

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043879**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.30

(21) Номер заявки
202100132

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(51) Int. Cl. **C12Q 1/683** (2018.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИИ p.L265P В ГЕНЕ MYD88**(31) **2020138892**(32) **2020.11.25**(33) **RU**(43) **2022.05.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ
"НОВОСИБИРСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ"
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО НГМУ МИНЗДРАВА
РОССИИ); ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК" (ИЦиГ СО РАН)
(RU)**

(72) Изобретатель:

**Воропаева Елена Николаевна,
Поспелова Татьяна Ивановна,
Максимов Владимир Николаевич,
Воевода Михаил Иванович, Агеева
Татьяна Августовна, Гуражева Анна
Александровна, Иванова Анастасия
Андреевна, Мельникова Елизавета
Сергеевна, Чуркина Мария Игоревна,
Карпова Виктория Сергеевна (RU)**

(56) ARGENTOU N., et al. "Rapid detection of MYD88-L265P mutation by PCR-RFLP in B-cell lymphoproliferative disorders", LEUKEMIA, 2014, 28(2): 447-449, фиг. 1, с. 447-448
WO-A2-2013006443
US-A1-2016289752

DATABASE, GenBank: KU886048.1, 2016-06-27, Найдено в Интернет: < [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU886048.1?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=R2XMAUF001N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU886048.1?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=1&RID=R2XMAUF001N) > [найдено 2021-10-21]
PETRONZIO THERESA, SCHILDKRAUT IRA, "Altered specificity of restriction endonuclease HinfI", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1990, 18(12): 3666, весь документ

SHEKHAR RAJA et al. "Frequency of MYD88 L265P mutation and its correlation with clinicohematological profile in mature B-cell neoplasm", HEMATOLOGY/ONCOLOGY AND STEM CELL THERAPY, 2021 (available online 13 November 2020), 14(3): 231-239, раздел "Materials and methods", фиг. 1
WO-A1-2017004599

JIMÉNEZ C. et al. "Detection of MYD88 L265P mutation by real-time allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction", APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY, 2014, 22(10): 768-773, реферат

(57) Изобретение относится к области медицинской генетики, молекулярной биологии и может быть использовано в онкологии и гематологии для быстрого выявления рекуррентной мутации p.L265P в гене MYD88 на стандартном оборудовании в широкой клинической практике. Из взятого у пациента образца выделяют ДНК с помощью фланкирующих область расположения мутации p.L265P праймеров прямого (5'-GТАСТТАGATGGGGGATGGCTGTTG-3') и обратного (5'-АТТGCСТТGТАСТТGATGGGGATG-3'), осуществляют ПЦР-амплификацию участка гена MYD88, потенциально содержащего мутацию p.L265P, полученный ампликон обрабатывают эндонуклеазой рестрикции HinfI, проводят электрофорез продуктов рестрикции и при выявлении аллелей длиной 148; 148, 124 и 24 п.н.; 124 и 24 п.н. диагностируют соответственно мутацию p.L265P в

B1**043879****043879****B1**

гомозиготном, гетерозиготном состоянии и ее отсутствие. Способ применим на свежесобранном, замороженном биоматериале, FFPE-образцах, в т.ч. архивных, большая часть фрагментов ДНК которых имеет длину около 200 п.н. Способ более чувствителен по сравнению с известным способом ПЦР-ПДРФ анализа FFPE-образцов; является простым, выполняется в течение 2 дней на доступном в клинической практике оборудовании.

043879 B1

043879 B1

Изобретение относится к медицинской генетике, молекулярной биологии и может быть использовано в онкологии и гематологии для быстрого выявления рекуррентной мутации p.L265P в гене MYD88 на стандартном оборудовании в широкой клинической практике.

Ген MYD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) кодирует белок MYD88 и расположен на хромосоме 3p22.2. Это универсальный адаптерный цитоплазматический растворимый белок, через который во время нормального врожденного иммунного ответа сигналы передаются с большинства Toll-подобных рецепторов (TLR) и рецепторов IL-1 и IL-18 внутрь клетки. Стимуляция TLRs активирует сигнальные пути NF- κ B и митоген-активированной протеинкиназы, а также защищает клетки от спонтанного апоптоза (M. Jiang, J. Li, J. Zhou, C. Xing, J.-J. X, F. Guo. High-resolution melting analysis for rapid and sensitive MYD88 screening in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology letters*. 2019. 18:814-821).

Белок MYD88 координирует сборку мультисубъединичного сигнального комплекса, включающего киназы IRAK1 и IRAK4, также активирующего путь NF- κ B (A. Pham-Ledard, D. Cappellen, F. Martinez, B. Vergier, M. Beylot-Barry, J.-P. Merlio. MYD88 Somatic Mutation Is a Genetic Feature of Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132, 2118-2120).

