миокарда для заполнения базы данных, содержащей стандартную информацию, касающуюся взаимоотношений между сердечной недостаточностью и уровнями VEGFB, THBS1 и PGF;
- определение параметрических данных пациента после инфаркта миокарда с неизвестным прогнозом; и
- обработка параметрических данных для уровней VEGFB, THBS1 и PGF от пациента для их сравнения с параметрическими данными в базе данных, при этом определение повышенного риска патологического состояния сердца относится к тем стандартным образцам с инфарктом миокарда, которые имеют относительно высокие уровни мРНК VEGFB или белка плазмы (\log соотношение $>-1,4$), относительно низкие уровни мРНК THBS1 или белка плазмы (\log соотношение <0) и относительно низкие уровни мРНК PGF или белка плазмы (\log соотношение $<-0,1$) по сравнению с запрашиваемым образцом соответственно.
- 13. Способ по п.12, в котором величины соотношений изменяются на количество, выбранное из группы, состоящей из по меньшей мере 1 или 2%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% и до 50%.
- 14. Способ по п.12, дополнительно включающий исследование уровня BNP и сравнение его со стандартным образцом BNP.
- 15. Способ осуществления прогноза для пациента с инфарктом миокарда, включающий:
 - исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB) и уровней тромбоспондина-1 (THBS1) и плацентарного фактора роста (PGF); и
 - сравнение уровней VEGFB, THBS1 и PGF с контролем; и
 - осуществление на основе указанного сравнения прогноза для указанного пациента, в котором контроль представляет собой соответствующий уровень VEGFB, THBS1 и PGF из более ранних образцов от указанного пациента и в котором высокий уровень VEGFB и низкие уровни THBS1 и PGF связаны с пониженной вероятностью развития указанного сердечного состояния, соответственно.
- 16. Способ осуществления прогноза для пациента с инфарктом миокарда, включающий:
 - формирование базы данных, содержащей параметрические данные от пациентов с инфарктом миокарда, причем данные включают клинический исход у пациента, соответствующий уровням VEGFB, THBS1 и PGF, исследованным после инфаркта миокарда,
 - исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB) и уровней тромбоспондина-1 (THBS1) и плацентарного фактора роста (PGF); и
 - запрос статистической программы (также называемой классификатором) на уровни VEGFB, THBS1 и PGF;
 в котором

- высокий уровень VEGFB и низкие уровни THBS1 и PGF связаны с пониженной вероятностью развития указанного патологического состояния сердца; и
- классификатор будет указывать, имеет ли пациент пониженную вероятность развития указанного патологического состояния сердца.

17. Способ идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих пониженный риск развития патологического состояния сердца, включающий:

- исследование, после инфаркта, образца биологической жидкости пациента на предмет уровней сосудистого эндотелиального фактора роста В (VEGFB), тромбоспондина-1 (THBS1) и плацентарного фактора роста (PGF);
- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и PGF с контролем; и
- определение на основе указанного сравнения, имеет ли пациент пониженный риск развития патологического состояния сердца,

при этом контроль представляет собой стандартную величину, которую можно получить из популяции пациентов с инфарктом миокарда, имеющей ряд клинических исходов, при этом следующие показатели указывают на пониженную вероятность того, что указанный пациент страдает указанным патологическим состоянием сердца:

- более высокие уровни VEGFB в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем VEGFB;
- более низкие уровни THBS1 в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем THBS1; и
- более низкие уровни PGF в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем PGF.

18. Система для идентификации пациентов с инфарктом миокарда, имеющих повышенный риск развития патологического сердечного состояния, причем указанная система содержит:

- базу данных, содержащую параметрические данные от пациентов с инфарктом миокарда, причем данные включают клинический исход у пациента, соответствующий уровням VEGFB, THBS1 и PGF, исследованным после инфаркта миокарда,
- и по меньшей мере одно сравнивающее устройство для доступа и/или эксплуатации базы данных и для обработки запроса,

при этом система проводит

- сравнение уровней VEGFB, THBS1 и PGF с контролем; и
- определение на основе указанного сравнения наличия у пациента повышенного риска развития патологического состояния сердца,

при этом контроль представляет собой стандартную величину, которую можно получить из популяции пациентов с инфарктом миокарда, имеющей ряд клинических исходов,

при этом следующие показатели указывают на повышенную вероятность того, что указанный пациент страдает указанным патологическим состоянием сердца:

- более низкие уровни VEGFB в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем VEGFB;
- более высокие уровни THBS1 в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем THBS1; и
- более высокие уровни PGF в исследованном образце пациента по сравнению с контрольным уровнем PGF.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Centre de Recherche Public de la Santé

