



(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/6844 (2021.08); *C12Q 2531/113* (2021.08); *G01N 33/5017* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021121807, 22.07.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.07.2021

Дата регистрации:
25.04.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.07.2021

(45) Опубликовано: 25.04.2022 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4,
 ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава
 России, Генеральному директору Е.Н.
 Паровичниковой

(72) Автор(ы):

Сычевская Ксения Андреевна (RU),
 Кравченко Сергей Кириллович (RU),
 Судариков Андрей Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение "Национальный медицинский
 исследовательский центр гематологии"
 Министерства здравоохранения Российской
 Федерации (ФГБУ "НМИЦ гематологии"
 Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: TAKEUCH S. et al., Frequent loss of
 heterozygosity on the long arm of chromosome
 6: identification of two distinct regions of deletion
 in childhood acute lymphoblastic leukemia,
 Cancer Res, 1998, Vol. 58, No 12, pp. 2618-23.
 GYAPAY G. et al., The 1993-94 Gén&
 eacute;thon human genetic linkage map, Nat
 Genet, 1994, Vol. 7, No 2 Спец. pp. (см. прод.)

(54) Тест-система и способ выявления делеций длинного плеча 6 хромосомы

(57) Реферат:

Изобретение относится к набору олигонуклеотидных праймеров для специфической амплификации двадцати микросателлитных локусов длинного плеча 6 хромосомы человека (6q), который может быть использован в тест-системе для определения делеций длинного плеча 6 хромосомы (6q) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также в способе выявления пациентов с риском неблагоприятного течения фолликулярной лимфомы по наличию значимых делеций длинного плеча 6 хромосомы (6q) с

помощью вышеупомянутой тест-системы. Наличие делеций региона 6q в случае гетерозиготного наследования на основании отсутствия пиков одного из аллелей или уменьшения интенсивности его флуоресценции по отношению к пику второго аллеля соответствующего микросателлитного локуса в опухолевой ткани при сравнении с контрольным образцом позволяет выделять группу пациентов с риском неблагоприятного течения фолликулярной лимфомы. 3 н.п. ф-лы, 6 ил., 1 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

246-339. INOUE M. et al., Chromosome 6 suffers frequent and multiple aberrations in thymoma, Am J Pathol, 2002, Vol. 161, No. 4, pp. 1507-13. US20200255913 A1, 13.08.2020. RU2717309 C2, 20.03.2020.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/6844 (2021.08); *C12Q 2531/113* (2021.08); *G01N 33/5017* (2021.08)(21)(22) Application: **2021121807, 22.07.2021**(24) Effective date for property rights:
22.07.2021Registration date:
25.04.2022

Priority:

(22) Date of filing: **22.07.2021**(45) Date of publication: **25.04.2022** Bull. № 12

Mail address:

125167, Moskva, Novyj Zykovskij pr-d, 4, FGBU
"NMITS gematologii" Minzdrava Rossii,
Generalnomu direktoru E.N. Parovichnikovoj

(72) Inventor(s):

**Sychevskaya Kseniya Andreevna (RU),
Kravchenko Sergej Kirillovich (RU),
Sudarikov Andrej Borisovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr gematologii" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU
"NMITS gematologii" Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) **TEST SYSTEM AND METHOD FOR DETECTING DELETIONS OF THE LONG ARM OF CHROMOSOME 6**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a set of oligonucleotide primers for the specific amplification of twenty microsatellite loci of the long arm of the human chromosome 6 (6q), which can be used in a test system for determining deletions of the long arm of chromosome 6 (6q) by multiplex polymerase chain reaction (PCR), as well as in a method for identifying patients at risk of adverse course of follicular lymphoma by the presence of significant deletions of the long arm of chromosome 6 (6q) using the above-mentioned test

system.

EFFECT: presence of deletions of region 6q in the case of heterozygous inheritance based on the absence of peaks of one of the alleles or a decrease in the intensity of its fluorescence relative to the peak of the second allele of the corresponding microsatellite locus in tumor tissue when compared with the control sample makes it possible to distinguish a group of patients at risk of adverse course of follicular lymphoma.

3 cl, 6 dwg, 1 tbl, 4 ex

Изобретение предназначено для идентификации делеции длинного плеча 6 хромосомы (6q) как молекулярно-генетического фактора неблагоприятного прогноза В-клеточных неходжкинских лимфом (В-НХЛ), в частности фолликулярной лимфомы (ФЛ), и может быть использовано в клинической медицине на этапе первичной диагностики с целью

5 выделения групп пациентов с риском неблагоприятного течения болезни, а также в рамках фундаментальных исследований и поиска потенциальных онкогенов.

Выделение в дебюте онкологического заболевания факторов, позволяющих идентифицировать группу пациентов с неблагоприятным прогнозом, является актуальной задачей с позиций дифференциальной диагностики и возможной

10 персонификации терапии. Определение молекулярно-генетических маркеров является оптимальным вариантом достижения подобных задач, поскольку прямо отражает биологические особенности опухоли.

Известно, что делеции 6q прогностически неблагоприятны при ряде онкологических заболеваний. В первую очередь это касается опухолей системы крови, в частности

15 неходжкинских В-клеточных лимфом и особенно ФЛ, однако также применимо к солидным новообразованиям. Например, ранее было показано, что общая выживаемость больных фолликулярной лимфомой с делецией 6q значительно ниже, чем пациентов без данной генетической аномалии [1]. Подобные же результаты были продемонстрированы в группе больных хроническим лимфолейкозом [2], кроме того,

20 в случае хронического лимфолейкоза делеция 6q оказалась ассоциирована с более высокими значениями лейкоцитоза и распространенной лимфаденопатией [3]. Делеция 6q является фактором неблагоприятного прогноза и риска опухолевой трансформации и рецидива заболевания при остром Т-лимфобластном лейкозе [4-6]. В области солидной онкологии отрицательное влияние делеции 6q на течение заболевания отмечено при

25 аденокарциноме простаты [7] и неоплазиях шейки матки [8].

В области 6q расположены гены, мутации которых обладают онкогенным потенциалом. Однако на настоящий момент точно идентифицированы только некоторые из них [9]. Варианты делеций 6q, вовлекающие различные цитогенетические регионы, обладают нозологической специфичностью [10-12] и соответственно отражают

30 уникальность патогенетических механизмов при различных типах опухолей.

Таким образом, идентификация делеций 6q и определение локализации потерь генетического материала представляется актуальной задачей как в практическом отношении диагностики прогностически неблагоприятных вариантов ФЛ, так и с позиций фундаментальных исследований и поиска ключевых онкогенов.

35 Данная задача может быть решена при использовании следующих вариантов лабораторного анализа:

- 1) цитогенетическое исследование;
- 2) флуоресцентная гибридизация in situ (FISH);
- 3) сравнительная геномная гибридизация (CGH);
- 40 4) полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Метод 1 отличается низкой чувствительностью и недостаточной воспроизводимостью результатов, абсолютным требованием к жизнеспособности клеток материала биоптата опухолевой ткани и способности давать достаточное количество митозов в

краткосрочных культурах, что исключает возможность анализа замороженных и

45 заключенных в парафин образцов, а также накладывает ограничения на спектр анализируемых патологий, поскольку многие типы опухолей характеризуются низкой пролиферативной способностью.

Метод 2 не применим при исследовании малоклеточных образцов и образцов с низкой

сохранностью генетического материала, в частности, парафиновых блоков, а также отличается технической сложностью выполнения и длительностью проведения исследования.

5 Метод 3 предоставляет высокоточные результаты, максимально полно характеризующие бq, однако отличается крайне высокой стоимостью анализа одного образца, отсутствием в большинстве практических лабораторий необходимого оборудования и реактивов.

10 Метод 4, заключающийся в амплификации методом ПЦР искомым последовательностей ДНК, расположенных на бq в известной локализации, характеризуется высокой чувствительностью. Он позволяет исследовать малоклеточные образцы и архивный материал (замороженные образцы опухолевых тканей и парафиновые блоки) и отличается относительной простотой выполнения и возможностью воспроизведения методики в большинстве молекулярно-генетических лабораторий.

15 Таким образом, данный вариант решения поставленной задачи максимально соответствует требованиям высокой чувствительности анализа, простоты технической реализации и воспроизводимости лабораторного исследования.