В настоящее время известно, что мутации гена MYD88 имеют более 2140 упоминаний в базе данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer version 91 (COSMIC v.91) (<https://cancer.sanger.ac.uk>). При этом более 1900 случаев составляет рекуррентная мутация c.818T>C, p.L273P NM_001172567 (Mutation ID COSV57169334), также называемая c.794T>C, p.L265P NM_002468.5.

Мутация MYD88 p.L265P приводит к однонуклеотидной замене T>C в 5-ом экзоне гена, что приводит к замене аминокислоты лейцин на пролин (p.L265P) в Toll/IL-1R (TIR) домене белка. Данный домен необходим для гомотипической и гетеротипической мультимеризации молекул белка MYD88 при связывании с цитоплазматическим хвостом TLR. Мутация MYD88 p.L265P вызывает аллостерические изменения в TIR домене белка MYD88 и приводит к спонтанному связыванию с цитоплазматическим хвостом TLR, а также способствует спонтанному образованию сигнального комплекса MYD88-IRAK (M. Jiang, J. Li, J. Zhou, C. Xing, J.-J. X, F. Guo. High-resolution melting analysis for rapid and sensitive MYD88 screening in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology letters*. 2019. 18: 814-821.), что приводит к повышенной активности NF- κ B. NF- κ B не только активирует транскрипцию генов, участвующих в выживании и пролиферации клеток, но и приводит к аутокринной сигнализации с помощью IL-6 и IL-10, также способствующей выживанию и росту опухолевых клеток (R.A.L. deGroen, A.M.R. Schrader, M.J. Kersten, S.T. Pals, J.S.P. Vermaat. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica*. 2019. V.104 (12): 2337-2348).

Практически все из более, чем 1900 случаев обнаружения MYD88 p.L265P, приходится на гематологические злокачественные новообразования. Единичные случаи выявления данной мутации описаны при опухолях легких - 4 упоминания, а также брюшины, толстого кишечника, простаты, слюнных желез, щитовидной железы, мочевыводящего тракта - по 1 упоминанию.

Этот факт важен для дифференциальной диагностики опухолей с локализацией в центральной нервной системе (ЦНС). В настоящее время биопсия головного мозга считается золотым стандартом диагностики лимфомы (гематологическая опухоль) ЦНС. Однако биопсия является инвазивной процедурой, несет в себе риск тяжелых осложнений и может задержать начало системной терапии опухоли. В то же время ни в одном из исследованных в настоящее время образцов глиом мутация MYD88 p.L265P не была обнаружена (T. Nakamura, K. Tateishi, T. Niwa, Y. Matsushita, K. Tamura, M. Kinoshita, K. Tanaka, S. Fukushima, H. Takami, H. Arita, A. Kubo, T. Shuto, M. Ohno, Y. Miyakita, S. Kocialkowski, T. Sasayama, N. Hashimoto, T. Maehara, S. Shibui, T. Ushijima, N. Kawahara, Y. Narita, K. Ichimura. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2016), 42, 279-290.), тогда как частота ее выявления при первичной лимфоме ЦНС составляет до 85% (MYD88 p. (L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *British Journal of Haematology*, 2019, 185, 940-1007).

Обнаружение мутации MYD88 p.L265P в спинномозговой жидкости, полученной при люмбальной пункции, будет свидетельствовать о поражении головного мозга лимфомой. Такое тестирование минимально инвазивно (Zorofchian S., Lu G., Zhu J.-J., Duose D.Y., Windham J., Esquenazi Y., Ballester L.Y. Detection of the MYD88 p.L265P Mutation in the CSF of a Patient With Secondary Central Nervous System Lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 2018. V. 8: 382).

Наличие мутации MYD88 p.L265P является также важным дифференциально-диагностическим признаком, помогающим отличить варианты гематологических опухолей, имеющих схожие/перекрывающиеся клинические проявления и патоморфологическую картину, но имеющие различные подходы к терапии и прогноз - например, отличить макроглобулинемию Вальденстрема (мутация встречается практически при всех случаях данного заболевания) от множественной миеломы, лимфомы маргинальной зоны и других Ig-секретирующих мелкоклеточных лимфом, для которых мутация не характерна [Schirico M.L., Ferrante M., Dogliotti I., Zamò A., Ferrero B., Bertuzzo D., Benevolo G., Omedè P., Cavallo F., Ladetto M., Boccadoro M., Drandi D., Ferrero S.. Droplet Digital PCR Assay for MYD88 L265P: Clinical Applications in Waldenström Macroglobulinemia. *HemaSphere*, 2020;4:1].

