



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.09

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Номер заявки
201791987

(22) Дата подачи заявки
2016.04.29

(54) ДЕТЕКТИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(31) 10 2015 106 646.7; 15195182.9

(32) 2015.04.29; 2015.11.18

(33) DE; EP

(43) 2018.05.31

(86) PCT/EP2016/059604

(87) WO 2016/174199 2016.11.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МИРДЕТЕКТ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
**Шпикерманн Майке, Винтер Нина,
Флор Инга, Бельге Газанфер (DE)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) Anonymous: "miScript PreAmp Handbook", August 2012 (2012-08), XP002759546, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=4f403d6b-0a62-4fe1-addd-87b253290612&lang=en>. [retrieved on 2016-07-04], page 14-19

Anonymous: miScript miRNA PCR array handbook, May 2012 (2012-05), pages 1-60, XP002759547, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=a230e7b0-6fe0-4075-8a09-ad815987202c&lang=en>. [retrieved on 2016-07-05], the whole document

M. SPIEKERMANN ET AL.: "MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker", ANDROLOGY, vol. 3, no. 1, 4 September 2014 (2014-09-04), pages 78-84, XP055285513, ISSN: 2047-2919, DOI: 10.1111/j.2047-2927.2014.00269.x, abstract, Materials and methods

MENGUAL LOURDES ET AL.: "Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays", BMC RESEARCH NOTES, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 1, no. 1, 5 June 2008 (2008-06-05), page 21, XP021045871, ISSN: 1756-0500, DOI: 10.1186/1756-0500-1-21, abstract, Methods

MATTHEW J MURRAY ET AL.: "A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 114, no. 2, 15 December 2015 (2015-12-15), pages 151-162, XP055285557, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2015.429, abstract, Materials and Methods

VLASTA KORENKOV ET AL.: "Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment", BMC MOLECULAR BIOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, GB, vol. 16, no. 1, 11 March 2015 (2015-03-11), page 5, XP021218987, ISSN: 1471-2199, DOI: 10.1186/S12867-015-0033-9, page 2, column 2 - page 3, column 1

CN-A-101363057

(57) Изобретение относится к способам детектирования молекул нуклеиновых кислот на нижнем пределе детектирования.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам детектирования молекул нуклеиновых кислот на нижнем пределе детектирования.

Уровень техники

Уровень экспрессии конкретных (определенных) молекул нуклеиновых кислот в биологических образцах, взятых у испытуемого человека, может быть показателем наличия, отсутствия и/или степени конкретных заболеваний или нарушений.

Например, получение профилей экспрессии микроРНК (miRNA) показало, что при разных заболеваниях присутствуют явные вариации экспрессии конкретных микроРНК между здоровыми испытуемыми и пациентами. МикроРНК представляют собой короткие, высококонсервативные, некодирующие РНК, которые играют важную роль в сложной системе регуляции генов. Они специфически связываются с матричными РНК (мРНК) и контролируют экспрессию генов путем регуляции стабильности и трансляции мРНК. Как правило, в состав микроРНК входит от 21 до 23 нуклеотидов.

Многие диагностически важные молекулы нуклеиновых кислот, например, конкретные микроРНК, трудно точно определить количественно из-за их небольшого размера и их типично низких концентраций в биологических образцах.

Для определения уровня экспрессии конкретной микроРНК, микроРНК обычно выделяют из биологического образца, и осуществляют обратную транскрипцию в комплементарную ДНК (кДНК). Затем уровень экспрессии микроРНК определяют, используя количественную ПНР (кПЦР) в реальном времени (qRT-PCR). В некоторых случаях перед фактическим измерением выполняют стадию предварительной амплификации. Эту дополнительную стадию выполняют, если (i) недостаточно материала микроРНК для использования в нескольких способах молекулярного биологического определения (ПНР в реальном времени, микрочипы и т.д.) и/или (ii) концентрация микроРНК в образце слишком низкая (т.е. без предварительной амплификации никакой сигнал не был бы получен во время проведения ПЦР в реальном времени).

Однако, как показано ниже в сравнительном примере 1, такой "классический" способ не позволяет точно и надежно определять уровни экспрессии, если целевые молекулы нуклеиновых кислот присутствуют в количествах на нижнем пределе детектирования, например, менее 1000 молекул на образец.

Соответственно задачей настоящего изобретения является обеспечение способов, которые облегчают точное и надежное определение уровня экспрессии конкретных молекул нуклеиновых кислот, например, микроРНК, в биологических образцах на нижнем пределе детектирования.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения уровня экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце, причем способ включает в себя следующие стадии:

(i) обеспечение пробы А, содержащей ДНК или кДНК, выделенную/полученную из биологического образца;

(ii) обеспечение трех или более аликвот пробы А со стадии (i), и осуществление независимой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с каждой из этих трех или более аликвот для того, чтобы амплифицировать указанную конкретную молекулу нуклеиновой кислоты, с получением трех или более проб В, содержащих амплифицированную указанную конкретную молекулу нуклеиновой кислоты; и

(iii) смешивание равных количеств трех или более проб В с получением пробы С и определение уровня указанной конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в пробе С с применением подхода на основе ПЦР, причем уровень, определенный на стадии (iii), соответствует уровню экспрессии указанной конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения уровня экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце, причем способ включает в себя следующие стадии:

(i) обеспечение пробы А, содержащей ДНК или кДНК, выделенную/полученную из биологического образца;

(ii) обеспечение трех или более аликвот пробы А со стадии (i) и осуществление независимой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с каждой из этих трех или более аликвот для того, чтобы амплифицировать указанную конкретную молекулу нуклеиновой кислоты, с получением трех или более проб В, содержащих амплифицированную указанную молекулу нуклеиновой кислоты; и

(iii) определение уровня указанной конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в каждой из этих трех или более проб В с применением подхода на основе ПЦР, причем среднее значение уровней, определенных на стадии (iii), соответствует уровню экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце.

В одном варианте реализации изобретения концентрация конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце составляет $\leq 1 \times 10^{-11}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-12}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-13}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-14}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-15}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-16}$ М.