20 Возможность поиска делеций при картировании хромосом методом ПЦР реализуется при анализе полиморфных локусов микросателлитных повторов, отличающихся высоким процентом гетерозиготности, на основании различий микросателлитного профиля в материале опухолевой ткани и нормальных клетках в качестве контроля. Сравнение проводят путем сопоставления длин амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих разным аллелям в парных образцах при разделении и визуализации ПЦР-продукта методами горизонтального электрофореза или капиллярного электрофореза. Последний вариант является предпочтительным, поскольку обладает 25 большей разрешающей способностью по сравнению с электрофорезом в полиакриламидном геле.

30 Перечни динуклеотидных микросателлитных маркеров, которые могут быть использованы для картирования хромосом, были разработаны и представлены ранее [13, 14] и послужили основой всех последующих лабораторных систем.

35 Наиболее близким аналогом предлагаемого изобретения можно считать системы мультиплексных реакций ABI PRISM® Linkage Mapping Set, v2.5-HD5 и v2.5-MD10 производства компании Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, USA). Указанные системы подразумевают картирование всех хромосом человека, в частности региона бq, по микросателлитным локусам, расположенным с интервалом 5 и 10 сМ, соответственно. В качестве их недостатка можно отметить тот факт, что сочетания определяемых маркеров в мультиплексных реакциях не являются сбалансированными по хромосомным регионам, в частности последовательности бр и бq объединены в одних и тех же пробах. Таким образом, подробный анализ бq может быть достигнут 40 только при использовании полной панели коммерческого набора, что с учетом стоимости избыточных реактивов и времени на проведение дополнительных лабораторных исследований представляется нерациональным для решения поставленной задачи. Кроме того, в настоящее время данный коммерческий продукт не производится и недоступен пользователям, что является основным недостатком данного аналога.

45 Также в работах Merup et al. [11], Inoue et al. [15] и Starostik et al. [16] представлены другие варианты аналогов систем картирования бq. Недостатками первого исследования являются проведение ПЦР в моноплексном режиме и анализ ПЦР-продукта методом горизонтального электрофореза, что обуславливает высокий расход биологического

материала в множественных реакциях и низкое разрешение результатов, соответственно. Недостаток двух других исследований заключается в недостаточном для решения поставленной задачи покрытии б_q предлагаемыми авторами панелями микросателлитных повторов. Так, в работе Inoue et al. [15] регион б_q21, на долю которого приходится большая часть делеций при онкогематологических заболеваниях [1, 9-11], представлен только 3 микросателлитными локусами. В работе Starostik et al. [16] совершенно не отражены микросателлитные повторы центромерной области б_q.

Заявляемая группа изобретений направлена на решение задачи создания простой, доступной для реализации в большинстве молекулярно-генетических лабораторий, и информативной диагностической тест-системы и способа выявления делеций б_q при ФЛ, как маркера неблагоприятного прогноза заболевания.

Поставленная задача решена разработкой тест-системы с набором праймеров и способа выявления пациентов с риском неблагоприятного течения фолликулярной лимфомы по наличию значимых делеций б_q в образце опухолевой ткани при сравнении с нормальными клетками в качестве контрольного образца путем проведения анализа изменений 20 микросателлитных локусов ДНК методом мультиплексной ПЦР с последующим фрагментным анализом ПЦР-продуктов. Выбранные микросателлиты равномерно распределены по длине б_q от центромерной до теломерной областей с результирующим интервалом 5,7 сМ в среднем (1,7 -12,5 сМ по данным [13, 14]) и характеризуются высоким уровнем гетерозиготности 82,5% в среднем (75-91% по данным [13, 14]), что также отличает предлагаемое изобретение от известных аналогов.

Результатом исследований, произведенных авторами заявляемого изобретения, является диагностическая тест-система и способ осуществления диагностики делеций б_q с определением областей их локализации при ФЛ.

В опубликованных источниках литературы авторами не обнаружено сведений, касающихся реализованного нового решения.

Использование в клинической практике заявляемого способа позволяет достичь следующих технических результатов:

1) определение прогноза заболевания на этапе первичной диагностики путем выявления прогностически неблагоприятных генетических аномалий в опухолевой ткани, а именно делеций б_q;

2) выделение значимых в патогенезе опухоли хромосомных регионов путем идентификации областей делеции микросателлитных локусов, имеющих известные хромосомные локализации, как основы направленного поиска вовлеченных онкогенов.

Сущность предлагаемого изобретения пояснена на следующих графических материалах:

Фиг. 1 - Пул праймеров 1, относится к примеру 1 и представляет результат исследования микросателлитных локусов у здорового донора. На графике электрофореграммы по оси X отмечена длина ПЦР-продукта, п.н. По оси Y отмечена интенсивность флуоресценции меченого ПЦР-продукта.

Фиг. 2 - Пул праймеров 2, относится к примеру 1 и представляет результат исследования микросателлитных локусов у здорового донора. На графике электрофореграммы по оси X отмечена длина ПЦР-продукта, п.н. По оси Y отмечена интенсивность флуоресценции меченого ПЦР-продукта.

Фиг. 3 - Пул праймеров 3, относится к примеру 1 и представляет результат исследования микросателлитных локусов у здорового донора. На графике электрофореграммы по оси X отмечена длина ПЦР-продукта, п.н. По оси Y отмечена интенсивность флуоресценции меченого ПЦР-продукта.

Фиг. 4 - Пул праймеров 4, относится к примеру 1 и представляет результат исследования микросателлитных локусов у здорового донора. На графике электрофореграммы по оси X отмечена длина ПЦР-продукта, п.н. По оси Y отмечена интенсивность флуоресценции меченого ПЦР-продукта.

5 Фиг. 5 - Относится к примеру 2 и представляет результат исследования микросателлитных локусов у пациента X. На графике электрофореграммы по оси X отмечена длина ПЦР-продукта, п.н. По оси Y отмечена интенсивность флуоресценции меченого ПЦР-продукта. Стрелочками указаны локусы утраты одного из аллелей в опухолевом образце.

10 Фиг. 6 - Относится к примеру 3 и представляет результат исследования панели микросателлитных локусов у пациента T. На графике электрофореграммы по оси X отмечена длина ПЦР-продукта, п.н. По оси Y отмечена интенсивность флуоресценции меченого ПЦР-продукта. Стрелочками указаны локусы утраты одного из аллелей в опухолевом образце.

15 Сущность группы изобретений пояснена следующими перечнями последовательностей:

SEQ ID NO: 1 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S1681;

20 SEQ ID NO: 2 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S1681;

SEQ ID NO: 3 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S434;

SEQ ID NO: 4 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S434;

25 SEQ ID NO: 5 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S403;

SEQ ID NO: 6 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S403;

30 SEQ ID NO: 7 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S1613;

SEQ ID NO: 8 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S1613;

SEQ ID NO: 9 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S292;

35 SEQ ID NO: 10 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S292;

SEQ ID NO: 11 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S460;

40 SEQ ID NO: 12 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S460;

SEQ ID NO: 13 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S287;

SEQ ID NO: 14 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S287;

45 SEQ ID NO: 15 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S300;

SEQ ID NO: 16 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S300;

- SEQ ID NO: 17 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S311;
- SEQ ID NO: 18 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S311;
- 5 SEQ ID NO: 19 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S447;
- SEQ ID NO: 20 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S447;
- 10 SEQ ID NO: 21 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S262;
- SEQ ID NO: 22 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S262;
- SEQ ID NO: 23 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S441;
- 15 SEQ ID NO: 24 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S441;
- SEQ ID NO: 25 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S305;
- 20 SEQ ID NO: 26 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S305;
- SEQ ID NO: 27 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S446;
- SEQ ID NO: 28 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S446;
- 25 SEQ ID NO: 29 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S261;
- SEQ ID NO: 30 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S261;
- 30 SEQ ID NO: 31 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S1594;
- SEQ ID NO: 32 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S1594;
- SEQ ID NO: 33 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S1719;
- 35 SEQ ID NO: 34 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S1719;
- SEQ ID NO: 35 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S415;
- 40 SEQ ID NO: 36 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S415;
- SEQ ID NO: 37 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S430;
- SEQ ID NO: 38 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S430;
- 45 SEQ ID NO: 39 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу D6S407;
- SEQ ID NO: 40 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу D6S407.

