РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2008 115 312** (13) **A**

(51) МПК
G01N 33/574 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21), (22) Заявка: **2008115312/15, 28.09.2006**

(30) Конвенционный приоритет:
29.09.2005 ES P200502369

(43) Дата публикации заявки: **27.10.2009** Бюл. № **30**

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: **22.04.2008**

(86) Заявка PCT:
EP 2006/066863 (28.09.2006)

(87) Публикация PCT:
WO 2007/039550 (12.04.2007)

Адрес для переписки:
**127055, Москва, а/я 11, пат.пов.
Н.К.Попеленскому, рег. № 31**

(71) Заявитель(и):
ПРОЕКТО ДЕ БИОМЕДИСИНА СИМА, С.Л. (ES)

(72) Автор(ы):
**АВИЛЬЯ САРАГОСА Матьяс (ES),
КОРРАЛЕС ИСКИЕРДО Фернандо (ES),
МУНЬОС ПЕРАЛТА Хавьер (ES),
ПРИЕТО ВАЛТУЭНЬЯ Хесус (ES),
САНТАМАРИЯ МАРТИНЕС Энрике (ES)**

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ПЕЧЕНОЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ (ПКК), СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ, НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, БЕЛОК, АНТИТЕЛО И ГЕН ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПКК, СПОСОБ СКРИНИНГА СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПКК, СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПКК, НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, БЕЛОК, АНТИТЕЛО И ГЕН ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПКК, СПОСОБ КРИНИНГА СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПКК, ТВЕРДЫЙ НОСИТЕЛЬ, НАБОР И НАБОР В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПКК И НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ПКК

(57) Формула изобретения

1. Способ диагностики печеночно-клеточной карциномы (ПКК) in vitro у субъекта или оценки предрасположенности субъекта к развитию ПКК или для оценки прогноза ПКК у субъекта или для определения стадии или тяжести ПКК у субъекта, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии, по крайней мере, одного гена в образце ткани печени упомянутого субъекта, сравнивают упомянутый уровень экспрессии гена с уровнем экспрессии того же гена в контрольном образце и рассматривают снижение упомянутого уровня экспрессии гена по сравнению с уровнем экспрессии того же гена в контрольном образце в качестве симптома ПКК, альтернативно измеряют уровень, по крайней мере, одного белка в образце ткани печени упомянутого субъекта, сравнивают упомянутый уровень белка с уровнем того же белка в контрольном образце и рассматривают снижение упомянутого уровня экспрессии гена по сравнению с уровнем экспрессии того же гена в контрольном образце в качестве симптома ПКК, при этом упомянутый ген выбирают из группы,

RU 2008115312 A

RU 2008115312 A

включающей ген, который кодирует алкогольдегидрогеназу (ADH) [ADH ген], ген, который кодирует антиоксидантный белок 2 (AOP2) [AOP2 ген], ген, который кодирует регукальцин (SMP30) [SMP30 ген], ген, который кодирует неспецифический стерол-переносящий белок (NSLT) [NSLT ген], ген, который кодирует сорбитолдегидрогеназу(SDH) [SDHген], ген, который кодирует сывороточный альбумин (SAP) [SAP ген], ген, который кодирует фосфоглюкомутазу (PGM) [PGM гена], ген, который кодирует фенилаланин-4-гидроксилазу (P4H) [P4H ген], ген, который кодирует аполипопротеин A1 (APOA1) [APOA1 ген], ген, который кодирует карбоангидразу III (CAIII) [CAIII ген], ген, который кодирует митохондриальную альдегиддегидрогеназу (AdDHm) [AdDHm ген], ген, который кодирует орнитинаминотрансферазу (OAT) [OATген] и ген, который кодирует орнитинкарбамоилтрансферазу (OCT) [OCTген], а упомянутый белок выбирают из группы, включающей алкогольдегидрогеназу (ADH), антиоксидантный белок 2 (AOP2), регукальцин (SMP30), неспецифический стерол-переносящий белок (NSLT), сорбитолдегидрогеназу (SDH), сывороточный альбумин (SAP), фосфоглюкомутазу (PGM), фенилаланин-4-гидроксилазу (P4H), аполипопротеин A1 (APOA1), карбоангидразу III (CAIII), митохондриальную альдегиддегидрогеназу (AdDHm), орнитинаминотрансферазу (OAT) и карбамоилтрансферазу (OCT).