В одном варианте реализации изобретения концентрация конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце составляет от 1×10^{-11} М до $\times 10^{-17}$ М или от $\times 10^{-12}$ М до $\times 10^{-17}$ М, или от $\times 10^{-13}$ М до $\times 10^{-17}$ М, или от $\times 10^{-14}$ до $\times 10^{-17}$ М, или от $\times 10^{-15}$ до $\times 10^{-17}$ М, или от $\times 10^{-16}$ до $\times 10^{-17}$ М.

В одном варианте реализации изобретения конкретную молекулу нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из конкретной микроРНК, конкретной внеклеточной циркулирующей ДНК (например, конкретной внеклеточной циркулирующей опухолевой ДНК), конкретной мРНК, конкретной миРНК и конкретной мяРНК.

В одном варианте реализации изобретения конкретная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой конкретную микроРНК.

В одном варианте реализации изобретения конкретную молекулу микроРНК выбирают из группы, состоящей из miR-371a-3p, miR-93-5p, miR-372, miR-373, miR-367 и miR-20a-5p.

В одном варианте реализации изобретения биологический образец выбирают из группы, состоящей из биологической жидкости, ткани, клетки, клеточного лизата и супернатанта клеточной культуры.

В одном варианте реализации изобретения биологическую жидкость выбирают из группы, состоящей из сыворотки крови, плазмы крови, семенной плазмы, жидкости гидроцеле, жидкости сперматоцеле, цельной крови, мочи, амниотической жидкости, экссудата, мокроты, слюны и спинномозговой жидкости.

В одном варианте реализации изобретения ткань выбирают из группы, состоящей из нативной ткани, мгновенно замороженной ткани и ткани, фиксированной в формалине и залитой парафином (FFPE).

В одном варианте реализации изобретения ткань представляет собой опухолевую ткань.

В одном варианте реализации изобретения проба А содержит кДНК, выделенную/полученную из биологического образца.

В одном варианте реализации изобретения стадия (i) включает в себя стадии: (ia) выделения РНК из биологического образца и (ib) преобразования РНК, выделенной на стадии (ia), в кДНК, с получением пробы А, содержащей кДНК.

В одном варианте реализации изобретения на стадии (ii) обеспечены три аликвоты пробы А.

В одном варианте реализации изобретения способ на основе ПНР представляет собой количественную ПНР в реальном времени (qRT-PCR) или цифровую ПНР, цПЦР (dPCR).

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано схематическое изображение способа в соответствии с настоящим изобретением (пример 1). После проведения трех кПЦР в реальном времени (qRT-PCRs) вычисляют среднее арифметическое значение для оценки данных.

На фиг. 2 показано схематическое изображение способа в соответствии с настоящим изобретением (пример 2). Только одну кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) выполняют со смесью равных количеств от трех независимых реакций предварительной амплификации для получения измеренного среднего значения для оценки данных.

Подробное описание изобретения

Хотя настоящее изобретение подробно описано выше и ниже, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методиками, протоколами и реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку они могут быть различными. Следует также понимать, что используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения объема притязаний согласно настоящему изобретению, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют те же значения, которые обычно понимает специалист в данной области техники.

Далее будут описаны некоторые элементы настоящего изобретения. Указанные элементы изобретения могут быть перечислены в конкретных вариантах реализации изобретения, однако следует понимать, что они могут быть объединены в любом способе и в любом числе для создания дополнительных вариантов реализации изобретения. Различные описанные примеры и предпочтительные варианты реализации изобретения не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение только явно описанными вариантами реализации изобретения. Настоящее описание следует понимать как поддерживающее и охватывающее варианты реализации изобретения, которые сочетают явно описанные варианты реализации изобретения с любым числом раскрытых и/или предпочтительных элементов. Кроме того, любые перестановки и комбинации всех описанных элементов в указанной заявке должны рассматриваться раскрытыми в описании настоящей заявки, если контекст не указывает иного.

Предпочтительно термины, используемые в настоящей заявке, определены, как описано в "A multi-lingual glossary of biotechnological terms (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel и H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Базель, Швейцария, (1995).

На практике настоящее изобретение будет использовать, если не указано иное, традиционные способы химии, биохимии, клеточной биологии, иммунологии и технологию рекомбинантных ДНК, которые объяснены в литературе данной области (ср., например, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, J. Sambrook et al. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2000).

На протяжении всего описания и последующей формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" и варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумевать включение заявленного элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, но указанное слово не исключает какого-либо другого элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий, хотя в некоторых вариантах реализации изобретения такой другой элемент, другое целое число или другая стадия или группа элементов, целых чисел или стадий могут быть исключены, т.е. объект изобретения заключается во включении заявленного элемента, целого числа или стадии или группы элементов, целых чисел или стадий. Термины "a" и "an", и "the" и аналогичное обозначение, используемые в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), должны рассматриваться как охватывающие как единственное, так и множественное число, если иное не указано в настоящей заявке или явно не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в настоящей заявке просто предназначено для использования в качестве сокращенного способа индивидуального обращения к каждому отдельному значению, входящему в диапазон. Если не указано иное, каждое индивидуальное значение включено в описание изобретения, как если бы оно было индивидуально перечислено в настоящей заявке. Все описанные в настоящей заявке способы могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящей заявке или иным способом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, "такой как"), приведенных в настоящей заявке, предназначено только для лучшей иллюстрации настоящего изобретения и не представляет собой ограничение объема притязаний согласно настоящему изобретению, заявленного иным образом. Никакие формулировки в описании изобретения не должны рассматриваться как указание на какой-либо незаявленный элемент, необходимый для практики настоящего изобретения.

Термин "уровень экспрессии", используемый в настоящей заявке, может относиться к относительному уровню экспрессии, то есть к уровню экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты относительно уровня(ей) экспрессии одной или более эталонных молекул нуклеиновых кислот или к абсолютному уровню экспрессии, т.е. фактическому количеству конкретной молекулы нуклеиновой кислоты. В соответствии с настоящим изобретением "определение уровня экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце" может быть "определением наличия или отсутствия конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце". В одном варианте реализации изобретения уровень экспрессии (или наличие, или отсутствие) конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце указывает на наличие, отсутствие и/или степень/прогрессирование заболевания или нарушения у субъекта, у которого был получен биологический образец. В одном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, например, раковое заболевание, указанное в настоящей заявке.

