

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035451**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.18

(21) Номер заявки
201600280

(22) Дата подачи заявки
2008.07.23

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

(31) 60/951,438

(32) 2007.07.23

(33) US

(43) 2016.07.29

(62) 201201551; 2008.07.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТЕ ЧАЙНИЗ ЮНИВЕРСИТИ ОВ
ГОНКОНГ (CN)**

(72) Изобретатель:
**Ло Йук-Минг Деннис, Чну Росса Вай
Квун, Чан Кван Чее (НК)**

(74) Представитель:
Агуреев А.П., Фелицына С.Б. (RU)

(56) RU-C1-2249820

TONG YK et al. "Plasma epigenetic markers for cancer detection and prenatal diagnosis", Front Biosci, 2006 Sep. 1; 11: 2647-2656, (abstract) [online] [retrieved on 15.04.2013], Retrieved from the PubMed, PMID:16720341

TONG YK et al. "Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations", Clin Chem, 2006 Dec; 52(12): 2194-202, (abstract) [online] [retrieved on 15.04.2013], Retrieved from the PubMed, PMID: 17040955

(57) Воплощения данного изобретения относятся к реализуемому на компьютере способу анализа биологического образца на наличие хромосомных aberrаций, ассоциированных с раком, системам и аппаратуре для его осуществления. Биологический образец представляет собой плазму, сыворотку, слюну или мочу, содержащие фрагменты ДНК, происходящие из незлокачественных клеток и потенциально из злокачественных опухолевых клеток. Способ предусматривает получение данных из рандомизированного секвенирования фрагментов ДНК, содержащихся в указанном биологическом образце с определением количества последовательности, которая потенциально делетирована или амплифицирована при злокачественной опухоли, и количества фоновой последовательности. На основании полученных количеств определяют параметр, сравнение которого с одним или несколькими пороговыми значениями позволяет определить, существует ли хромосомная aberrация, ассоциированная с раком, в указанном биологическом образце

B1

035451

035451

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение в целом относится к диагностическому исследованию хромосомных aberrаций, ассоциированных с раком, посредством определения дисбаланса между различными нуклеотидными последовательностями через исследование биологического образца (например, крови).

Более конкретно, изобретение в соответствии с настоящей заявкой относится к реализуемому на компьютере способу анализа биологического образца, такого как плазма крови, сыворотка, слюна или моча, на наличие хромосомных aberrаций, который включает фрагменты ДНК, происходящие из незлокачественных клеток и потенциально из злокачественных опухолевых клеток, ассоциированных с раком, на наличие хромосомных aberrаций, ассоциированных с раком.

Настоящая заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США № 60/951438, озаглавленной "Определение дисбаланса последовательности нуклеиновой кислоты", зарегистрированной 23 июля 2007 (досье поверенного № 016285-005200US), включенной в данное описание в качестве ссылки.

Настоящая заявка также является родственной непредварительной заявке, озаглавленной "Определение дисбаланса последовательности нуклеиновой кислоты" (досье поверенного № 016285-005210US), включенной в данное описание в качестве ссылки.

Уровень техники

Генетические заболевания, раковые заболевания и другие состояния часто являются результатом или вызывают дисбаланс в двух соответствующих хромосомах или аллелях или других последовательностях нуклеиновых кислот.

То есть количество одной последовательности относительно другой последовательности больше или меньше, чем нормальное. Обычно нормальное соотношение составляет точное соотношение 50/50. Разработана численная (digital) ПНР для детекции отклонения аллельного соотношения в образцах нуклеиновых кислот (Chang H. W. et al., 2002, J. Natl. Cancer Inst, 94, 1697-1703).

Численная ПНР представляет собой амплификацию на основе метода анализа нуклеиновых кислот, при котором требуется распределение образца, содержащего нуклеиновые кислоты, на множество отдельных образцов, где каждый образец содержит в среднем не более чем примерно одну последовательность-мишень на образец. Специфические нуклеиновые кислоты-мишени амплифицируются с последовательностью специфическими праймерами для образования специфических ампликонов численной ПНР. Локусы нуклеиновых кислот, являющихся мишенями, и виды или панель последовательностей специфических праймеров, включенных в реакции, определяют или отбирают перед анализом нуклеиновых кислот.

Клинически показана применимость детекции утраты гетерозиготности (LOH) в образцах опухолевых ДНК (Zhou W. et al., 2002, Lancet, 359, 219-225). Для результатов анализов методом численной ПНР последовательный критерий отношения вероятностей (SPRT) адаптирован предварительными исследованиями для классификации экспериментальных результатов как приводящих к выводу о наличии или отсутствии LOH в образце (El Karoui et al., 2006, Stat. Med., 25, 3124-3133).

В методах, используемых в предыдущих исследованиях, количество данных, собранных при численной ПНР, слишком мало. Таким образом, точность может быть поставлена под сомнение из-за небольшого числа полученных точек и типичных статистических флуктуаций.

Поэтому желательно, чтобы неинвазивные тесты имели высокую чувствительность и специфичность для минимизации ложно-отрицательных и ложно-положительных результатов соответственно.

Сущность изобретения

Воплощения данного изобретения относятся к способам, системам и аппаратуре для определения того, имеется ли дисбаланс последовательности, ассоциированный с раком, для последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты (например, хромосомный дисбаланс) в биологическом образце. Такое определение можно осуществить с использованием параметра количества клинически релевантного хромосомного участка по отношению к другим клинически нерелевантным хромосомным участкам (фоновые участки) в биологическом образце. В одном аспекте количество хромосом определяют из секвенирования фрагментов ДНК, содержащихся в биологическом образце, таком как моча, плазма, сыворотка, фрагменты ДНК секвенируют, так что секвенируется часть генома. Выбирают одно или несколько пороговых значений для определения того, имеется ли изменение при сравнении с референсным количеством (т.е. дисбаланс), например, в отношении соотношения количеств двух хромосомных участков (или наборов участков).

