



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/50 (2018.08); C12Q 1/6827 (2018.08); C12Q 1/683 (2018.08); C12Q 1/686 (2018.08); C12Q 1/6883 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017140679, 22.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.11.2017Дата регистрации:
25.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 22.11.2017

(45) Опубликовано: 25.12.2018 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

121471, Москва, ул. Багрицкого, 53, кв. 100,
Шагам Л.И.

(72) Автор(ы):

Шагам Лев Иосифович (RU),
Герасимов Андрей Николаевич (RU),
Длин Владимир Викторович (RU),
Сухоруков Владимир Сергеевич (RU),
Аксёнова Марина Евгеньевна (RU),
Кузнецова Татьяна Александровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Шагам Лев Иосифович (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: HERTZ J.M. Alport syndrome. Molecular genetic aspects. 2009 Aug; 56(3): 105-52. SLAJPAH M. et al. Sixteen novel mutations identified in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria. Kidney Int. 2007 Jun; 71(12): 1287-95. RU 2621162 C1, 31.05.2017.

(54) СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ ГЕНА COL4A5 У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕДПОЛАГАЕМЫМ ДИАГНОЗОМ "СИНДРОМ АЛЬПОРТА"

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к нефрологии, и предназначено для прогнозирования наличия у пациента с клиническими признаками синдрома Альпорта X-сцепленного типа наследования частой мутации гена COL4A5. В частности, если возраст манифестации гематурии составляет не менее 49 мес., а протеинурия отсутствует, либо возраст манифестации протеинурии не менее 18 лет,

прогнозируется наличие мутации COL4A5 с.1871G>A, p.Gly624Asp. Если возраст манифестации гематурии менее либо равен 48 мес., при наличии у пациента протеинурии, возраст манифестации протеинурии до 18 лет, прогнозируется отсутствие у пациента мутации COL4A5 с.1871G>A, p.Gly624Asp. Изобретение обеспечивает эффективную диагностику синдрома Альпорта по наличию мутации гена COL4A5.

RU 2 675 861 C1

RU 2 675 861 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

G01N 33/50 (2018.08); *C12Q 1/6827* (2018.08); *C12Q 1/683* (2018.08); *C12Q 1/686* (2018.08); *C12Q 1/6883* (2018.08)

(21)(22) Application: **2017140679, 22.11.2017**

(24) Effective date for property rights:
22.11.2017

Registration date:
25.12.2018

Priority:

(22) Date of filing: **22.11.2017**

(45) Date of publication: **25.12.2018** Bull. № 36

Mail address:

**121471, Moskva, ul. Bagritskogo, 53, kv. 100,
Shagam L.I.**

(72) Inventor(s):

**Shagam Lev Iosifovich (RU),
Gerasimov Andrej Nikolaevich (RU),
Dlin Vladimir Viktorovich (RU),
Sukhorukov Vladimir Sergeevich (RU),
Aksenova Marina Evgenevna (RU),
Kuznetsova Tatyana Aleksandrovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

Shagam Lev Iosifovich (RU)

(54) **METHOD FOR PREDICTING EXISTENCE OF COL4A5 GENE MUTATION IN PATIENTS PRESUMPTIVELY DIAGNOSED WITH ALPORT SYNDROME**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, in particular to nephrology, and is intended to predict the presence of the X-linked type of inheritance of a frequent mutation of the COL4A5 gene in a patient with clinical signs of Alport syndrome. In particular, if the age of manifestation of hematuria is not less than 49 months, but there is no proteinuria, or the age of manifestation of proteinuria is at least 18 years, the presence of the COL4A5 c.1871G>A,

p.Gly624Asp mutation is predicted. If the age of manifestation of hematuria is less than or equal to 48 months, if the patient has proteinuria, the age of manifestation of proteinuria is up to 18 years, the patient is not expected to have mutations COL4A5 c.1871G>A, p.Gly624Asp.

EFFECT: invention provides an effective diagnosis of Alport syndrome by the presence of a mutation of the COL4A5 gene.

1 cl

RU 2 675 861 C1

RU 2 675 861 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к нефрологии, и может найти применение в диагностике синдрома Альпорта (СА).