<120> БИОМАРКЕРЫ

<130> 08171-2.WO

<160> 13

<170> Патентная версия 3.3

<210> 1

<211> 1172

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcgatgcggg cgcggcgccg gggcgggccc ggcggggcacc atgagccctc tgctccgccc      60
cctgctgctc gccgcactcc tgcagctggc ccccgcccag gccctgtct cccagcctga      120
tgcccctggc caccagagga aagtgggtgc atggatagat gtgtatactc gcgctacctg      180
ccagccccgg gaggtgggtg tgcccttgac tgtggagctc atgggcaccg tggccaaaca      240
gctggtgccc agctgcgtga ctgtgcagcg ctgtgggtggc tgctgccctg acgatggcct      300
ggagtgtgtg cccactgggc agcaccaagt ccggatgcag atcctcatga tccggtaccc      360
gagcagtcag ctgggggaga tgtccctgga agaacacagc cagtgtgaat gcagacctaa      420
aaaaaaggac agtgctgtga agccagacag ggctgccact cccaccacc gtccccagcc      480
ccgttctgtt ccgggctggg actctgcccc cggagcacc ccccagctg acatcaccca      540
tcccactcca gcccagggc cctctgccc cgtgcaccc agcaccacca gcgccctgac      600
ccccggacct gccgctgccg ctgccagcg cgcagcttc tccgttgcca agggcggggc      660
ttagagctca acccagacac ctgcaggtgc cggaagctgc gaagggtgaca catggctttt      720
cagactcagc aggggtgactt gcctcagagg ctatatccca gtgggggaac aaagaggagc      780
ctggtaaaaa acagccaagc cccaagacc tcagcccagg cagaagctgc tctaggacct      840
gggcctctca gagggctctt ctgccatccc ttgtctccct gaggccatca tcaaacagga      900
cagagttgga agaggagact gggaggcagc aagaggggtc acataccagc tcaggggaga      960
atggagtact gtctcagttt ctaaccactc tgtgcaagta agcatcttac aactggctct     1020
tctccccctc actaagaaga cccaaacctc tgcataatgg gatttgggct ttggtacaag     1080
aactgtgacc cccaacctg ataaaagaga tggaaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1140
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa                                     1172

```

<210> 2

<211> 624

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 2
atgagccctc tgcctcgccg cctgctgctc gccgcactcc tgcagctggc ccccgcccag 60
gcccctgtct cccagcctga tgcccctggc caccagagga aagtgggtgtc atggatagat 120
gtgtatactc gcgctacctg ccagccccgg gaggtgggtg tgcccttgac tgtggagctc 180
atggggcaccg tggccaaaca gctggtgccc agctgcgtga ctgtgcagcg ctgtggtggc 240
tgctgccctg acgatggcct ggagtgtgtg cccactgggc agcaccaagt ccggatgcag 300
atcctcatga tccggtaccc gagcagtcag ctgggggaga tgcctctgga agaacacagc 360
cagtgtgaat gcagacctaa aaaaaaggac agtgctgtga agccagacag ggctgccact 420
ccccaccacc gtccccagcc ccgttctgtt ccgggctggg actctgcccc cggagcaccc 480
tccccagctg acatcaccca tccactcca gcccagggc cctctgcca cgtgcaccc 540
agcaccacca gcgccctgac ccccgacct gccgctgccg ctgccgacgc cgcagcttcc 600
tccgttgcca agggcggggc ttag 624

<210> 3
<211> 207
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65 70 75 80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg

RU 2545757 C2

130	135	140
Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro		
145	150	155 160
Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala		
	165	170 175
His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala		
	180	185 190
Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala		
	195	200 205

<210> 4
 <211> 5820
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 4

agccgctgcg cccgagctgg cctgcgagtt cagggctcct gtcgctctcc aggagcaacc	60
tctactccgg acgcacaggc attccccgcg cccctccagc cctcgccgcc ctgccaccg	120
ctcccgccg ccgcgctccg gtacacacag gatccctgct gggcaccaac agctccacca	180
tggggctggc ctggggacta ggcgtcctgt tcctgatgca tgtgtgtggc accaaccgca	240
ttccagagtc tggcggagac aacagcgtgt ttgacatctt tgaactcacc ggggccgccc	300
gcaaggggtc tgggcgcoga ctggtgaagg gcccgaacc ttccagccca gctttccgca	360
tcgaggatgc caacctgatc cccctgtgc ctgatgacaa gttccaagac ctggtggatg	420
ctgtgcgggc agaaaagggt ttctctcttc tggcatccct gaggcagatg aagaagacc	480
ggggcacgct gctggccctg gagcggaaag accactctgg ccaggctctc agcgtggtgt	540
ccaatggcaa ggcgggcacc ctggacctca gcctgaccgt ccaaggaaag cagcacgtgg	600
tgtctgtgga agaagctctc ctggcaaccg gccagtggaa gagcatcacc ctgtttgtgc	660