Конкретная молекула нуклеиновой кислоты может, согласно изобретению, быть в форме молекулы, которая является одноцепочечной или двухцепочечной и линейной или ковалентно замкнутой с образованием кольца. В одном варианте реализации изобретения конкретная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК или РНК.

В контексте настоящего изобретения термин "ДНК" относится к молекуле, которая содержит дезоксирибонуклеотидные остатки и предпочтительно полностью или по существу состоит из дезоксирибонуклеотидных остатков. "Дезоксирибонуклеотид" относится к нуклеотиду, который не имеет гидроксильной группы в 2'-положении β -D-рибофуранозильной группы. В контексте настоящего документа термин "комплементарная ДНК (кДНК)" относится к двухцепочечной ДНК, синтезированной на матрице РНК за счёт реакции, катализируемой ферментом обратной транскриптазой.

В контексте настоящего изобретения термин "РНК" относится к молекуле, которая содержит рибонуклеотидные остатки и предпочтительно полностью или по существу состоит из рибонуклеотидных остатков. "Рибонуклеотид" относится к нуклеотиду с гидроксильной группой в 2'-положении β -D-рибофуранозильной группы.

В одном варианте реализации изобретения конкретную молекулу нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из конкретной микроРНК, конкретной внеклеточной циркулирующей ДНК (например, конкретной внеклеточной циркулирующей опухолевой ДНК), конкретной мРНК, конкретной миРНК и конкретной мяРНК.

МикроРНК (miRNAs) представляют собой малые некодирующие молекулы РНК, состоящие из 21-23 рибонуклеотидов, функция которых заключается в РНК-подавлении экспрессии генов и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов.

Термин "внеклеточная циркулирующая опухолевая ДНК (ctDNA)" относится к небольшим фрагментам опухолевой ДНК умерших раковых клеток, которые высвобождаются в кровоток. Скрининг на/направленный на внеклеточную циркулирующую опухолевую ДНК (ctDNA) позволяет выявить и следить за прогрессированием опухоли пациента.

Матричная РНК (мРНК) передает генетическую информацию от ДНК к рибосоме, где она определяет аминокислотную последовательность белковых продуктов экспрессии генов.

Малая интерферирующая РНК (миРНК) представляет собой класс двухцепочечных молекул РНК, длиной 20-25 пар оснований, которые подавляют экспрессию конкретных генов за счет комплементарных нуклеотидных последовательностей (что называют РНК-интерференцией, RNAi).

Малые ядерные РНК (мяРНК) представляют собой небольшие молекулы РНК со средней длиной приблизительно 150 нуклеотидов, которые, например, участвуют в обработке предшественника матричной РНК (hnRNA) в ядре клетки эукариотических клеток. К этому термину также относят малые ядрышковые РНК (мякРНК).

В одном варианте реализации изобретения конкретная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой конкретную молекулу ДНК или РНК, предпочтительно конкретную молекулу РНК, с длиной менее 500 (дезокси)рибонуклеотидов или менее 400 (дезокси)рибонуклеотидов, или менее 300 (дезокси)рибонуклеотидов, или менее 200 (дезокси)рибонуклеотидов, или менее 100 (дезокси)рибонуклеотидов, или менее 50 (дезокси)рибонуклеотидов.

В одном варианте реализации изобретения конкретная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой конкретную микроРНК, причем предпочтительно, чтобы конкретная молекула микроРНК была выбрана из группы, состоящей из miR-371a-3p, miR-93-5p, miR-372, miR-373, miR-367 и miR-20a-5p. В одном варианте реализации изобретения конкретная микроРНК представляет собой miR-371a-3p.

Согласно настоящему изобретению указанные способы позволяют обнаруживать конкретные молекулы нуклеиновых кислот на нижнем пределе детектирования. В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" относится к нижнему пределу детектирования, обеспеченному способом на основе ПЦР, таким как количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) или цифровая ПЦР (dPCR).

В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" означает, что концентрация конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце составляет $\leq 1 \times 10^{-11}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-12}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-13}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-14}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-15}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-16}$ М. В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" означает, что концентрация конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце составляет от 1×10^{-11} М до 1×10^{-17} М или от 1×10^{-12} М до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-13} М до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-14} до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-15} до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-16} до 1×10^{-17} М.

В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" означает, что число конкретных молекул нуклеиновых кислот в биологическом образце составляет ≤ 10000 или ≤ 5000 , или ≤ 2500 , или ≤ 1000 , или ≤ 500 , или ≤ 250 . В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" означает, что число конкретных молекул нуклеиновых кислот в биологическом образце составляет от 20 до 10000, или от 20 до 5000, или от 20 до 2500, или от 20 до 1000, или от 20 до 500, или от 20 до 250. В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" означает, что число конкретных молекул нуклеиновых кислот в биологическом образце составляет от 50 до 10000, или от 50 до 5000, или от 50 до 2500, или от 50 до 1000, или от 50 до 500, или от 50 до 250. В одном варианте реализации изобретения термин "нижний предел детектирования" означает, что число конкретных молекул нуклеиновых кислот в биологическом образце составляет от 100 до 10000 или от 100 до 5000, или от 100 до 2500, или от 100 до 1000, или от 100 до 500, или от 100 до 250.

В одном варианте реализации изобретения концентрации или количества конкретных молекулы (конкретных молекул) нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот), приведенные в настоящей заявке, относятся к концентрациям или количествам конкретной молекулы (конкретных молекул) нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот) в пробы А, содержащей ДНК или кДНК, выделенную/полученную из биологического образца (причем конкретную молекулу РНК преобразуют в соответствующую молекулу кДНК). В одном варианте реализации изобретения концентрации или количества конкретной молекулы (конкретных молекул) нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот), перечисленные в настоящей заявке, относятся к концентрациям или количествам конкретной молекулы (конкретных молекул) нуклеиновой кислоты (нуклеиновых кислот) в РНК, выделенной/экстрагированной из биологического образца.