Нуклеотидные последовательности праймеров к локусам D6S292 и D6S441 были заимствованы из работы Guарay et al. [14], поскольку предоставляли оптимальный вариант амплификации искомой микросателлитной последовательности, удовлетворяющий требованиям разрабатываемой тест-системы. К остальным 18 микросателлитным локусам были подобраны оригинальные специфичные пары олигонуклеотидов, ранее не описанные в литературе.

Сущность группы изобретения заключается в следующем.

Разработана тест-система.

Состав тест-системы:

1) пары прямого и обратного праймеров к 20 динуклеотидным микросателлитным маркерам, объединенным в 4 мультиплексных пула соответственно 4 реакционным смесям

1 пул:

- локус D6S1681, расположенный в локусе 6q14 (прямой праймер SEQ ID NO: 1, 2,5

пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 2, меченный FAM, 2,5 пмоль/л);

- локус D6S434, расположенном в локусе 6q21 (прямой праймер SEQ ID NO: 3, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 4, меченный ROX, 10 пмоль/л);

- локус D6S403, расположенном в локусе 6q23 (прямой праймер SEQ ID NO: 5, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 6, меченный FAM, 5 пмоль/л);

- локус D6S1613, расположенном в локусе 6q16 (прямой праймер SEQ ID NO: 7, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 8, меченный ROX, 5 пмоль/л).

2 пул:

- локус D6S292, расположенном в локусе 6q23 (прямой праймер SEQ ID NO: 9, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 10, меченный FAM, 5 пмоль/л);

- локус D6S460, расположенном в локусе 6q14-15 (прямой праймер SEQ ID NO: 11, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 12, меченный ROX, 10 пмоль/л);

- локус D6S287, расположенном в локусе 6q22 (прямой праймер SEQ ID NO: 13, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 14, меченный ROX, 10 пмоль/л);

- локус D6S300, расположенном в локусе 6q 16-21 (прямой праймер SEQ ID NO: 15, 4 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 16, меченный FAM, 4 пмоль/л);

- локус D6S311, расположенном в локусе 6q24-25 (прямой праймер SEQ ID NO: 17, 4 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 18, меченный FAM, 4 пмоль/л).

3 пул:

- локус D6S447, расположенном в локусе 6q21 (прямой праймер SEQ ID NO: 19, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 20, меченный ROX, 10 пмоль/л);

- локус D6S262, расположенном в локусе 6q23 (прямой праймер SEQ ID NO: 21, 4 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 22, меченный FAM, 4 пмоль/л);

- локус D6S441, расположенном в локусе 6q25 (прямой праймер SEQ ID NO: 23, 15 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 24, меченный ROX, 15 пмоль/л);

- локус D6S305, расположенном в локусе 6q26 (прямой праймер SEQ ID NO: 25, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 26, меченный FAM, 5 пмоль/л);

- локус D6S446, расположенном в локусе 6q27 (прямой праймер SEQ ID NO: 27, 3,75 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 28, меченный FAM, 3,75 пмоль/л);

- локус D6S261, расположенном в локусе 6q21-22 (прямой праймер SEQ ID NO: 29, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 30, меченный FAM, 5 пмоль/л).

4 пул:

- локус D6S1594, расположенном в локусе 6q21 (прямой праймер SEQ ID NO: 31, 3,75 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 32, меченный FAM, 3,75 пмоль/л);

- локус D6S1719, расположенном в локусе 6q26-27 (прямой праймер SEQ ID NO: 33, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 34, меченный FAM, 5 пмоль/л);
- локус D6S415, расположенном в локусе 6q25.3 (прямой праймер SEQ ID NO: 35, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 36, меченный ROX, 10 пмоль/л);
- 5 - локус D6S430, расположенном в локусе 6q12 (прямой праймер SEQ ID NO: 37, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 38, меченный ROX, 10 пмоль/л);
- локус D6S407, расположенном в локусе 6q22-23 (прямой праймер SEQ ID NO: 39, 5 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 40, меченный FAM, 5 пмоль/л).

Каждому пулу соответствует одна пробирка со смесью праймеров, которая
10 подготавливается путем смешивания стоков синтезированных олигонуклеотидов в приведенных концентрациях, обеспечивающих наиболее благоприятные условия проведения ПЦР. Объем готовой смеси праймеров, необходимый для анализа одного образца - 1 мкл.

2) Реактивы для проведения мультиплексной ПЦР:

- 15 - 10x ПЦР-Буфер-Б (ООО "СИНТОЛ", Россия) в пробирках по 500 мкл из расчета 1 пробирка на 150 реакций;
- смесь dNTP (концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата 25 мМ) в пробирках по 500 мкл из расчета 1 пробирка на 150 реакций;
- 25 мМ раствор MgCl₂ в пробирках по 500 мкл из расчета 1 пробирка на 300 реакций;
- 20 - Taq-полимераза 5 ед./мкл в пробирках по 1000 мкл из расчета 1 пробирка на 2000 реакций;
- деионизированная вода во флаконах по 50 мл из расчета 1 флакон на 3000 реакций.

Особенность заявляемого способа заключается в том, что определяют изменения
25 совокупности 20 микросателлитных маркеров тест-системы. При реализации способа осуществляют анализ изменений микросателлитных локусов ДНК в образце опухолевой ткани при сравнении с контрольным образцом методом ПЦР на основании последующего анализа длин ПЦР-продуктов.

Амплификация исследуемых локусов производится в условиях 4 реакционных смесей
30 соответственно 4 пулам праймеров методом мультиплексной ПЦР. Оптимальные сочетания специфичных пар праймеров к перечисленным микросателлитным локусам в 4 пулах, определенные на основании исключения вероятности взаимного отжига и образования димеров и с учетом лучшей визуализации отдельных ПЦР-продуктов, разделенных по длине и каналу флуоресценции, а также условия проведения ПЦР и соотношения концентраций реагентов являются оригинальной особенностью
35 заявляемого изобретения.

Заявляемый способ осуществляется согласно описанной далее методике.

1. Подготовка материалов и компонентов

Исследуемый материал представлен образцом опухолевой ткани, в качестве которого
40 допустимо использование следующих источников:

- 40 - фрагмент опухолевого биоптата (объемом не менее 0,5 мм³);
- срезы с парафиновых блоков (в количестве от 2 до 10 при толщине среза 10 мкм в зависимости от объема заключенного материала) с последующей депарафинизацией согласно стандартным методикам;
- 45 - клетки периферической крови или аспирата костного мозга при доказанном иными методами наличии лейкомизации или вовлечении в опухолевый процесс костного мозга (10 мл в пробирке с раствором ЭДТА).

Доля опухолевых клеток от общей клеточности образца должна быть не менее 10%, что определено чувствительностью молекулярного исследования.

В качестве отрицательного контроля используют внесение в состав реакционной смеси ПЦР деионизированной воды вместо матрицы ДНК.

В качестве парного нормального образца в параллельном исследовании целесообразно использовать клетки периферической крови того же пациента, а в случае лейкемизации - клетки буккального эпителия, что обеспечивает наличие контроля и достоверность анализа.

Фрагменты опухолевых биоптатов могут быть взяты в работу непосредственно после выполнения биопсии или после замораживания при температуре не выше минус 30°C без использования криоконсерванта.

2. Выделение ДНК из опухолевой ткани биоптатов и депарафинизированных срезов
Подготовку проводят по изложенной ранее методике [17]. Забор клеток аспирата костного мозга или периферической крови осуществляют в 10 мл пробирку с раствором ЭДТА. Выделение ДНК проводят по любой из стандартных методик.

ПЦР проводят в составе реакционной смеси путем смешивания следующих компонентов в 0,2 мл микропробирках:

- 3 мкл 10x буфера (ПЦР-Буфер-Б, ООО "СИНТОЛ", Россия);
- 3 мкл смеси dNTP (концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата 25 mM);
- 1,5 мкл 25 mM раствора MgCl₂;
- не менее 20 нг геномной ДНК (в среднем в объеме водного раствора от 2 мкл до 5 мкл);
- 1 мкл одного из четырех пулов праймеров;
- 2,5 ед. Таq-полимеразы;
- деионизированная вода до общего объема реакционной смеси 25 мкл.