aggaagacag ggcccagctg tacatcgact gtgaaaagat ggagaatgct gagttggacg	720
tccccatcca aagcgtcttc accagagacc tggccagcat cgccagactc cgcacgcaa	780
aggggggct caatgacaat ttccaggggg tgctgcagaa tgtgaggttt gtctttggaa	840
ccacaccaga agacatctc aggaacaaag gctgctccag ctctaccagt gtcctcctca	900
cccttgacaa caacgtggtg aatggttcca gccctgccat ccgcactaac tacattggcc	960
acaagacaaa ggacttgcaa gccatctgcg gcatctcctg tgatgagctg tccagcatgg	1020
tcctggaact caggggcctg cgcaccattg tgaccacgct gcaggacagc atccgcaaag	1080
tgactgaaga gaacaaagag ttggccaatg agctgaggcg gcctccccta tgctatcaca	1140
acggagttca gtacagaaat aacgaggaat ggactgttga tagctgcact gagtgtcact	1200

gtcagaactc agttaccatc tgcaaaaagg tgtcctgccc catcatgccc tgctccaatg	1260
ccacagttcc tgatggagaa tgctgtcctc gctgttgccc cagcgactct ggggacgatg	1320
gctggtctcc atggtccgag tggacctcct gttctacgag ctgtggcaat ggaattcagc	1380
agcgcgggccg ctctgcgat agcctcaaca accgatgtga gggctcctcg gtccagacac	1440
ggacctgcca cattcaggag tgtgacaaga gatttaaaca ggatggtggc tggagccact	1500
gggtccccgtg gtcattcttgt tctgtgacat gtggtgatgg tgtgatcaca aggatccggc	1560
tctgcaactc tcccagcccc cagatgaacg ggaaaccctg tgaaggcgaa gcgcgggaga	1620
ccaaagcctg caagaaagac gcctgcccc acaatggagg ctggggctct tggtcacccat	1680
gggacatctg ttctgtcacc tgtggaggag gggtagacaa acgtatcgt ctctgcaaca	1740
acccacacc ccagtttga ggcaaggact gcgttggtga tgtaacagaa aaccagatct	1800
gcaacaagca ggactgtcca attgatggat gcctgtccaa tccctgcttt gccggcgtga	1860
agtgtactag ctacctgat ggcagctgga aatgtggtgc ttgtccccct gggtacagtg	1920
gaaatggcat ccagtgcaca gatgttgatg agtgcaaaga agtgccctgat gcctgcttca	1980
accacaatgg agagcaccgg tgtgagaaca cggaccccg ctacaactgc ctgccctgcc	2040
ccccacgctt caccggctca cagcccttcg gccagggtgt cgaacatgcc acggccaaca	2100
aacaggtgtg caagccccgt aaccctgca cggatgggac ccacgactgc aacaagaacg	2160
ccaagtgcaa ctacctgggc cactatagcg accccatgta ccgctgagag tgcaagcctg	2220
gctacgctgg caatggcatc atctgcgggg aggacacaga cctggatggc tggcccaatg	2280
agaacctggg gtgcgtggcc aatgcgactt accactgcaa aaaggataat tgcccaacc	2340
ttcccaactc agggcaggaa gactatgaca aggatggaat tggatgatgcc tgtgatgatg	2400
acgatgacaa tgataaaatt ccagatgaca gggacaactg tccattccat tacaaccag	2460
ctcagtatga ctatgacaga gatgatgtgg gagaccgctg tgacaactgt ccctacaacc	2520
acaaccacaga tcaggcagac acagacaaca atggggaagg agacgcctgt gctgcagaca	2580
ttgatggaga cggatctctc aatgaacggg acaactgcca gtacgtctac aatgtggacc	2640
agagagacac tgatatggat ggggttgagg atcagtgtga caattgcccc ttggaacaca	2700
atccggatca gctggactct gactcagacc gcattggaga tacctgtgac aacaatcagg	2760
atattgatga agatggccac cagaacaatc tggacaactg tccctatgtg cccaatgcca	2820
accaggctga ccatgacaaa gatggcaagg gagatgcctg tgaccacgat gatgacaacg	2880
atggcattcc tgatgacaag gacaactgca gactcgtgcc caatcccgac cagaaggact	2940
ctgacggcga tggctgagggt gatgcctgca aagatgattt tgaccatgac agtgtgccag	3000
acatcgatga catctgtcct gagaatgttg acatcagtga gaccgatttc cgcgattcc	3060
agatgattcc tctggacccc aaagggacat cccaaaatga ccctaactgg gttgtacgcc	3120

atcagggtaa agaactcgtc cagactgtca actgtgatcc tggactcgct gtaggttatg 3180
 atgagtttaa tgctgtggac ttcagtggca ctttcttcat caacaccgaa agggacgatg 3240
 actatgctgg atttgtcttt ggctaccagt ccagcagccg cttttatggt gtgatgtgga 3300
 agcaagtcac ccagtcctac tgggacacca accccacgag ggctcaggga tactcgggcc 3360
 tttctgtgaa agttgtaaac tccaccacag ggctggcgga gcacctgcgg aacgccctgt 3420
 ggcacacagg aaacaccctt ggccagggtgc gcacctgtg gcatgaccct cgtcacatag 3480
 gctggaaaga tttcaccgcc tacagatggc gtctcagcca caggccaaag acgggtttca 3540
 ttagagtggg gatgtatgaa gggaagaaaa tcatggctga ctcaggacct atctatgata 3600
 aaacctatgc tgggtgtaga ctagggttgt ttgtcttctc tcaagaaatg gtgttcttct 3660
 ctgacctgaa atacgaatgt agagatccct aatcatcaaa ttgttgattg aaagactgat 3720
 cataaaccaa tgctggtatt gcaccttctg gaactatggg cttgagaaaa cccccaggat 3780
 cacttctcct tggtctcctt cttttctgtg cttgcatcag tgtggactcc tagaacgtgc 3840