Высокая частота (до 78%) мутации MYD88 p.L265P при первично-кожных В-крупноклеточных лимфомах leg-типа также позволяет использовать ее обнаружение для дифференциальной диагностики

данной лимфомы и первичной кожной фолликулярной В-крупноклеточной лимфомы, первичной кожной лимфомы маргинальной зоны или вторичного поражения кожи при нодальных формах диффузной В-крупноклеточной лимфомы, при которых данная мутация практически не встречается (A. Pham-Ledard, D. Cappellen, F. Martinez, B. Vergier, M. Beylot-Barry, J.-P. Merlio. MYD88 Somatic Mutation Is a Genetic Feature of Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type. *Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132, 2118-2120).

Помимо дифференциально-диагностического значения обнаружение мутации MYD88 p.L265P служит предиктивным биомаркером ответа опухоли на терапию таргетным препаратом ибрутиниб (ингибитор Брутон-тирозинкиназы) (Schirico M.L., Ferrante M., Dogliotti I., Zamo A., Ferrero B., Bertuzzo D., Benvenuto G., Omede P., Cavallo F., Ladetto M., Boccadoro M., Drandi D., Ferrero S. Droplet Digital PCR Assay for MYD88 L265P: Clinical Applications in Waldenstrom Macroglobulinemia. *HemaSphere*, 2020;4:1).

В клинической практике основным материалом для определения наличия мутации MYD88 p.L265P являются зафиксированные формалином и залитые парафином FFPE-биоптаты опухолей (FFPE - formalin-fixed and paraffin-embedded). Формальдегид, эффективный компонент формалина, приводит к образованию поперечных сшивок между нитями ДНК и связей между нуклеиновыми кислотами и белками и вызывает фрагментацию нуклеиновых кислот в процессе фиксации. Это очень затрудняет амплификацию высокомолекулярной ДНК и блокирует амплификацию ДНК в ходе ПЦР. Фрагментация ДНК прогрессирует с увеличением срока хранения биоматериала.

Существуют и при необходимости используются в исследовательских лабораториях несколько методов извлечения ДНК из образцов FFPE, позволяющих получать ДНК с достаточным для исследования содержанием длинных фрагментов нуклеиновых кислот. Они трудоемки, требуют много времени и включают токсичные химические вещества, такие как ксилол и/или фенол. В клинической же практике используются коммерческие наборы для быстрого и эффективного выделения ДНК, которые обеспечивают получение высококачественной ДНК, пригодной для экспериментов по генотипированию с участием фрагментов ДНК, большая часть из которых имеет длину около 200 п.н. (J. Lin, S.H. Kennedy, T. Svavrovsky, J. Rogers, J.W. Kemnitz, A. Xu, K.T. Zondervana. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *AnalBiochem*. 2009 Dec 15; 395(2): 265-267).

На сегодняшний день известно несколько описанных ниже способов выявления мутации MYD88 p.L265P, основанных на анализе коротких фрагментов ДНК и пригодных для тестирования мутации в материале из образцов FFPE.

1. Способ анализа кривых плавления продуктов ПЦР высокого разрешения (HRM) (Wang C.Z., Lin J., Qian J., Shao R., Xue D., Qian W., et al. Development of high-resolution melting analysis for the detection of the MYD88 L265P mutation. *ClinBiochem* 2013; 46: 385-7).

Метод плавления с высоким разрешением (High Resolution Melts, HRM) основан на определении различий в кривых плавления (диссоциации) ампликонов ДНК, содержащих и не содержащих мутацию. HRM начинается с ПЦР-амплификации области ДНК, которая может нести мутацию MYD88 L265P (используются праймеры 5'-AGGTGCCCATCAGAAGC-3' и 5'-GGAACTCTTCTTCATTCGCTTGTA-3'). Амплификация идет в присутствии интеркалирующего красителя (SYTO® 9, EvaGreen®), который имеет высокую флуоресценцию при связывании с двухцепочечной ДНК и низкую флуоресценцию в свободном состоянии. В результате плавления двойная спираль ДНК диссоциирует с высвобождением интеркалирующего красителя и снижением уровня флуоресценции. Изменение уровня флуоресценции в зависимости от температуры отслеживается с помощью специального программного обеспечения и фиксируется в виде графиков, которые отличаются при наличии и отсутствии мутации в ампликоне. Эта разница может быть очень небольшой, в доли градуса.

