РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 846 219**(13) **C1**

(51) МПК
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/68 (2025.05); C12Q 1/6876 (2025.05)

(21)(22) Заявка: **2025101733, 28.01.2025**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.01.2025

Дата регистрации:
02.09.2025

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **28.01.2025**

(45) Опубликовано: **02.09.2025** Бюл. № **25**

Адрес для переписки:
125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4, ФГБУ "НМИЦ Гематологии", Паровичникова Елена Николаевна

(72) Автор(ы):
Абдурашидова Руниза Равильевна (RU),
Сурин Вадим Леонидович (RU),
Рисинская Наталья Владимировна (RU),
Мангасарова Яна Константиновна (RU),
Никулина Елена Евгеньевна (RU),
Абрамова Татьяна Валерьевна (RU),
Звонков Евгений Евгеньевич (RU),
Судариков Андрей Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр гематологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Tanaka Y. et al. Expression pattern of PD-L1 and PD-L2 in classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, and gray zone lymphoma. European Journal of Haematology, 2018, v.100(5), p.511-517. WO 2012113064 A1, 30.08.2012. RU 2743657 C2, 20.02.2021.**

(54) Тест-система и способ выявления геномной нестабильности локусов 9p24.1 и 16p13.13 при первичной медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфоме

(57) Реферат:

Изобретение относится к области молекулярной биологии. Описана тест-система для определения геномной нестабильности в регионах генов PD-L1/PD-L2 локус 9p24.1 и CIITA локус 16p13.13 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), включающая пул олигонуклеотидных пар разработанных праймеров. Также описан способ выявления неблагоприятного течения первичной медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфомы с применением указанной тест-системы. Технический результат заключается в определении прогноза ПМВКЛ в дебюте заболевания путем выявления прогностически неблагоприятных генетических аномалий в опухолевой ткани и идентифицировании значимых маркеров эффективности/резистентности к иммунотерапии. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 7 ил., 1 табл., 3 пр.

RU 2846219 C1

RU 2846219 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 846 219**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12Q 1/68 (2025.05); C12Q 1/6876 (2025.05)

(21)(22) Application: **2025101733, 28.01.2025**

(24) Effective date for property rights:
28.01.2025

Registration date:
02.09.2025

Priority:
(22) Date of filing: **28.01.2025**

(45) Date of publication: **02.09.2025** Bull. № **25**

Mail address:
125167, Moskva, Novyj Zykovskij pr-d, 4, FGBU "NMITS Gematologii", Parovichnikova Elena Nikolaevna

(72) Inventor(s):
Abdurashidova Runiza Ravilevna (RU),
Surin Vadim Leonidovich (RU),
Risinskaia Natalia Vladimirovna (RU),
Mangasarova Iana Konstantinovna (RU),
Nikulina Elena Evgenevna (RU),
Abramova Tatiana Valerevna (RU),
Zvonkov Evgenii Evgenevich (RU),
Sudarikov Andrei Borisovich (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii issledovatelskii tsentr gematologii» Ministerstva zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (RU)

(54) TEST SYSTEM AND METHOD FOR DETECTING GENOMIC INSTABILITY OF 9P24_1 AND 16P13_13 LOCI IN PRIMARY MEDIASTINAL LARGE B-CELL LYMPHOMA

(57) Abstract:

FIELD: molecular biology.

SUBSTANCE: described is a test system for determining genomic instability in regions of genes PD-L1/PD-L2 locus 9p24.1 and CIITA locus 16p13.13 by polymerase chain reaction (PCR), including a pool of oligonucleotide pairs of designed primers. What is also described is a method for detecting the unfavourable clinical course of primary mediastinal large B-cell lymphoma with using said test system.

EFFECT: determining the onset prognosis of PMBCL by detecting prognostically unfavourable genetic anomalies in the tumour tissue and identifying significant markers of effectiveness/resistance to immunotherapy.

4 cl, 7 dwg, 1 tbl, 3 ex

RU 2846219 C1

RU 2846219 C1

Изобретение относится к молекулярно-генетическим методам диагностики и может применяться для выявления геномной нестабильности в локусах, важных для патогенеза первичной медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ).

Для ПМВКЛ характерен фенотип уклонения от иммунного ответа, который достигается за счет множественных конвергентных генетических механизмов, включая структурные изменения в 9p24.1, приводящие к экспрессии PD-L (*CD274* [PD-L1- лиганд белка запрограммированной гибели клеток-1] и, в частности, *PDCD1LG12* [PD-L2]), а также снижение иммуногенности опухолевых клеток при снижении экспрессии MHC-II (Major Histocompatibility Complex, главный комплекс гистосовместимости 2 класса), которая может быть следствием транслокаций и делеций с участием гена *CIITA* (Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator, трансактиватор главного комплекса гистосовместимости II класса) (Mottok A. et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. Blood, 2018; 132(22), p. 2401–5, DOI: 10.1182/blood-2018-05-851154; Кузнецова С.А. и др. Характеристика цитогенетических и молекулярно-генетических нарушений гена CIITA у пациентов с первичной медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфомой. Клиническая онкогематология, 2021, 14(2), с. 173–8, DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-2-173-178).

Для ПМВКЛ на сегодняшний день отсутствуют стандартизированные системы прогноза. Отдельные клинические параметры, такие как плохое общее состояние по шкале ECOG, высокая концентрация ЛДГ, вовлечение мягких тканей и/или молочных желез, наличие экстрамедиастинального поражения согласно противоречивым сообщениям связаны с неудачей лечения (Hang H et al. Prognostic factors and clinical survival outcome in patients with primary mediastinal diffuse large B-cell lymphoma in rituximab era: A population-based study. Medicine (Baltimore), 2024, 103(8), p. e37238, DOI: 10.1097/MD.0000000000037238; Shih H.J. et al. Major impact of prognosis by age and sex in patients with primary mediastinal large B cell lymphoma. Oncol Lett., 2023, 27(2), p. 57, DOI: 10.3892/ol.2023.14190). Но клинические данные остаются ненадежным предиктором, так как результаты различных крупных исследований противоречат друг другу. В отличие от других неходжкинских лимфом, прогностическое значение аберраций *TP53*, *MYC*/8q24, *BCL2*/18q21, *BCL6*/3q27, del17p13 при ПМВКЛ не доказано (Noerenberg D. et al. Genetic Characterization of Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: Pathogenesis and Patient Outcomes. Journal of Clinical Oncology, 2024, 42 (4), p. 452–466, DOI: 10.1200/JCO.23.01053).

Несмотря на идентифицированные важные генетические события в патогенезе ПМВКЛ, в настоящее время надежные биомаркеры, позволяющие стратифицировать пациентов на группы риска, не определены, часть биомаркеров продемонстрировали предиктивную ценность только при низкоинтенсивной химиотерапии, программа R-DA-EPOCH нивелировала прогностическую роль многих описанных молекулярных нарушений (NOERENBERG D. et al. Genetic Characterization of Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: Pathogenesis and Patient Outcomes. Journal of Clinical Oncology, 2024, 42 (4), p. 452–466, DOI: 10.1200/JCO.23.01053).

Принимая во внимание особенности патогенеза ПМВКЛ, иммунологическую толерантность, а также тот факт, что иммунотерапия больных первично-рефрактерными формами ПМВКЛ эффективна только у половины пациентов, остро стоял вопрос о разработке эффективного и доступного диагностического метода определения маркеров высокого риска и в дальнейшем использование этих маркеров как предикторов эффективности/резистентности к иммунотерапии (Zinzani P.L. et al. Pembrolizumab in Relapsed or Refractory Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: Final Analysis of KEYNOTE-170. Blood Journal, 2023, 142(2), p. 141–145, DOI: 10.1182/blood.2022019340).