3. Постановка реакции

ПЦР проводят при следующих условиях:

- первичная денатурация 95°C 10 минут;
- 35 циклов денатурации при 95°C 40 секунд, отжига при 57°C 40 секунд, элонгации при 72°C 30 секунд;
- заключительная элонгация при 72°C 5 минут.

4. Учет результатов

Продукты амплификации в разведении 1:60-100 смешивают с формамидом в соотношении 1:3 и денатурируют при 95°C в течение 3 минут, после чего проводят фрагментный анализ на основе капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Авторами заявляемого изобретения был использован генетический анализатор Нанофор-05 (ООО "СИНТОЛ", Россия).

5. Интерпретация результатов

Наличие делеции региона bq определяют в случае гетерозиготного наследования на основании отсутствия пиков одного из аллелей или уменьшения интенсивности его флуоресценции по отношению к пику второго аллеля соответствующего микросателлитного локуса в опухолевой ткани при сравнении с контрольным образцом. Наличие делеции региона bq у пациента с ФЛ относит его к группе высокого риска и позволяет предполагать у него неблагоприятное течение заболевания.

Сущность группы изобретений пояснена примерами конкретной реализации, которые не ограничивают объем прав.

Пример 1. Технические условия заявляемого способа были разработаны и отработаны с использованием образцов ДНК клеток периферической крови 4 здоровых доноров. В дополнительной группе из 28 здоровых доноров была доказана работоспособность и воспроизводимость разработанной диагностической тест-системы.

В таблице 1 представлены данные об аллельном разнообразии исследуемых микросателлитных локусов в донорской популяции.

На Фиг. 1-4 отображены электрофореграммы, полученные при анализе ДНК одного из доноров, соответственно пулам смесей праймеров и каналам флуоресценции.

5 Пример 2. Пациент X. Диагноз: фолликулярная лимфома 3 морфологического типа с трансформацией в крупноклеточную лимфому, 6 курсов химиотерапии 1 линии, прогрессия заболевания после окончания лечения в течение месяца, химиотерапия 2 линии, рефрактерность, смерть.

10 По данным стандартного цитогенетического исследования в опухоли выявлен комплексный кариотип с множественными хромосомными нарушениями: дополнительной хромосомой X, делецией короткого плеча хромосомы 1, дериватами хромосом 3, 6 и 11 (47XY,+Xdel(1)(p36),del(3)(?q23),add(6)(q26),del(6)(q26)ort(6;6)(q26;q26),add(11)(q25)[cp1]/47,XY,+X[10], idem der(3)del(3)(?q 13) [cp 12]/47,XY,+12 [1]/46,XY [6]).

15 На Фиг. 5 представлены результаты исследования панели микросателлитных локусов в контрольном и опухолевом образцах пациента X., а также примеры электрофореграмм отдельных локусов. По трем микросателлитным локусам (D6S292, D6S403, D6S311) в опухолевой ткани отмечена утрата одного из аллелей, что свидетельствует о наличии делеции соответствующего хромосомного региона. В данном случае протяженность делеции распространяется на цитогенетические регионы 6q23-25.

20 В рассмотренном примере молекулярное и цитогенетическое исследования выявили делецию 6q как фактор неблагоприятного прогноза у пациента с ФЛ с прогрессирующим течением заболевания. Проведенный анализ микросателлитного профиля подтвердил неблагоприятный прогноз течения заболевания и представил более точные данные локализации области потери генетического материала, что имеет фундаментальное значение для изучения патогенеза опухоли.

Пример 3. Пациент Т. Фолликулярная лимфома 3А морфологического типа, 6 курсов химиотерапии 1 линии, ремиссия заболевания, ранний рецидив через год после окончания лечения, химиотерапия 2 линии, вторая ремиссия.

30 На Фиг. 6 представлены результаты исследования панели микросателлитных локусов в контрольном и опухолевом образцах пациента Т., а также примеры электрофореграмм отдельных локусов. По тринадцати микросателлитным локусам (D6S430, D6S1681, D6S460, D6S1613, D6S434, D6S1594, D6S287, D6S407, D6S441, D6S415, D6S305, D6S1719, D6S446) в опухолевой ткани отмечена утрата одного из аллелей, что свидетельствует о наличии делеции соответствующего хромосомного региона. В приведенном случае протяженность делеции распространяется на три независимых цитогенетического региона, разделенных областями сохранения гетерозиготности: 6q12-21, 6q22-23, 6q25-27, что свидетельствует о сложном характере генетических нарушений у данного пациента. В практическом отношении у данного пациента с делецией 6q подтвердился неблагоприятный прогноз заболевания, а именно - развитие раннего рецидива.

40 У данного пациента отсутствовала техническая возможность проведения цитогенетического исследования материала опухоли, доступного в качестве парафиновых блоков. Таким образом, именно предложенный метод молекулярного исследования позволил расширить информацию о генетических абберациях опухолевого клона.

Пример 4. Пациентка П. Фолликулярная морфологического типа, 6 курсов химиотерапии 1 линии, ремиссия.

У данной пациентки при исследовании микросателлитного профиля не были выявлены

абберрации микросателлитных повторов, свидетельствующие о делеции 6q, что позволяло предположить благоприятный прогноз заболевания. Действительно, несмотря на наличие экстранодальных очагов поражения, что обычно сочетается с агрессивным течением ФЛ, данная пациентка находится в длительной полной ремиссии.

5 Таким образом, проведенные авторами исследования позволили определить набор олигонуклеотидных праймеров, разработать диагностическую тест-систему для выявления делеций области 6q при злокачественных новообразованиях и способ
10 выявления пациентов с риском неблагоприятного течения фолликулярной лимфомы по наличию значимых делеций длинного плеча 6 хромосомы, что реализуется путем выполнения мультиплексной ПЦР с набором оригинальных олигонуклеотидных пар праймеров 20 микросателлитных локусов с последующего фрагментным анализом ПЦР-продуктов. Результаты, получаемые при осуществлении изобретения, применимы при определении характера последующего течения опухолевого заболевания на этапе
15 первичной диагностики и могут быть полезны в дифференциации методов терапии, а также могут быть использованы для идентификации значимых в патогенезе опухолей областей хромосомных делеций, что в дальнейшем послужит основой направленного поиска вовлеченных онкогенов.

Источники информации, принятые во внимание при составлении описания к заявке на выдачу патента РФ на изобретение «Тест-система и способ выявления делеций
20 длинного плеча 6 хромосомы»:

1. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kimlin A, Monconduit M, Bastard C. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood*. 1994 Aug 15; 84(4): 1043-9. PMID: 8049424.
2. Jarosova M, Hruby M, Oltova A, Plevova K, Kruzova L, Kriegerova E, Fillerova R, Koritakova
25 E, Doubek M, Lysak D, Prochazka V, Mraz M, Indrak K, Papajik T. Chromosome 6q deletion correlates with poor prognosis and low relative expression of FOXO3 in chronic lymphocytic leukemia patients. *Am J Hematol*. 2017 Oct; 92(10):E604-E607. doi: 10.1002/ajh.24852. Epub 2017 Jul 29. PMID: 28699185.
3. Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A, Wildenberger K, Bentz M, Dohner K, Ho AD, Lichter
30 P, Dohner H. Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1999 Sep; 13(9):1331-4. doi: 10.1038/sj.leu.2401499. PMID: 10482982.
4. Remke M, Pfister S, Cox C, Toedt G, Becker N, Benner A, Werft W, Breit S, Liu S, Engel
35 F, Wittmann A, Zimmermann M, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD, Bartram CR, Radlwimmer B, Muckenthaler MU, Lichter P, Kulozik AE. High-resolution genomic profiling of childhood T-ALL reveals frequent copy-number alterations affecting the TGF-beta and PI3K-AKT pathways and deletions at 6q15-16.1 as a genomic marker for unfavorable early treatment response. *Blood*. 2009 Jul 30; 114(5):1053-62. doi: 10.1182/blood-2008-10-186536. Epub 2009 Apr 30. PMID: 19406988.
5. Gachet S, El-Chaar T, Avran D, Genesca E, Catez F, Quentin S, Delord M, Thérizols G,
40 Briot D, Meunier G, Hernandez L, Pla M, Smits WK, Buijs-Gladdines JG, Van Looke W, Menschaert G, André-Schmutz I, Taghon T, Van Vlierberghe P, Meijerink JP, Baruchel A, Dombret H, Clappier E, Diaz JJ, Gazin C, de Thé H, Sigaux F, Soulier J. Deletion 6q Drives T-cell Leukemia Progression by Ribosome Modulation. *Cancer Discov*. 2018 Dec; 8(12):1614-1631. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0831. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30266814.
6. Bonn BR, Rohde M, Zimmermann M, Krieger D, Oschlies I, Niggli F, Wrobel G, Attarbaschi
45 A, Escherich G, Klapper W, Reiter A, Burkhardt B. Incidence and prognostic relevance of genetic

variations in T-cell lymphoblastic lymphoma in childhood and adolescence. *Blood*. 2013 Apr 18; 121(16):3153-60. doi: 10.1182/blood-2012-12-474148. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23396305.