Выявление отклонений в кривой плавления продукта ПЦР не дает возможность говорить о характере изменений в последовательности (являются ли эти изменения однонуклеотидными заменами или маленькими инсерциями/делециями), а также о месторасположении указанных изменений и поэтому требует дальнейшего уточнения путем секвенирования отобранных проб, чтобы подтвердить наличие именно мутации MYD88 p.L265P.

Метод HRM-анализа требует специального дорогостоящего оборудования и программного обеспечения для анализа, а также связывающихся с двухцепочечной ДНК интеркалирующих красителей третьего поколения, от которых зависит точность исследования. Важно отметить, что интеркалирующий краситель SYBR Green, более доступный по сравнению с вышеуказанными и широко использующийся при проведении ПЦР-анализа, для HRM-анализа не подходит.

2. Способ аллель-специфической полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) (Rovira J., Karube K., Valera A., Colomer D., Enjuanes A., Colomo L., et al. MYD88 L265P mutations, but no other variants, identify a subpopulation of DLBCL patients of activated B-cell origin, extranodal involvement, and poor outcome. *Clin-CancerRes*; 2016, 22(11); 2755-64).

Метод основан на применении аллель-специфических праймеров (не указанных в статье), комплементарных мутантным последовательностям анализируемой ДНК. Амплифицируются только мутантные последовательности, ДНК дикого типа не амплифицируется. Подобный подход позволяет обнаруживать

несколько десятков или сотен молекул мутантной ДНК на фоне десятков тысяч молекул ДНК дикого типа.

Как правило, для проведения АС-ПЦР используются ДНК-матрицы хорошего качества, выделяемые в достаточном количестве из свежих биоматериалов. При работе со "сложными" объектами (FFPE образцы) анализ становится нетривиальной задачей, требующей методических отклонений от традиционных подходов (Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция с использованием системы сближенных праймеров © А.А. Галимова*, Р.Р. Гарафутдинов, А.Р. Сахабутдинова, А.В. Чемерис. Вестник Башкирского университета. 2014. Т. 19. №4, С. 1196-1199). Кроме того, метод требует использования специального оборудования и дорогостоящих флуоресцентных олигонуклеотидных зондов.

3. Способ цифровой капельной ПЦР (Zorofchian S., Lu G., Zhu J.-J., Duose D.Y., Windham J., Esquenazi Y., Ballester L.Y. Detection of the MYD88 p.L265P Mutation in the CSF of a Patient With Secondary Central Nervous System Lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 2018. V. 8: P. 382).

Цифровая капельная ПЦР (Droplet Digital PCR) - метод ПЦР, при котором реакционная смесь после добавления ДНК распрыскивается на множество мельчайших капель, попадающих на лунки чипа. Чип может содержать несколько десятков тысяч ячеек, на которых в каплях протекает ПЦР. При этом возможна визуализация результата реакции с каждой ячейки. По завершению реакции данный чип может быть использован для проведения секвенирования или клонирования с каждой капли.

В статье не указаны использовавшиеся авторами праймеры.

Особенностью метода является сверхчувствительность и сверхточность количественного анализа продуктов амплификации гена-мишени в каждой капле образца. Фракционирование образцов на наночастицы сводит к минимуму влияние на результат исследований таких параметров как наличие ингибиторов ПЦР. Отсутствует необходимость в использовании калибровочных кривых; происходит прямое обнаружение редкого варианта гена-мишени в сложном окружении.

Главные ограничения метода капельной цифровой ПЦР связаны с необходимостью специального импортного оборудования и расходных материалов, высокой стоимостью исследования и сложной пробоподготовкой.

4. Способ прямого секвенирования по Сэнгеру (Treon S.P., Xu L., Yang G., Zhou Y., Liu X., Cao Y., et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012; 367: 826-33).

В основе этого метода лежит ферментативное построение комплементарной цепи ДНК на одноцепочечной матрице.

На первом этапе осуществляют амплификацию в ходе ПЦР области, которая может содержать мутацию MYD88 p.L265P (используют праймеры 5'-GGGATATGCTGAACTAAGTTGCCAC-3' и 5'-GACGTGTCTGTGAAGTTGGCATCTC-3'), и очистку продукта амплификации от компонентов реакционной смеси на колонках.

На втором этапе проводят непосредственно реакцию секвенирования, в которой используют флуоресцентно-меченые дидезоксинуклеозидтрифосфаты ddATP, ddTTP, ddCTP и ddGTP, которые способны включаться в растущую цепь ДНК, но не способны обеспечивать дальнейшее копирование. На втором этапе используют праймеры 5'-GCTGTTGTTAACCCCTGGGGTTGAAG-3' и 5'-GACGTGTCTGTGAAGTTGGCATCTC-3'.