Согласно примеру одного воплощения биологический образец анализируют. Биологический образец включает фрагменты ДНК. Фрагменты ДНК, содержащиеся в биологическом образце, секвенируют. На основании секвенирования определяют первое количество последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты, которая потенциально делетирована или амплифицирована при злокачественной опухоли. Затем определяют второе количество фоновой последовательности нуклеиновой кислоты, нормальное отношение которой к указанной последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты известно. Затем параметр, представляющий собой отношение между первым количеством и вторым количеством, сравнивают с одним или несколькими пороговыми значениями. На основании сравнения определяют, существует дисбаланс последовательности, ассоциированный с раком для ука-

занной последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты в указанном биологическом образце.

Согласно одному из примеров воплощения биологический образец на основании рандомизированного секвенирования определяют первое количество и второе количество. Затем параметр, представляющий собой отношение первого количества и второго количества, сравнивают с одним или несколькими пороговыми значениями. На основании сравнения определяют, существует дисбаланс последовательности, ассоциированный с раком для указанной последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты в указанном биологическом образце. Рандомизированное секвенирование выгодно максимизирует количество генетической информации.

Другие воплощения изобретения относятся к системам и носителям, считываемым на компьютере, связанным со способами, описанными в данном описании.

Лучшего понимания характера и преимуществ настоящего изобретения можно достичь, обратившись к приведенному далее подробному описанию и прилагаемым чертежам.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает таблицу, в которой приведены ожидаемые значения численного соотношения аллелей и P_t для диапазона примерных концентраций, выраженного в виде средней референсной примерной концентрации на лунку (m_g) в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 2 показывает блок-схему примера компьютерной аппаратуры, применимой с системой и способами согласно воплощениям настоящего изобретения.

Определения

Термин "биологический образец", используемый в данном описании, относится к любому образцу, взятому у субъекта (например, человека), и содержащему одну или несколько молекул нуклеиновой(ых) кислоты(кислот), представляющих интерес.

Термин "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) или рибонуклеиновой кислоте (РНК) в одно- или в двухцепочечной форме. Если конкретно не указано иное, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют свойства связывания, схожие с референсной нуклеиновой кислотой, и метаболизируются подобно нуклеотидам, встречающимся в природе. Если не указано иное, определенная последовательность нуклеиновой кислоты также безоговорочно охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замещения, связанные с вырожденностью генетического кода), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также точно указанную последовательность. Конкретно, замещения, связанные с вырожденностью генетического кода, можно обеспечить, генерируя последовательности, в которых третья позиция одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещена смешанными остатками оснований и/или дезоксиинозинов (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608 (1985) и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98 (1994)). Термин "нуклеиновая кислота" используется как взаимозаменяемый с геном, кДНК, мРНК, малой некодирующей РНК, микроРНК (миРНК), взаимодействующей с Рiwi РНК и короткой шпилечной РНК (shRNA), кодируемой геном или локусом.

Термин "ген" обозначает сегмент ДНК, участвующий в синтезе полипептид цепи. Он может включать участки, предшествующие и следующие за кодирующей областью (лидерные и концевые), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

Термин "реакция", используемый в данном описании, относится к любому процессу, включающему химическое, ферментативное или физическое действие, которое указывает на присутствие или отсутствие определенной полипоследовательности нуклеиновой кислоты, представляющей интерес. Примером "реакции" является реакция амплификации, такая как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Другим примером "реакции" является реакция секвенирования, осуществляемая как путем синтеза, так и путем лигирования. "Информативная реакция" представляет собой реакцию, которая указывает на присутствие одной или нескольких определенных полинуклеотидных последовательностей, представляющих интерес, в том числе, когда присутствует только одна последовательность, представляющая интерес. Термин "лунка", используемый в данном описании, относится к реакции в предварительно обусловленном месте в пределах ограниченной структуры, например в сосуде, клетке или камере в форме лунки в ряду операций ПЦР.

Термин "клинически релевантная последовательность нуклеиновой кислоты", используемый в данном описании, может относиться к полипоследовательности нуклеиновой кислоты, соответствующей сегменту более крупной геномной последовательности, возможный дисбаланс которой проверяют, или к более крупной геномной последовательности самой по себе. Одним из примеров является последовательность хромосомы 21. Другие примеры включают хромосомы 18, 13, X и Y. Еще другие примеры включают мутированные генетические последовательности или генетические полиморфизмы или вариации числа копий, которые плод может унаследовать от одного или обоих родителей. Еще другие примеры включают последовательности, которые мутированы, делетированы или амплифицированы в злокачественной опухоли, например последовательности, в которых происходит потеря гетерози-

готности или дубликации генов. В некоторых воплощениях несколько клинически релевантных нуклеотидных последовательностей или, равнозначно, несколько маркеров клинически релевантной последовательности нуклеиновой кислоты можно использовать для получения данных для детекции дисбаланса.

Термин "фоновая последовательность нуклеиновой кислоты", используемый в данном описании, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, нормальное отношение которой к клинически релевантной последовательности нуклеиновой кислоты известно, например, равное 1 к 1. Как один из примеров, фоновая последовательность нуклеиновой кислоты и клинически релевантная последовательность нуклеиновой кислоты представляют собой два аллеля из одной и той же хромосомы, различающиеся по гетерозиготности. В другом примере фоновая последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой один аллель, гетерозиготный к другому аллелю, который представляет собой клинически релевантную нуклеотидную последовательность. Более того, некоторые из любых - фоновой последовательности нуклеиновой кислоты и клинически релевантной последовательности нуклеиновой кислоты могут происходить от различных индивидуумов.

Термин "референсная последовательность нуклеиновой кислоты", используемый в данном описании, относится к последовательности нуклеиновой кислоты, средняя концентрация которой на реакцию известна или, что одно и то же, измерена.

Термин "сверхпредставленная последовательность нуклеиновой кислоты", используемый в данном описании, относится к одной из двух нуклеотидных последовательностей, представляющих интерес (например, клинически релевантной последовательности нуклеиновой кислоты и фоновой последовательности нуклеиновой кислоты), которой в биологическом образце больше, чем другой последовательности.

