

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192485** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.05.31**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.10.11**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6813* (2006.01)  
*C12Q 1/6827* (2006.01)  
*C12Q 1/6844* (2006.01)  
*C12Q 1/686* (2006.01)  
*C12Q 1/682* (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПА ЧЕЛОВЕКА, СВЯЗАННОГО С  
АЦЕТИЛИРОВАНИЕМ КСЕНОБИОТИКОВ**

---

(31) **2020137412**

(32) **2020.11.13**

(33) **RU**

(71) Заявитель:  
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ ИРКУТСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ;  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И  
РЕПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА" (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Огарков Олег Борисович,  
Перетолчина Надежда Павловна,  
Малов Сергей Игоревич, Орлова  
Елизавета Андреевна, Степаненко  
Лилия Александровна, Хромова  
Полина Андреевна (RU)**

(74) Представитель:  
**Шестакова Т.А. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к фармагенетике, молекулярной диагностике и касается олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентных ДНК-зондов и способа определения генотипа человека, связанного с быстрым и медленным ацетилированием ксенобиотиков. Генотипирование ариламин-N-ацетилтрансферазы осуществляют путем детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флюоресцентно-меченных зондов, содержащих участки "замкнутых нуклеотидов", NAT2 5'-R6G-AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-BHQ2 и 5'-FAM-AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95° - 5 мин, 40 циклов 95° -10 с, 65° - 15 с, 72° - 15 с. Оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18-38 циклами.

---

**202192485  
A1**

**202192485  
A1**

## Способ определения генотипа человека, связанного с ацелированием ксенобиотиков

Предполагаемое изобретение относится к медицине, а именно к фармакогенетике, молекулярной диагностике, и касается олигонуклеотидных праймеров, флуоресцентных ДНК-зондов и способа определения генотипа человека, связанного с быстрым и медленным ацелированием ксенобиотиков.

Ариламин-N-ацелилтрансфераза 2 (NAT2) – фермент второй фазы биотрансформации ксенобиотиков, осуществляющий ацелирование ариламинов и гидразинов. Фермент синтезируется во всех клетках организма, но его наибольшая активность наблюдается в клетках печени, где завершается детоксикация веществ. Ген фермента локализован на 8 хромосоме (8p22) и имеет ряд полиморфизмов, комбинация которых привела к существованию двух гаплотипов, ассоциированных с медленным или быстрым ацелированием субстрата (Hein, David W. "N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine." Expert opinion on drug metabolism & toxicology 5.4 (2009): 353-366). Сочетание аллельных вариантов гена NAT2 приводит к тримодальному распределению популяции на быстрых, медленных и промежуточных ацелиляторов.

NAT2 участвует в ацелировании ароматических и гетероциклических аминов, которые содержатся в табачном дыме, загрязнителях окружающей среды, продуктах горения, эндогенных соединениях (серотонин, гистамин, дофамин), некоторых лекарственных веществах, а также выделяются в атмосферный воздух при производстве красок, резине, каменноугольного газа.

В медицине наибольшее практическое значение имеет оценка скорости ацелирования лекарственных препаратов. В исследованиях ряда ученых об эффективности и безопасности использования изониазида для лечения больных с туберкулезом показана зависимость частоты нейро- и гепатотоксического эффекта препарата от генотипа: медленные ацелиляторы имели более высокие риски развития токсических эффектов при применении изониазида (Ho, Hsin-Tien, et al. "The NAT2 tag SNP rs1495741 correlates with the susceptibility of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity." Pharmacogenetics and Genomics 23.4 (2013): 200-207). Кроме того, медленные ацелиляторы имеют предрасположенность к развитию лекарственной системной красной волчанке при длительном лечении антиаритмическими препаратами (прокаинамид, гидралазин), гематологической токсичности при применении дапсона,

токсического эпидермального некролиза при лечении инфекционных заболеваний антибиотиками группы сульфаниламидов. Быстрые ацетиляторы, по сравнению с медленными, в меньшей степени подвержены токсическим эффектам, но эффективность применения лекарственных средств у данной группы снижена в связи с быстрым метаболизмом и выведением из организма действующего вещества, что приводит к уменьшению времени его воздействия на клетки-мишени. Определение генотипа гена NAT2 позволяет назначать лекарственные средства в соответствии с индивидуальными особенностями пациента, что является актуальным для развития персонифицированной медицины. Кроме этого замедление скорости ацетилирования обуславливает повышенный риск развития рака из-за снижения дезактивации ароматических аминов. В ряде исследований показана связь предрасположенности к онкологическим заболеваниям, таким как рак груди и рак мочевого пузыря, с генотипом NAT2, особенно среди курильщиков (Umberto Gelatti et al. "N-Acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms, cigarette smoking and hepatocellular carcinoma: A case-control study". *Int. J. Cancer*: 115, (2005):301–306. Таким образом, генетически детерминированные особенности биотрансформации ксенобиотиков определяют индивидуальные реакции организма на разнообразные токсические вещества и лекарственные препараты.