В одном варианте реализации изобретения независимая ПНР, выполняемая с каждой из этих трех или более аликвот на стадии (ii) указанных способов, согласно настоящему изобретению, представляет собой реакцию ПНР с предварительной амплификацией.

Предпочтительные биологические образцы в соответствии с настоящим изобретением выбирают из группы, состоящей из биологической жидкости, ткани, клеток, клеточного лизата и супернатанта клеточной культуры.

Предпочтительные биологические жидкости выбирают из группы, состоящей из сыворотки крови, плазмы крови, семенной плазмы, жидкости гидроцеле, жидкости сперматоцеле, цельной крови, мочи, амниотической жидкости, экссудата, мокроты, слюны и спинномозговой жидкости. В одном варианте реализации изобретения биологическая жидкость представляет собой сыворотку крови.

Ткани предпочтительно выбирают из группы, состоящей из нативной ткани, мгновенно замороженной ткани и ткани, фиксированной в формалине и залитой парафином (FFPE).

В конкретных вариантах реализации изобретения ткань представляет собой опухолевую ткань.

В контексте настоящего документа термин "опухоль" относится к массе, основанной на росте опухолевых клеток и пролиферации, независимо от того является ли она злокачественной (раковой) или доброкачественной. В одном варианте реализации изобретения опухоль представляет собой солидную опухоль. В другом варианте реализации изобретения опухоль обусловлена раковым заболеванием, выбранным из группы, состоящей из лейкозов, семином, меланом, тератом, лимфом, нейробластом, глиом, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака прямой кишки, рака эндометрия, рака почки, рака надпочечников, рак щитовидной железы, гемобластоза, рака кожи, опухоли головного мозга, рака шейки матки, интестинального рака желудка, рака печени, рака толстой кишки, рака желудка, рака тонкой кишки, раковых образований головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака лимфоузлов, рака пищевода, колоректального рака, рака поджелудочной железы, раковых заболеваний ротовой полости, носа и горла (ENT), рака молочной железы, рака предстательной железы, рака матки, рака яичников и рака легкого и метастазов указанных раковых заболеваний. В одном варианте реализации изобретения раковое заболевание представляет собой рак яичка.

В одном варианте реализации изобретения проба А содержит кДНК, выделенную/полученную из биологического образца.

В одном варианте реализации изобретения стадия (i) включает в себя стадии: (ia) выделения РНК из биологического образца и (ib) преобразования РНК, выделенной на стадии (ia), в кДНК, с получением пробы А, содержащей кДНК.

Средства и способы выделения (или экстракции) РНК, например, тотальной РНК или микроРНК, из биологического образца известны специалисту в данной области техники и включают коммерчески доступные наборы, такие как набор RNeasy Mini Kit и набор miRNeasy Mini Kit (оба набора от компании Qiagen).

Стадию преобразования РНК в кДНК предпочтительно проводят с помощью обратной транскрипции (RT) с использованием фермента обратной транскриптазы. Средства и способы обратной транскрипции и синтеза кДНК известны специалисту в данной области и включают коммерчески доступные наборы, такие как набор TaqMan® microRNA RT Kit (Life Technologies).

Предпочтительными способами на основе ПНР в соответствии с настоящим изобретением являются количественная ПНР в реальном времени (qRT-PCR) и цифровая ПНР (dPCR).

В одном варианте реализации изобретения кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) представляет собой кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) на основе флуоресценции, включающую использование флуоресцентно меченого зонда. В одном варианте реализации изобретения флуоресцентно меченый зонд состоит из олигонуклеотида, меченного как флуоресцентным репортерным красителем, так и красителем-тушителем (= проба с двойной меткой). Подходящие флуоресцентные репортерные красители и красители-тушители/фрагменты известны специалисту в данной области техники и включают, но не ограничиваются перечисленными, репортерные красители/фрагменты 6-FAM™, JOE™, Cy5® и Cy3® и красители-тушители/фрагменты dabcyf, TAMRA™ и BHQ™-1, -2 или -3. Амплификация специфического для зонда продукта вызывает расщепление зонда (= смещение зонда, опосредованное амплификацией), тем самым приводя к увеличению репортерной флуоресценции. Другие подходящие флуоресцентные красители для использования в кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) на основе флуоресценции включают EvaGreen® и SYBR® Green. В общем, увеличение флуоресценции в реакции (измеренное в реальном времени) прямо пропорционально увеличению целевых амплификатов.

цПЦР (dPCR) представляет собой альтернативный способ обычной кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) для абсолютной количественной оценки и детектирования молекул нуклеиновых кислот. цПЦР (dPCR) работает за счет разделения образца ДНК или кДНК на многие отдельные параллельные реакции ПЦР; некоторые из этих реакций содержат целевую молекулу нуклеиновой кислоты (положительные), тогда как другие не содержат (отрицательные). Одна молекула может быть амплифицирована в миллион раз или больше. Во время амплификации меченые красителем зонды используют для детектирования последовательность-специфичных молекул (целевых молекул, мишеней). Когда никакой целевой последовательности не присутствует, сигнал не накапливается. После ПЦР-анализа доль отрицательных реакций используют для получения абсолютного количества чисел целевых молекул в образце без необходимости в стандартах или в эндогенных контролях.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ детектирования заболевания или нарушения у субъекта или определения степени/прогрессирования заболевания или нарушения у субъекта, причем указанный способ включает (а) получение биологического образца от субъекта и (b) определение уровня экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце способом, указанным в настоящей заявке, причем уровень экспрессии конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце указывает на наличие, отсутствие и/или степень/прогрессирование заболевания или нарушения у субъекта. В одном варианте реализации изобретения заболевание или нарушение представляет собой раковое заболевание, например, раковое заболевание, указанное в настоящей заявке.

В контексте настоящего документа термин "субъект" относится к любому организму, такому как позвоночное животное, в частности к любому млекопитающему, включая как человека, так и другое

млекопитающее, например, животное, такое как грызун, кролик или примат, отличный от человека (например, обезьяна). Грызун может представлять собой мышшь, крысу, хомяка, морскую свинку или шиншиллу. Предпочтительно, субъект представляет собой человека. В одном варианте реализации изобретения субъект представляет собой субъекта, имеющего заболевание или нарушение, или субъекта, который подозревается в наличии заболевания или нарушения, в частности заболевания или нарушения, указанного в настоящей заявке, также называемого в настоящей заявке "пациентом".