После очистки полученные продукты секвенирования разгоняются в полиакриламидном геле, который способен разделять фрагменты, отличающиеся друг от друга на один нуклеотид в широком диапазоне длин.

Результаты анализируют с помощью программного обеспечения. Они представлены в виде последовательности разноцветных пиков, соответствующих четырём нуклеотидам.

Метод требует определенной квалификации сотрудников лаборатории, а также подготовки исследуемого материала к секвенированию, что делает его дорогостоящим и длительным по времени (выявление единственной мутации занимает несколько дней). Для осуществления этого способа предъявляются определенные требования к отдельному помещению, где установлен секвенатор.

5. Способ пиросеквенирования (Gebauer N., Bernard V., Röhner C., Krokowski M., Merz H., Feller A.C., Thorns C. Pyrosequencing as a fast and reliable method in detecting the MYD88 p.L265P mutation in decalcified formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Ann Lab Med*. 2014 Mar; 34(2): 170-3.)

Пиросеквенирование ДНК основано на принципе "секвенирование путем синтеза". Метод позволяет секвенировать одну цепочку нуклеотидов ДНК путем синтеза комплементарной цепочки, при этом регистрируется присоединение каждого нуклеотида. Матрица ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов А, С, G и Т последовательно добавляются и отмываются после реакции. При включении нуклеотида происходит детекция высвобождающихся пирофосфатов.

Дороговизна импортных оборудования и расходных материалов делает его недоступным для большинства лабораторий. Также требует квалификации сотрудников. Метод трудоемкий и время затратный.

Для обогащения исследуемого материала последовательностями, потенциально содержащими мутацию, использовали праймеры

5'-GAATGTGTGCCAGGGTACTT,

5'-Bioteg-TCAGGATGCTGGGAACТА;

для секвенирования - праймер 5'-CCCATCAGAAGCGAC.

6. Способ высокопроизводительного секвенирования (Cani, A.K. et al. Comprehensive genomic profiling of orbital and ocular adnexal lymphomas identifies frequent alterations in MYD88 and chromatin modifiers: new routes to targeted therapies. *Mod Pathol*, 2016, 29, 685-697).

Технология методов секвенирования нового поколения позволяет секвенировать одновременно тысячи молекул ДНК. Большинство технологий высокопроизводительного секвенирования включают в себя следующие этапы: подготовку библиотек, непосредственно секвенирование и анализ полученных данных.

Подготовка библиотек включает в себя фрагментирование ДНК до 300-500 нуклеотидных пар, лигирование секвенсовых адаптеров (синтезированные олигонуклеотиды с известной последовательностью) с концами фрагментов и амплификацию полученных библиотек. Использованные праймеры не указаны.

Секвенирование производится путем синтеза новых фрагментов ДНК на одноцепочечных ДНК-библиотеках. Нуклеотиды встраиваются в новую цепь в порядке, соответствующем матричной цепи. После включения в цепь каждого последующего нуклеотида прибор регистрирует сигнал.

Полученные данные проходят несколько этапов обработки.

Помимо высокой стоимости исследования и необходимости специализированной аппаратуры и активной базы, применяемые в клинической практике методы высокопроизводительного секвенирования рассчитаны на получение данных большого объема, и поэтому предусматривают одновременное тестирование как минимум панели из нескольких десятков генов в группе образцов. Срок выполнения способа - от нескольких недель до 3-х месяцев. Кроме того, требуются высококвалифицированные сотрудники как для собственно секвенса, так и для его биоинформационной обработки. Все найденные в ходе исследования находки требуют подтверждения с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Ряд других, описанных в литературе методов тестирования MYD88 p.L265P, два из которых приведены ниже, не могут гарантировать точность определения мутации в биоматериале, полученном из FFPE, в силу необходимости наработки длинных ампликонов.

1. Способ аллель-специфической полу-гнездовой количественной ПЦР (Yu S., Luo H., Pan M., Palomino L.A., Song X., Wu P., Huang J.M., Zhang Z. High frequency and prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma with R-CHOP treatment. *Oncology letters*, 2018, 15 (2): 1707-1715).

Метод включает в себя два этапа ПЦР. Первый этап представляет собой аллель-специфический ПЦР-анализ. Были разработаны два обратных праймера для разделения мутантных и диких аллелей MYD88L265P и общий праймер для амплификации больших фрагментов для повышения чувствительности ПЦР (F: 5'-CAGCCTCTCTCCAGGTAAGCTCAACC-3', RW: 5'-ATTGCCTTGTA CTTGATGGGGATCA-3' и RM: 5'-CCTTGTA CTTGATGGGGAAGG-3'). Для повышения специфичности ПЦР были введены два внутренних несоответствия во второй и третьей позициях от 3'-конца в обратном праймере. После первого раунда получили два продукта ПЦР для каждого образца (продукты дикого типа, W; вероятные продукты мутации, M).