7. Kluth M, Jung S, Habib O, et al. Deletion lengthening at chromosomes 6q and 16q targets multiple tumor suppressor genes and is associated with an increasingly poor prognosis in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(65): 108923-108935. Published 2017 Nov 11. doi:10.18632/oncotarget.22408

8. Mazurenko NN, Bliev AIu, Bidzhieva BA, Peskov DIu, Snigur NV, Savinova EB, Kiselev FL. [Loss of heterozygosity at chromosome 6 as a marker of early genetic alterations in cervical intraepithelial neoplasias and microinvasive carcinomas]. *Mol Biol (Mosk)*. 2006 May-Jun; 40(3):436-47. Russian. PMID: 16813163.

9. Oricchio E, Katanayeva N, Donaldson MC, Sungalee S, Pasion JP, Beguelin W, Battistello E, Sanghvi VR, Jiang M, Jiang Y, Teater M, Parmigiani A, Budanov AV, Chan FC, Shah SP, Kridel R, Melnick AM, Ciriello G, Wendel HG. Genetic and epigenetic inactivation of SESTRIN1 controls mTORC1 and response to EZH2 inhibition in follicular lymphoma. *Sci Transl Med*. 2017 Jun 28; 9(396):eaak9969. doi: 10.1126/scitranslmed.aak9969. PMID: 28659443; PMCID: PMC5559734.

10. Offit K, Parsa NZ, Gaidano G, Filippa DA, Louie D, Pan D, Jhanwar SC, Dalla-Favera R, Chaganti RS. 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1993 Oct 1; 82(7):2157-62. PMID: 8104536.

11. Merup M, Moreno TC, Heyman M, Rönnerberg K, Grandér D, Detlofsson R, Rasool O, Liu Y, Söderhäll S, Juliusson G, Gahrton G, Einhorn S. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1998 May 1; 91(9):3397-400. PMID: 9558398.

12. Jackson A, Carrara P, Duke V, Sinclair P, Papaioannou M, Harrison CJ, Feroni L. Deletion of 6q16-q21 in human lymphoid malignancies: a mapping and deletion analysis. *Cancer Res*. 2000 Jun 1; 60(11):2775-9. PMID: 10850412.

13. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet*. 1998 Sep; 63(3):861-9. doi: 10.1086/302011. PMID: 9718341; PMCID: PMC1377399.

14. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Génethon human genetic linkage map. *Nat Genet*. 1994 Jun; 7(2 Spec No):246-339. doi: 10.1038/ng0694supp-246. PMID: 7545953.

15. Inoue M, Marx A, Zettl A, Strobel P, Muller-Hermelink HK, Starostik P. Chromosome 6 suffers frequent and multiple aberrations in thymoma. *Am J Pathol*. 2002 Oct; 161(4): 1507-13. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64426-4. PMID: 12368223; PMCID: PMC 1867301.

16. Starostik P, Greiner A, Schultz A, Zettl A, Peters K, Rosenwald A, Kolve M, Müller-Hermelink HK. Genetic aberrations common in gastric high-grade large B-cell lymphoma. *Blood*. 2000 Feb 15; 95(4):1180-7. PMID: 10666188.

17. Sidorova JV, Biderman BV, Nikulina EE, Sudarikov AB. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp Dermatol*. 2012; 21(1):57-60. doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x

Таблица 1. Характеристики аллельного разнообразия исследуемых микросателлитных локусов в группе доноров

Микросателлитный локус	Диапазон длин аллелей			Аллельные частоты (п.н.-%)
	Минимальная длина ПЦР-продукта, п.н.	Максимальная длина ПЦР-продукта, п.н.	Медиана, п.н.	
D6S430	215	251	239	215-9,4%, 217-4,7%, 235-1,6%, 237-29,7%, 239-14,1%, 241-20,3%, 243-1,6%, 245-6,3%, 247-9,3%, 251-3%
D6S1681	201	217	207	201-18%, 203-18%, 205-10,2%, 207-24,2%, 209-21,1%, 211-2,3%, 215-3,9%, 217-2,3%
D6S460	166	184	174	166-29,7%, 170-3,1%, 172-6,3%, 174-14,1%, 176-26,6%, 178-6,3%, 180-9,4%, 182-3,1%, 184-1,6%
D6S1613	128	156	142	128-4%, 130-4%, 132-4%, 134-4%, 136-2,4%, 138-8,6%, 140-8,6%, 142-21,1%, 144-10,2%, 146-7,1%, 148-7,1%, 150-5,5%, 152-8,6%, 154-2,4%, 156-2,4%
D6S300	247	299	253	247-3,8%, 249-30,4%, 251-3,8%, 253-28,8%, 255-13,2%, 257-10,1%, 259-3,8%, 261-3,8%, 299-2,3%
D6S434	198	234	208	198-1,8%, 202-6,5%, 204-12,8%, 206-28,4%, 208-20,6%, 210-4,9%, 218-1,8%, 220-4,9%, 222-8,1%, 224-4,9%, 232-1,8%, 234-3,4%
D6S447	234	248	242	234-9,4%, 236-1,6%, 238-20,3%,

				240-17,2%, 242-4,7%, 244-12,5%, 246-28,1%, 248-6,3%	
5	D6S1594	112	132	126	112-6,1%, 116-3%, 120-6,1%, 122-9,2%, 124-21,7%, 126-26,4%, 128-6,1%, 130-18,6%, 132-3%
10	D6S261	93	123	103	93-3,1%, 95-1,6%, 99-15,6%, 101-26,6%, 103-6,3%, 105-14,1%, 107-4,7%, 109-7,8%, 111-1,6%, 113-1,6%, 117-3,1%, 121-12,5%, 123-1,6%
15					
20	D6S287	233	255	245	233-3,3%, 239-6,4%, 241-4,8%, 243-34,5%, 245-4,8%, 247-4,8%, 249-23,6%, 251-9,5%, 253-4,8%, 255-3,3%
25	D6S407	227	259	247	227-9,4%, 229-4,7%, 233-1,6%, 241-1,6%, 243-14,1%, 245-15,6%, 247-17,2%, 249-21,9%, 251-6,3%, 253-3,1%, 255-3,1%, 259-1,6%
30					
35	D6S262	154	170	160	154-1,7%, 156-37,7%, 158-9,5%, 160-1,7%, 162-1,7%, 164-6,4%, 166-26,7%, 168-8%, 170-6,4%
40	D6S292	141	163	153	141-3,1%, 143-1,6%, 147-1,6%, 149-17,2%, 151-12,5%, 153-31,3%, 155-9,4%, 157-3,1%, 159-9,4%, 161-3,1%, 163-7,8%
45	D6S403	258	274	264	258-10,3%, 262-4%, 264-40%, 266-18,1%, 268-11,8%, 270-11,8%, 274-4%