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие объем притязаний согласно настоящему изобретению.

Примеры

Сравнительный пример 1.

а) Выделение РНК

Из образцов сыворотки крови выделяли тотальную РНК с использованием набора QIAGEN miR-Neasy Mini Kit в соответствии с инструкциями производителя с незначительными изменениями для образцов сыворотки крови: для 200 мкл сыворотки крови использовали 1 мл QIAzol и 200 мкл хлороформа.

б) Синтез кДНК

Для количественного определения miR-371a-3p в образцах сыворотки крови осуществляли обратную транскрипцию 6 мкл тотальной РНК с использованием набора TaqMan® microRNA RT Kit (Life Technologies) и пула праймеров, состоящего из 1 мкл каждого из праймеров типа петли-шпильки для miR-371a-3p и miR-93-5p (для нормализации) (Life Technologies, идентификаторы анализа: 002124 (miR-371a-3p) и 000432 (miR-93-5p)).

с) Предварительная амплификация

Из-за низкой концентрации РНК/микроРНК в сыворотке крови перед кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) проводили стадию предварительной амплификации. Реакция предварительной амплификации состояла из 4 мкл продукта обратной транскрипции (RT), 1,12 мкл образца для анализа (разведенного 1:100) каждого из miR-371a-3p и miR-93-5p, 4 мкл 5x Real Time ready cDNA Pre-Amp Master (Roche, Мангейм, Германия) и свободной от нуклеаз воды для доведения до общего объема реакции 20 мкл. Предварительную амплификацию проводили при 95°C в течение 1 мин, с последующими 14 циклами при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 4 мин. Продукт предварительной амплификации затем разбавляли 1:2 в свободной от нуклеаз воде и 5 мкл разбавленного продукта предварительной амплификации использовали для кПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

д) Детектирование микроРНК с помощью кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с использованием зондов TaqMan®

Реакция кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) состояла из 10 мкл FASTstart Universal Probe Master (Roche, Мангейм, Германия), 1 мкл конкретного образца для анализа и свободной от нуклеаз воды в общем объеме реакции 20 мкл.

кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) выполняли на 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) при следующих условиях циклов: в течение 10 мин при 95°C, затем 40 циклов в течение 15 с при 95°C и в течение 1 мин при 60°C. Относительную величину (RQ) рассчитывали с использованием способа ААSt.

Во время стадии предварительной амплификации часто возникают проблемы, если определение проводится на нижнем пределе детектирования способа кПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Молекулы микроРНК пипетировали в синтез кДНК и транскрибировали 1:1 в молекулы кДНК. Т.е., если изначально присутствует только небольшое количество молекул микроРНК, это приводит к такому же небольшому количеству к ДНК. Статистически невозможно повторно пипетировать такое же точное количество молекул кДНК/микроРНК в реакционную пробирку для предварительной амплификации, если результаты должны быть воспроизведены в ходе другого эксперимента. Объяснением этого является то, что, например, 10 молекул микроРНК или кДНК присутствуют в пробирке с завершенной реакцией. Если определенную аликвоту пипетируют из данной пробирки в следующую реакционную пробирку для предварительной амплификации, вследствие статистической вероятности каждый раз невозможно извлечь такое же количество молекул кДНК/микроРНК. В связи с этим возможно, что в течение одной стадии пипетирования 5 молекул кДНК/микроРНК, 8 молекул, 3 молекулы или даже ни одна из молекул не будет перенесена в следующую реакцию предварительной амплификации. Собственные эксперименты показали, что именно поэтому воспроизводимые результаты на нижнем пределе детектирования очень сложны или даже невозможны.

В табл. 1 показаны результаты микроРНК анализа одного образца, который был обработан после выделения РНК два раза (А и В) отдельно путем индивидуального синтеза кДНК, предварительной амплификации и кПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Здесь хорошо видно, что значения Ct микроРНК-371a-3p образца в серии "А" существенно отличались от значений, полученных в серии "В". Напротив, значения Ct микроРНК-93 того же образца были почти одинаковыми в каждой серии. Это приводило к совершенно различным уровням экспрессии для серии "А" и "В" целевой микроРНК-371a-3p для одного и того же образца. Указанное явление связано со статистическим распределением крайне малого количе-

ства молекул микроРНК: если присутствуют, например, 1002 молекулы микроРНК по сравнению с 1005 молекулами, используемыми для синтеза кДНК, разница в значениях Ct после предварительной амплификации и кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) почти незаметна. Но если только 2 молекулы по сравнению с 5 молекулами пипетируют в реакцию предварительной амплификации, разница растет экспоненциально во время циклов (например, 14 циклов) процесса предварительной амплификации, и после кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) определяют огромную разницу в уровнях экспрессии пропорционально значениям Ct. При условии 100% эффективности копирования в течение каждого цикла, после 14 циклов предварительной амплификации 2 молекулы становятся 16 384 молекулами, и 5 молекул становятся 6 103 535 625 молекулами.

Таблица 1. Обобщённые результаты экспериментов, проверяющих воспроизводимость измерений в кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) (А и В - разные серии одного и того же образца); Название целевой молекулы = измеренная микроРНК; Ct = пороговый цикл; Ct Среднее = среднее значение кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), проведенных три раза.

| Название образца | Название целевой молекулы | Ct | Ct Среднее |
|------------------|---------------------------|--------|------------|
| 8594 А | miR-371a-3p | 43,377 | 43,458 |
| 8594 А | miR-371a-3p | 43,520 | 43,458 |
| 8594 А | miR-371a-3p | 43,476 | 43,458 |
| 8594 В | miR-371a-3p | 29,493 | 29,460 |
| 8594 В | miR-371a-3p | 29,479 | 29,460 |
| 8594 В | miR-371a-3p | 29,408 | 29,460 |
| 8594 А | miR-93-5p | 12,780 | 12,791 |
| 8594 А | miR-93-5p | 12,814 | 12,791 |
| 8594 А | miR-93-5p | 12,779 | 12,791 |
| 8594 В | miR-93-5p | 12,580 | 12,631 |
| 8594 В | miR-93-5p | 12,644 | 12,631 |
| 8594 В | miR-93-5p | 12,670 | 12,631 |

Такие различия также можно увидеть в табл. 2, где клеточную линию (НТ 27), обычно экспрессирующую микроРНК-371a-3p на очень высоком уровне, разбавляли до тех пор, пока не был достигнут нижний предел детектирования, чтобы возникли вариации значений Ct.