На втором этапе АС-ПЦР в реальном времени использовали праймеры (F: 5'-GGCAAGAGAATGAGGGAATGTG-3', RW: 5'-GCCTTGTA CTTGATGGGGAACA-3' и RM: 5'-CCTTGTA CTTGATGGGGAACG-3') с разбавленными W, разбавленными M и стандартами в качестве шаблонов. Power SYBR Green PCR Master Mix применялся в соответствии с инструкциями производителя, а реакции запускались на системе обнаружения последовательностей ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Результаты второго раунда АС-ПЦР в реальном времени были подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Метод разработан для анализа мутации в свежезабранной крови и требует проведения нескольких этапов ПЦР с тремя наборами праймеров. На первом из которых требуется наработка ампликона длиной более 600 п.н., а на втором - применение специализированного дорогостоящего оборудования для количественной ПЦР. Таким образом, помимо технической сложности, ограничением применения данного способа в клинической практике с образцами FFPE является необходимость получения длинного ампликона.

2. Способ ПЦР с анализом длин рестрикционных фрагментов в образцах свежезабранной крови и костного мозга (M. Lemaire, M. D'Huyvetter, T. Lahoutte, E. VanValckenborgh, E. Menu, E. DeBruyne, P. Kronenberger, U. Wernery, S. Muyldermans, N. Devoogdt, K. Vanderkerken. Rapid detection of MYD88-L265P mutation by PCR-RFLP in B-cell lymphoproliferative disorders. *Leukemia* (2014) 28, 447-449. и N. Gachard, M. Parrons, I. Soubeyran, B. Petit, A. Marfak, D. Rizzo, M. Devesa, M. Delage-Corre, V. Coste, M.P. Laforêt, A. de Mascarel, J.P. Merlio, K. Bouabdhalha, N. Milpied, P. Soubeyran, A. Schmitt, D. Bordessoule, M. Cogné, J. Feuillard. IGHV gene features and MYD88 L265P mutation separate the three marginal zone lymphoma entities and Waldenstrom macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphomas. *Leukemia* (2013) 27:183-189).

В первой из указанных в предыдущем абзаце работ использовали праймеры 5'-CTGGCAAGAGAATGAGGGAATGT-3' и 5'-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3' и нарабатывали ампликон длиной 489 п.н.

Во второй работе использовали праймеры 5'-CTTAGATGGGGGATGGCTGT-3' и 5'-AGGAGGCAGGGCAGAAGTA-3 и нарабатывали ампликон длиной 325 п.н.

При ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестриционных фрагментов) анализе наработанный в ходе ПЦР продукт подвергается действию эндонуклеазы рестрикции, имеющей специфический сайт распознавания и разрезания ДНК, а также дальнейшего анализа размеров образующихся фрагментов (рестриктов) путём гель-электрофореза (электрофореза ДНК).

Как видно из приведенных сведений, методика требует наработки ампликонов длиной 489 п.н. и 325 п.н., что ограничивает ее применение в клинической практике с образцами FFPE.

Единственный описанный ранее способ выявления мутации MYD88p.L265P с помощью ПЦР с анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов для FFPE-образцов показал свою неэффективность (L. Tadic, G. Marjanovic, L. Macukanovic-Golubovic, M. Krstic, T. Jevtic-Stoimenov, M. Kostov, Z. Smelcerovic, M. Stojanovic. The importance of Myd88 L265P mutation, clinical and immunohistochemical prognostic factors for the survival of patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma treated by immunochemotherapy in southeast Serbia. JBUON 2016; 21(5):1259-1267.) Авторы использовали рестриктазу BsiEI и праймеры: F 5'-GGGATATGCTGAACSTAAGTTGCCAC-3' и R 5'-GACGTGTCTGTGAAGTTGGCATCTC-3'. Однако им не удалось обнаружить ни одной мутации в анализируемой выборке пациентов (57 человек) с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), несмотря на то, что распространенность мутации MYD88 p.L265P у пациентов с данной опухолью не отличается в зависимости от расы и составляет около 29% (J.-H. Lee, H. Jeong, J.-W. Choi, H.E. Oh, Y.-S. Kim. Clinicopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: a metaanalysis. Scientific Reports. 2017. V.7, Article number: 1785). Отрицательный результат анализа может быть связан с низкой чувствительностью метода ввиду необходимости наработки в ходе ПЦР длинного продукта (726 п.н.), в то время как большая часть фрагментов ДНК из FFPE-образцов имеет длину около 200 п.н.