5	D6S311	251	293	283	251-1,9%, 253-5%, 255-8,1%, 257-3,4%, 263-3,4%, 265-14,4%, 267-8,1%, 269-3,4%, 281-1,9%, 283-8,1%, 285-8,1%, 287-11,3%, 289-5%, 291-6,6%, 293-11,3%
10	D6S441	162	184	174	162-1,6%, 164-1,6%, 166-1,6%, 168-14,1%, 170-10,9%, 172-7,8%, 174-14,1%, 176-6,3%, 178-9,4%, 180-15,6%, 182-12,5%, 184-4,7%
15	D6S415	187	203	189	187-17,2%, 189-42,2%, 191-18,8%, 193-1,6%, 201-14,1%, 203-6,3%
20	D6S305	227	287	241	227-23,4%, 229-1,6%, 231-3,1%, 239-1,6%, 241-26,6%, 243-9,4%, 245-6,3%, 247-4,7%, 249-4,7%, 251-6,3%, 253-6,3%, 255-1,6%, 257-3,1%, 287-1,6%
25	D6S1719	161	187	179	161-4,7%, 175-35,9%, 177-1,6%, 179-21,9%, 181-9,4%, 183-12,5%, 185-10,9%, 187-3,1%
30	D6S446	191	199	193	191-34,4%, 193-20,3%, 195-12,5%, 197-9,4%, 199-23,4%
35					

Перечень последовательностей

40 <110> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России)

45 Federal Governmental Budgetary Institution «National Research Center for Hematology»

<120> ТЕСТ-СИСТЕМА И СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ДЕЛЕЦИЙ ДЛИННОГО ПЛЕЧА 6 ХРОМОСОМЫ

<160> 40

<210> 1

<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
5 ACACAGGCAT TCAAATCAGA GC
<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens
10 <400> 2
CACTCACCCAC CTAAATGTTT CAGT
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 3
CAACACACAG GTAGTCCCCC
<210> 4
<211> 19
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4
AGCTCAGGGC TTATGCCAG
<210> 5
25 <211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
TCTGAAGAAA GAGGCGTTAA CCA
30 <210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
35 CCGGCCCAAA GTCTTGT
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
40 <400> 7
AGGAAGACTC CACCTCATTT AAA
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 8
TCAAGATTAA GTTCCTGGCC AT
<210> 9

<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 9
5 AATTCACAAG ACACAATCTC AG
<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens
10 <400> 10
AGAACTAAAG TTGCCTGTTC TTGTA
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 11
CCCAGGCTTA TAAAGGTGGC
<210> 12
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 12
TGGTTCTCTC ACCCTTTTGT
<210> 13
25 <211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 13
GCTTCTGTAA TTTTCTATAG CCTAC
30 <210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 14
35 GCCTTTGCCC TGAGTATTGG
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
40 <400> 15
TGCCTTCTTA ATGCTGCTCA
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 16
ACTTGCTTCT CTTGCCTCAA
<210> 17

<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 17
5 GGCAGTGGAC ATGGAACCTT
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
10 <400> 18
TGGATTCAGA GCCCAGGAAG
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 19
TTCTCTCGCT CTCTCACAGC
<210> 20
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 20
ATTCCAGAGA GCGGGGCAAA
<210> 21
25 <211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 21
AGATAGCCGA ATATGCAACC A
30 <210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 22
35 GGACTCTCAG TTAACAAGGA GCA
<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens
40 <400> 23
AACAATATTT GGTGACTGTT AAAGG
<210> 24
<211> 25
<212> DNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 24
TGGACAAATT GATTAGGAAG TAAAG
<210> 25

<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 25
5 TCCTCTCCAC CAGCGTTAGA
<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
10 <400> 26
GTTTAGATCC CAGGCCTGCA
<210> 27
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 27
AGGGATGTCT ACACCTACAC
<210> 28
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 28
GGGAGGACGT TCTGGTTTCA
<210> 29
25 <211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 29
TGAAACCCTG TCTCACTGCA TA
30 <210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 30
35 TATAGGACCA TGCCATTAGG C
<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
40 <400> 31
GCCTGAGACT CTTCAATGCC T
<210> 32
<211> 20
<212> DNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 32
AGCTTAAAGT GTAGGACGGT
<210> 33

<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 33
5 GGAACTACTC CCATTCCAAC C
<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
10 <400> 34
GAGATACAAG CAGGAGGTAG CA
<210> 35
<211> 20
<212> DNA
15 <213> Homo sapiens
<400> 35
TCGGCCACCA GAAGTAAAGC
<210> 36
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 36
GGAGGTGCAG CATCTTTCCT
<210> 37
25 <211> 22
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 37
CAGCATAGTT CCTTCAAGCA CA
30 <210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 38
35 GGCTTCCCCT TCACTTCTTC A
<210> 39
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens
40 <400> 39
AAAAGTACCT CCCGCC
<210> 40
<211> 21
<212> DNA
45 <213> Homo sapiens
<400> 40
GGGGACAGTT ACCTTTGGAG T

(57) Формула изобретения

1. Набор олигонуклеотидных пар праймеров для специфической амплификации двадцати микросателлитных локусов длинного плеча 6 хромосомы человека (6q):
- 5 D6S430, расположенный в локусе 6q12, D6S1681, расположенный в локусе 6q14, D6S460, расположенный в локусе 6q14-15, D6S1613, расположенный в локусе 6q16, D6S300, расположенный в локусе 6q16-21, D6S434, расположенный в локусе 6q21, D6S447, расположенный в локусе 6q21, D6S1594, расположенный в локусе 6q21, D6S261, расположенный в локусе 6q21-22, D6S287, расположенный в локусе 6q22, D6S407, расположенный в локусе 6q22-23, D6S262, расположенный в локусе 6q23, D6S292, расположенный в локусе 6q23, D6S403, расположенный в локусе 6q23, D6S311, расположенный в локусе 6q24-25, D6S441, расположенный в локусе 6q25, D6S415, расположенный в локусе 6q25.3, D6S305, расположенный в локусе 6q26, D6S1719, расположенный в локусе 6q26-27, D6S446, расположенный в локусе 6q27, имеющих
- 15 следующие нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 40:
- D6S430-F: 5'-CAGCATAGTTCCTTCAAGCACA-3',
D6S430-R: 5'-ROX-GGCTTCCCCTTCACTTCTTCA-3',
D6S1681 -F: 5'-ACACAGGCATTCAAATCAGAGC-3',
D6S1681 -R: 5'-FAM-CACTCACCACTAAATGTTTCAGT-3',
20 D6S434-F: 5'-CAACACACAGGTAGTCCCCC-3',
D6S434-R: 5'-ROX-AGCTCAGGGCTTATGCCAG-3',
D6S261 -F: 5'-TGAAACCCTGTCTCACTGC ATA-3',
D6S261 -R: 5'-FAM-TATAGGACCATGCCATTAGGC-3',
D6S403-F: 5'-TCTGAAGAAAGAGGCGTTAACCA-3,
25 D6S403-R: 5'-FAM-CCGGCCCAAAGTCTTGT-3',
D6S460-F: 5'-CCCAGGCTTATAAAGGTGGC-3',
D6S460-R: 5'-ROX-TGGTTCTCTCACCTTTTGT-3',
D6S300-F: 5'-TGCCTTCTTAATGCTGCTCA-3',
D6S300-R: 5'-F AM- ACTTGCTTCTCTTGCCTC AA-3',
30 D6S1594-F: 5'-GCCTGAGACTCTTCAATGCCT-3',
D6S1594-R: 5'-FAM-AGCTTAAAGTGTAGGACGGT-3',
D6S287-F: 5'-GCTTCTGTAATTTTCTATAGCCTAC-3',
D6S287-R: 5'-ROX-GCCTTTGCCCTGAGTATTGG-3',
D6S292-F: 5'-AATTCACAAGACACAATCTCAG-3',
35 D6S292-R: 5'-FAM-AGAАCTAAAGTTGCCTGTTCTTGTA-3,
D6S311-F: 5'-GGCAGTGGACATGGAACCTT-3',
D6S311-R: 5'-FAM-TGGATTCAGAGCCCAGGAAG-3',
D6S447-F: 5'-TTCTCTCGCTCTCTCACAGC-3',
D6S447-R: 5'-ROX-ATTCCAGAGAGCGGGGCAA-3',
40 D6S262-F: 5'-AGATAGCCGAATATGCAACCA-3',
D6S262-R: 5'-FAM-GGACTCTCAGTTAACAAGGAGCA-3',
D6S441-F: 5'-AAC AATATTTGGTGA CTGTTAAAGG-3',
D6S441 -R: 5'-ROX-TGGACAAATTGATTAGGAAGTAAAG-3',
D6S305-F: 5'-TCCTCTCCACCAGCGTTAGA-3',
45 D6S305-R: 5'-FAM-GTTTAGATCCCAGGCCTGCA-3',
D6S446-F: 5'-AGGGATGTCTACACCTACAC-3',
D6S446-R: 5'-FAM-GGGAGGACGTTCTGGTTTCA-3',
D6S415-F: 5'-TCGGCCACCAGAAGTAAAGC-3',

D6S415-R: 5'-ROX-GGAGGTGCAGCATCTTTCCT-3',
 D6S1719-F: 5'-GGAАCTACTCCCATTCААСС-3',
 D6S1719-R: 5'-FAM-GAGATACAAGCAGGAGGTAGCA-3,
 D6S407-F: 5'-AAAAGTACCTCCCGCCC-3',
 5 D6S407-R: 5'-FAM-GGGGACAGTTACSTTTGGAGT-3',
 D6S1613-F: 5'-AGGAAGACTCCACSTCATTTAAA-3',
 D6S1613-R: 5'-ROX-TCAAGATTAAGTTCCTGGCCAT-3'.