 gacctgcctc aagaaaatgc agttttcaaa aacagaactca gcattcagcc tccaatgaat 3900
 aagacatctt ccaagcatat aaacaattgc tttggtttcc ttttgaaaaa gcatctactt 3960
 gcttcagttg ggaaggtgcc cattccactc tgcctttgtc acagagcagg gtgctattgt 4020
 gaggccatct ctgagcagtg gactcaaaag cattttcagg catgtcagag aaggaggagc 4080
 tactagaat tagcaaaca aaccacctg acatcctcct tcaggaacac ggggagcaga 4140
 ggccaaagca ctaaggggag ggcgcatacc cgagacgatt gtatgaagaa aatatggagg 4200
 aactgttaca tgttcggtac taagtcattt tcaggggatt gaaagactat tgctggattt 4260
 catgatgctg actggcggtta gctgattaac ccatgtaaat aggcacttaa atagaagcag 4320
 gaaagggaga caaagactgg cttctggact tcctccctga tccccacct tactcatcac 4380
 ctgcagtggc cagaattagg gaatcagaat caaaccagtg taaggcagtg ctggctgcca 4440
 ttgcctggtc acattgaaat tgggtggcttc attctagatg tagcttgtgc agatgtagca 4500
 ggaaaatagg aaaacctacc atctcagtga gcaccagctg cctcccaaag gaggggcagc 4560
 cgtgcttata tttttatggt tacaatggca caaaattatt atcaacctaa ctaaaacatt 4620
 ccttttctct tttttctga attatcatgg agttttctaa ttctctcttt tggaatgtag 4680
 atttttttta aatgctttac gatgtaaaa atttattttt tacttattct ggaagatctg 4740
 gctgaaggat tattcatgga acaggaagaa gcgtaaagac tatccatgtc atctttgttg 4800
 agagtcttcg tgactgtaag attgtaaata cagattatth attaactctg ttctgcctgg 4860
 aaatttaggc ttcatacgga aagtgtttga gagcaagtag ttgacattta tcagcaaata 4920
 tcttgcaaga acagcacaag gaaaatcagt ctaataagct gctctgcccc ttgtgctcag 4980
 agtggatggt atgggattct tttttctct gttttatctt ttcaagtgga attagttggg 5040

tatccatttg caaatgtttt aaattgcaaa gaaagccatg aggtcttcaa tactgtttta	5100
ccccatccct tgtgcatatt tccagggaga aggaaagcat atacactttt ttctttcatt	5160
tttccaaaag agaaaaaat gacaaaaggt gaaacttaca tacaaatatt acctcatttg	5220
ttgtgtgact gagtaaagaa tttttggatc aagcggaaag agtttaagtg tctaacaaac	5280
ttaaagctac tgtagtacct aaaaagtcag tggtgtacat agcataaaaa ctctgcagag	5340
aagtattccc aataaggaaa tagcattgaa atgttaaata caatttctga aagttatgtt	5400
ttttttctat catctggtat accattgctt tttttttata aattattttc tcattgccat	5460
tggaatagat atctcagatt gtgtagatat gctattttaa taatttatca ggaaatactg	5520
cctgtagagt tagtatttct atttttatat aatgtttgca cactgaattg aagaattgtt	5580
ggttttttct tttttttgtt ttgttttttt tttttttttt ttttgctttt gacctcccat	5640
ttttactatt tgccaatacc tttttctagg aatgtgcttt tttttgtaca catttttctc	5700
cattttacat tctaaagcag tgtaagttgt atattactgt ttcttatgta caaggaacaa	5760
caataaatca tatggaaatt tatattttata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5820

<210> 5
 <211> 3513
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 5	
atggggctgg cctggggact aggcgtcctg ttcctgatgc atgtgtgtgg caccaaccgc	60
attccagagt ctggcgagga caacagcgtg tttgacatct ttgaactcac cggggccgcc	120
cgcaaggggt ctgggcgccg actggtgaag ggccccgacc cttccagccc agctttccgc	180
atcgaggatg ccaacctgat cccctctgtg cctgatgaca agttccaaga cctggtggat	240
gctgtgcggg cagaaaaggg tttcctcctt ctggcatccc tgaggcagat gaagaagacc	300
cggggcacgc tgctggccct ggagcggaaa gaccactctg gccaggctct cagcgtggtg	360
tccaatggca aggcgggcac cctggacctc agcctgaccg tccaaggaaa gcagcacgtg	420
gtgtctgtgg aagaagctct cctggcaacc ggccagtgga agagcatcac cctgtttgtg	480
caggaagaca gggcccagct gtacatcgac tgtgaaaaga tggagaatgc tgagttggac	540
gtcccatcc aaagcgtctt caccagagac ctggccagca tcgccagact ccgcatcgca	600
aaggggggcg tcaatgacaa tttccagggg gtgctgcaga atgtgaggtt tgtctttgga	660
accacaccag aagacatcct caggaacaaa ggctgctcca gctctaccag tgtcctcctc	720
acccttgaca acaacgtggt gaatggttcc agccctgcc tccgcactaa ctacattggc	780
cacaagacaa aggacttgca agccatctgc ggcactctct gtgatgagct gtccagcatg	840
gtcctggaac tcaggggcct gcgcaccatt gtgaccacgc tgcaggacag catccgcaaa	900

gtgactgaag agaacaaaga gttggccaat gagctgaggc ggcctcccct atgctatcac	960
aacggagttc agtacagaaa taacgaggaa tggactgttg atagctgcac tgagtgtcac	1020
tgtcagaact cagttaccat ctgcaaaaag gtgtcctgcc ccatcatgcc ctgctccaat	1080
gccacagttc ctgatggaga atgctgtcct cgctgttggc ccagcgactc tgcggacgat	1140