Термин "на основании (основе)", используемый в данном описании, обозначает "на основании (основе), по меньшей мере, частично" и относится к одному значению (или результату), используемому при определении другого значения, например, что имеет место в соотношении на входе и выходе данного способа. Термин "получение", используемый в данном описании, также относится к соотношению на входе и выходе данного способа, например, когда получение представляет собой расчет формулы.

Термин "количественные данные", используемый в данном описании, означает, что данные получены из одной или нескольких реакций и что получены одно или несколько численных значений. Например, число лунок, которое показывает флуоресцентный маркер для определенной последовательности, может представлять собой количественные данные.

Термин "параметр", используемый в данном описании, обозначает численное значение, которое характеризует набор количественных данных и/или соотношение между наборами количественных данных. Например, отношение (или функция отношения) между первым количеством первой последовательности нуклеиновой кислоты и вторым количеством второй последовательности нуклеиновой кислоты является параметром.

Термин "пороговое значение", обозначает численное значение, которое используют для того, чтобы вынести решение о двух или большем числе состояний (например, болезненное или неболезненное) для классификации биологического образца. Например, если параметр больше порогового значения, количественным данным дают первую классификацию (например, болезненное состояние); или если параметр меньше порогового значения, количественным данным дают вторую классификацию (например, неболезненное состояние).

Термин "дисбаланс", используемый в данном описании, обозначает значимое отклонение, определенное по меньшей мере по одному пороговому значению в количестве клинически релевантной последовательности нуклеиновой кислоты в сравнении с референсной последовательностью. Например, эталонное количество может представлять собой отношение 3/5, и, таким образом, дисбаланс может иметь место, если измеренное отношение равно 1:1.

Термин "рандомизированное секвенирование", используемый в данном описании, относится к секвенированию, при котором секвенируемые фрагменты нуклеиновой кислоты специфически не идентифицируют или не намечают перед процедурой секвенирования. Специфические к последовательности праймеры для локализации специфических генных локусов не требуются. Секвенированные пулы нуклеиновых кислот изменяются от образца к образцу и даже от анализа к анализу одного и того же образца. Идентичность секвенированных нуклеиновых кислот обнаруживается только исходя из результатов секвенирования. В некоторых воплощениях настоящего изобретения рандомизированному секвенированию могут предшествовать процедуры обогащения биологического образца определенными популяциями молекул нуклеиновых кислот, проявляющих некоторые общие свойства. В одном воплощении каждый из фрагментов в биологическом образце имеет равную вероятность быть секвенированным.

Термин "фракция генома человека" или "часть генома человека", используемый в данном описании, относится к менее чем 100% нуклеотидных последовательностей в геноме человека, который включают около 3 млрд пар оснований нуклеотидов. В контексте секвенирования он относится к менее чем 1-кратному охвату нуклеотидных последовательностей в геноме человека. Термин может выражаться в процентах от абсолютного числа нуклеотидов/пар оснований. Как пример использования, термин может использоваться как относящийся к фактическому объему секвенирования. Воплощения могут определять требуемое минимальное значение секвенированной фракции генома человека для того, чтобы поставить

точный диагноз. Как другой пример использования, термин можно отнести к количеству данных по секвенированию, используемых для получения параметра или всей суммы данных для классификации заболелания.

Термин "секвенированная метка", используемый в данном описании, относится к ряду секвенированных нуклеотидов из любой части или всей молекулы нуклеиновой кислоты. Например, секвенированная метка может представлять собой короткий ряд секвенированных нуклеотидов из фрагмента нуклеиновой кислоты, короткий ряд нуклеотидов по обоим концам фрагмента нуклеиновой кислоты или секвенирование всего фрагмента нуклеиновой кислоты, который существует в биологическом образце. Фрагмент нуклеиновой кислоты представляет собой любую часть более крупной молекулы нуклеиновой кислоты. Фрагмент (например, ген) может существовать отдельно (т.е. не быть связанным) от других частей более крупной молекулы нуклеиновой кислоты.

Осуществление изобретения

Воплощения данного изобретения относятся к способам, системам и аппаратуре для определения того, имеется ли увеличение или уменьшение (болезненное состояние) клинически релевантного хромосомного участка по сравнению с неболезненным состоянием. Такое определение можно осуществить с использованием параметра количества клинически релевантного хромосомного участка относительно других клинически нерелевантных хромосомных участков (фоновые участки) в биологическом образце. Молекулы нуклеиновых кислот биологического образца секвенируют так, что секвенируют часть генома, и количество можно определить из результатов секвенирования. Выбирают одно или несколько пороговых значений для определения того, имеется ли изменение по сравнению с эталонным количеством (т.е. дисбаланс), например, в отношении отношения количеств двух хромосомных участков (или наборов участков).

Изменение, обнаруженное в референсном количестве, может представлять собой любое отклонение (в большую или меньшую сторону) в отношении клинически релевантной последовательности нуклеиновой кислоты к другим клинически нерелевантным нуклеотидным последовательностям. Таким образом, эталонное состояние может представлять собой любое отношение или другую количественную характеристику (например, иное соотношение, чем 1:1) и измеренное состояние, обозначающее изменение, может представлять собой любое отношение или другую количественную характеристику, отличающиеся от референсной количественной характеристики, определенной по одному или нескольким пороговым значениям.

Клинически релевантный хромосомный участок (также называемый клинически релевантной нуклеотидной последовательностью) и фоновая последовательность нуклеиновой кислоты могут происходить от первого типа клеток и от одного или нескольких вторых типов клеток. В одном воплощении пороговое значение определяют на основании, по меньшей мере частично, процента первого типа клеток в биологическом образце. В другом воплощении пороговое значение определяют, по меньшей мере частично, по проценту опухолевых последовательностей в биологическом образце, таком как плазма, сыворотка, слюна или моча, который содержит фон нуклеотидных последовательностей, полученных из незлокачественных клеток организма.

Для выполнения способа по изобретению осуществляют секвенирование по меньшей мере части нескольких фрагментов ДНК, содержащихся в биологическом образце. Секвенированная часть представляет фракцию генома человека. В одном воплощении фрагменты ДНК представляют собой фрагменты соответствующих хромосом. Секвенированы могут быть один конец (например, 35 пар оснований (п.о.)), оба конца или весь фрагмент. Могут быть секвенированы все фрагменты ДНК в образце или может быть секвенировано только подмножество. Такое подмножество может быть выбрано произвольно, а также, как описано подробнее ниже.