Таблица 2. Серия разбавлений микроРНК; Название целевой молекулы = измеренная микроРНК; Ct = пороговый цикл; Ct Среднее = среднее значение кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), проведенных два раза; неопределяемый = отсутствие сигнала во время детектирования посредством кПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

| Название образца | Название целевой молекулы | Ct | Ct Среднее | Разбавление |
|------------------|---------------------------|----------------|----------------|-------------|
| 1) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 11,931 | 11,883 | 1:250 |
| 1) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 11,836 | 11,883 | |
| 1) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 12,101 | 11,998 | |
| 1) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 11,896 | 11,998 | |
| 1) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 11,985 | 11,975 | |
| 1) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 11,964 | 11,975 | |
| 2) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 15,277 | 15,310 | 1:2500 |
| 2) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 15,342 | 15,310 | |
| 2) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 15,394 | 15,386 | |
| 2) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 15,378 | 15,386 | |
| 2) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 15,426 | 15,419 | |
| 2) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 15,412 | 15,419 | |
| 3) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 18,596 | 18,582 | 1:25000 |
| 3) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 18,569 | 18,582 | |
| 3) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 18,552 | 18,548 | |
| 3) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 18,544 | 18,548 | |
| 3) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 18,797 | 18,758 | |
| 3) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 18,720 | 18,758 | |
| 4) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 22,241 | 22,258 | 1:250000 |
| 4) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 22,274 | 22,258 | |
| 4) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 21,958 | 21,924 | |
| 4) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 21,889 | 21,924 | |
| 4) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 21,961 | 21,958 | |
| 4) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 21,955 | 21,958 | |
| 5) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 25,487 | 25,516 | 1:2500000 |
| 5) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 25,546 | 25,516 | |
| 5) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 25,355 | 25,328 | |
| 5) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 25,301 | 25,328 | |
| 5) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 25,064 | 25,038 | |
| 5) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 25,013 | 25,038 | |
| 6) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 26,831 | 26,826 | 1:25000000 |
| 6) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | 26,820 | 26,826 | |
| 6) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 34,186 | 34,218 | |
| 6) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | 34,251 | 34,218 | |
| 6) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 29,800 | 29,785 | |
| 6) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | 29,769 | 29,785 | |
| 7) НТ 27 (1) | miR-371a-3p | Неопределяемый | Неопределяемый | 1:250000000 |
| 7) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | Неопределяемый | Неопределяемый | |
| 7) НТ 27 (2) | miR-371a-3p | Неопределяемый | Неопределяемый | |
| 7) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | Неопределяемый | Неопределяемый | |
| 7) НТ 27 (3) | miR-371a-3p | Неопределяемый | Неопределяемый | |

В другом эксперименте определенные количества искусственной микроРНК, так называемой sel-

miRNA-39, использовали в качестве примера для синтеза кДНК. Результаты показаны в табл. 3. Можно увидеть, что при примерно 100 молекул микроРНК (приблизительно 0,000000002 пикомоль) возникают большие различия относительно значений Ct.

Таблица 3. Разведение микроРНК cel-miRNA-39 на молекулярном уровне; Название целевой молекулы = измеренная микроРНК; Ct = пороговый цикл; Ct; Среднее = среднее значение кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), проведенных два раза; Ct MV = среднее значение трех серий предварительной амплификации одного и того же образца; Теоретическое значение $Ct=Ct$, которое было определено математически на основе значения самой высокой концентрации; ud = неопределяемый, отсутствие сигнала во время детектирования посредством кПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

| Название образца | Число молекул | Число молекул [пикомоль, нмоль] | Концентрация [M] | Название целевой молекулы | Ct | Ct Среднее | Ct MV | Теоретическое Ct |
|------------------|--------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------|--------|------------|-------|------------------|
| 1. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 4,067 | 4,154 | | |
| 1. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 4,241 | 4,154 | | |
| 1. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 4,171 | 4,214 | | |
| 1. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 4,257 | 4,214 | | |
| 1. (3) | | | | cel-miR-39-3p | 4,334 | 4,308 | | |
| 1. (3) | $1*10^8=100000000$ | 0,00016605388 | $4,15*10^{-11}$ | cel-miR-39-3p | 4,283 | 4,308 | 4,23 | 4,20 |
| 5. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 18,928 | 18,961 | | |
| 5. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 18,994 | 18,961 | | |
| 5. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 19,145 | 19,145 | | |
| 5. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 19,145 | 19,145 | | |
| 5. (3) | | | | cel-miR-39-3p | 19,318 | 19,335 | | |
| 5. (3) | $1*10^4 = 10000$ | 0,00000001661 | $4,15*10^{-15}$ | cel-miR-39-3p | 19,351 | 19,335 | 19,15 | 17,40 |
| 6. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 22,598 | 22,578 | | |
| 6. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 22,557 | 22,578 | | |
| 6. (3) | | | | cel-miR-39-3p | 23,052 | 23,029 | | |
| 6. (3) | | | | cel-miR-39-3p | 23,005 | 23,029 | | |
| 6. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 23,127 | 23,122 | | |
| 6. (2) | $1*10^3 = 1000$ | 0,00000000166 | $4,15*10^{-16}$ | cel-miR-39-3p | 23,116 | 23,122 | 22,91 | 20,70 |
| 7. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 24,781 | 24,822 | | |
| 7. (1) | | | | cel-miR-39-3p | 24,863 | 24,822 | | |
| 7. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 27,048 | 27,042 | | |
| 7. (2) | | | | cel-miR-39-3p | 27,037 | 27,042 | | |
| 7. (3) | | | | cel-miR-39-3p | 26,229 | 26,234 | | |
| 7. (3) | $1*10^2 = 100$ | 0,00000000017 | $4,15*10^{-17}$ | cel-miR-39-3p | 26,240 | 26,234 | 26,03 | 24,00 |
| 8. (1) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 8. (1) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 8. (2) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 8. (2) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 8. (3) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 8. (3) | 10 | 0,00000000002 | $4,15*10^{-18}$ | cel-miR-39-3p | ud | | ud | 27,30 |
| 9. (1) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 9. (1) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 9. (2) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 9. (2) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 9. (3) | | | | cel-miR-39-3p | ud | | | |
| 9. (3) | 0 | 0 | 0 | cel-miR-39-3p | ud | | ud | ud |