Цель настоящего изобретения заключается в обеспечении эффективного, доступного и простого способа выявления геномной нестабильности в локусах 9p24.1 и 16p13.13 опухолевой ДНК у больных ПМВКЛ.

При проведении исследований нами были выбраны два ключевых локуса, играющих роль в патогенезе и уклонении от иммунного ответа ПМВКЛ. Также был разработан набор праймеров для олигонуклеотидных микросателлитов, обеспечивающих специфическую амплификацию микросателлитных повторов локусов 9p24.1 и 16p13.13. Этот набор может быть использован в тест-системе для выявления изменения копийности исследуемых локусов в опухолевом геноме методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). На рисунке 1 продемонстрирована хромосомная локализация исследуемых молекулярных маркеров.

Заявленный способ основан на сравнении интенсивности флуоресценции ПЦР-продуктов микросателлитных маркеров опухолевой ДНК с контрольным образцом геномной ДНК этого же пациента, выделенной из пула клеток без специфического поражения (мононуклеары периферической крови). Различные количественные изменения микросателлитных повторов в опухоли в сравнении с контрольным образцом могут проявляться аллельным дисбалансом (АД) и в подавляющем большинстве случаев являются следствием хромосомных нарушений (делеция, дупликация и т. д.). Сравнение проводят путем сопоставления интенсивности флуоресценции ПЦР-продуктов (высот пиков флуоресценции на электрофореграмме) амплифицированных фрагментов ДНК, соответствующих разным аллелям в парных образцах при разделении и визуализации ПЦР-продукта методами горизонтального электрофореза или капиллярного электрофореза.

Для повышения точности анализа, подтверждения и верификации выявленных изменений, результаты анализа микросателлитных повторов 15 больных ПМВКЛ сопоставили с результатами хромосомного микроматричного анализа (ХМА), выполненного независимой лабораторией (лаборатория молекулярной патологии «Геномед», Россия). Во всех случаях АД были выявлены хромосомные нарушения (амплификация, делеция, cnLOH), а образцы без АД были без аберраций анализируемых локусов по результатам ХМА.

Идентификация геномной нестабильности 9p24.1 и 16p13.13 представляется актуальной задачей как в практическом отношении диагностики прогностически неблагоприятных вариантов ПМВКЛ, так и с позиций поиска предикторов эффективности иммунотерапии.

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

1) стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ);

2) флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH);

3) хромосомный микроматричный анализ (ХМА);

4) полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Метод 1 наряду с известными преимуществами и широким распространением в рутинной практике для исследования многих гемобластозов имеет ряд недостатков:

- метод позволяет обнаруживать только крупные хромосомные аномалии. Мелкие делеции, дупликации, а также сбалансированные хромосомные нарушения, например, количественно-нейтральная потеря гетерозиготности (cnLOH), не обнаруживаются;

- СЦИ требует значительного времени для культивирования клеток и подготовки метафазных пластинок;

- для успешного анализа необходимы нативные образцы с высокой митотической

активностью. Это ограничивает использование образцов с низкой клеточностью и архивных материалов, в том числе замороженных и заключенных в парафин образцов. Из-за низкой митотической активности опухолевых клеток всех типов лимфом стандартное цитогенетическое исследование затруднено.

Метод 2. Несмотря на наличие коммерчески доступных флуоресцентных зондов для регионов 9p24.1 (*PD-L1* (*CD274*) FISH Probe производства компании Empire Genomics (США) и Cytocell *PD-L1* (*CD274*) Probe производства компании Cytocell (Oxford Gene Technology, Великобритания)) и 16p13.13 (*CIITA* Break Apart FISH Probe производства компании Empire Genomics (США)), их применение в методе FISH для диагностики геномной нестабильности при ПМВКЛ ограничено рядом существенных недостатков:

- метод требует приобретения флуоресцентно меченных ДНК-зондов, специфичных для интересующих генов или хромосомных регионов. Это увеличивает стоимость и сложность подготовки к исследованию;
- для исследования нескольких локусов требуется проведение множественных экспериментов, что увеличивает время и расходы;
- метод чувствителен к качеству и сохранности тканей. Архивные образцы, такие как парафиновые блоки с деградированной ДНК, могут быть непригодны для FISH-анализа;
- FISH может не выявить генетические изменения, если они присутствуют в небольшом проценте клеток. Это затрудняет обнаружение мозаичных и субклональных популяций опухолевых клеток;
- FISH позволяет выявлять только те генетические изменения, для которых разработаны специфические зонды. Неизвестные или редкие аномалии остаются невыявленными;
- метод эффективен для обнаружения крупных хромосомных перестроек, но не может детектировать мелкие делеции или точечные мутации.

Метод 3 позволяет максимально полно оценить количественные изменения в геноме, но пока не доступен в рутинной практике:

- анализ одного образца с помощью ХМА является дорогостоящим из-за стоимости микроматричных чипов, оборудования и программного обеспечения для анализа данных;
- метод требует значительного количества высококачественной ДНК, что может быть проблематично при работе с малоклеточными или деградированными образцами, такими как парафиновые блоки;
- результаты ХМА генерируют большой объем данных, требующий специализированного программного обеспечения и экспертизы для корректной интерпретации, что может привести к длительному времени анализа.

Метод 4, заключающийся в амплификации методом ПЦР коротких высокополиморфных последовательностей ДНК, расположенных на 9p24.1 и 16p13.13, имеет ряд преимуществ в идентификации геномной нестабильности интересуемых локусов:

- значительно снижает стоимость исследования за счет отсутствия необходимости в дорогостоящих зондах, реактивах и оборудовании;
- методика отличается относительной простотой выполнения и возможностью воспроизведения в большинстве молекулярно-генетических лабораторий;
- разработанный метод основан на использовании праймеров к коротким ДНК-мишеням, что позволяет проводить амплификацию даже на деградированной ДНК из архивных материалов (например, парафиновых блоков);

- мультиплексная ПЦР позволяет одновременно исследовать несколько генетических маркеров, что сокращает время исследования.

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

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

1. определить прогноз ПМВКЛ в дебюте заболевания путем выявления прогностически неблагоприятных генетических аномалий в опухолевой ткани;

2. идентифицировать значимые маркеры эффективности/резистентности к иммунотерапии.

Сущность группы изобретений заключается в следующем.

Заявленная тест-система предназначена для определения геномной нестабильности в регионах генов *PD-L1/PD-L2* (локус 9p24.1) и *CIITA* (локус 16p13.13) методом ПЦР и состоит из:

– пула олигонуклеотидных пар праймеров:

TTAT9-F: 5'- GGCATCTGCTTTGACCATGA -3',

TTAT9-R: 5'-FAM-AGTAGTGAGCCGAGATCTTG -3',

GT9-F: 5'- TCCATGTTGCCACAAATGACA -3',

GT9-R: 5'- FAM-GAGGCTGTGGGTGGGACGAT -3',

CA16-F: 5'- FAM-TGCATTGTTGCATCCAGCCT -3',

CA16-R: 5'- CATAACCACGCACGCACCCT -3',

GT16-F: 5'- FAM-CCAGCCCAGCACTGTGACCT -3',

GT16-R: 5'- CCTGGTCAAAAAACATGCCA-3',

разделенного на 4 смеси пар праймеров: 1 смесь – TTAT9, 2 смесь- GT9, 3 смесь – CA16, 4 смесь – GT16;

– реактивов для проведения ПЦР: 10х ПЦР-Буфер, смесь dNTP, раствор $MgCl_2$, Taq-полимераза, деионизированная вода.