ggctgggtctc catgggtccga gtggacctcc tgttctacga gctgtggcaa tggaattcag	1200
cagcgcggcc gctcctgcga tagcctcaac aaccgatgtg agggctcctc ggtccagaca	1260
eggacctgcc acattcagga gtgtgacaag agattttaaag aggatgggtg ctggagccac	1320
tgggtcccgt ggtcatcttg ttctgtgaca tgtgggtgatg gtgtgatcac aaggatccgg	1380
ctctgcaact ctcccagccc ccagatgaac gggaaaccct gtgaaggcga agcgcgggag	1440
accaaagcct gcaagaaaga cgctgcccc atcaatggag gctggggctc ttggtcacca	1500
tgggacatct gttctgtcac ctgtggagga ggggtacaga aacgtagtcg tctctgcaac	1560
aacccccacac ccagtttgg aggcaaggac tgcgttgggtg atgtaacaga aaaccagatc	1620
tgcaacaagc aggactgtcc aattgatgga tgctgtcca atccctgctt tgccggcgtg	1680
aagtgtacta gctaccctga tggcagctgg aaatgtgggtg cttgtccccc tggttacagt	1740
ggaaatggca tccagtgcac agatgttgat gaggcaaaag aagtgcctga tgctgcttc	1800
aaccacaatg gagagcaccg gtgtgagaac acggaccccc gctacaactg cctgcctgc	1860
ccccacgct tcaccggctc acagcccttc ggccaggggtg tcgaacatgc cacggccaac	1920
aaacaggtgt gcaagccccg taaccctgc acggatggga ccacgactg caacaagaac	1980
gccaagtgca actacctggg ccactatagc gaccccatgt accgctgcga gtgcaagcct	2040
ggctacgctg gcaatggcat catctgctgg gaggacacag acctggatgg ctggcccaat	2100
gagaacctgg tgtgcgtggc caatgcgact taccactgca aaaaggataa ttgccccaac	2160
cttcccaact cagggcagga agactatgac aaggatggaa ttgggtgatgc ctgtgatgat	2220
gacgatgaca atgataaaat tccagatgac agggacaact gtccattcca ttacaacca	2280
gctcagtatg actatgacag agatgatgtg ggagaccgct gtgacaactg tccctacaac	2340
cacaaccacg atcaggcaga cacagacaac aatggggaag gagacgcctg tgctgcagac	2400
attgatggag acggtatcct caatgaacgg gacaactgcc agtacgtcta caatgtggac	2460
cagagagaca ctgatatgga tggggttgga gatcagtgtg acaattgccc cttggaacac	2520
aatccggatc agctggactc tgactcagac cgcattggag atacctgtga caacaatcag	2580
gatattgatg aagatggcca ccagaacaat ctggacaact gtccctatgt gcccaatgcc	2640
aaccaggctg accatgacaa agatggcaag ggagatgctt gtgaccacga tgatgacaac	2700
gatggcattc ctgatgacaa ggacaactgc agactcgtgc ccaatccga ccagaaggac	2760
tctgacggcg atggtcgagg tgatgcctgc aaagatgatt ttgacctga cagtgtgcca	2820

gacatcgatg acatctgtcc tgagaatggt gacatcagtg agaccgattt ccgccgattc 2880
cagatgattc ctctggaccc caaagggaca tcccaaatg accctaactg ggttgtagcg 2940
catcagggta aagaactcgt ccagactgtc aactgtgatc ctggactcgc ttagagttat 3000
gatgagttta atgctgtgga cttcagtggc accttcttca tcaacaccga aagggacgat 3060
gactatgctg gatttgtctt tggctaccag tccagcagcc gcttttatgt tgtgatgtgg 3120
aagcaagtca cccagtccta ctgggacacc aacccacga gggctcaggg atactcgggc 3180
ctttctgtga aagttgtaaa ctccaccaca gggcctggcg agcacctgcg gaacgccctg 3240
tggcacacag gaaacacccc tggccaggtg cgcaccctgt ggcatgaccc tcgtcacata 3300
ggctggaaag atttcaccgc ctacagatgg cgtctcagcc acaggccaaa gacgggttcc 3360
attagagtgg tgatgtatga aggaagaaa atcatggctg actcaggacc catctatgat 3420
aaaacctatg ctggtggtag actaggggtg tttgtcttct ctcaagaaat ggtgttcttc 3480
tctgacctga aatacgaatg tagagatccc taa 3513

<210> 6
<211> 1170
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Leu Ala Trp Gly Leu Gly Val Leu Phe Leu Met His Val Cys
1 5 10 15

Gly Thr Asn Arg Ile Pro Glu Ser Gly Gly Asp Asn Ser Val Phe Asp
20 25 30

Ile Phe Glu Leu Thr Gly Ala Ala Arg Lys Gly Ser Gly Arg Arg Leu
35 40 45

Val Lys Gly Pro Asp Pro Ser Ser Pro Ala Phe Arg Ile Glu Asp Ala
50 55 60

Asn Leu Ile Pro Pro Val Pro Asp Asp Lys Phe Gln Asp Leu Val Asp
65 70 75 80

Ala Val Arg Ala Glu Lys Gly Phe Leu Leu Leu Ala Ser Leu Arg Gln
85 90 95

Met Lys Lys Thr Arg Gly Thr Leu Leu Ala Leu Glu Arg Lys Asp His
100 105 110

Ser Gly Gln Val Phe Ser Val Val Ser Asn Gly Lys Ala Gly Thr Leu
115 120 125

RU 2 545 757 C2

Asp	Leu	Ser	Leu	Thr	Val	Gln	Gly	Lys	Gln	His	Val	Val	Ser	Val	Glu	130	135	140	
Glu	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Gln	Trp	Lys	Ser	Ile	Thr	Leu	Phe	Val	145	150	155	160
Gln	Glu	Asp	Arg	Ala	Gln	Leu	Tyr	Ile	Asp	Cys	Glu	Lys	Met	Glu	Asn	165	170	175	
Ala	Glu	Leu	Asp	Val	Pro	Ile	Gln	Ser	Val	Phe	Thr	Arg	Asp	Leu	Ala	180	185	190	