2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии любого из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 генов, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

3. Способ по п.1, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии любого из 13 генов, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

4. Способ по п.1, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии любого из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 белков, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

5. Способ по п.1, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии любого из 13 белков, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

6. Способ in vitro подбора и оценки эффективности лечебного фактора, подходящего в качестве кандидата для лечения ПКК, отличающийся тем, что у субъекта на различных фазах и стадиях болезни или во время периодов лечения или периодов отсутствия лечения измеряют уровень, по крайней мере, одного белка и/или измеряют уровень экспрессии, по крайней мере, одного гена и сравнивают этот уровень с контрольными величинами, признаваемыми в качестве нормальных или с предыдущими величинами того же субъекта и при увеличении уровня экспрессии, по крайней мере, одного гена и/или уровня, по крайней мере, одного белка после воздействия упомянутого лечебного фактора, этот фактор рассматривают в качестве кандидата для лечения ПКК, при этом упомянутый ген выбирают из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT, а упомянутый белок выбирают из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

7. Применение последовательности нуклеотидов гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT или пары олигонуклеотидных праймеров, подходящих для специфической амплификации фрагментов одного из упомянутых генов, или пробы,

RU 2008115312 A

RU 2008115312 A

подходящей для идентификации одного из упомянутых генов, в качестве диагностического средства ПКК in vitro у субъекта или оценочного средства предрасположенности субъекта к развитию ПКК, или оценочного средства прогноза ПКК у субъекта, или оценочного средства стадии или тяжести ПКК у субъекта, или средства для подбора или оценки эффективности лечебного фактора для лечения ПКК.

8. Применение белка, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT в качестве диагностического средства ПКК in vitro у субъекта или в качестве оценочного средства предрасположенности субъекта к развитию ПКК, или в качестве оценочного средства прогноза ПКК у субъекта, или в качестве средства для оценки стадии или тяжести ПКК у субъекта, или в качестве средства для подбора и оценки эффективности лечебного фактора для лечения ПКК.

9. Применение антитела, способного связываться с белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT в качестве диагностического средства ПКК in vitro у субъекта или в качестве оценочного средства предрасположенности субъекта к развитию ПКК, или в качестве оценочного средства прогноза ПКК у субъекта, или в качестве средства для оценки стадии или тяжести ПКК у субъекта, или в качестве средства для подбора и оценки эффективности лечебного фактора для лечения ПКК.

10. Применение комбинации генов, включающей, по крайней мере, один ген, выбранный из группы, состоящей из ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT и/или комбинации белков, включающей, по крайней мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT в качестве средства для скрининга, поиска, идентификации, разработки и оценки эффективности соединений для лечения ПКК.

11. Способ скрининга, поиска, идентификации, разработки и оценки эффективности потенциально полезного соединения для лечения ПКК, характеризующийся тем, что клеточную систему, которая экспрессирует сниженный уровень, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT вводят в контакт с соединением-кандидатом и оценивают экспрессию упомянутого гена, причем при увеличении экспрессии упомянутого гена соединение-кандидат рассматривают в качестве потенциально полезного соединения для лечения ПКК.

12. Способ для выявления начальной стадии печеночно-клеточной карциномы (ПКК) in vitro у субъекта, характеризующийся тем, что в образце ткани печени упомянутого субъекта измеряют уровень экспрессии, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM и сравнивают упомянутый уровень экспрессии гена с уровнем экспрессии того же гена в контрольном образце и при упомянутом уровне ниже уровня экспрессии того же гена в контрольном образце начальную стадию ПКК рассматривают в качестве выявленной или, альтернативно, в образце ткани печени упомянутого субъекта измеряют уровень, по крайней мере, одного белка, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM и сравнивают упомянутый уровень белка с уровнем белка в контрольном образце и при упомянутом уровне белка ниже уровня того же белка в контрольном образце начальную стадию ПКК рассматривают в качестве выявленной.

13. Способ по п.12, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии любого из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 генов, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM.