Заявленный способ предназначен для выявления неблагоприятного течения ПМВКЛ у пациента по наличию геномной нестабильности в регионах генов *PD-L1/PD-L2* и *CIITA* с помощью заявленной тест-системы и включает следующие этапы:

– сбор и подготовку парных образцов опухоли и контрольной ткани;

– выделение ДНК;

– проведение мультиплексной ПЦР с помощью указанной тест-системы для каждого образца при условиях, исключающих вероятность взаимного отжига и образования димеров и с учетом лучшей визуализации отдельных ПЦР-продуктов:

первичная денатурация 95°C 2 минуты,

28 циклов денатурации при 96°C 10 секунд, отжига при 58°C 30 секунд,

элонгации при 72°C 30 секунд,

заключительная элонгация при 68°C 10 минут;

- смешивание продуктов амплификации в разведении 1:60-100 с формамидом в соотношении 1:3 и денатурирование при 95°C в течение 3 минут;

- фрагментный анализ на основе капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе;

– анализ полученных данных: наличие геномной нестабильности в регионах генов *PD-L1/PD-L2* и *CIITA* 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 выявляетнеблагоприятное течение ПМВКЛ у пациента.

В качестве образца опухолевой ткани допустимо использование фрагментов опухолевого биоптата, срезов с парафиновых блоков с последующей депарафинизацией, а также клеток периферической крови или аспирата костного мозга в случае вовлечения их в опухолевый процесс. В качестве парного нормального образца используют клетки периферической крови того же пациента, а в случае лейкемизации - клетки буккального эпителия.

К локусам 9p24.1 (TTAT9 и GT9) и 16p13.13 (CA16 и GT16) были подобраны оригинальные специфичные пары олигонуклеотидов, ранее не описанные в литературе. В таблице 1 представлены данные о праймерах и анализируемых STR.

Таблица 1.Состав и характеристика праймеров к локусам 9p24.1 (GT9 и TTAT9) и 16p13.13 (CA16 и GT16), включенных в исследование.

Набор праймеров	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')	Гетерозиготность, %	Длина ПЦР-продукта, п.н.
TTAT9	GGCATCTGCTTTGACCATGA (SEQ ID NO: 1)	FAM-AGTAGTGAGCCGAGATCTTG (SEQ ID NO: 2)	73,6	222-226
GT9	TCCATGTTGCCACAAATGACA (SEQ ID NO: 3)	FAM-GAGGCTGTGGGTGGGACGAT (SEQ ID NO: 4)	60,5	230-240
CA16	FAM-TGCATTGTTGCATCCAGCCT (SEQ ID NO: 5)	CATAACCACGCACGCACCCT (SEQ ID NO: 6)	81,6	171-181
GT16	FAM-CCAGCCCAGCACTGTGACCT (SEQ ID NO: 7)	CCTGGTCAAAAAACATGCCA (SEQ ID NO: 8)	68,4	490-500

Состав тест-системы:

1) пары прямого и обратного праймеров к 4 микросателлитным маркерам соответственно 4 реакционным смесям

1 пара - локус TTAT9 (прямой праймер SEQ ID NO: 1, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 2, меченный FAM, 10 пмоль/л);

2 пара - локус GT9 (прямой праймер SEQ ID NO: 3, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 4, меченный FAM, 10 пмоль/л).

3 пара - локус CA16 (прямой праймер SEQ ID NO: 5, меченный FAM, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 6, 10 пмоль/л);

4 пара - локус GT16 (прямой праймер SEQ ID NO: 7, меченный FAM, 10 пмоль/мкл; обратный праймер SEQ ID NO: 8, 10 пмоль/л).

Каждой паре соответствует одна пробирка со смесью праймеров, которую подготавливают путем смешивания стоков синтезированных олигонуклеотидов в приведенных концентрациях, обеспечивающих наиболее благоприятные условия проведения ПЦР. Объем каждой готовой смеси пар праймеров, необходимой для анализа одного образца, - 2 мкл.

2) Реактивы для проведения мультиплексной ПЦР:

- 10х ПЦР-Буфер в пробирках по 500 мкл из расчета 1 пробирка на 200 реакций;
- смесь dNTP (концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата 25 мМ) в пробирках по 500 мкл из расчета 1 пробирка на 200 реакций;
- 25 мМ раствор $MgCl_2$ в пробирках по 500 мкл из расчета 1 пробирка на 300 реакций;
- Taq-полимераза 5 ед./мкл в пробирках по 1000 мкл из расчета 1 пробирка на 4000 реакций;
- деионизированная вода во флаконах по 50 мл из расчета 1 флакон на 3400 реакций.

Особенность заявляемого способа заключается в том, что определяют изменения совокупности 4 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 4 реакционных смесях методом ПЦР.

Заявляемый способ осуществляется согласно описанной далее методике.

1. Подготовка материалов и компонентов

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

- фрагмент опухолевого биоптата (объемом не менее 0,5 $мм^3$);

- 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;

- клетки периферической крови или аспирата костного мозга при доказанном иными методами наличия лейкемизации или вовлечения в опухолевый процесс костного мозга (10 мл в пробирке с раствором ЭДТА).

Доля опухолевых клеток от общей клеточности образца должна быть не менее 30%, что определено чувствительностью молекулярного исследования.

В качестве отрицательного контроля используют внесение в состав реакционной смеси ПЦР деионизированный 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°С без использования криоконсерванта.

2. Выделение ДНК из опухолевой ткани биоптатов и депарафинизированных срезов. Подготовку проводят по изложенной ранее методике (Sidorova J.V. et al. 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), p. 57–60, DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01375). 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:

– 2,5 мкл 10х буфера (ПЦР-Буфер);

– 2,5 мкл смеси dNTP (концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата 25 мМ);

– 1,5 мкл 25 мМ раствора $MgCl_2$;

– не менее 20 нг геномной ДНК (в среднем в объеме водного раствора от 2 мкл до 5 мкл);

– 2 мкл одной из 4 смеси пар праймеров;

– 2,5 ед. Taq-полимеразы;

– деионизированная вода до общего объема реакционной смеси 25 мкл.

3. Постановка реакции

ПЦР проводят при следующих условиях:

– первичная денатурация 95°С 2 минуты;

– 28 циклов денатурации при 96°С 10 секунд, отжига при 58°С 30 секунд,

– элонгации при 72°С 30 секунд;

– заключительная элонгация при 68°С 10 минут.

4. Учет результатов

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

5. Интерпретация результатов

Наличие геномной нестабильности в локусах 9p24.1 и 16p13.13 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.

На рисунках 2-7 отображены электрофореграммы, полученные при анализе исследуемых маркеров. Наличие геномной нестабильности в регионах генов *PD-L1/PD-L2* (9p24.1)и *CIITA* (16p13.13) у пациента с ПМВКЛ подтверждает иммунопривилегированный статус и, потенциально, свидетельствует о неблагоприятном прогнозе ПМВКЛ.