Ser	Ile	Ala	Arg	Leu	Arg	Ile	Ala	Lys	Gly	Gly	Val	Asn	Asp	Asn	Phe	195	200	205	
Gln	Gly	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Arg	Phe	Val	Phe	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	210	215	220	
Asp	Ile	Leu	Arg	Asn	Lys	Gly	Cys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Val	Leu	Leu	225	230	235	240
Thr	Leu	Asp	Asn	Asn	Val	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Pro	Ala	Ile	Arg	Thr	245	250	255	
Asn	Tyr	Ile	Gly	His	Lys	Thr	Lys	Asp	Leu	Gln	Ala	Ile	Cys	Gly	Ile	260	265	270	
Ser	Cys	Asp	Glu	Leu	Ser	Ser	Met	Val	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	275	280	285	
Thr	Ile	Val	Thr	Thr	Leu	Gln	Asp	Ser	Ile	Arg	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	290	295	300	
Asn	Lys	Glu	Leu	Ala	Asn	Glu	Leu	Arg	Arg	Pro	Pro	Leu	Cys	Tyr	His	305	310	315	320
Asn	Gly	Val	Gln	Tyr	Arg	Asn	Asn	Glu	Glu	Trp	Thr	Val	Asp	Ser	Cys	325	330	335	
Thr	Glu	Cys	His	Cys	Gln	Asn	Ser	Val	Thr	Ile	Cys	Lys	Lys	Val	Ser	340	345	350	
Cys	Pro	Ile	Met	Pro	Cys	Ser	Asn	Ala	Thr	Val	Pro	Asp	Gly	Glu	Cys	355	360	365	
Cys	Pro	Arg	Cys	Trp	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Asp	Asp	Gly	Trp	Ser	Pro	370	375	380	

RU 2 545 757 C2

Trp	Ser	Glu	Trp	Thr	Ser	Cys	Ser	Thr	Ser	Cys	Gly	Asn	Gly	Ile	Gln	385	390	395	400
Gln	Arg	Gly	Arg	Ser	Cys	Asp	Ser	Leu	Asn	Asn	Arg	Cys	Glu	Gly	Ser	405	410	415	
Ser	Val	Gln	Thr	Arg	Thr	Cys	His	Ile	Gln	Glu	Cys	Asp	Lys	Arg	Phe	420	425	430	
Lys	Gln	Asp	Gly	Gly	Trp	Ser	His	Trp	Ser	Pro	Trp	Ser	Ser	Cys	Ser	435	440	445	
Val	Thr	Cys	Gly	Asp	Gly	Val	Ile	Thr	Arg	Ile	Arg	Leu	Cys	Asn	Ser	450	455	460	
Pro	Ser	Pro	Gln	Met	Asn	Gly	Lys	Pro	Cys	Glu	Gly	Glu	Ala	Arg	Glu	465	470	475	480
Thr	Lys	Ala	Cys	Lys	Lys	Asp	Ala	Cys	Pro	Ile	Asn	Gly	Gly	Trp	Gly	485	490	495	
Pro	Trp	Ser	Pro	Trp	Asp	Ile	Cys	Ser	Val	Thr	Cys	Gly	Gly	Gly	Val	500	505	510	
Gln	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Cys	Asn	Asn	Pro	Thr	Pro	Gln	Phe	Gly	Gly	515	520	525	
Lys	Asp	Cys	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Glu	Asn	Gln	Ile	Cys	Asn	Lys	Gln	530	535	540	
Asp	Cys	Pro	Ile	Asp	Gly	Cys	Leu	Ser	Asn	Pro	Cys	Phe	Ala	Gly	Val	545	550	555	560
Lys	Cys	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Ser	Trp	Lys	Cys	Gly	Ala	Cys	Pro	565	570	575	
Pro	Gly	Tyr	Ser	Gly	Asn	Gly	Ile	Gln	Cys	Thr	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	580	585	590	
Lys	Glu	Val	Pro	Asp	Ala	Cys	Phe	Asn	His	Asn	Gly	Glu	His	Arg	Cys	595	600	605	
Glu	Asn	Thr	Asp	Pro	Gly	Tyr	Asn	Cys	Leu	Pro	Cys	Pro	Pro	Arg	Phe	610	615	620	
Thr	Gly	Ser	Gln	Pro	Phe	Gly	Gln	Gly	Val	Glu	His	Ala	Thr	Ala	Asn	625	630	635	640

RU 2 545 757 C2

Lys Gln Val Cys Lys Pro Arg Asn Pro Cys Thr Asp Gly Thr His Asp
645 650 655

Cys Asn Lys Asn Ala Lys Cys Asn Tyr Leu Gly His Tyr Ser Asp Pro
660 665 670

Met Tyr Arg Cys Glu Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Ile Ile
675 680 685

Cys Gly Glu Asp Thr Asp Leu Asp Gly Trp Pro Asn Glu Asn Leu Val
690 695 700

Cys Val Ala Asn Ala Thr Tyr His Cys Lys Lys Asp Asn Cys Pro Asn
705 710 715 720

Leu Pro Asn Ser Gly Gln Glu Asp Tyr Asp Lys Asp Gly Ile Gly Asp
725 730 735

Ala Cys Asp Asp Asp Asp Asp Asn Asp Lys Ile Pro Asp Asp Arg Asp
740 745 750

Asn Cys Pro Phe His Tyr Asn Pro Ala Gln Tyr Asp Tyr Asp Arg Asp
755 760 765

Asp Val Gly Asp Arg Cys Asp Asn Cys Pro Tyr Asn His Asn Pro Asp
770 775 780

Gln Ala Asp Thr Asp Asn Asn Gly Glu Gly Asp Ala Cys Ala Ala Asp
785 790 795 800

Ile Asp Gly Asp Gly Ile Leu Asn Glu Arg Asp Asn Cys Gln Tyr Val
805 810 815

Tyr Asn Val Asp Gln Arg Asp Thr Asp Met Asp Gly Val Gly Asp Gln
820 825 830

Cys Asp Asn Cys Pro Leu Glu His Asn Pro Asp Gln Leu Asp Ser Asp
835 840 845

Ser Asp Arg Ile Gly Asp Thr Cys Asp Asn Asn Gln Asp Ile Asp Glu
850 855 860

Asp Gly His Gln Asn Asn Leu Asp Asn Cys Pro Tyr Val Pro Asn Ala
865 870 875 880