2. Тест-система для определения делеций длинного плеча 6 хромосомы (6q) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР), состоящая из набора
 10 олигонуклеотидных пар праймеров по п. 1, разделенного на 4 пула-смеси праймеров, исключающих вероятность взаимного отжига и образования димеров, и с учетом лучшей визуализации отдельных ПЦР-продуктов:

1 пул - D6S1681 - 2,5 пмоль/мкл, D6S434 - 10 пмоль/мкл, D6S403 - 5 пмоль/мкл, D6S1613 - 5 пмоль/мкл;

15 2 пул - D6S292 - 5 пмоль/мкл, D6S460 - 10 пмоль/мкл, D6S287 - 10 пмоль/мкл, D6S300 - 4 пмоль/мкл, D6S311 - 4 пмоль/мкл;

3 пул - D6S447 - 10 пмоль/мкл, D6S262 - 4 пмоль/мкл, D6S441 - 15 пмоль/мкл, D6S305 - 5 пмоль/мкл, D6S446 - 3,75 пмоль/мкл, D6S261 - 5 пмоль/мкл;

4 пул - D6S1594 - 3,75 пмоль/мкл, D6S1719 - 5 пмоль/мкл, D6S415 - 10 пмоль/мкл,
 20 D6S430 - 10 пмоль/мкл, D6S407 - 5 пмоль/мкл;

реактивов для проведения ПЦР: 10x ПЦР-Буфер-Б, смесь dNTP по 25 мМ, 25 мМ раствор MgCl₂, Taq-полимераза, деионизированная вода.

3. Способ выявления пациентов с риском неблагоприятного течения фолликулярной лимфомы по наличию значимых делеций длинного плеча 6 хромосомы (6q) с помощью
 25 тест-системы по п. 2, включающий следующие этапы: сбор и подготовка парных образцов опухоли и контрольной ткани, при этом в качестве образца опухолевой ткани допустимо использование фрагментов опухолевого биоптата, срезов с парафиновых блоков с последующей депарафинизацией, клеток периферической крови или аспирата костного мозга, в качестве парного нормального образца используют клетки
 30 периферической крови того же пациента, а в случае лейкоемизации - клетки буккального эпителия; выделение ДНК, проведение мультиплексной ПЦР с помощью тест-системы по п. 2 для каждого образца при следующих условиях:

первичная денатурация 95°C 10 минут,

35 циклов денатурации при 95°C 40 секунд, отжига при 57°C 40 секунд,

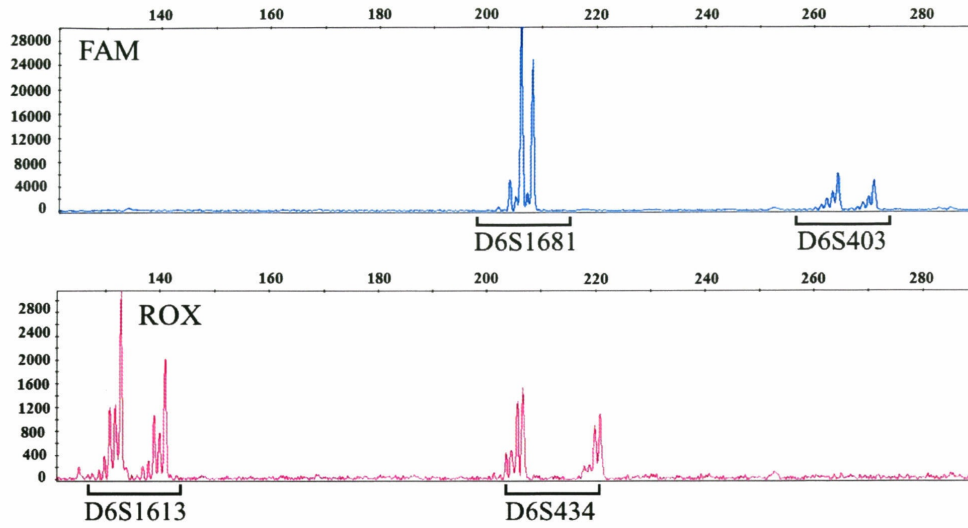
элонгации при 72°C 30 секунд,

заключительная элонгация при 72°C 5 минут;

продукты амплификации в разведении 1:60-100 смешивают с формамидом в соотношении 1:3 и денатурируют при 95°C в течение 3 минут, после чего проводят фрагментный анализ на основе капиллярного электрофореза на генетическом
 40 анализаторе; интерпретацию полученных данных, при этом наличие делеции региона 6q в случае гетерозиготного наследования на основании отсутствия пиков одного из аллелей или уменьшения интенсивности его флуоресценции по отношению к пику второго аллеля соответствующего микросателлитного локуса в опухолевой ткани при сравнении с контрольным образцом позволяет выделять группу пациентов с риском
 45 неблагоприятного течения фолликулярной лимфомы.