Сущность группы изобретений пояснена клиническими примерами:

Клинический пример 1. Пациентка В. Диагноз: ПМВКЛ, 6 курсов химиотерапии 1 линии (R-DA-EPOCH), прогрессия, химиотерапия 2 линии с включением иммунотерапии (Nivo-Dexa-Beam №2), полная ремиссия более 7 месяцев. СЦИ в дебюте заболевания не было выполнено в связи с отсутствием достаточного количества опухолевых клеток. На Рис. 2 и 5 представлены результаты исследования панели микросателлитных локусов 9p24.1 и 16p13.13 в контрольном и опухолевом образцах пациентки В., а также примеры электрофореграмм отдельных локусов. По двум микросателлитным локусам (TTAT9, GT16) в опухолевой ткани отмечена утрата одного из аллелей, что свидетельствует о наличии геномной нестабильности. По данным СЦИ биоптата опухоли, взятого при прогрессии: анализ затруднен в связи с единичными митозами низкого качества, был выявлен клон гипердиплоидным набором хромосом и комплексными перестройками кариотипа: дополнительными хромосомами 12,18,9,4, дериватами хромосом 9,16, маркерными хромосомами (47-50, XX,?+4,+9, der(9), ?+12, der(16)x2,?+18,+1-2mar, inc[cp5]/46,XX[3]). Мутация в гене *TP53* не была обнаружена ни в дебюте заболевания, ни в прогрессии. В рассмотренном примере молекулярное исследование выявило геномную нестабильность по всем анализируемым маркерам, указывающим на иммунологическую толерантность, в дальнейшем у пациентки достигнута полная ремиссия после иммунотерапии. Проведенный анализ микросателлитного профиля подтвердил неблагоприятный прогноз течения заболевания.

Клинический пример 2. Пациент Е. ПМВКЛ, 4 курса высокодозной химиотерапии 1 линии (Rm-NHL-BFM-90), прогрессия заболевания, химиотерапия 2 линии (R-GIDOX№1), смерть в результате рефрактерного течения заболевания. На Рис. 3 и 7 представлены результаты исследования панели микросателлитных локусов в контрольном и опухолевом образцах пациента Е. По двум микросателлитным локусам (GT9, CA16) в опухолевой ткани отмечена утрата одного из аллелей, что свидетельствует о наличии геномной нестабильности.

В связи с отсутствием митозов в биоптате опухоли СЦИ не было выполнено. В

практическом отношении у данного пациента с геномной нестабильностью в локусах, указывающих на иммунологическую толерантность, опухолевый клон оказался не чувствительным к проводимой высокодозной химиотерапии. Проведенный анализ микросателлитного профиля подтвердил неблагоприятный прогноз течения ПМВКЛ.

Клинический пример 3. Пациентка Б. ПМВКЛ, 6 курсов химиотерапии 1 линии (R-DA-EPOCH), полная ремиссия более 24 месяцев. На Рис. 4 и 6 представлены результаты исследования панели микросателлитных локусов в контрольном и опухолевом образцах пациентки Б. У данной пациентки при исследовании микросателлитного профиля не были выявлены аберрации микросателлитных повторов локусов 9p24.1 и 16p13.13, что предполагает благоприятный прогноз заболевания. Данная пациентка находится в длительной полной ремиссии.

Таким образом, проведенные авторами исследования позволили определить набор олигонуклеотидных праймеров, разработать диагностическую тест-систему для выявления геномной нестабильности в локусах 9p24.1 и 16p13.13 опухолевой ДНК и способ выявления пациентов с возможным риском неблагоприятного течения ПМВКЛ, что реализуется путем выполнения мультиплексной ПЦР с набором пар олигонуклеотидных праймеров для амплификации локусов 9p24.1 и 16p13.13 и последующего фрагментного анализа ПЦР-продуктов. Требуется расширение исследования для уточнения неблагоприятного прогноза ПМВКЛ, выполнение исследования в группе больных ПМВКЛ, получивших иммунотерапию в первой линии и оценки эффективности иммунотерапии у больных с геномной нестабильностью в анализируемых локусах.

Перечень последовательностей:

1. SEQ ID NO: 1 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу TTAT9:

GGCATCTGCTTTGACCATGA

2. SEQ ID NO: 2 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу TTAT9

FAM-AGTAGTGAGCCGAGATCTTG

3. SEQ ID NO: 3 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу GT9

TCCATGTTGCCACAAATGACA

4. SEQ ID NO: 4 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу GT9

FAM-GAGGCTGTGGGTGGGACGAT

5. SEQ ID NO: 5 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу CA16

FAM-TGCATTGTTGCATCCAGCCT

6. SEQ ID NO: 6 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу CA16

CATAACCACGCACGCACCCT

7. SEQ ID NO: 7 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, прямой праймер к локусу GT16

FAM-CCAGCCCAGCACTGTGACCT

8. SEQ ID NO: 8 последовательность нуклеотидов ДНК Homo sapiens, обратный праймер к локусу GT16

CCTGGTCAAAAAACATGCCA

<?xml version="1.0" encoding="ISO-8859-1"?>

<!DOCTYPE ST26SequenceListing SYSTEM "ST26SequenceListing_V1_3.dtd"
PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN">
<ST26SequenceListing productionDate="2025-01-21"
softwareVersion="2.3.0" softwareName="WIPO Sequence"
fileName="Перечень последовательностей.xml" dtdVersion="V1_3"
originalFreeTextLanguageCode="ru">
<ApplicationIdentification>
<IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
<ApplicationNumberText/>
<FilingDate/>
</ApplicationIdentification>
<ApplicantFileReference>1</ApplicantFileReference>
<ApplicantName languageCode="ru">Федеральное государственное
бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский
центр гематологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации,
RU</ApplicantName>
<ApplicantNameLatin>Federal State Budgetary Institution "National
Medical Rasearch Center of Hematology" of the Ministry of Healthcare
of the Russion Federation</ApplicantNameLatin>
<InventionTitle languageCode="ru">Тест-система и способ выявления
геномной нестабильности локусов 9p24.1 и 16p13.13 при первичной
медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфоме</InventionTitle>
<SequenceTotalQuantity>8</SequenceTotalQuantity>
<SequenceData sequenceIDNumber="1">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q17">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ggcatctgctttgaccatga</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">

<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q18">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>agtagtgagccgagatcttg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>21</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..21</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q6">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tccatgttgccacaaatgaca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">

<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q8">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>gaggctgtgggtgggacgat</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>tgcattgttgcatccagcct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">