В одном воплощении секвенирование осуществляют с использованием массивированного параллельного секвенирования. Массивированное параллельное секвенирование, такое, которого можно достичь на платформе 454 (Roche) (Margulies M. et al., 2005, Nature, 437, 376-380), с анализатором Illumina Genome (или на платформе Solexa) или с системой SOLiD (Applied Biosystems) или технологией секвенирования Helicon True Single Molecule DNA (Harris T.D. et al., 2008, Science, 320, 106-109), одномолекулярной технологией в реальном времени (SMRT™) от Pacific Biosciences и нанопористым секвенированием (Soni G.V. and Meller A., 2007, Clin. Chem., 53:1996-2001), позволяет параллельно секвенировать множество молекул нуклеиновых кислот, выделенных из образца, при высоких порядках мультиплексирования (Dear Brief Funct. Genomic Proteomic, 2003, 1:397-416). На каждой из таких платформ секвенируют клонально размноженные или даже неамплифицированные отдельные молекулы фрагментов нуклеиновых кислот.

Так как при каждом прогоне от каждого образца получают большое число данных секвенирования - порядка от сотен тысяч до миллионов или даже, возможно, сотни миллионов или миллиарды, полученные результаты секвенирования образуют характерный профиль смеси видов нуклеиновых кислот в исходном образце. Например, гаплотип, транскриптома и профили метилирования по данным секвенирования имеют сходство с показателями исходного образца (Brenner et al., Nat. Biotech., 2000, 18:630-634;

Taylor et al., *Cancer Res.*, 2007, 67:8511-8518). Из-за большого числа отобранных последовательностей из каждого образца число идентичных последовательностей, таких как полученные при секвенировании пула нуклеиновых кислот при многократном охвате или высокой избыточности, также является хорошей количественной представленностью количества определенных видов нуклеиновых кислот или локуса в исходном образце.

Далее на основании секвенирования (например, результатов секвенирования) определяют первое количество первой хромосомы (например, клинически релевантной хромосомы). Первое количество определяют из последовательностей, идентифицированных как происходящие от первой хромосомы. Например, затем можно использовать процедуры биоинформатики для определения местонахождения каждой из таких последовательностей ДНК в геноме человека. Возможно, что доля таких последовательностей будет отброшена при последующем анализе, поскольку они присутствуют в повторяющихся участках генома человека или в участках, подвергнутых интериндивидуальным вариациям, например вариациям числа копий. Таким образом можно определить количество хромосомы, представляющей интерес, и одной или нескольких других хромосом.

На основании секвенирования определяют второе количество одной или нескольких вторых хромосом из последовательностей, идентифицированных как происходящие от одной из вторых хромосом. В одном воплощении вторые хромосомы представляют собой все другие хромосомы, кроме одной первой (т.е. испытывают одну). В другом воплощении вторая хромосома представляет собой только одну другую хромосому.

Существует ряд способов определения количеств хромосом, в том числе, но без ограничения, подсчет числа секвенированных меток, числа секвенированных нуклеотидов (пар оснований) или общей длины секвенированных нуклеотидов (пар оснований), происходящих от определенной(ых) хромосомы(хромосом) или участков хромосомы.

В другом воплощении могут быть установлены критерии для результатов секвенирования для определения того, что подсчитывать. В одном аспекте количество можно получить, основываясь на доле секвенированного продукта. Например, после анализа методами биоинформатики можно выбрать продукт секвенирования, соответствующий фрагментам нуклеиновой кислоты в определенном интервале по размеру. Примерами интервалов размера являются примерно <300 п.о., <200 п.о. или <100 п.о.

Затем определяют параметр из первого количества и второго количества. Параметр может представлять собой, например, простое отношение первого количества ко второму количеству или первого количества ко второму количеству плюс первое количество. В одном аспекте каждое количество может представлять собой показатель функции или отдельных функций, где затем из таких отдельных функций может быть взято отношение. Специалисту в данной области техники будет понятно значение ряда различных подходящих параметров.

В одном воплощении параметр (например, представленность фракции) хромосомы, например хромосомы 18 или хромосомы 13, затем можно вычислить из результатов процедуры биоинформатики. Представленность фракции можно получить на основании количества всех последовательностей (например, некоторой меры всех хромосом, включая клинически релевантную хромосому) или определенного подмножества хромосом (например, только одной другой хромосомы кроме испытываемой).

На этой же стадии сравнивают с одним или несколькими пороговыми значениями. Пороговые значения можно определить любым подходящим путем. Такие пути включают метод правдоподобия по баейсовскому типу, последовательный критерий отношения вероятностей (SPRT), ложное обнаружение, доверительный интервал, оперативную характеристику получателя (ROC). Примеры применений таких методов и специфических для образцов методов описаны в одновременно рассматриваемой заявке "Определение дисбаланса нуклеотидных последовательностей" (досье поверенного № 016285-005210US), включенной в данное описание в качестве ссылки.

В одном воплощении параметр (например, представленность фракции клинически релевантной хромосомы) затем сравнивают с референсным интервалом.

На основании сравнения выполняют классификацию - существует ли дисбаланс последовательности для последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты. В одном воплощении классификация представляет собой определенное "да" или "нет". В другом воплощении классификация может быть не поддающейся определению или неопределенной. В еще одном воплощении классификация может представлять собой оценку, которая должна быть интерпретирована позднее, например, врачом.

Как указано выше, секвенируют только часть генома. В одном аспекте, даже когда секвенируют пул нуклеиновых кислот в образце при <100% геномном охвате вместо многократного охвата и из числа захваченных молекул нуклеиновых кислот, большинство каждого вида нуклеиновой кислоты секвенируют только один раз. Также можно определить дисбаланс дозы определенной хромосомы или участков хромосомы. Иными словами, дисбаланс дозы определенной хромосомы или участков хромосомы выводят из представленности в процентах указанного локуса среди других картируемых секвенированных меток образца.