Несмотря на то, что большинство описанных выше методов, как и предлагаемый, используют ПЦР и праймеры, фланкирующие на гене MYD88 область расположения мутации p.L265P, использованные в этих методах праймеры не могли быть использованы в предлагаемом способе и существовала необходимость в разработке новых праймеров по следующим причинам:

- 1) праймеры должны были фланкировать область гена MYD88, потенциально содержащую мутацию, протяженностью не более 200 п.н.;
- 2) один из праймеров должен был содержать введенный сайт рестрикции;
- 3) способ должен был быть простым, эффективным, недорогим и быстро выполнимым на доступном в клинической практике оборудовании;
- 4) способ должен быть применим на любом биоматериале -свежезабранном, замороженном и FFPE-образцах.

Раскрытие изобретения

Предлагаемый способ выявления мутации p.L265P в гене MYD88 включает выделение ДНК из взятого у пациента для анализа биоматериала в виде FFPE-образца, проведение амплификации участка гена MYD88 с помощью фланкирующих область расположения мутации p.L265P праймеров, обработку наработанного в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) продукта эндонуклеазой рестрикции, проведение электрофоретического разделения образующихся фрагментов ДНК, при этом для анализа может быть также использована ДНК, выделенная из свежезабранных или замороженных периферической крови пациента, костного мозга, биоптата опухоли; для амплификации в качестве прямого используют праймер 5'-GTACTTAGATGGGGGATGGCTGTTG-3' (SEQ ID №1), в качестве обратного - праймер 5'-ATTGCCTTGTACTTGATGGGGATG-3' (SEQ ID №2), полученный ампликон обрабатывают эндонуклеазой рестрикции HinfI, проводят электрофорез продуктов рестрикции и при выявлении аллелей длиной 148 п.н.; 148 п.н., 124 п.н. и 24 п.н.; 124 п.н. и 24 п.н. диагностируют соответственно мутацию p.L265P в гомозиготном, гетерозиготном состоянии и ее отсутствие.

Техническими результатами способа являются следующие:

- 1) способ применим на любом биоматериале: свежезабранном, замороженном и FFPE-образцах;
- 2) благодаря созданным праймерам способ можно использовать для анализа архивных FFPE-образцов, большая часть фрагментов ДНК которых имеет длину около 200 п.н.;
- 3) благодаря введенному в праймер сайту рестрикции, способ позволяет использовать ПЦР-ПДРФ анализ, являющийся более простым и доступным в клинической практике по сравнению с другими описанными выше способами;
- 4) предлагаемый способ является более чувствительным по сравнению с описанным выше способом, также использующим ПЦР-ПДРФ анализ для FFPE-образцов, т.к. предлагаемый способ дает возможность охватить фрагменты ДНК размером около 200 п.н., что особенно актуально при работе с архивными FFPE-образцами;
- 5) способ выполняется быстро (2 суток) на доступном в клинической практике оборудовании.

Перечень чертежей иллюстративного материала

Фиг. 1. Электрофореграмма результатов генотипирования образцов ДНК на наличие мутации p.L265P в гене MYD88: образец 1 (первая колонка - здесь и далее нумерация указана слева направо) - гетерозигота по мутации p.L265P (фрагменты 148 п.н. (верхний) и 124 п.н.); образцы 2 (вторая колонка), 4, 5 (колонки 5 и 6) - нормальные гомозиготы (фрагмент 124 п.н.); образец 3 (колонка 3) - гомозигота по

мутации p.L265P (фрагмент 148); M (колонка 4) - маркер молекулярных весов 100 п.н. Фрагмент длиной 24 п.н. на фигуре не виден, он короткий и быстро выходит из геля.

Фиг. 2. Секвенограмма мутации p.L265P в гене MYD88.

Заявленный способ осуществляют следующим образом.

Экстракцию ДНК из свежезабранных или замороженных образцов периферической крови, костного мозга, биоптатов опухоли или из FFPE-образцов биоматериала осуществляют любым доступным коммерческим набором. В дальнейшем полученную ДНК используют в качестве матрицы для амплификации области расположения мутации MYD88 p.L265P в ходе ПЦР.

Специфические последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции мутации MYD88 p.L265P выбирали с помощью программы Vector NTI. Праймеры должны были фланкировать область гена MYD88, потенциально содержащую мутацию, протяженностью не более 200 п.н. Один из праймеров (обратный) должен был содержать введенный сайт рестрикции, в связи с чем последовательность праймера содержала замену одного нуклеотида (С на G) и создавала сайт рестрикции для эндонуклеазы HinfI при отсутствии мутации.