Asn Gln Ala Asp His Asp Lys Asp Gly Lys Gly Asp Ala Cys Asp His
885 890 895

RU 2 545 757 C2

Asp Asp Asp Asn Asp Gly Ile Pro Asp Asp Lys Asp Asn Cys Arg Leu
900 905 910

Val Pro Asn Pro Asp Gln Lys Asp Ser Asp Gly Asp Gly Arg Gly Asp
915 920 925

Ala Cys Lys Asp Asp Phe Asp His Asp Ser Val Pro Asp Ile Asp Asp
930 935 940

Ile Cys Pro Glu Asn Val Asp Ile Ser Glu Thr Asp Phe Arg Arg Phe
945 950 955 960

Gln Met Ile Pro Leu Asp Pro Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Pro Asn
965 970 975

Trp Val Val Arg His Gln Gly Lys Glu Leu Val Gln Thr Val Asn Cys
980 985 990

Asp Pro Gly Leu Ala Val Gly Tyr Asp Glu Phe Asn Ala Val Asp Phe
995 1000 1005

Ser Gly Thr Phe Phe Ile Asn Thr Glu Arg Asp Asp Asp Tyr Ala
1010 1015 1020

Gly Phe Val Phe Gly Tyr Gln Ser Ser Ser Arg Phe Tyr Val Val
1025 1030 1035

Met Trp Lys Gln Val Thr Gln Ser Tyr Trp Asp Thr Asn Pro Thr
1040 1045 1050

Arg Ala Gln Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Val Lys Val Val Asn Ser
1055 1060 1065

Thr Thr Gly Pro Gly Glu His Leu Arg Asn Ala Leu Trp His Thr
1070 1075 1080

Gly Asn Thr Pro Gly Gln Val Arg Thr Leu Trp His Asp Pro Arg
1085 1090 1095

His Ile Gly Trp Lys Asp Phe Thr Ala Tyr Arg Trp Arg Leu Ser
1100 1105 1110

His Arg Pro Lys Thr Gly Phe Ile Arg Val Val Met Tyr Glu Gly
1115 1120 1125

Lys Lys Ile Met Ala Asp Ser Gly Pro Ile Tyr Asp Lys Thr Tyr
1130 1135 1140

Ala Gly Gly Arg Leu Gly Leu Phe Val Phe Ser Gln Glu Met Val
1145 1150 1155

Phe Phe Ser Asp Leu Lys Tyr Glu Cys Arg Asp Pro
1160 1165 1170

<210> 7
<211> 1758
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 7
ctgctgtctg cggaggaaac tgcacgacg gacggccgcc cagctacggg aggacctgga 60
gtggcactgg gcgcccgcag gaccatcccc gggaccgcgc tgcccctcgg cgcgccgccc 120
cgccggggccg ctccccgtcg ggttccccag ccacagcctt acctacgggc tcctgactcc 180
gcaaggcttc cagaagatgc tcgaaccacc ggccggggcc tcggggcagc agtgagggag 240
gcgtccagcc cccactcag ctcttctcct cctgtgccag gggctccccg ggggatgagc 300
atggtggttt tccctcggag cccctggct cgggacgtct gagaagatgc cggatcatgag 360
gctgttccct tgcttctcgc agctcctggc cgggctggcg ctgcctgctg tgcccccca 420
gcagtgggcc ttgtctgctg ggaacggctc gtcagaggtg gaagtggtag ccttccagga 480
agtgtggggc cgcagctact gccgggcgct ggagaggctg gtggacgtcg tgtccgagta 540
ccccagcgag gtggagcaca tggtcagccc atcctgtgtc tccctgctgc gctgcaccgg 600
ctgctgcggc gatgagaatc tgcactgtgt gccggtggag acggccaatg tcaccatgca 660
gctoctaaag atccgttctg gggaccggcc ctccacgtg gagctgacgt tctctcagca 720
cgttcgtcgc gaatgccggc ctctgcggga gaagatgaag ccggaaagga ggagacccaa 780
gggcaggggg aagaggagga gagagaagca gagaccaca gactgccacc tgtgcggcga 840
tgctgttccc cggaggtaac ccacccttg gaggagagag accccgcacc cggctcgtgt 900
atttattacc gtcacactct tcagtgaetc ctgctggtac ctgccctcta tttattagcc 960
aactgtttcc ctgctgaatg cctcgtccc ttcaagacga ggggcaggga aggacaggac 1020
cctcaggaat tcagtgcctt caacaacgtg agagaaagag agaagccagc cacagacccc 1080
tgggagcttc cgctttgaaa gaagcaagac acgtggcctc gtgaggggca agctaggccc 1140
cagaggccct ggaggtctcc aggggcctgc agaaggaaag aagggggccc tgctacctgt 1200
tcttgggcct caggctctgc acagacaagc agcccttget ttcggagctc ctgtccaaag 1260
tagggatgag gatcctgctg gggccgccac ggcctggctg gtgggaaggc cggcagcggg 1320
cggaggggat ccagccactt cccctcttc ttctgaagat cagaacattc agctctggag 1380
aacagtgggt gcctgggggc ttttgccact ccttgtcccc cgtgatctcc cctcacactt 1440
tgccatttgc ttgtactggg acattgttct ttccggccaa ggtgccacca ccctgcccc 1500

cctaagagac acatacagag tgggccccgg gctggagaaa gagctgcctg gatgagaaac 1560
agctcagcca gtggggatga ggtcaccagg ggaggagcct gtgcgtccca gctgaaggca 1620
gtggcagggg agcaggttcc ccaagggccc tggcaccccc acaagctgtc cctgcagggc 1680
catctgactg ccaagccaga ttctcttgaa taaagtattc tagtgtggaa aaaaaaaaaa 1740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1758

<210> 8
<211> 513
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 8
atgccggtca tgaggctgtt cccttgcttc ctgcagctcc tggccgggct ggcgctgcct 60