Это контрастирует с ситуациями, когда один и тот же пул нуклеиновых кислот секвенируют не-

сколько раз для того, чтобы достичь высокой избыточности или многократного охвата, посредством чего каждый вид нуклеиновой кислоты секвенируют несколько раз. В таких ситуациях число раз секвенирования определенного вида нуклеиновой кислоты относительно другого вида нуклеиновой кислоты коррелирует с их относительными концентрациями в исходном образце. Стоимость секвенирования возрастает с числом крат охвата, требуемым для достижения точной представленности вида нуклеиновой кислоты.

В одном воплощении используют анализатор Illumina Genome для секвенирования геномной ДНК человека и образцов ДНК плазмы человека по одному концу. Анализатор Illumina Genome секвенирует молекулы клонально размноженной одной ДНК, захваченные на твердой поверхности, названной проточной ячейкой. Каждая проточная ячейка имеет 8 полос для секвенирования 8 отдельных образцов или пулов образцов. Каждая полоса способна генерировать ~200 млн.осн. (Mb) последовательности, которая представляет собой только фракцию последовательностей в 3 млрд пар оснований в геноме человека. Каждую геномную ДНК или образец ДНК плазмы секвенируют с использованием одной полосы проточной ячейки. Полученные короткие метки последовательностей выравнивают с референсной последовательностью генома и отмечают хромосомное происхождение. Общее число отдельных секвенированных меток, выровненных с каждой хромосомой, табулируют и сравнивают с относительным размером каждой хромосомы, ожидаемой от эталонного генома человека или характерных образцов без заболевания. Затем идентифицируют прирост или утрату хромосом.

Описанный подход является только одним примером описанной в данном описании стратегии дозы гена/хромосомы. С другой стороны, можно осуществить секвенирование по парным концам. Вместо сравнения длины секвенированных фрагментов с длиной, ожидаемой в референсном геноме, как описано в Campbell et al. (Nat. genet., 2008, 40: 722-729), подсчитывают число выровненных секвенированных меток и сортируют согласно местоположению хромосом. Прирост или утрату хромосомных участков или целых хромосом определяют путем сравнения полученных чисел с ожидаемым размером хромосом в референсном геноме или в характерных образцах без заболевания. Так как секвенирование по парным концам дает возможность установить размер исходного фрагмента нуклеиновой кислоты, в одном примере фокусируются на подсчете числа парных секвенированных меток, соответствующих фрагментам нуклеиновых кислот обусловленного размера, такого как <300 п.о., <200 п.о. или <100 п.о.

В другом воплощении фракцию пула нуклеиновых кислот, которую секвенируют за прогон, подвергают дополнительному отбору перед секвенированием. Например, можно использовать методы на основе гибридизации, такие как олигонуклеотидная матрица, для первого подбора нуклеотидных последовательностей из определенной хромосомы. Другим примером является то, что перед секвенированием из пула образцов дополнительно выбирают или обогащают определенное подмножество нуклеотидных последовательностей. Например, специалисты в данной области техники могут использовать один или несколько известных способов фракционирования нуклеотидных последовательностей в образце в соответствии с размером молекул, например электрофорез в геле или колонки для исключения по размеру или подход на основе микрогидродинамики. В одном воплощении часть подмножества предварительно отобранного пула нуклеиновых кислот секвенируют рандомизированно.

Другие стратегии секвенирования отдельных молекул, такие как на платформе 454 Roche, платформе Applied Biosystems SOLiD, технология секвенирования Helicon True Single Molecule DNA, одномолекулярная технология в реальном времени (SMRT) от Pacific Biosciences и нанопористое секвенирование, можно подобным образом использовать в данной заявке.

После массового параллельного секвенирования осуществляют анализ методами биоинформатики для установления места хромосомного происхождения секвенированных меток. Число различных количеств секвенированных меток включает, но не ограничивается перечисленным далее из того, что можно было бы получить из секвенированных меток. Например, число секвенированных меток, т.е. подсчитанных абсолютно, выровненных с определенной хромосомой, можно было бы сравнить с абсолютным числом секвенированных меток, выровненных с другими хромосомами. Общее число секвенированных нуклеотидов для любой определенной хромосомы будет преимущественно соответствовать количеству, доле или длине части указанной хромосомы, которая секвенирована. Следовательно, количественное определение представленности потенциально ассоциированной с раком хромосомы можно получить из фракции числа или эквивалентной длины секвенированных нуклеотидов из такой хромосомы относительно полученного подобным образом количества для других хромосом.

Как указано выше и установлено в разделе примеров ниже, только часть генома человека требуется для секвенирования. Таким образом, возможно и эффективно по стоимости обогащать пул нуклеиновых кислот для секвенирования перед рандомизированным секвенированием фракции обогащенного пула. Таким образом, специалисты могут использовать один или несколько известных способов для фракционирования нуклеотидных последовательностей в образце в соответствии с размером молекул, например, с помощью электрофореза в геле или колонок для исключения по размерам или подхода на основе микрогидродинамики.

С другой стороны, последовательности можно обогатить методами гибридизации, например, на

олигонуклеотидных микроматрицах. Затем обогащенные пулы нуклеиновых кислот можно подвергнуть рандомизированному секвенированию. Это может создать возможность для уменьшения стоимости секвенирования.

В одном аспекте в случае подхода с массивным параллельным секвенированием одновременно можно получить представительные результаты от всех хромосом. Источник определенного фрагмента заранее не выбирают. Секвенирование осуществляют рандомизированно, и затем можно осуществить поиск в базе данных для того, чтобы увидеть, откуда появился определенный фрагмент. Это противоположно ситуациям, когда амплифицируют специфический фрагмент из одной хромосомы и другой фрагмент из другой хромосомы.