5 СА (согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра МКБ-10: другие уточненные синдромы врожденных аномалий, не классифицированные в других рубриках: Q87.8), также в литературе называемый наследственным нефритом, имеет в нашей стране распространенность около 1 случая на 6 тысяч жителей [Тареева И.Е. Нефрология: руководство для врачей. // Москва: Медицина. - 2000. - 688 с]. Развивается вследствие нарушения структуры базальной мембраны клубочков (БМК), связанного с дефектом сборки или отсутствием протомеров альфа-цепей коллагена IV типа. Данное нарушение приводит к изменению проницаемости гломерулярного фильтра, вследствие чего развивается гематурия, протеинурия и другие симптомы, характерные для наследственного нефрита [Abrahamson D.R. Steps on the Alport path to proteinuria // *Kidney Int.* - 2016. - №2 (90). - С. 242-244; Kashtan C. Alport syndrome: facts and opinions // *F1000 Research.* - 2017. - №6. - С. 50.].

15 Согласно современным диагностическим рекомендациям [Savage J. и др. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* - 2013. - №3 (24). - С. 364-375.], диагноз СА высоковероятен при наличии стойкой гломерулярной гематурии в сочетании с двусторонней нейросенсорной тугоухостью, характерными нарушениями зрения (помутнение роговицы, передний лентиконус, катаракта, центральная перимакулярная и периферическая ретинопатии, сопровождающиеся пятнами, истончение сетчатки с височной стороны; редко - задняя полиморфная дистрофия роговицы, макулярное отверстие или макулопатия) или семейным анамнезом. Наличие у пациента стойкой гломерулярной гематурии с раннего возраста при отсутствии других диагностических критериев СА не позволяет исключить данное заболевание и требует наблюдения за пациентом с определением динамики СКФ и протеинурии. В случае снижения СКФ и/или нарастания протеинурии у пациента, вероятно наличие СА. Подтверждение диагноза может быть проведено при помощи электронной микроскопии нефробиоптата, однако данный метод является инвазивным и имеет ограниченную чувствительность, особенно в детском возрасте. В связи с развитием в последние годы и активным внедрением в диагностическую практику методов высокопроизводительного секвенирования, стал доступен другой способ подтверждения СА - генетический, являющийся малоинвазивным и обеспечивающий возможность верификации диагноза в любом возрасте [Savage J. и др. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* - 2013. - №3 (24). - С. 364-375.]. Метод может быть основан на секвенировании экзона пациента, либо на секвенировании панели генов [Shagam L.I., Polyakova A.V., Shentseva D.V. et al. Targeted sequencing of COL4A3, COL4A4 and COL4A5 coding exons as a direct approach to Alport syndrome diagnostics // *European Journal of Human genetics.* - 2014. - 22 supplement 1].

40 При этом полное генетическое исследование, а именно секвенирование генов COL4A3, COL4A4 и COL4A5, требует значительных трудозатрат и финансовых ресурсов. Мы выявили в российской популяции частую мутацию гена COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp) (нумерация нуклеотидов соответствует транскриптам NM_000495.4 и NM_033380.2), также характерную для некоторых других популяций Европы [Demosthenous P. и др. X-linked Alport syndrome in Hellenic families: phenotypic heterogeneity and mutations near interruptions of the collagen domain in COL4A5 // *Clin. Genet.* - 2012. - №3 (81). - С. 240-248; Kovács G. и др. Efficient Targeted Next Generation Sequencing-Based Workflow for Differential Diagnosis of Alport-Related Disorders // *PLOS ONE* / ed. Brusgaard

К. - 2016. - №3 (11). - С. e0149241; Slajpah M. и др. Sixteen novel mutations identified in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria // *Kidney Int.* - 2007. - №12 (71). - С. 1287-1295]. Данная мутация может быть выявлена методом, требующим значительно меньше финансовых и временных затрат, таким, как ПЦР в реальном времени, ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), секвенирование по Сэнгеру двадцать пятого экзона гена COL4A5, мультиплексная лигазозависимая амплификация (MLPA) и другие [патент США PCT/US1991/004051 «Способ и зонды для выявления синдрома Альпорта»; Martin P. и др. High mutation detection rate in the COL4A5 collagen gene in suspected Alport syndrome using PCR and direct DNA sequencing // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* - 1998. - №12 (9). - С. 2291-2301].