е) Заключение

Вышеприведенные данные показывают, что проблема получения надёжных результатов на нижнем пределе детектирования связана со стадией предварительной амплификации. Если предварительную амплификацию выполняли для образца, и продукт указанной предварительной амплификации измеряли с использованием кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), то это приводило к одинаковым результатам каждый раз (см. анализы кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), проведенных три или два раза, в табл. 1, табл. 2 и табл. 3). Однако, если несколько предварительных амплификаций выполняли из одной кДНК-

реакционной пробирки, и указанные предварительные амплификации содержали различные количества молекул кДНК согласно статистике, то это приводило к поразительным различиям в значениях C_t в последующих кПЦР в реальном времени (qRT-PCRs). Несмотря на лучшие способы смешивания, невозможно было распределить небольшое количество молекул кДНК из синтеза кДНК в равных частях в реакционные пробирки предварительной амплификации. Впоследствии возникала ошибка, и значительная вариация значений C_t . Это объясняется удвоением числа молекул в каждом из 14 циклов.

Пример 1.

Для процесса предварительной амплификации образец был разделен на три реакционные пробирки после синтеза кДНК. Далее, кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) проводили отдельно с каждой из трех реакционных пробирок (см. табл. 4 и фиг. 1).

Чтобы рассмотреть отклонение значений C_t и полученных в результате разных уровней экспрессии (здесь, например, для miR-371a-3p), среднее значение трех значений RQ определяли математически (среднее арифметическое) (RQ = относительная величина = экспрессия).

Таблица 4. Результаты кПЦР в реальном времени (qRT-PCR); RQ = относительная величина; Математическое RQ-MV C_t = математическое среднее значение относительной величины; Среднее = среднее значение кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), проведенных три раза; неопределяемый = отсутствие сигнала во время детектирования посредством кПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

| Образец | RQ | Математическое RQ-MV | C_t Среднее 371a-3p | C_t Среднее 93 |
|---------|--------|----------------------|-----------------------|------------------|
| 90 (1) | 0,000 | | неопределяемый | 11,179 |
| 90 (2) | 9,389 | 3,130 | 30,289 | 11,442 |
| 90 (3) | 0,000 | | неопределяемый | 11,548 |
| 71 (1) | 14,986 | | 31,809 | 13,637 |
| 71 (2) | 22,193 | 12,393 | 31,249 | 13,644 |
| 71 (3) | 0,000 | | неопределяемый | 13,651 |

Пример 2.

Образец был разделен после синтеза кДНК на три реакционные пробирки для предварительной амплификации, как в примере 1. Далее, одинаковый объем отбирали из каждой из трех реакционных пробирок предварительной амплификации и его пипетировали вместе в одну реакционную пробирку и хорошо смешивали для одной последующей кПЦР в реальном времени (qRT-PCR) (см. фиг. 2).

Предварительная амплификация, проведенная три раза, была сделана для компенсации различий в значениях C_t и определенных уровней экспрессии соответственно. Указанные различия могут быть компенсированы или путем вычисления среднего значения относительной величины (пример 1 = расчетное среднее значение/среднее арифметическое) или, как в примере 2, путем смешивания трех реакций предварительной амплификации и использования смеси в следующем анализе кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), так что получают систематическое среднее значение/измеренное среднее значение для интерпретации результатов. Результаты указанного исследования приведены в табл. 5.

Таблица 5. Результаты кПЦР в реальном времени (qRT-PCR); RQ = относительная величина; Математическое RQ-MV C_t = математическое среднее значение относительной величины; C_t Среднее значение = среднее значение кПЦР в реальном времени (qRT-PCR), проведенных три раза; неопределяемый = отсутствие сигнала во время детектирования посредством кПЦР в реальном времени (qRT-PCR); Zus = образец обрабатывали в соответствии с протоколом примера 2 (систематическое среднее значение)

| Образец | RQ | Математическое RQ (1),(2),(3) | C_t Среднее 371a-3p | C_t Среднее 93 |
|-----------------|----------|-------------------------------|-----------------------|------------------|
| 80 (1) | 1060,735 | | 24,605 | 12,578 |
| 80 (2) | 1853,232 | | 23,906 | 12,684 |
| 80 (3) | 1365,875 | | 24,292 | 12,630 |
| 80 Zus (1,2,3) | 1582,389 | 1426,614 | 24,033 | 12,583 |
| 129 (1) | 154,021 | | 27,944 | 13,133 |
| 129 (2) | 244,851 | | 27,287 | 13,146 |
| 129 (3) | 420,644 | | 26,453 | 13,092 |
| 129 Zus (1,2,3) | 278,655 | 273,172 | 27,084 | 13,129 |
| 112 (1) | 0,000 | | | 13,204 |
| 112 (2) | 0,000 | | | 13,336 |
| 112 (3) | 0,000 | | | 13,264 |
| 112 Zus (1,2,3) | 0,000 | 0,000 | | 13,373 |
| 90 (1) | 0,000 | | | 11,179 |
| 90 (2) | 9,389 | | 30,289 | 11,442 |
| 90 (3) | 0,000 | | | 11,548 |
| 90 Zus (1,2,3) | 2,708 | 3,130 | 32,007 | 11,367 |
| 119 (1) | 79,004 | | 30,596 | 14,822 |
| 119 (2) | 5,524 | | 34,343 | 14,731 |
| 119 (3) | 0,000 | | | 14,874 |
| 119 Zus (1,2,3) | 31,989 | 28,176 | 31,995 | 14,917 |