Согласно другому аспекту осуществления изобретения рандомизированно секвенируют, по меньшей мере, N молекул из множества молекул нуклеиновых кислот, содержащихся в биологическом образце. Особенностью такого описанного подхода является то, что секвенируемые нуклеиновые кислоты специально не идентифицируют или не локализируют перед анализом образца, т.е. секвенированием. Специфические не последовательности праймеры для локализации специфических генных локусов для секвенирования не требуются. Пулы секвенированных нуклеиновых кислот изменяются от образца к образцу и даже от анализа к анализу одного и того же образца. Более того, количество продукта секвенирования, необходимое в случае диагностики, может изменяться между испытываемыми образцами и референсной популяцией. Такие аспекты заметно контрастируют с большинством диагностических подходов, таких как основанные на флуоресценции гибридизации *in situ*, количественной флуоресцентной ПЦР, количественной ПЦР в реальном времени, численной ПЦР, сравнительной геномной гибридизации, микроматричной сравнительной геномной гибридизации и т.д., где требуется локализация генных локусов до предварительного определения, причем таким образом необходимо использовать локуспецифические праймеры или набор зондов или их панели.

Можно осуществлять рандомизированное секвенирование на фрагментах ДНК, которые присутствуют в плазме, и получить геномные последовательности. Рандомизированное секвенирование включает получение образцов (секвенирование) произвольной части молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в биологическом образце. Так как секвенирование рандомизированное, в каждом анализе могут быть секвенированы различные подмножества (фракции) молекул нуклеиновых кислот (и, таким образом, генома), причем даже в тех случаях, когда такое подмножество изменяется от образца к образцу и от анализа к анализу, что может происходить даже с использованием одного и того же образца. Примеры фракции составляют примерно 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 или 30% генома. В других воплощениях фракция составляет, по меньшей мере, любую из указанных величин.

Подмножество данных секвенирования может представлять собой долю секвенированных меток, которые выходят за пределы некоторых качественных параметров. Например, можно использовать секвенированные метки, которые уникально выравниваются с референсным геномом человека, замаскированного повторами. С другой стороны, можно секвенировать характерный пул фрагментов нуклеиновых кислот из всех хромосом, но сосредоточиться на сравнении между данными, относящимися к потенциально ассоциированной с раком хромосоме, и данными, относящимися к ряду хромосом, не ассоциированных с раком.

Также с другой стороны, подмножество продукта секвенирования, охватывающее секвенированные метки, образованные из фрагментов нуклеиновых кислот, соответствующих окну определенного размера в исходном образце, можно разобрать во время анализа после секвенирования. Например, с использованием анализатора Illumina Genome можно использовать секвенирование по парным концам, которое относится к секвенированию обоих концов фрагментов нуклеиновых кислот. Данные секвенирования каждой пары концов затем выравнивают с референсной последовательностью генома человека. Затем можно установить расстояние или число нуклеотидов, заключающихся между двумя концами. Также можно установить полную длину исходного фрагмента нуклеиновой кислоты. С другой стороны, платформы секвенирования, такие как платформа 454, и возможно, некоторые другие методы одномолекулярного секвенирования, дают возможность секвенировать полную длину коротких фрагментов нуклеиновых кислот, например 200 п.о. Таким способом из данных секвенирования можно сразу же узнать фактическую длину фрагмента нуклеиновой кислоты.

Такой анализ парных концов также возможен с использованием других платформ секвенирования, например, системы Applied Biosystems SOLiD. В случае платформы Roche 454 из-за повышенной регистрируемой длины по сравнению с другими системами массивного параллельного секвенирования также возможно определить длину фрагмента из его полной последовательности.

Отбор подмножеств пулов нуклеиновых кислот после секвенирования отличается от других стратегий обогащения нуклеиновых кислот, которые осуществляют перед анализом образца, таких как применение электрофореза в геле или колонок с исключением по размерам, для отбора нуклеиновых кислот определенного размера, которые требуют физического отделения обогащенного пула от фонового пула нуклеиновых кислот. Физические процедуры будут вводить больше экспериментальных стадий и могут привести к проблемам, таким как загрязнение. Отбор *in silico* после секвенирования подмножеств из продукта секвенирования также может допускать отбор в зависимости от чувствительности и специфич-

ности, требуемых для определения заболевания.

Биоинформативные, вычислительные и статистические подходы можно исполнить в компьютерном программном продукте, используемом для определения параметров из результатов секвенирования. Работа компьютерной программы может включать определение поддающегося измерению количества потенциально хромосомы, ассоциированной с раком, а также количества(количеств) одной или нескольких других хромосом. Параметр можно определить и сравнить с соответствующими пороговыми значениями для определения, существует ли дисбаланс последовательности, ассоциированный с раком для указанной последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты.

В одном варианте осуществления дозировку хромосомы определяют с помощью анализа с использованием цифровой ПЦР. В анализе с использованием цифровой ПЦР две сравниваемые гипотезы будут представлять собой нулевую гипотезу об отсутствии хромосомного дисбаланса и альтернативную гипотезу о том, что хромосомный дисбаланс существует.

Этот подход может быть применен к обнаружению рака путем анализа изменения отношения хромосомы, обычно удаляемой, частично при раке, к референсной хромосоме. Примеры первого включают хромосому 5q при колоректальном раке, хромосому 3p при раке легкого и хромосому 9p при раке носоглотки. В табл. I перечислены некоторые распространенные связанные с раком хромосомные aberrации, которые приводят к дисбалансу последовательности.

Таблица I. Примеры обычно обнаруживаемых хромосомных aberrаций при раке

Рак	Обычные хромосомные aberrации	
	Прирост	Потеря
Рак мочевого пузыря ¹	7	9p; 11q; 17p
Рак молочной железы ²	1q; 8q; 17q; 20q	8p; 13q; 16q; 18q
Колоректальный рак ³	7; 8q; 13q; 20q	1p; 5q; 8p; 15q; 17p; 18q
Печеночно-клеточный рак ⁴	1q; 8q; 20q	4q; 8p; 13q; 16q; 17p
Немелкоклеточный рак легких ⁵	1q; 3q; 5p; 8q	3p; 8p; 9p; 13q; 17p
Мелкоклеточный рак легких ⁵	3q; 5p; 8q; 19q	3p; 4q; 5q; 10q; 13q; 16q
Рак носоглотки ⁶	1q; 3q; 8; 12; 19	1p; 3p; 9; 11q; 13q; 14q; 16q
Рак предстательной железы ⁷	7; 8q; Xq	8p; 13q; 16q

Пример.