Прототипом исследования является методика [Slajpah M. и др. Sixteen novel mutations identified in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria // *Kidney Int.* - 2007. - №12 (71). - С. 1287-1295], где авторы описывают способ генетического подтверждения СА с использованием метода ПЦР и анализа однокитевого конформационного полиморфизма (англ. SSCP), и выявление данной мутации в 6 семьях, пяти из которых авторы, в связи с легкостью течения заболевания, поставили диагноз «доброкачественная семейная гематурия», а не СА. Из таблицы 1а, приведенной в работе, ясно, что у пациентов в 5 семьях из 6 не было выявлено протеинурии.

Недостатком данного способа выявления мутаций при СА является его низкая эффективность и чувствительность в сравнении с секвенированием. Недостатком данного способа прогнозирования наличия частой мутации является отсутствие выявления достоверной связи наличия данной мутации с возрастом манифестации гематурии, а также отсутствие описания возможности прогнозирования ее наличия исходя из клинико-лабораторных признаков (включая наличие протеинурии). Кроме того, были проанализированы в основном взрослые пациенты (возраст пациентов 14-47 лет, средний 26 лет), в статье не говорится о наличии у них протеинурии в детском и подростковом возрасте.

Известен также «Способ и зонды для выявления синдрома Альпорта» (патент США PCT/US1991/004051), полученный в 1991 году был как первый патент на генетическую диагностику СА методом детекции мутаций в гене COL4A5.

Недостатком данного способа являются высокие финансовые и временные затраты на проведение теста. Данный метод не позволяет прогнозировать наличие частой в российской популяции мутации исходя из клинико-лабораторных признаков.

Известен также аналог патента - способ анализа в российской популяции ранее описанных в литературе мутаций, связанных с X-сцепленным синдромом Альпорта [Тверская СМ. Молекулярно-генетическое исследование синдрома Альпорта: дисс. канд. мед. наук, Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, 1995].

Недостатком данного способа является то, что среди проверяемых мутаций не было частой мутации COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp). Кроме того, автор не нашел в российской популяции ни одной из выбранных им мутаций, описанных в литературе на тот момент, для которых был разработан метод ПЦР-ПДРФ.

Известен также аналог патента - способ секвенирования экзонов и промоторной области гена COL4A5 [Martin P. и др. High mutation detection rate in the COL4A5 collagen gene in suspected Alport syndrome using PCR and direct DNA sequencing // *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* - 1998. - №12 (9). - С. 2291-2301] методом Сэнгера. Авторами данного способа вариант нуклеотидной последовательности COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp) был

впервые описан в выборке пациентов из Дании, Германии, Исландии, Швеции и США.

Недостатком данного способа является то, что в данной работе не приведено описание клинической картины заболевания у его носителя, в связи с чем скрининговое определение частой мутации невозможно. Кроме того, недостатком данного способа является высокая стоимость и времязатратность.

Известен также аналог патента - способ прогнозирования наличия частой мутации на основе позднего возраста развития терминальной стадии хронической почечной недостаточности (тХПН) у мужчин и в целом более мягкого течения заболевания. [Demosthenous P. и др. X-linked Alport syndrome in Hellenic families: phenotypic heterogeneity and mutations near interruptions of the collagen domain in COL4A5 // Clin. Genet. - 2012. - №3 (81). - С. 240-248].

Недостатком данного способа является то, что представлены данные только по 2 семьям из Греции и Кипра. Авторы не изучали отличия возраста манифестации гематурии, а также наличия протеинурии у носителей частой мутации в сравнении с носителями прочих вариантов нуклеотидной последовательности. Кроме того, прогнозирование наличия мутации по возрасту развития тХПН возможно только в позднем возрасте, тогда как диагностика СА наиболее актуальна в детском и подростковом возрасте.

Задачей изобретения является прогнозирование наличия патогенного варианта нуклеотидной последовательности COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp) исходя из клинико-лабораторных признаков до проведения генетического исследования с целью рекомендовать определенной группе пациентов, выявляемой в процессе скрининга, проведение исследование на данную точечную мутацию.

Предлагаемый способ прогнозирования наличия частой мутации может быть использован для пациентов из российской популяции с вероятным или высоковероятным диагнозом СА (см. выше) со следующими клиническими признаками СА: наличием стойкой гломерулярной гематурии в сочетании с семейным анамнезом СА, либо семейным анамнезом гематурии, не связанной с иным выявленным заболеванием. При этом паттерн наследования в семье должен соответствовать X-сцепленному: у мужчин заболевание протекает тяжелее, чем у женщин; нет передачи от отца к сыну.