<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q19">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cataaccacgcacgcaccct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q14">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ccagcccagcactgtgacct</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">

```
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>Homo sapiens</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cctggtcaaaaaacatgcca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```


(57) Формула изобретения

1. Тест-система для определения геномной нестабильности в регионах генов PD-L1/PD-L2 локус 9p24.1 и CIITA локус 16p13.13 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), состоящая из:

пула олигонуклеотидных пар праймеров

TTAT9-F: 5'- GGCATCTGCTTTGACCATGA -3',

TTAT9-R: 5'- FAM-AGTAGTGAGCCGAGATCTTG -3',

GT9-F: 5'- TCCATGTTGCCACAAATGACA -3',

GT9-R: 5'- FAM-GAGGCTGTGGGTGGGACGAT -3',

CA16-F: 5'- FAM-TGCATTGTTGCATCCAGCCT -3',

CA16-R: 5'- CATAACCACGCACGCACCCT -3',

GT16-F: 5'- FAM-CCAGCCCAGCACTGTGACCT -3',

GT16-R: 5'- CCTGGTCAAAAAACATGCCA -3',

разделенного на 4 смеси пар праймеров: 1 смесь - TTAT9, 2 смесь - GT9, 3 смесь - CA16, 4 смесь - GT16;

реактивов для проведения ПЦР: 10х ПЦР-буфер, смесь dNTP, раствор $MgCl_2$, Taq-полимераза, деионизированная вода.

2. Способ выявления неблагоприятного течения первичной медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ) у пациента по наличию геномной нестабильности в регионах генов PD-L1/PD-L2 и CIITA с помощью тест-системы по п. 1, включающий следующие этапы:

сбор и подготовку парных образцов опухоли и контрольной ткани;

выделение ДНК;

проведение мультиплексной ПЦР с помощью тест-системы по п. 1 для каждого образца при условиях, исключающих вероятность взаимного отжига и образования димеров, и с учетом лучшей визуализации отдельных ПЦР-продуктов:

первичная денатурация 95°С 2 минуты,

28 циклов денатурации при 96°С 10 секунд, отжига при 58°С 30 секунд,

элонгации при 72°С 30 секунд,

заключительная элонгация при 68°С 10 минут;

смешивание продуктов амплификации в разведении 1:60-100 с формамидом в соотношении 1:3 и денатурирование при 95°С в течение 3 минут;

фрагментный анализ на основе капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе;

анализ полученных данных: наличие геномной нестабильности в регионах генов PD-L1/PD-L и CIITA 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 выявляет неблагоприятное течение ПМВКЛ у пациента.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что в качестве образца опухолевой ткани допустимо использование фрагментов опухолевого биоптата, срезов с парафиновых блоков с последующей депарафинизацией, а также клеток периферической крови или аспирата костного мозга в случае вовлечения их в опухолевый процесс.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что в качестве парного нормального образца используют клетки периферической крови того же пациента, а в случае лейкемизации - клетки буккального эпителия.