Приведенный далее пример приводится для пояснения, но не для ограничения заявленного изобретения.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение может быть выполнено для классификации образца, как имеющего соотношение аллелей без отклонения или с отклонением, как может наблюдаться в раковой опухоли. В одном аспекте для каждого случая число лунок с положительным сигналом только для А-аллеля, только для G-аллеля и для обоих аллелей было определено посредством цифровой ПЦР. Референсный аллель был определен как аллель в наименьшем числе положительных лунок. В маловероятном сценарии, когда оба аллеля имеют одно и то же число положительных лунок, любой из них можно использовать в качестве референсного аллеля. Предполагаемую среднюю концентрацию референсного аллеля на лунку (m_r) рассчитывали с применением общего числа лунок, отрицательных по референсному аллелю, независимо от того, был ли другой аллель положительным, в соответствии с плотностью распределения вероятности по закону Пуассона. Мы использовали гипотетический пример для иллюстрации расчетов.

Из 96 реакционных лунок 20 лунок являются положительными в отношении аллеля А, 24 лунки являются положительными в отношении аллеля G и 28 лунок являются положительными по обоим аллелям. Аллель А будет рассматриваться как референсный аллель, поскольку меньше всего лунок являются положительными по этому аллелю. Число лунок, отрицательных по референсному аллелю, будет составлять $96 - 20 - 28 = 48$. Таким образом, m_r может быть рассчитано с применением распределения Пуассона и будет составлять $-\ln(48/96) = 0,693$.

В контексте детекции утраты гетерозиготности (LOH) нулевая гипотеза относится к образцу, который считается не имеющим отклонения в соотношении аллелей, вызванного присутствием делеции одного аллеля. С учетом этого предположения ожидаемое соотношение числа положительных лунок по двум аллелям будет составлять 1:1, и таким образом, ожидаемая пропорция информативных лунок (лунок, положительных только по одному аллелю), содержащих потенциально сверхпредставленный аллель, будет составлять 0,5.

В контексте детекции LOH альтернативная гипотеза относится к образцу, который считается име-

ющим отклонение в соотношении аллелей, вызванное присутствием делеции одного аллеля в 50% клеток образца. Поскольку соотношение аллелей между сверхпредставленным аллелем и референсным аллелем составляет 2:1, средняя концентрация сверхпредставленного аллеля на лунку будет удвоена по отношению к референсному аллелю. Однако число лунок, положительных по сверхпредставленному аллелю, будет не просто увеличенным двукратно по отношению к референсному аллелю, но будет следовать распределению Пуассона.

Информативной лункой считается лунка, положительная либо по аллелю А, либо по аллелю G, но не по обоим аллелям. Расчет предполагаемой пропорции числа лунок, содержащих сверхпредставленные аллели для образцов с отклонением в соотношении аллелей, является таким, как показано в таблице 600 (фиг. 1). В вышеуказанном примере, если LOH присутствует в 50% опухолевых клеток, средняя концентрация аллеля G на лунку будет $2 \times 0,693 = 1,386$. Если LOH присутствует в более чем 50% опухолевых клеток, средняя концентрация аллеля G на лунку будет соответствовать формуле: $1/[1-(\text{пропорция с LOH})] \times m_r$.

Ожидаемая пропорция лунок, положительных по аллелю G, будет составлять $1 - e^{-1,386} = 0,75$ (т.е. 75% или 72 лунки). С учетом того, что лунки положительны по аллелю А или аллелю G независимо, $0,5 \times 0,75 = 0,375$ лунок будут положительными и по аллелю А, и по аллелю G. Следовательно, $0,5 - 0,375 = 0,125$ лунок будут положительными только по аллелю А, а $0,75 - 0,375 = 0,375$ лунок будут положительными только по аллелю G. Таким образом, пропорция информативных лунок будет составлять $0,125 + 0,375 = 0,5$. Ожидаемая пропорция информативных лунок, несущих аллель G, будет составлять $0,375 / 0,5 = 0,75$. Это ожидаемое значение для P_r может быть использовано для построения подходящих кривых SPRT для определения того, присутствует ли отклонение в соотношении аллелей (т.е. LOH в этом контексте) в образце.

Фактическая пропорция информативных лунок, несущих неререференсный аллель, экспериментально определенная посредством анализа с использованием цифровой ПЦР (P_r), была затем использована для определения того, может быть принята нулевая или альтернативная гипотеза, или будет ли необходим дополнительный анализ большего числа лунок. Решающие границы для P_r для принятия нулевой или альтернативной гипотезы были рассчитаны на основе порогового отношения правдоподобия 8, поскольку было показано, что это значение обеспечивает удовлетворительную эффективность для дифференцировки образцов с дисбалансом и без дисбаланса аллелей в контексте выявления рака (Zhou et al., 2001, Zhou et al., 2002). В вышеприведенном примере число информативных лунок будет составлять $20 + 24 = 44$, а экспериментально полученное значение P_r будет составлять $24/44 = 0,5455$. Решающие границы будут $\leq 0,5879$ для принятия нулевой гипотезы и $\geq 0,6739$ для принятия альтернативной гипотезы. Таким образом, образец в данном примере будет классифицирован как НЕ имеющий отклонения в соотношении аллелей.

Приведенное выше описание примеров воплощения изобретения представлено в целях пояснения и описания. Не предполагается, что оно является исчерпывающим или ограничивает изобретение точно описанной формой, и в свете описанного выше возможны многие модификации и вариации. Воплощения выбраны и описаны для наилучшего понимания принципов изобретения и его практических применений, которые позволят другим специалистам в данной области техники применять изобретение наилучшим образом в различных воплощениях и различных модификациях, которые подходят для определенного предполагаемого применения.

Все публикации, патенты и заявки на патент, цитированные в данном описании, входят в него в качестве ссылок.