Предлагаемый способ прогнозирования наличия частой мутации основан на следующих клинико-лабораторных признаках: возраст манифестации гематурии и наличие протеинурии (а именно, количества белка в моче более 100 мг/сут).

На выборке из 44 пациентов возраста 1-17 лет (средний 12 лет±3,7) с генетически подтвержденным диагнозом СА X-сцепленного типа наследования, мутация COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp) была выявлена у 7 человек (16%). Мутация выявлена у пациентов из различных регионов европейской части России: Московская (3 чел), Нижегородская, Калужская и Липецкая области, а также республика Мордовия. При этом среди 5 пациентов с возрастом манифестации гематурии не ранее 49 месяцев и без протеинурии у всех (100%, 95% ДИ 48-100%) была выявлена данная мутация, среди 3 пациентов с возрастом манифестации гематурии не ранее 49 месяцев с протеинурией данная мутация была выявлена только у 1 пациента, при этом она сочеталась с другим вероятно патогенным вариантом нуклеотидной последовательности COL4A3 с. 3247G>C, р. (Gly1083Arg) (вероятность наличия мутации 33%, 95% ДИ 9-71%). Среди 11 пациентов с возрастом манифестации гематурии до 48 месяцев и без протеинурии мутация COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp) была выявлена у 1 человека (вероятность наличия мутации 9%, 95% ДИ 2-28%). Среди 23 пациентов с возрастом манифестации гематурии до 48 месяцев и с протеинурией мутация COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp) не была выявлена

ни у одного испытуемого (0%; 95% ДИ 0-15%). При этом для двух пациентов возраст манифестации гематурии известен не был, носителей частой мутации среди них нет.

На основании полученных результатов, мы рекомендуем пациентам с возрастом выявления гематурии от 49 месяцев и без протеинурии (либо с возрастом выявления протеинурии не ранее 18 лет) для генетического подтверждения СА в качестве первого теста проводить анализ частой мутации COL4A5 с. 1871G>A, р. (Gly624Asp).

Пациентам с возрастом манифестации гематурии не позднее 48 месяцев с протеинурией (возраст манифестации до 18 лет) не рекомендуем проведение теста на частую мутацию.

Пациентам с возрастом манифестации гематурии не позднее 48 месяцев без протеинурии (либо с возрастом выявления протеинурии не ранее 18 лет), а также пациентам с возрастом выявления гематурии от 49 месяцев с протеинурией (возраст манифестации до 18 лет) также рекомендуем по возможности пройти тест на частую мутацию, исходя из того, что ее наличие не исключается.

15 (57) Формула изобретения

Способ прогнозирования наличия у пациента с клиническими признаками синдрома Альпорта X-сцепленного типа наследования частой мутации гена COL4A5, отличающийся тем, что прогноз осуществляется на основании следующих сведений: возраст манифестации гематурии, факт наличия протеинурии в возрасте до 18 лет, при этом, в случае, если возраст манифестации гематурии составляет не менее 49 мес., а протеинурия отсутствует, либо возраст манифестации протеинурии не менее 18 лет, прогнозируется наличие мутации COL4A5 с.1871G>A, р.Gly624Asp - вероятность наличия мутации 100%, 95% ДИ 48-100%, в случае, если возраст манифестации гематурии составляет не менее 49 мес., при наличии протеинурии, возраст манифестации протеинурии до 18 лет, вероятно наличие мутации COL4A5 с.1871G>A, р.Gly624Asp - вероятность наличия мутации 33%, 95% ДИ 9-71%, в случае, если возраст манифестации гематурии менее либо равен 48 мес., при отсутствии у пациента протеинурии, либо возраст манифестации протеинурии не менее 18 лет, не исключается наличие у пациента мутации COL4A5 с.1871G>A, р.Gly624Asp - вероятность наличия мутации 9%, 95% ДИ 2-28%, в случае, если возраст манифестации гематурии менее либо равен 48 мес., при наличии у пациента протеинурии, возраст манифестации протеинурии до 18 лет, прогнозируется отсутствие у пациента мутации COL4A5 с.1871G>A, р.Gly624Asp - вероятность наличия мутации 0%, 95% ДИ 0-15%.

35

40

45