В совокупности способы настоящего изобретения обеспечивают возможность анализа конкретных молекул нуклеиновых кислот даже на нижнем пределе детектирования $\sim 0,000000002$ пкомоль точным и

надежным образом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения уровня экспрессии целевой молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце, включающий следующие стадии:

(i) обеспечение пробы А, содержащей ДНК или кДНК, выделенную/полученную из биологического образца;

(ii) обеспечение трех или более аликвот пробы А со стадии (i) и осуществление независимой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с каждой из этих трех или более аликвот для того, чтобы амплифицировать указанную молекулу нуклеиновой кислоты, с получением трех или более проб В, содержащих амплифицированную указанную молекулу нуклеиновой кислоты; и

(iii) смешивание равных количеств трех или более проб В с получением пробы С и определение уровня указанной молекулы нуклеиновой кислоты в пробе С с применением подхода на основе ПЦР, причем уровень, определенный на стадии (iii), соответствует уровню экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце.

2. Способ определения уровня экспрессии целевой молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце, включающий следующие стадии:

(i) обеспечение пробы А, содержащей ДНК или кДНК, выделенную/полученную из биологического образца;

(ii) обеспечение трех или более аликвот пробы А со стадии (i) и осуществление независимой полимеразной цепной реакции (ПЦР) с каждой из этих трех или более аликвот для того, чтобы амплифицировать указанную молекулу нуклеиновой кислоты, с получением трех или более проб В, содержащих амплифицированную указанную молекулу нуклеиновой кислоты; и

(iii) определение уровня указанной молекулы нуклеиновой кислоты в каждой из этих трех или более проб В с применением подхода на основе ПЦР,

причем среднее значение уровней, определенных на стадии (iii), соответствует уровню экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце.

3. Способ по п.1 или 2, характеризующийся тем, что концентрация указанной целевой молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце составляет $\leq 1 \times 10^{-11}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-12}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-13}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-14}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-15}$ М, или $\leq 1 \times 10^{-16}$ М.

4. Способ по п.3, характеризующийся тем, что концентрация указанной целевой молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце составляет от 1×10^{-11} М до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-12} М до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-13} М до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-14} до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-15} до 1×10^{-17} М, или от 1×10^{-16} до 1×10^{-17} М.

5. Способ по любому из пп.1-4, характеризующийся тем, что указанная целевая молекула нуклеиновой кислоты выбрана из группы, состоящей из целевой микроРНК, целевой внеклеточной циркулирующей ДНК (например, целевой внеклеточной циркулирующей опухолевой ДНК), целевой мРНК, целевой миРНК и целевой мяРНК.

6. Способ по п.5, характеризующийся тем, что указанная целевая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой целевую микроРНК.

7. Способ по п.6, характеризующийся тем, что указанная целевая молекула микроРНК выбрана из группы, состоящей из miR-371a-3p, miR-93-5p, miR-372, miR-373, miR-367 и miR-20a-5p.

8. Способ по любому из пп.1-7, характеризующийся тем, что биологический образец выбран из группы, состоящей из биологической жидкости, ткани, клеток, клеточного лизата и супернатанта клеточной культуры.

9. Способ по п.8, характеризующийся тем, что биологическая жидкость выбрана из группы, состоящей из сыворотки крови, плазмы крови, семенной плазмы, жидкости гидроцеле, жидкости сперматоцеле, цельной крови, мочи, амниотической жидкости, экссудата, мокроты, слюны и спинномозговой жидкости.

10. Способ по п.8, характеризующийся тем, что ткань выбрана из группы, состоящей из нативной ткани, мгновенно замороженной ткани и ткани, фиксированной в формалине и залитой парафином (FFPE).

11. Способ по п.8 или 10, характеризующийся тем, что ткань представляет собой опухолевую ткань.

12. Способ по любому из пп.1-11, характеризующийся тем, что проба А содержит кДНК, выделенную/полученную из биологического образца.

13. Способ по п.12, характеризующийся тем, что стадия (i) включает в себя стадии:

(ia) выделение РНК из биологического образца и

(ib) преобразование РНК, выделенной на стадии (ia), в кДНК, с получением пробы А, содержащей кДНК.

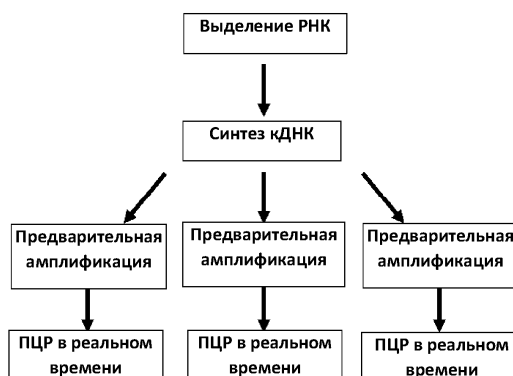
14. Способ по любому из пп.1-13, характеризующийся тем, что на стадии (ii) обеспечены три аликвоты пробы А.

15. Способ по любому из пп.1-14, характеризующийся тем, что способ на основе ПЦР представляет собой количественную ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) или цифровую ПЦР (dPCR).

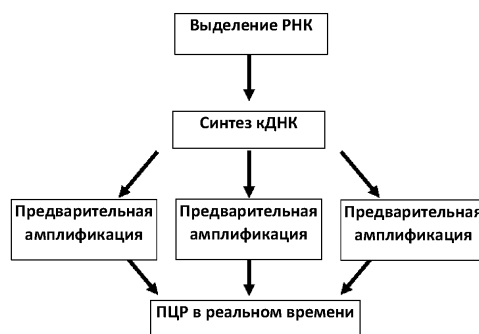
16. Способ детектирования заболевания или нарушения у субъекта или определения степени/прогрессирования заболевания или нарушения у субъекта, где уровень экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце субъекта указывает на наличие, отсутствие и/или степень/прогрессирование данного заболевания или нарушения у субъекта, включающий следующие стадии:

(а) получение указанного биологического образца от субъекта и

(б) определение уровня экспрессии указанной молекулы нуклеиновой кислоты в биологическом образце способом по любому из пп.1-15.



Фиг. 1



Фиг. 2