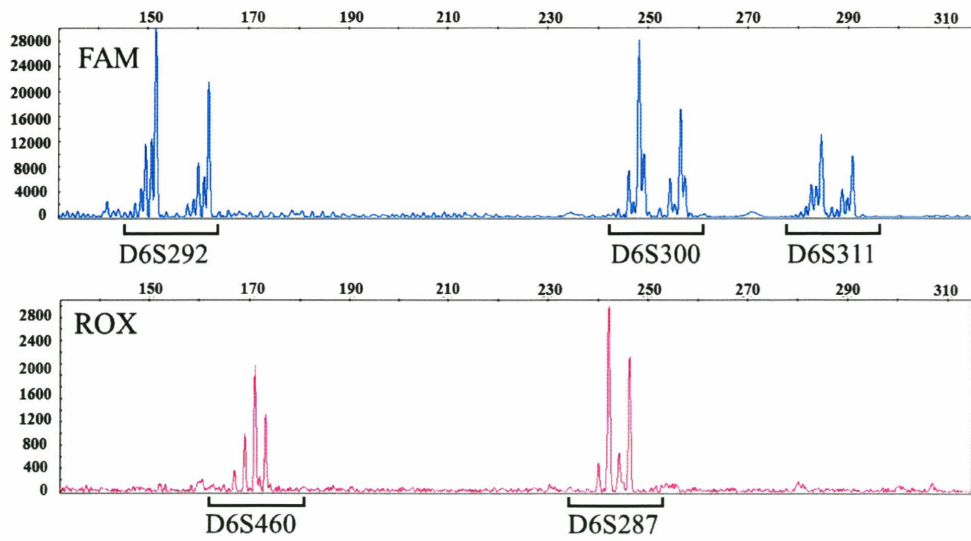
1

Пул праймеров 1



Фиг. 1

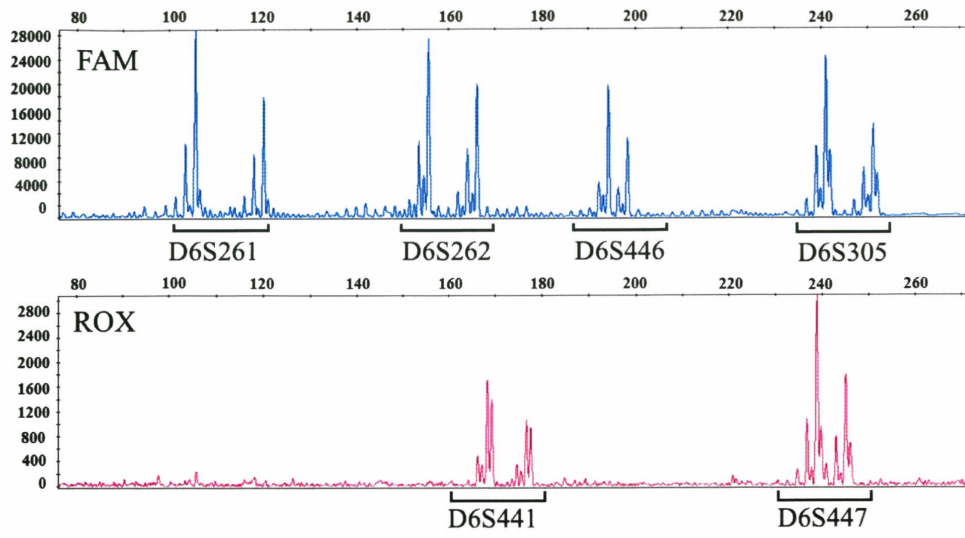
Пул праймеров 2



Фиг. 2

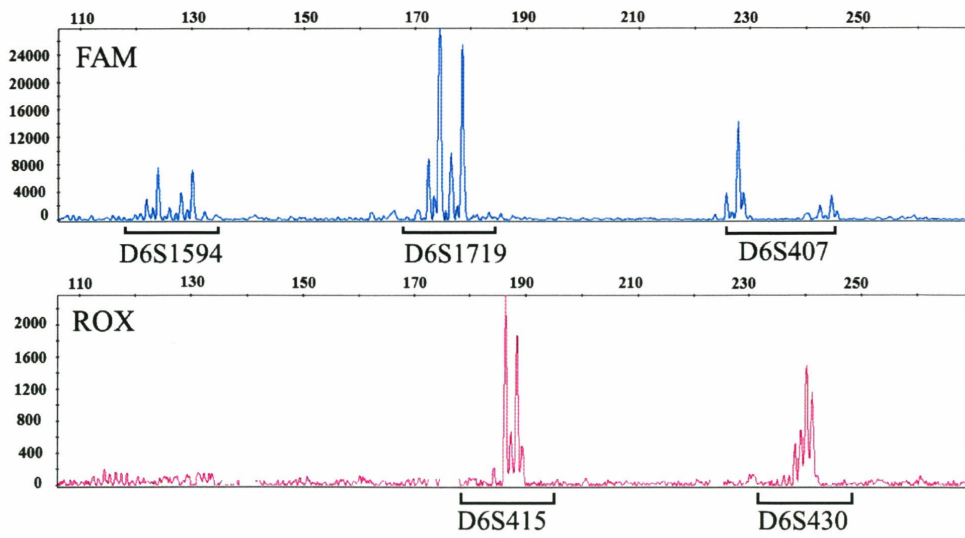
2

Пул праймеров 3



Фиг. 3

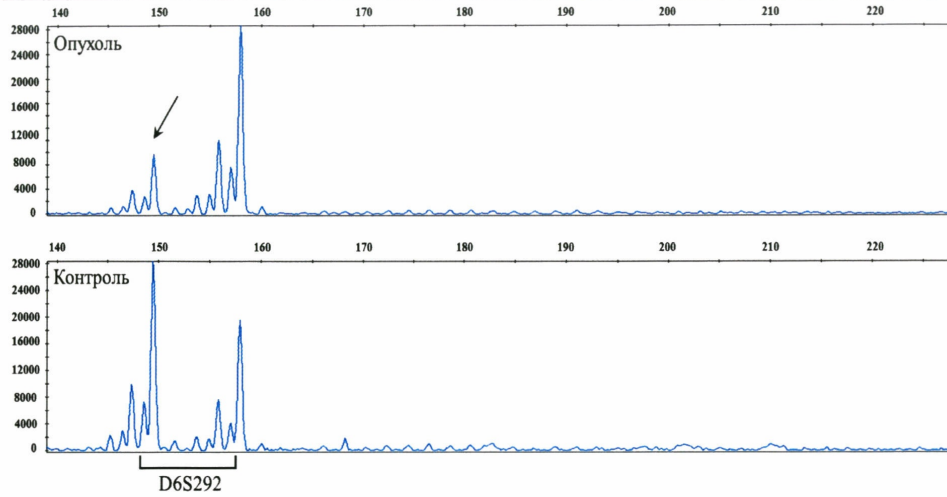
Пул праймеров 4



Фиг. 4

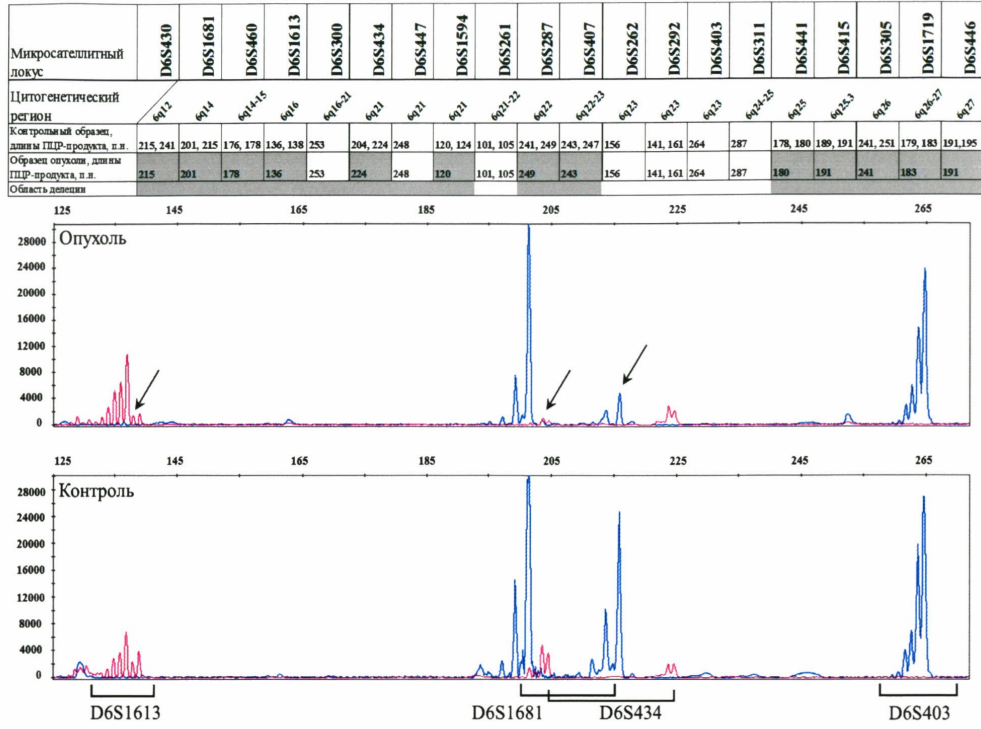
Пациент X.

Микросателлитный локус	D6S430	D6S1681	D6S460	D6S1613	D6S300	D6S434	D6S447	D6S1594	D6S261	D6S287	D6S407	D6S262	D6S292	D6S403	D6S311	D6S441	D6S415	D6S305	D6S1719	D6S446
Цитогенетический регион	9q12	9q14	9q14-q15	9q16	9q16-q21	9q22	9q23	9q23	9q23-q22-q23	9q23	9q23-q23-q23	9q23	9q23	9q23	9q23-q25	9q23	9q23-q3	9q28	9q28-q27	9q27
Контрольный образец, длинм ППР-продукта, п.н.	237, 239	205, 207	166	138, 146	247, 261	208, 210	238	112, 120	101, 105	243	227, 261	156, 164	147, 157	266, 268	265, 269	174, 180	191	227, 241	185	191
Образец опухоли, длинм ППР-продукта, п.н.	237, 239	205, 207	166	138, 146	247, 261	208, 210	238	112, 120	101, 105	243	227, 261	156, 164	157	268	269	174, 180	191	227, 241	185	191
Область деции																				



Фиг. 5

Пациент Т.



Фиг. 6