Праймеры были синтезированы в ООО "Биосинтез" (г. Новосибирск). Амплификацию проводили в термоциклере "Терцик" (ЗАО НПФ "ДНК-Технология", г. Москва).

ПЦР проводили с фланкирующими исследуемый район праймерами: 5'-GTACTTAGATGGGGGATGGCTGTG-3' - прямой праймер; 5'-ATTGCCTTGTACTTGATGGGGATG-3' - обратный праймер. Параметры ПЦР были следующими: денатурация 30 сек. при 95°C; отжиг 20 сек. при 62°C; синтез 20 сек. при 72°C, всего 33 цикла.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 75 mM Tris-HCl, pH 9,0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 % Tween-20; 1 мкл ДНК; по 1 мкМ каждого праймера; 2,5 mM MgCl₂; 1 mM каждого из dNTP; 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы ("СибЭнзим", г. Новосибирск). Рестрикция проводилась в стандартных условиях с 10 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции HinfI ("СибЭнзим", г. Новосибирск) при 37°C в течение 12 часов, с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Результаты рестрикции подвергали электрофорезу в камере НПФ БИОКЛОН (г. Москва) в 4% полиакриламидном геле с постоянным напряжением 50 вольт и окрашиванием бромистым этидием в течение 3-х минут. Разделенные фрагменты ДНК визуализировали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документирования (Gel Doc XR+, США). Сохранение и обработка изображений электрофоретических гелей проводилось с помощью программы Quantity One.

При наличии в амплифицируемом участке ДНК сайта рестрикции (нормальный аллель) от продукта амплификации размером 148 п.н. отрезается фрагмент размером 24 п.н., то есть в случае гетерозиготы по мутации MYD88 p.L265P образуются три фрагмента длиной 148 п.н., 124 п.н. и 24 п.н., а в случае мутации в гомозиготном состоянии - длина ПЦР продукта остается неизменной - 148 п.н.

Для верификации генотипирования образцы были секвенированы на автоматическом секвенаторе AB3500 (США) по протоколу фирмы-изготовителя. Результаты секвенирования образца ДНК, содержащего мутацию MYD88 p.L265P, представлены на фиг. 2.

Время исследования предлагаемым способом взятого у пациента образца - 2 дня.

Перечень последовательностей

<110> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения

Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России);

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский

центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

(ИЦиГ СО РАН)

<120> Способ выявления мутации p.L265P в гене MYD88

<160>2

<210> Номер SEQ ID NO: 1

<211> 25

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<400>1

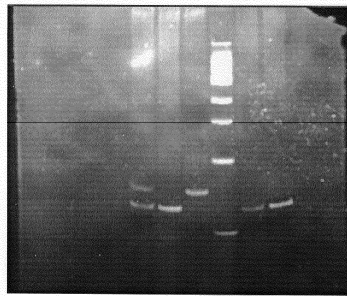
gtacttagat gggggatggc tggtg 25

<210>2
 <211> 24
 <212>DNA
 <213>Homo sapiens
 <400>2
 attgccttgt acttgatggg gatg 24

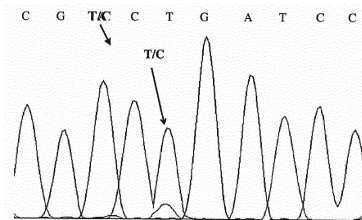
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ выявления мутации p.L265P в гене MYD88, включающий выделение ДНК из взятого у пациента для анализа биоматериала в виде FFPE-образца, проведение амплификации участка гена MYD88 с помощью фланкирующих область расположения мутации p.L265P праймеров, обработку наработанного в ходе ПЦР продукта эндонуклеазой рестрикции, проведение электрофоретического разделения образующихся фрагментов ДНК, отличающийся тем, что для анализа может быть также использована ДНК, выделенная из свежезабранных или замороженных периферической крови пациента, костного мозга, биоптата опухоли; для амплификации в качестве прямого используют праймер с нуклеотидной последовательностью SEQ ID № 1, в качестве обратного используют праймер с нуклеотидной последовательностью SEQ ID № 2, полученный ампликон обрабатывают эндонуклеазой рестрикции HinfI, проводят электрофорез продуктов рестрикции и при выявлении аллелей длиной 148; 148, 124 и 24 п.н.; 124 и 24 п.н. диагностируют соответственно мутацию MYD88 p.L265P в гомозиготном, гетерозиготном состоянии и ее отсутствие.

Способ выявления мутации p.L265P в гене MYD88



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2