RU 2008115312 A

RU 2008115312 A

14. Способ по п.12, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии 7 генов, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM.

15. Способ по п.12, характеризующийся тем, что измеряют уровень любого из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 белков, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM.

16. Способ по п.12, характеризующийся тем, что измеряют уровень экспрессии 7 белков, выбранных из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM.

17. Применение нуклеотидной последовательности гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM или пары олигонуклеотидных праймеров для специфической амплификации фрагментов одного из упомянутых генов или пробы для идентификации одного из упомянутых генов для in vitro выявления начальной стадии ПКК.

18. Применение белка, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и/или PGM в качестве средства выявления in vitro начальной стадии ПКК.

19. Применение антитела, способного связываться с белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM в качестве средства идентификации in vitro начальной стадии ПКК.

20. Применение комбинации генов, включающей, по крайней мере, один ген, выбранный из группы, состоящей из ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM и/или комбинации белков, включающей, по крайней мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM в качестве средства для скрининга, поиска, идентификации, разработки и оценки эффективности соединений для лечения стадии, предшествующей развитию ПКК.

21. Способ скрининга, поиска, идентификации, разработки и оценки эффективности соединения, потенциально полезного для лечения начальной стадии ПКК, характеризующийся тем, что клеточную систему, которая экспрессирует сниженный уровень, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM вводят в контакт с соединением-кандидатом и оценивают экспрессию упомянутого гена, причем при увеличении экспрессии упомянутого гена соединение-кандидат рассматривают в качестве потенциально полезного для лечения начальной стадии ПКК.

22. Твердый носитель, характеризующийся тем, что он включает в себя, по крайней мере, одну пробу, подходящую для идентификации, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT или включает в себя, по крайней мере, одно антитело, способное связываться с белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

23. Набор, характеризующийся тем, что он включает в себя, по крайней мере, один реагент для определения уровня экспрессии, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и/или OCT или, по крайней мере, один реагент для определения уровня, по крайней мере, одного белка, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT.

24. Набор по п.23, характеризующийся тем, что включает в себя, по крайней мере, одну пару олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов мРНК или соответствующих им кДНКгена, выбранного из группы, включающей ADH,

RU 2008115312 A

RU 2008115312 A

AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT и/или по крайней мере, одну пробу для идентификации, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT и/или по крайней мере, одно антитело, способное связываться с белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT или с его фрагментом, который содержит антигенные детерминанты и/или по крайней мере, одну пару олигонуклеотидных праймеров для специфической амплификации фрагментов мРНК или соответствующих им кДНК гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM и/или по крайней мере, одну пробу для идентификации, по крайней мере, одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM и/или по крайней мере, одно антитело, способное связываться с белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM или с его фрагментом, который содержит антигенную детерминанту.

25. Набор по п.24, характеризующийся тем, что он включает в себя 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 пар олигонуклеотидных праймеров, каждый из которых является специфичным для одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT или OCT или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 проб, каждая из которых является специфичной для идентификации одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT или OCT или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 антител, каждое из которых способно связываться с одним белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP, PGM, P4H, APOA1, CAIII, AdDHm, OAT и OCT, или с его фрагментом, который содержит антигенную детерминанту или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 пар олигонуклеотидных праймеров, каждый из которых является спечифичным для одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 проб, каждая из которых является специфичной для идентификации одного гена, выбранного из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 антител, каждое из которых способно связываться с одним белком, выбранным из группы, включающей ADH, AOP2, SMP30, NSLT, SDH, SAP и PGM, или с его фрагментом, который содержит антигенные детерминанты.

26. Набор по п.24, характеризующийся тем, что упомянутые пробы и упомянутые антитела иммобилизованы на твердом носителе.

27. Применение набора по любому из пп.23-26 в качестве диагностического средства ПКК in vitro у субъекта или оценочного средства предрасположенности субъекта к развитию ПКК, или оценочного средства прогноза ПКК у субъекта или средства для определения стадии или тяжести ПКК у субъекта, или средства для подбора или оценки эффективности лечения ПКК, или средства для выявления начальной стадии ПКК.

RU 2008115312 A

RU 2008115312 A