Дополнительные ссылки

1. Sandberg AA: Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer: a personal view. *Am J Med Genet* 115:173-182, 2002
2. Popescu NC, Zimonjic DB: Chromosome and gene alterations in breast cancer as markers for diagnosis and prognosis as well as pathogenetic targets for therapy. *Am J Med Genet* 115:142-149, 2002
3. Grady WM: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23:11-27, 2004
4. Lau SH, Guan XY: Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin* 26:659-665, 2005
5. Balsara BR, Testa JR: Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 21:6877-6883, 2002
6. Lo KW, Huang DP: Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12:451-462, 2002
7. Hughes C, Murphy A, Martin C, et al: Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 58:673-684, 2005

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Реализуемый на компьютере способ анализа биологического образца на наличие хромосомных aberrаций, ассоциированных с раком, в котором биологический образец включает фрагменты ДНК, происходящие из незлокачественных клеток и потенциально из злокачественных опухолевых клеток, включающий

получение данных из рандомизированного секвенирования фрагментов ДНК, содержащихся в указанном биологическом образце, где биологический образец представляет собой плазму, сыворотку, слюну или мочу;

определение первого количества последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты, которая потенциально делетирована или амплифицирована при злокачественной опухоли;

определение второго количества фоновой последовательности нуклеиновой кислоты, нормальное отношение которой к указанной последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты известно;

определение параметра для указанного первого количества и указанного второго количества, где этот параметр представляет собой отношение между указанным первым количеством и указанным вторым количеством;

сравнение этого параметра с одним или несколькими пороговыми значениями, раскрытыми в описании, для определения того, существует ли хромосомная aberrация, ассоциированная с раком, для указанной последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты в указанном биологическом образце.

2. Способ по п.1, где определяют, что последовательность указанной клинически релевантной нуклеиновой кислоты амплифицирована, когда указанный параметр больше, чем пороговое значение.

3. Способ по п.1, где определяют, что указанная последовательность клинически релевантной нуклеиновой кислоты содержит делецию, когда параметр меньше, чем пороговое значение.

4. Способ по п.1, в котором указанное отношение выражает долю последовательности клинически релевантной нуклеиновой кислоты в указанном биологическом образце.

5. Способ по п.1, где по меньшей мере одно или более пороговых значений представляют собой референсное количество, определенное в нормальном биологическом образце.

6. Способ по п.1, в котором по меньшей мере одно пороговое значение получено на основе количества опухолевых последовательностей в указанном биологическом образце.

7. Способ по п.1, в котором указанный параметр представляет собой долю фрагментов ДНК в биологическом образце, которые происходят из последовательности указанной клинически релевантной нуклеиновой кислоты.

8. Способ по п.1, где указанное отношение представляет собой отношение хромосомы, обычно удаленной при раке, к референсной хромосоме.

9. Способ по п.1, в котором вычисление указанного порогового значения включает методы тестирования последовательных критериев отношения вероятностей, вычисление средней доли ложных отклонений гипотезы, доверительные интервалы, операционные характеристики ресивера или их комбинации.

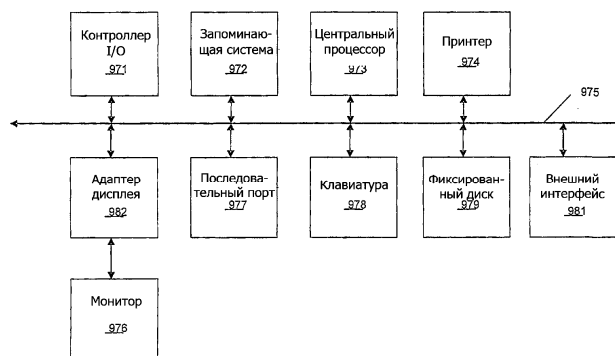
10. Способ по п.1, в котором хромосомную aberrацию обнаруживают с использованием множества последовательностей клинически значимых нуклеиновых кислот.

11. Компьютер, запрограммированный для осуществления способа по любому из предшествующих пунктов.

m	Пропорция лунок, положительных по референсному аллелю	Пропорция лунок, положительных по сверхпредставленному аллелю	Пропорция лунок, положительных по обоим аллелям	Пропорция лунок, положительных по референсному аллелю ТОЛЬКО	Пропорция лунок, положительных по сверхпредставленному аллелю ТОЛЬКО	Численное соотношение аллелей	Пропорция информативных лунок	P_i
0.1	0.0952	0.1813	0.0173	0.0779	0.164	2.11	0.2419	0.68
0.2	0.1813	0.3297	0.0598	0.1215	0.2699	2.22	0.3914	0.69
0.3	0.2592	0.4512	0.1169	0.1422	0.3342	2.35	0.4765	0.7
0.4	0.3297	0.5507	0.1815	0.1481	0.3691	2.49	0.5173	0.71
0.5	0.3935	0.6321	0.2487	0.1448	0.3834	2.65	0.5282	0.73
0.6	0.4512	0.6988	0.3153	0.1359	0.3835	2.82	0.5194	0.74
0.7	0.5034	0.7534	0.3793	0.1241	0.3741	3.01	0.4983	0.75
0.8	0.5507	0.7981	0.4395	0.1112	0.3586	3.23	0.4698	0.76
0.9	0.5934	0.8347	0.4953	0.0981	0.3394	3.46	0.4375	0.78
1	0.6321	0.8647	0.5466	0.0855	0.3181	3.72	0.4036	0.79
1.1	0.6671	0.8892	0.5932	0.0739	0.296	4	0.3699	0.8
1.2	0.6988	0.9093	0.6354	0.0634	0.2739	4.32	0.3373	0.81
1.3	0.7275	0.9257	0.6734	0.054	0.2523	4.67	0.3063	0.82
1.4	0.7534	0.9392	0.7076	0.0458	0.2316	5.06	0.2774	0.83
1.5	0.7769	0.9502	0.7382	0.0387	0.212	5.48	0.2507	0.85
1.6	0.7981	0.9592	0.7656	0.0325	0.1937	5.95	0.2262	0.86
1.7	0.8173	0.9666	0.79	0.0273	0.1766	6.47	0.2039	0.87
1.8	0.8347	0.9727	0.8119	0.0228	0.1608	7.05	0.1836	0.88
1.9	0.8504	0.9776	0.8314	0.019	0.1462	7.69	0.1652	0.88
2	0.8647	0.9817	0.8488	0.0158	0.1329	8.39	0.1487	0.89

600

Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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