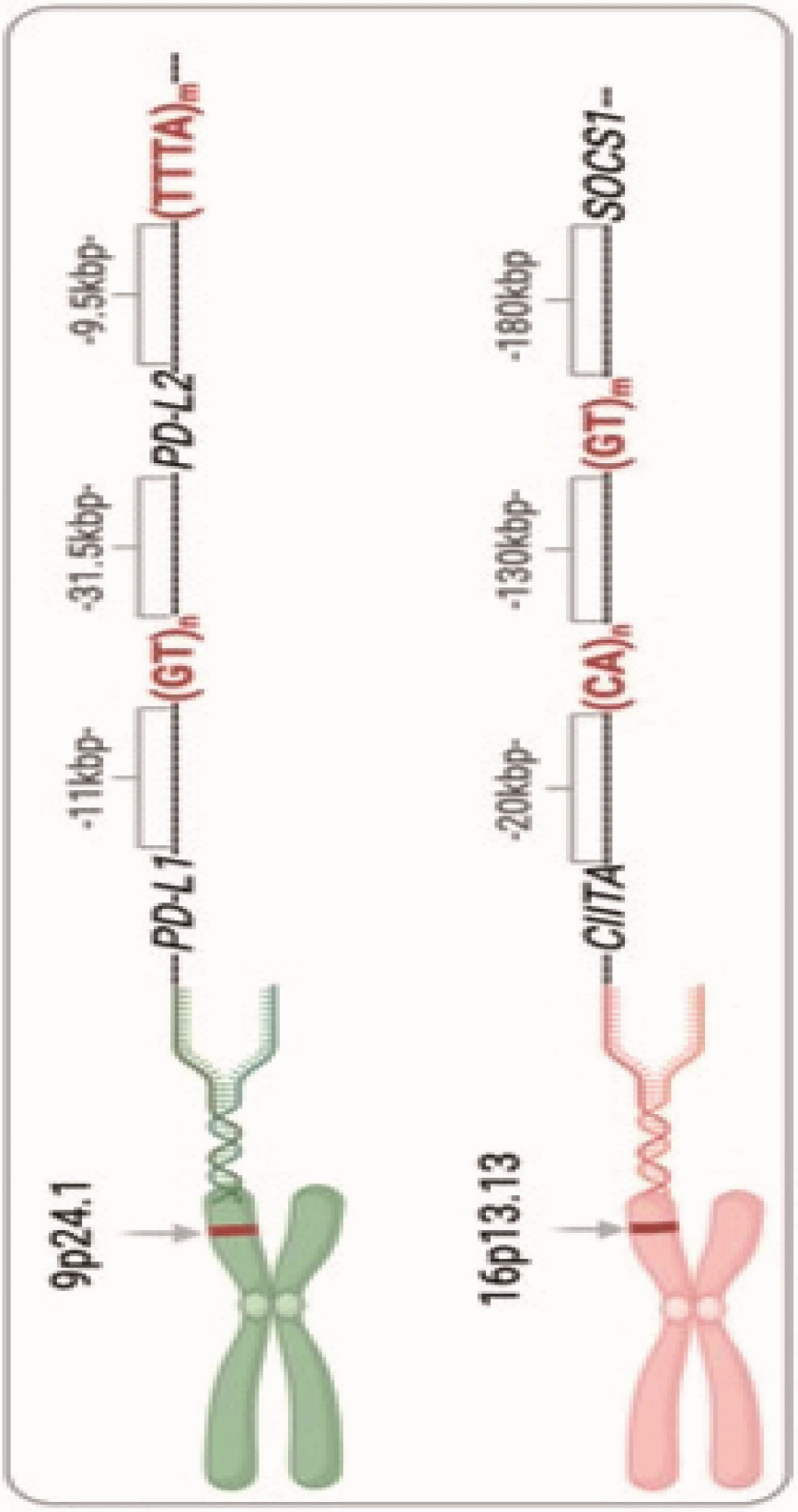


Рис. 1. Хромосомная локализация исследуемых молекулярных маркеров.

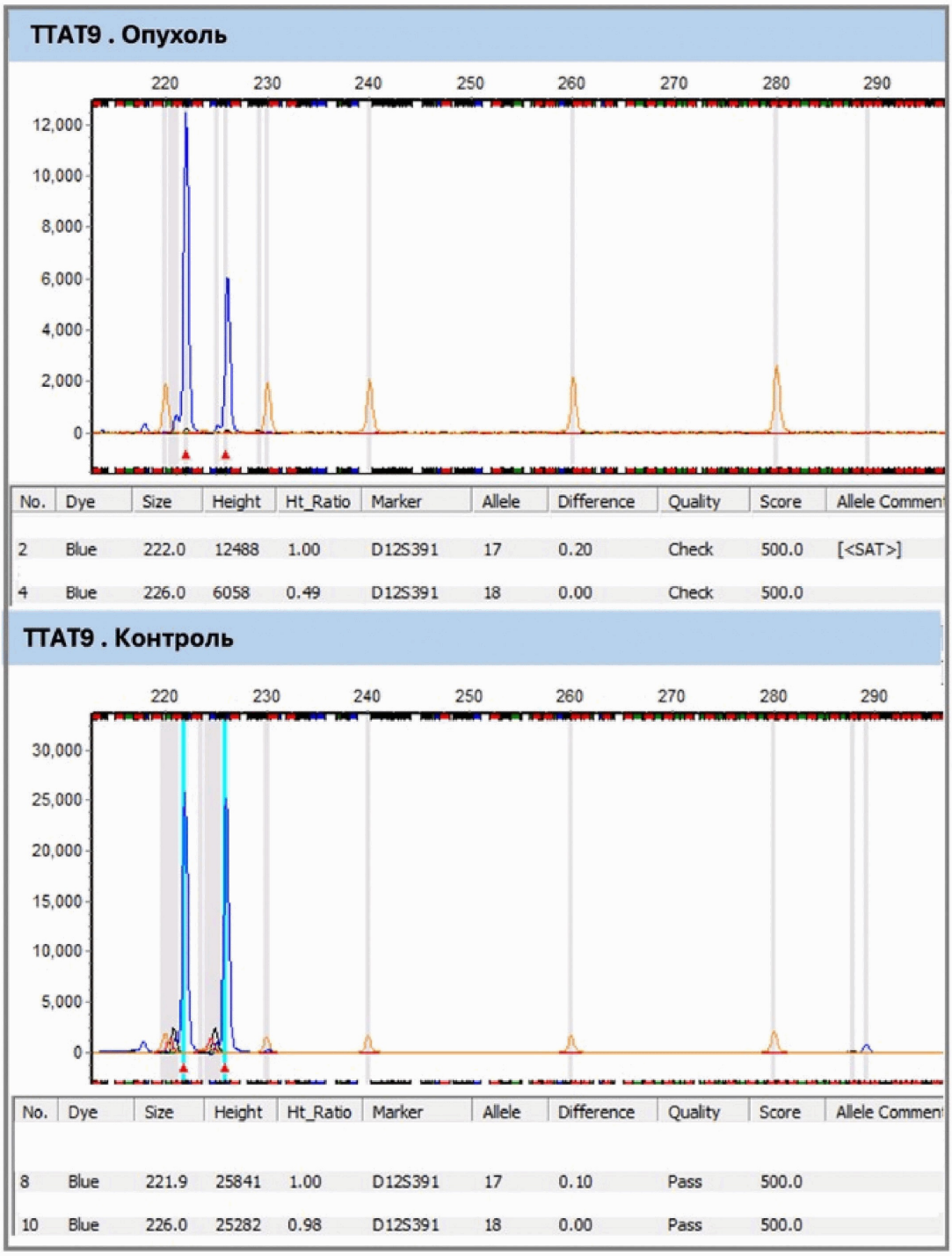
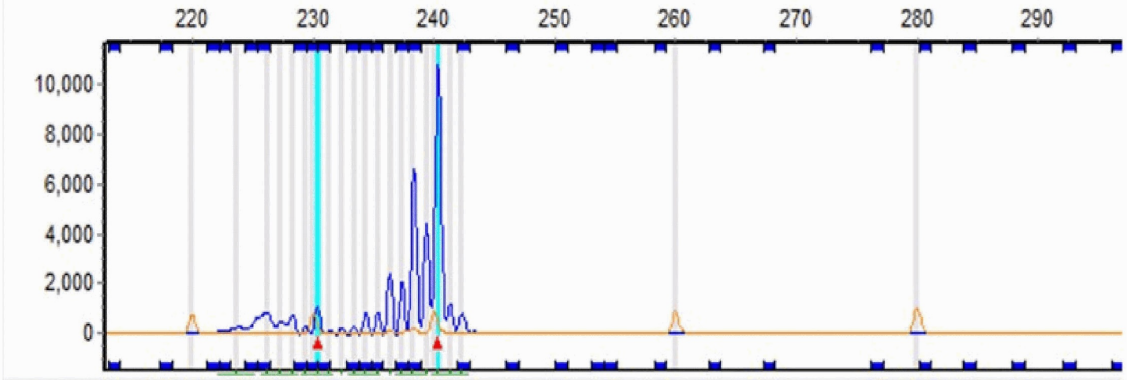

TTAT9 . Опухоль
220 230 240 250 260 270 280 290
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
No. Dye Size Height Ht_Ratio Marker Allele Difference Quality Score Allele Comment
2 Blue 222.0 12488 1.00 D12S391 17 0.20 Check 500.0 [<SAT>]
4 Blue 226.0 6058 0.49 D12S391 18 0.00 Check 500.0
TTAT9 . Контроль
220 230 240 250 260 270 280 290
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
No. Dye Size Height Ht_Ratio Marker Allele Difference Quality Score Allele Comment
8 Blue 221.9 25841 1.00 D12S391 17 0.10 Pass 500.0
10 Blue 226.0 25282 0.98 D12S391 18 0.00 Pass 500.0

Рис. 2

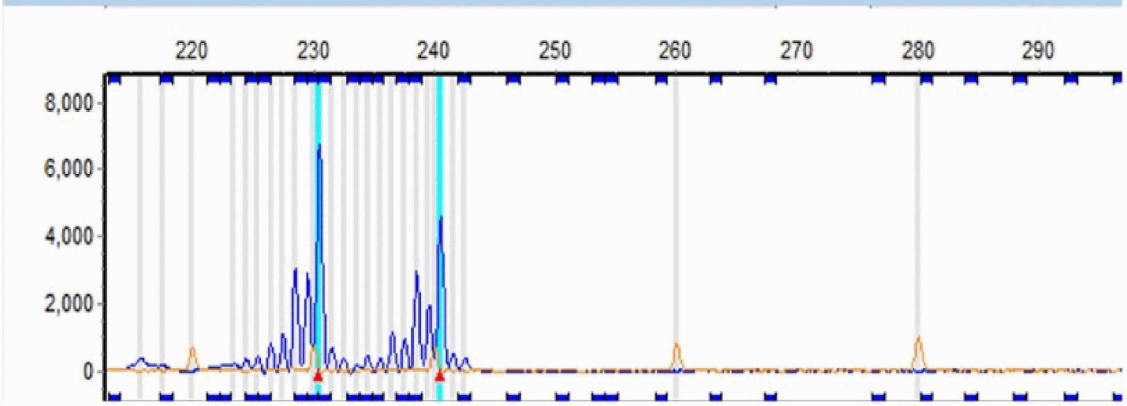
3

GT9 . Опухоль



No.	Dye	Size	Height	Ht_Ratio	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Allele Comment
8	Blue	230.4	1079	0.10	D12S391	19	0.40	Check	237.7	
18	Blue	240.3	10731	1.00	D12S391	OB	1.80	Undete...	500.0	

GT9 . Контроль



No.	Dye	Size	Height	Ht_Ratio	Marker	Allele	Difference	Quality	Score	Allele Comment
9	Blue	230.5	6768	1.00	D12S391	19	0.50	Check	500.0	
19	Blue	240.5	4562	0.67	D12S391	OB	2.00	Undete...	500.0	[<SAT (Repaire

Рис. 3

4

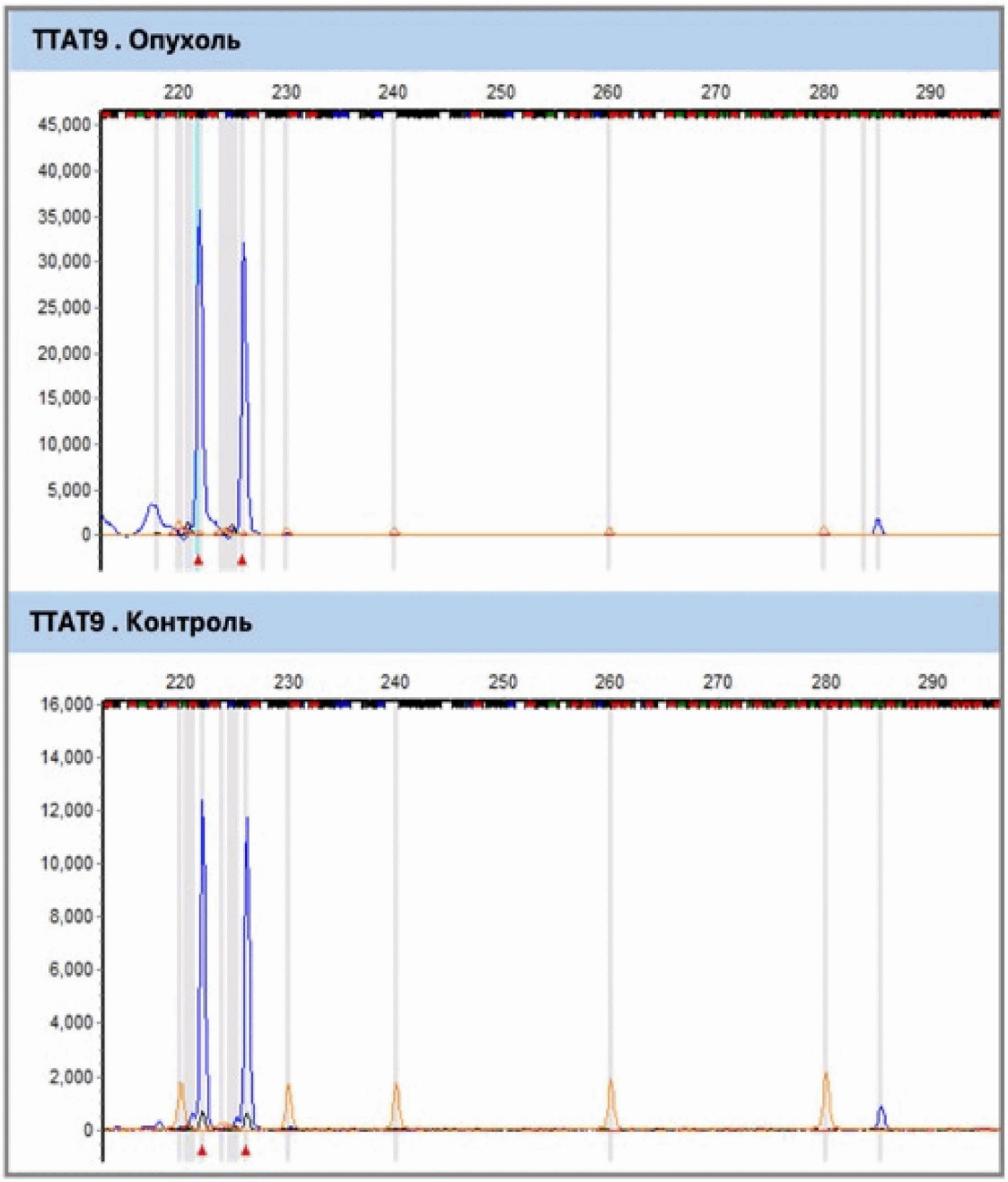

TTAT9 . Опухоль
220
230
240
250
260
270
280
290
45,000
40,000
35,000
30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0