gctgtgcccc ccagcagtg ggccttgtct gctgggaacg gctcgtcaga ggtggaagtg 120
gtacccttcc aggaagtgtg gggccgcagc tactgccggg cgctggagag gctgggtggac 180
gtcgtgtccg agtaccocag cgaggtggag cacatgttca gccatcctg tgtctccctg 240
ctgcgctgca ccggtctgtg cggcgatgag aatctgcaact gtgtgccggt ggagacggcc 300
aatgtcacca tgcagctcct aaagatccgt tctggggacc ggcctccta cgtggagctg 360
acgttctctc agcacgttcg ctgcgaatgc cggcctctgc gggagaagat gaagccggaa 420
aggaggagac ccaagggcag ggggaagagg aggagagaga agcagagacc cacagactgc 480
cacctgtgcg gcgatgctgt tccccggagg taa 513

<210> 9
<211> 170
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro

RU 2 545 757 C2

85

90

95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro
130 135 140

Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys
145 150 155 160

His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
165 170

<210> 10

<211> 708

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccccgcaggc tgagggcagg tgggaagcaa acccggacgc atcgagcag cagcagcagc 60

agcagaagca gcagcagcag cctccgcagt ccctccagag acatggatcc ccagacagca 120

ccttcccggg cgctcctgct cctgctcttc ttgcattctgg ctttcctggg aggtcggtcc 180

caccgcgtgg gcagccccgg ttcagcctcg gacttgga aa cgtccgggtt acaggagcag 240

cgcaaccatt tgcagggcaa actgtcggag ctgcaggtgg agcagacatc cctggagccc 300

ctccaggaga gccccgctcc cacaggtgtc tggaagtccc gggaggtagc caccgagggc 360

atccgtgggc accgcaaaat ggtcctctac accctgcggg caccacgaag cccaagatg 420

gtgcaagggc ctggctgctt tgggaggaag atggaccgga tcagctcctc cagtggcctg 480

ggctgcaaag tgctgaggcg gcattaagag gaagtcctgg ctgcagacac ctgcttctga 540

ttccacaagg ggctttttcc tcaaccctgt ggccgccttt gaagtgactc atttttttaa 600

tgtatttatg tatttatttg attgttttat ataagatggt ttcttacctt tgagcacaaa 660

atttccacgg tgaaataaag tcaacattat aagctttaaa aaaaaaaaaa 708

<210> 11

<211> 405

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 11

atggatcccc agacagcacc ttcccgggag ctctgctcc tgctcttctt gcattctggct 60

ttcctgggag gtcgttccca cccgctgggc agccccggtt cagcctcgga cttggaaacg 120

RU 2 545 757 C2

tccgggttac aggagcagcg caaccatttg cagggcaaac tgtcggagct gcaggtggag 180
cagacatccc tggagcccct ccaggagagc ccccgccca caggtgtctg gaagtcccg 240
gaggtagcca ccgagggcat ccgtgggcac cgcaaaatgg tcctctacac cctgcgggca 300
ccacgaagcc ccaagatggt gcaaggtct ggctgctttg ggaggaagat ggaccggatc 360
agctcctcca gtggcctggg ctgcaaagtg ctgaggcggc attaa 405

<210> 12
<211> 134
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 12

Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro
20 25 30

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn
35 40 45

His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu
50 55 60

Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg
65 70 75 80

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr
85 90 95

Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys
100 105 110

Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys
115 120 125

Lys Val Leu Arg Arg His
130

<210> 13
<211> 184
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens
<400> 13

Phe Asp Ala Ile Ala Glu Ile Gly Asn Gln Leu Tyr Leu Phe Lys Asp
1 5 10 15

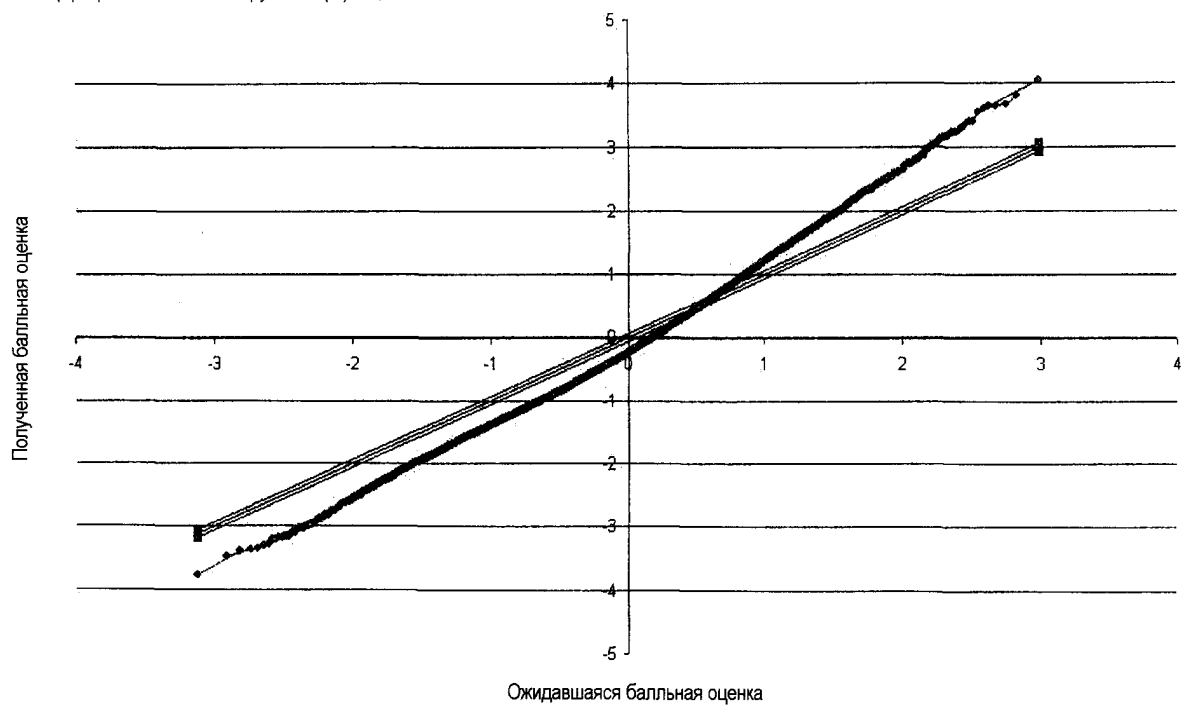
RU 2545757 C2

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

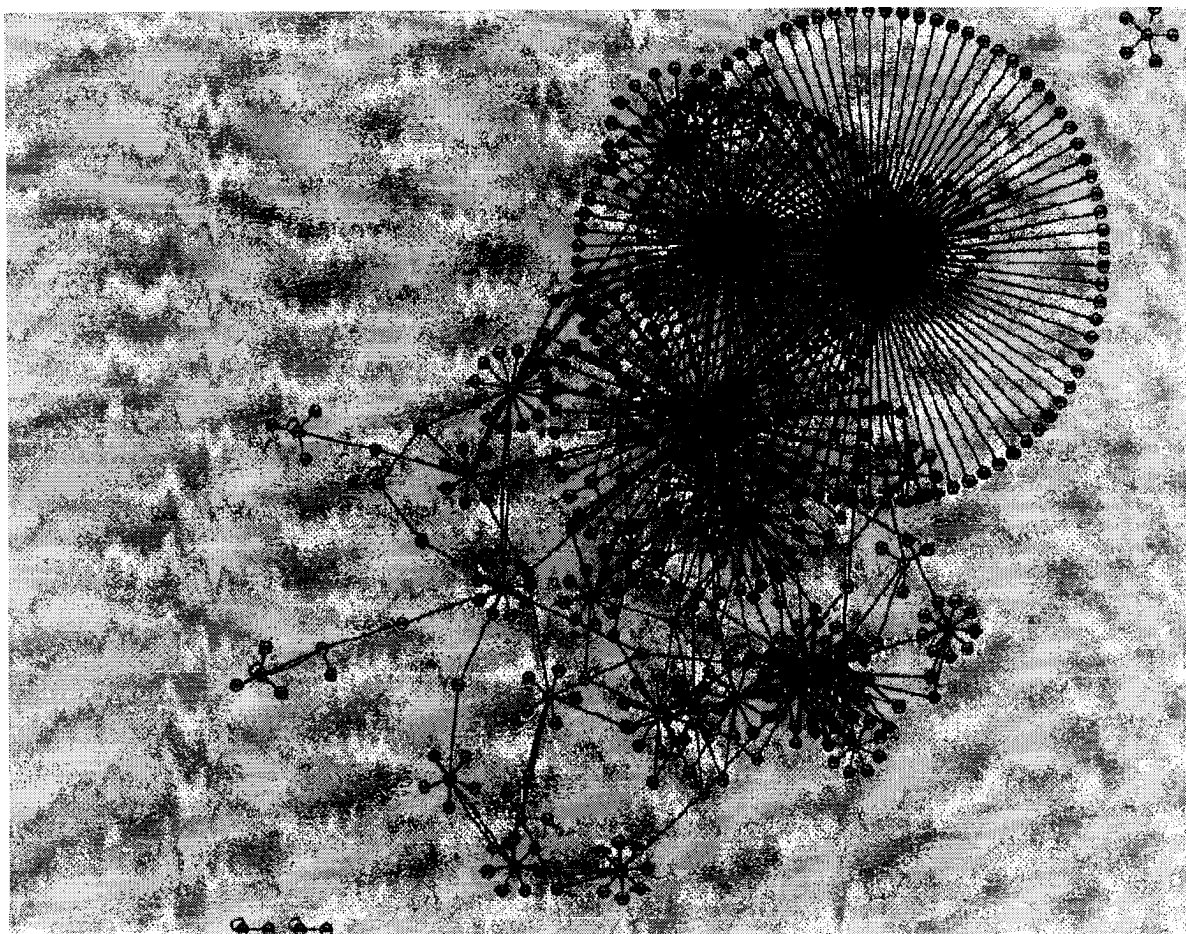
Значимые: 525
 Медианное количество ложноположительных
 результатов: 128,68
 Коэффициент ложного обнаружения (%): 24,51

График SAM

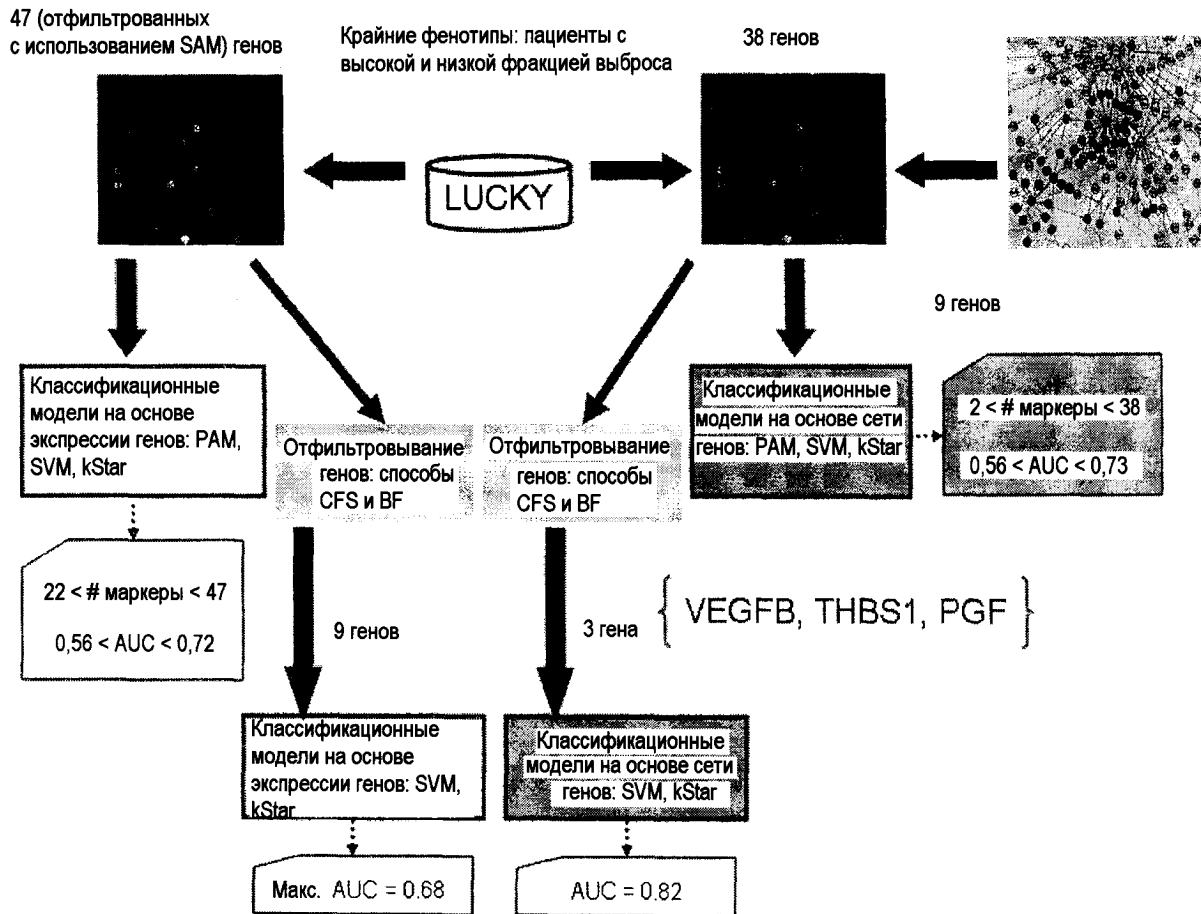
Tail strength (%): 32
 se (%): 24,6



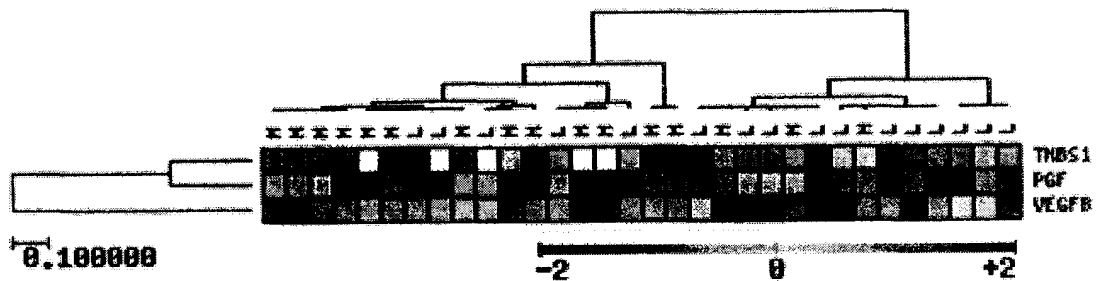
Фиг. 1



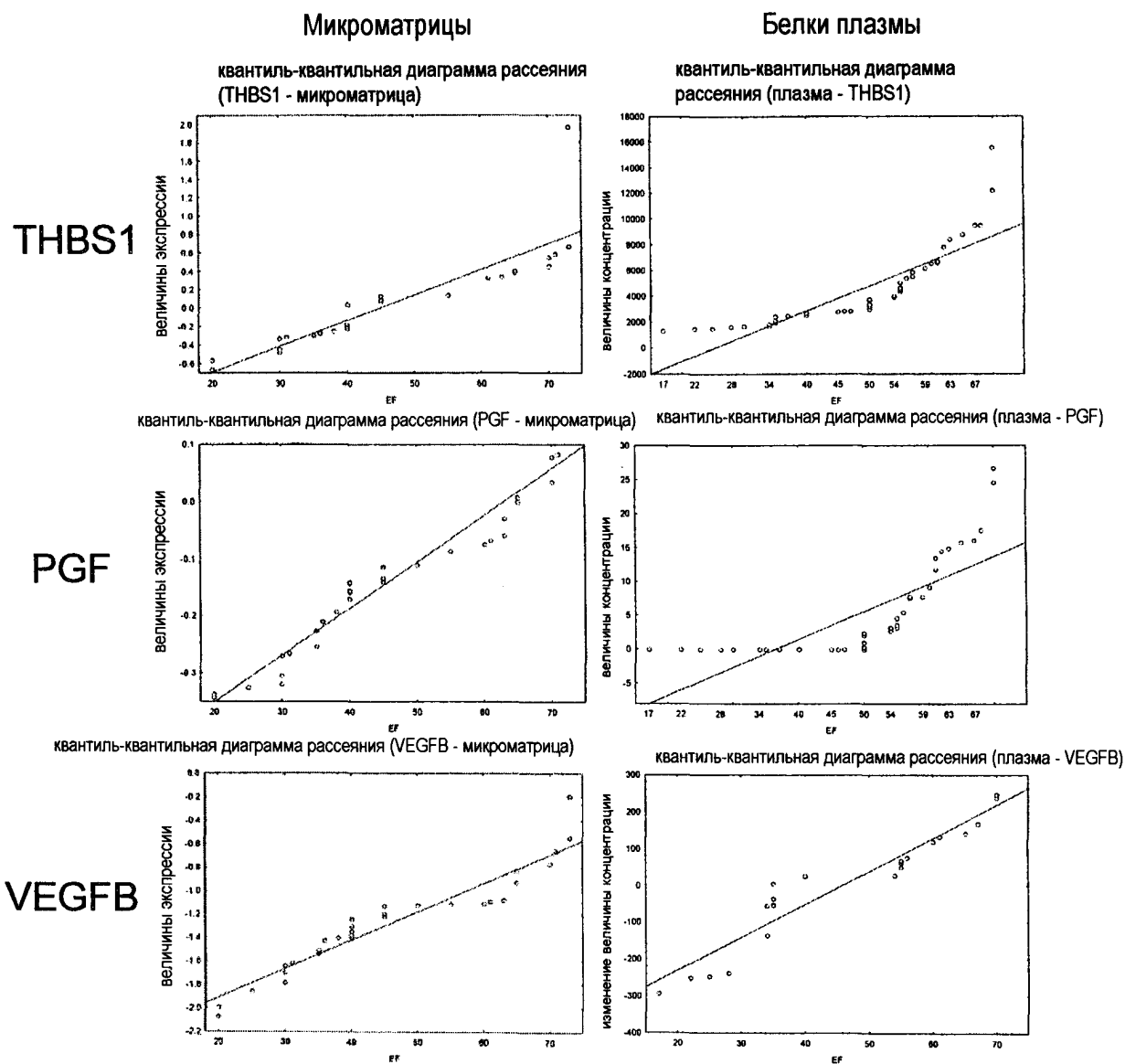
Фиг. 2



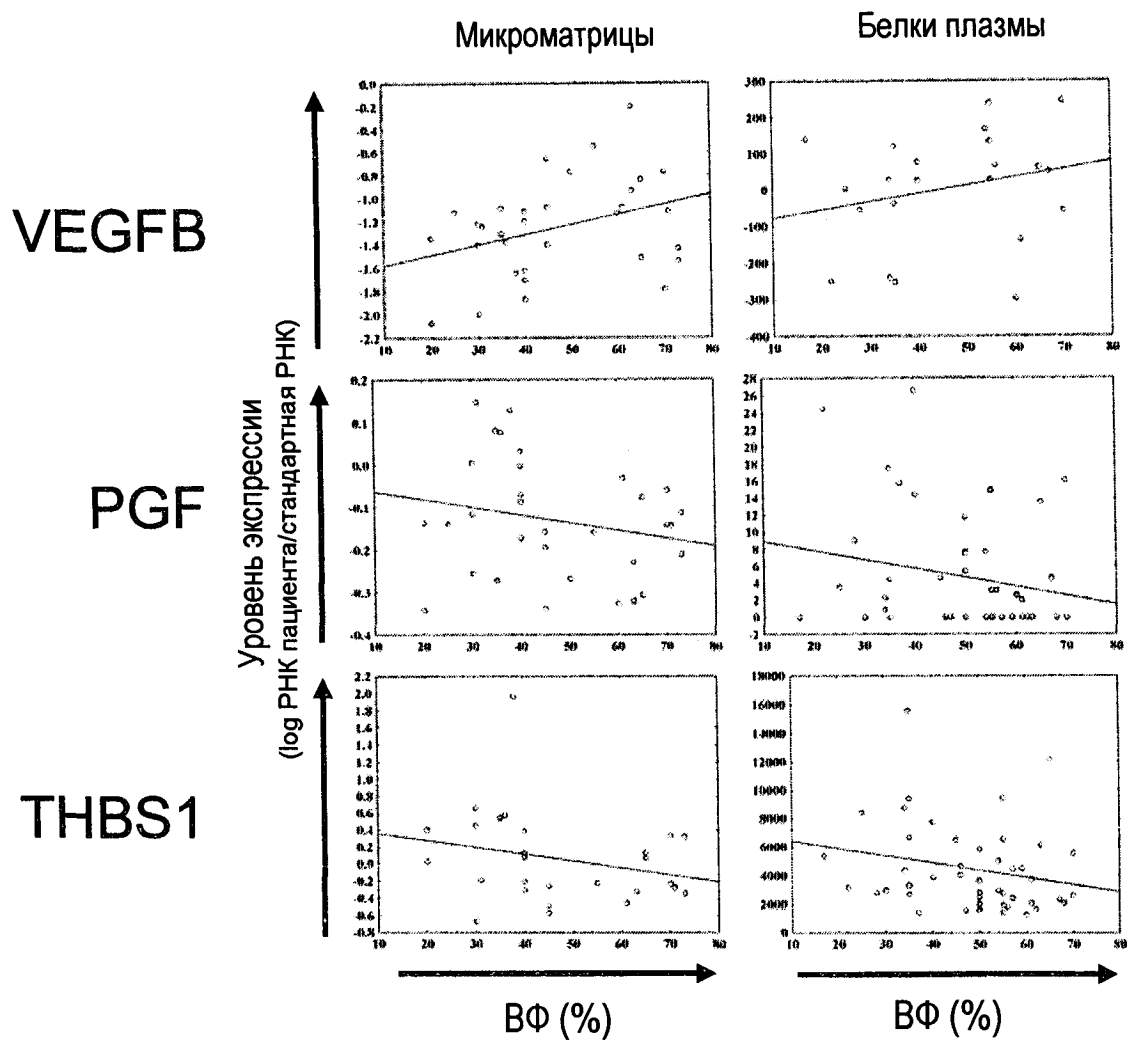
Фиг. 3



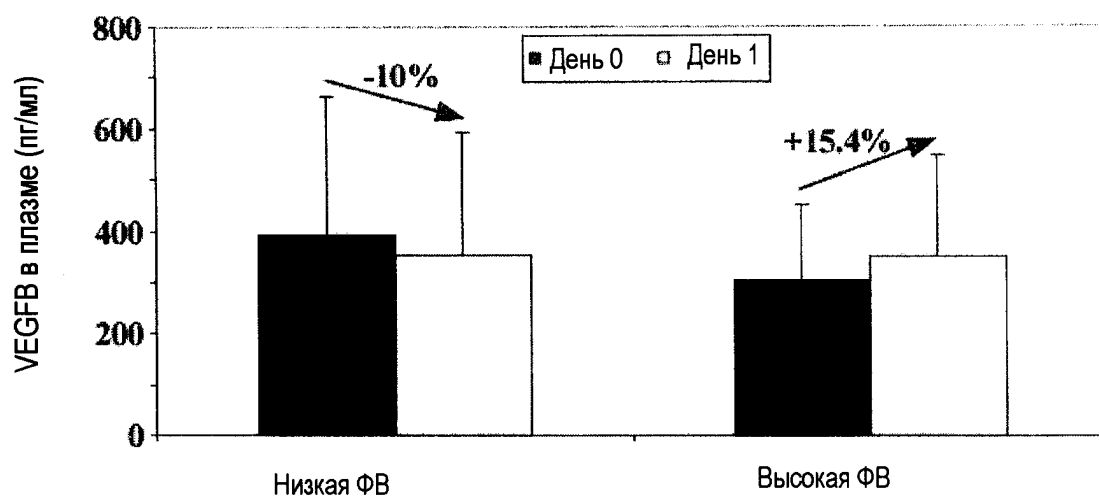
Фиг. 4



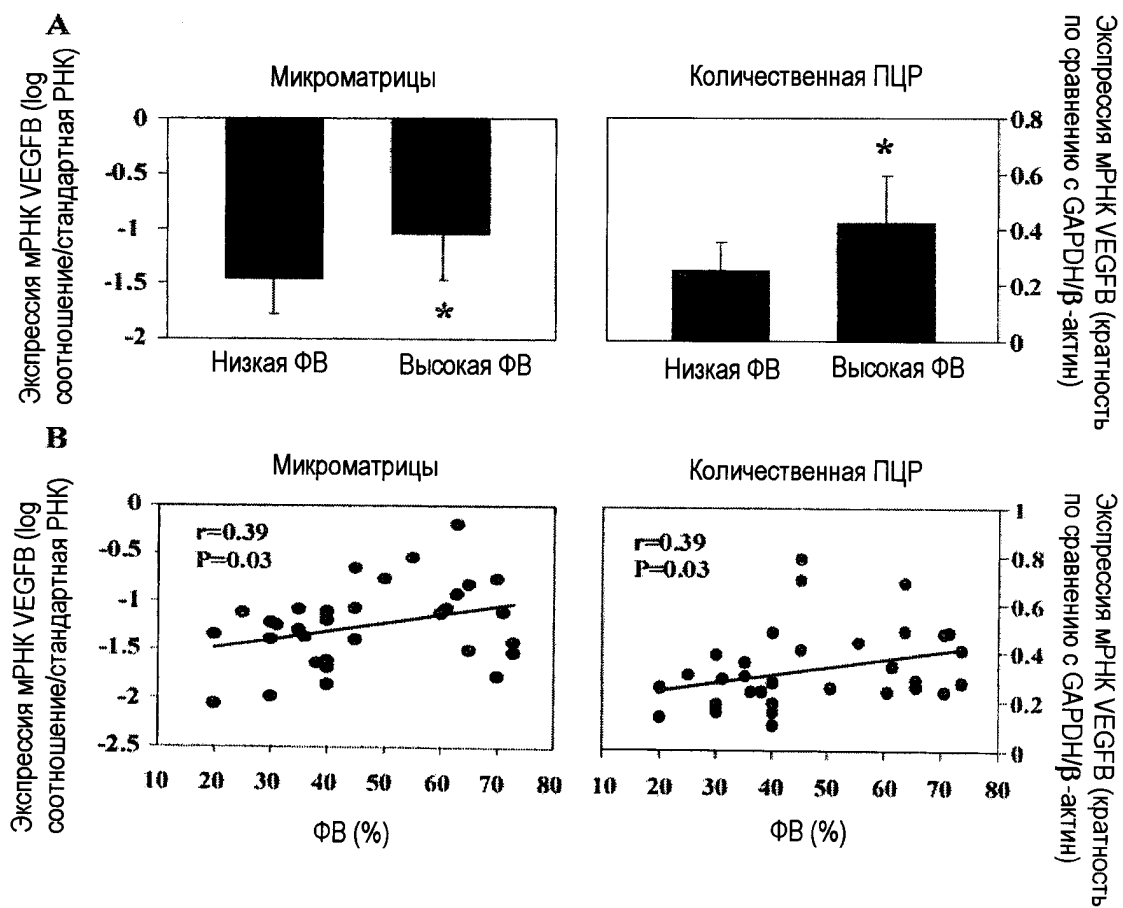
Фиг. 5



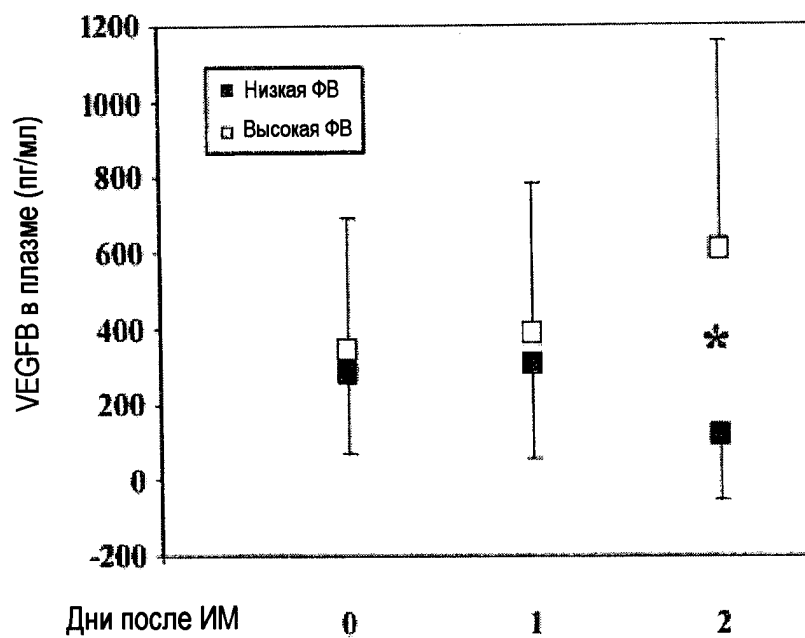
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9