TTAT9 . Контроль
220
230
240
250
260
270
280
290
16,000
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0

Рис. 4

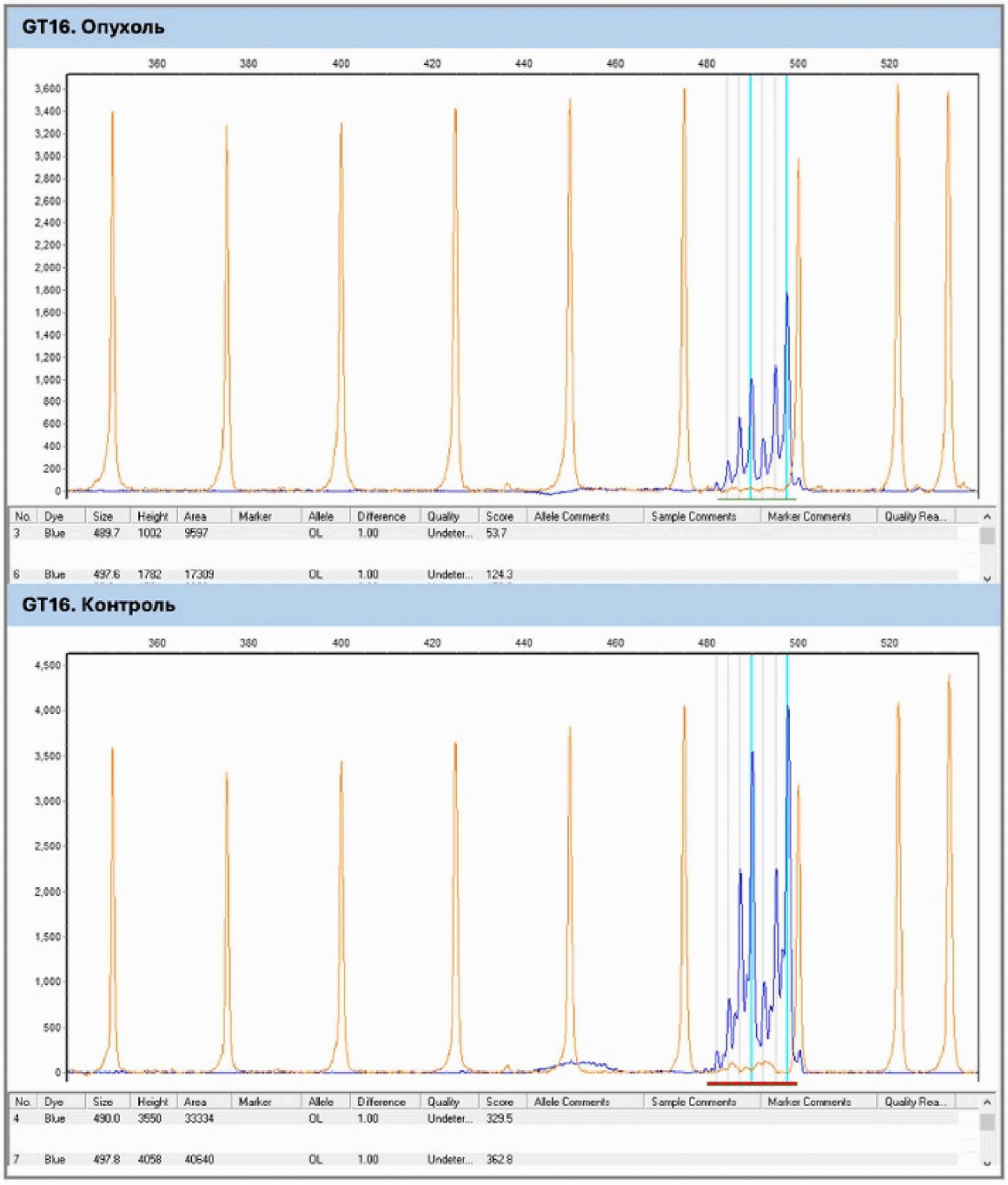

GT16. Опухоль
360 380 400 420 440 460 480 500 520
3,600 3,400 3,200 3,000 2,800 2,600 2,400 2,200 2,000 1,800 1,600 1,400 1,200 1,000 800 600 400 200 0
No. Dye Size Height Area Marker Allele Difference Quality Score Allele Comments Sample Comments Marker Comments Quality Rea...
3 Blue 489.7 1002 9597 OL 1.00 Undeter... 53.7
6 Blue 497.6 1782 17309 OL 1.00 Undeter... 124.3
GT16. Контроль
360 380 400 420 440 460 480 500 520
4,500 4,000 3,500 3,000 2,500 2,000 1,500 1,000 500 0
No. Dye Size Height Area Marker Allele Difference Quality Score Allele Comments Sample Comments Marker Comments Quality Rea...
4 Blue 490.0 3550 33334 OL 1.00 Undeter... 329.5
7 Blue 497.8 4058 40640 OL 1.00 Undeter... 362.8

Рис. 5

6

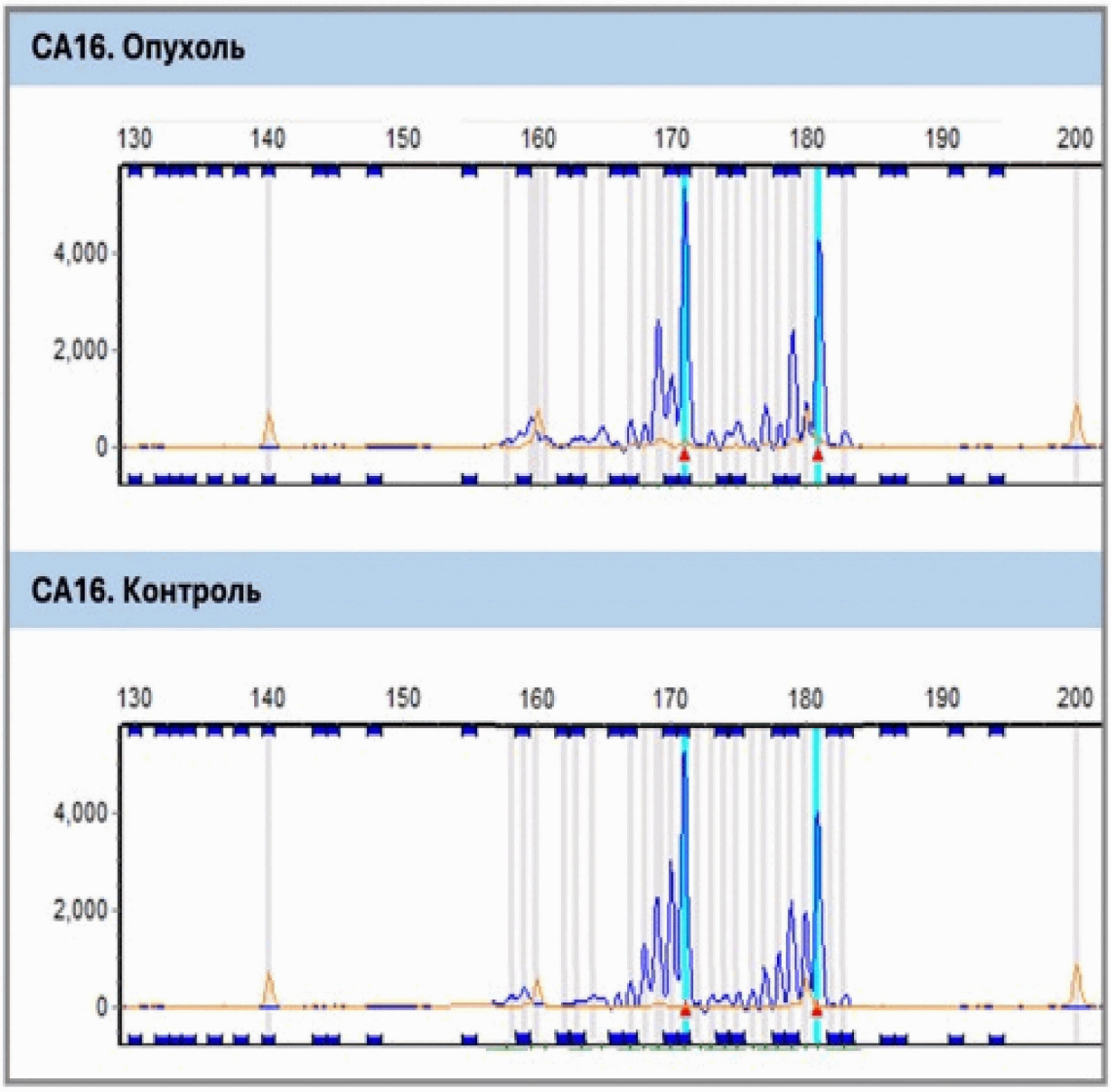
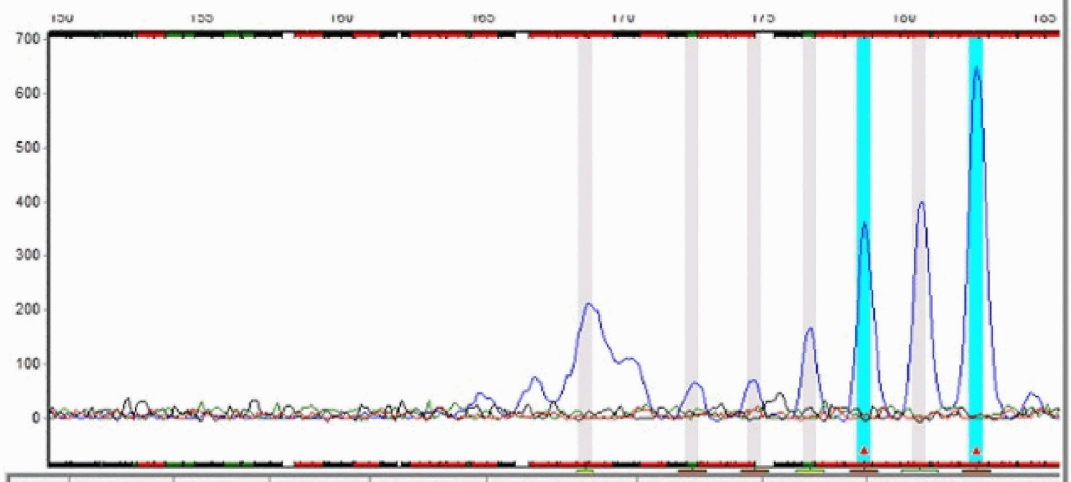

CA16. Опухоль
130
140
150
160
170
180
190
200
4,000
2,000
0
CA16. Контроль
130
140
150
160
170
180
190
200
4,000
2,000
0

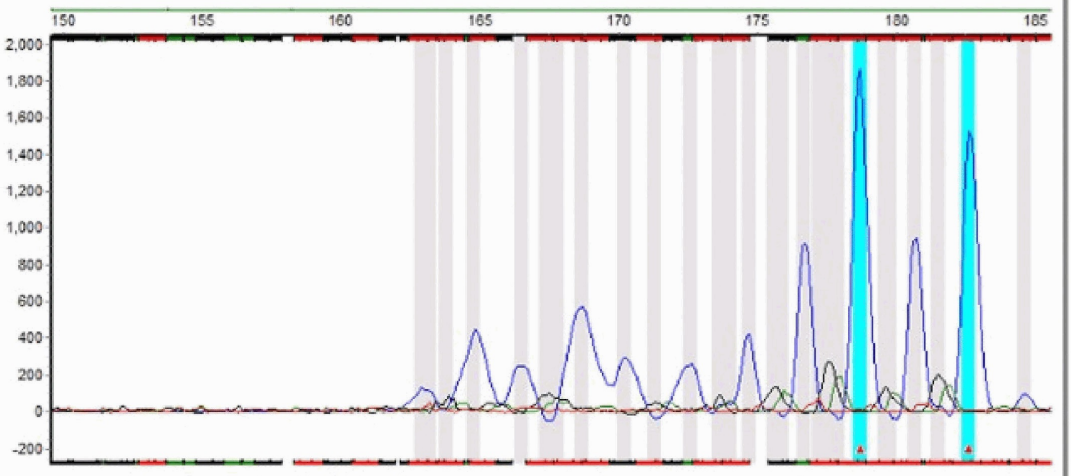
Рис. 6

CA16. Опухоль



No.	Dye	Size	Height	Ht_Ratio	Difference	Quality	Score	Sample Comments
5	Blue	178.6	361	0.55	1.30	Undete...	31.8	
7	Blue	182.6	651	1.00	1.20	Undete...	73.0	

CA16. Контроль



No.	Dye	Size	Height	Ht_Ratio	Difference	Quality	Score	Sample Comments
9	Blue	178.7	1868	1.00	1.40	Undete...	436.3	
11	Blue	182.6	1529	0.82	1.20	Undete...	339.8	

Рис. 7