Известно несколько методов генотипирования гена NAT2, основанные на определении семи SNP: rs1801279 (G191A), rs1041983 (C282T), rs1801280 (T341C), rs1799929 (C481T), rs1799930 (G590A), rs1208 (A803G), rs1799931 (G857A) [Bolt HM, Selinski S, Dannappel D, Blaszkewicz M, Golka K. Re-investigation of the concordance of human NAT2 phenotypes and genotypes. *Arch Toxicol*. 2005;79:196–200].

Известен способ секвенирование второго экзона гена NAT2 и определение генотипа с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186). Однако применение данного способа ограничено в медицинской практике в связи со сложностью пробоподготовки, длительностью выполнения теста и высокой стоимостью оборудования и наборов.

Известен способ генотипирования, основанный на анализе полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК (полимеразная цепная реакция в реальном времени) [Miller, M.A., Grigg, M.E., Kreuder, C., James, E.R., Melli, A.C., Crosbie, P.R., Jessup, D.A., Boothroyd, J.C., Brownstein, D., Conrad, P.A., 2004. An unusual genotype of *Toxoplasma*

gondiiis common in California sea otters(*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int. J. Parasitol.* 34,275–284.]. Недостатком способа является его время- и трудозатратность, так как он включает в себя проведение двух полимеразных цепных реакций и использование 7 рестрикционных ферментов с последующей детекцией в агарозном геле.

5 Известен способ определения полиморфизма гена NAT2 (rs1801280) в комбинации с генами других ферментов биотрансформации с помощью метода гибридизации на биологическом чипе. Разработана диагностическая система «ПФ-Биочип» (Рег. Уд. No ФС 01262006/5317–06) для выявления и диагностики предрасположенности к развитию онкологических заболеваний и для определения индивидуальной чувствительности к некоторым лекарственным препаратам (5-фторурацилу, метотрексату, омепразолу и др.).  
10 К недостаткам способа относится длительность анализа (Gra, O. A., et al. "Genetic polymorphism of GST, NAT2, and MTRR and susceptibility to childhood acute leukemia." *Molecular Biology* 42.2 (2008): 187). Кроме того, полиморфизм rs1801280 часто определяют в комбинации с rs1041983 для более точного предсказания генотипа NAT2.

15 Наиболее близким способом является «Набор и метод для обнаружения полиморфизма гена NAT2 с использованием флуоресцентной количественной ПЦР в реальном времени» (Рег. уд. № WO/2014/036924). Для обнаружения ключевого однонуклеотидного полиморфизма (SNP) используют набор олигонуклеотидных праймеров с последующим проведением флуоресцентной количественной полимеразной  
20 цепной реакции в реальном времени.

Перечисленные выше способы обладают рядом недостатков – высокая трудозатратность и стоимость наборов, длительность выполнения теста, что затрудняет их использование в практической медицине.

Техническим результатом предлагаемого способа является сокращение времени  
25 определения, а также повышение чувствительности и специфичности при доступности оборудования и реактивов.

Новым в предлагаемом способе является то, что генотипирование ариламин-N-ацетилтрансферазы осуществляют на основании детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA  
30 и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флуоресцентно-меченных зондов, содержащих участки «замкнутых нуклеотидов» NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCCA(C-LNA)ATT – BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT – RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95<sup>0</sup> – 5 мин., 40 циклов 95<sup>0</sup> – 10 сек., 65<sup>0</sup> – 15 сек., 72<sup>0</sup> - 15 сек.

Новым является также то, что оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18—38 циклами.

Для выявления ключевого однонуклеотидного полиморфизма (tag SNP) rs1495741 были использованы сконструированные авторами синтетические олигонуклеотидные праймеры и ДНК-зонды:

1) Праймеры NAT2F 5'- AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'- GCCACTCATGGTCACTTCGGC

2) Флуоресцентно-меченные зонды NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT – BHQ2 еки 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT – RTQ1.

Достоинство предлагаемого способа в том, что определения генотипа NAT2 включает выделение ДНК из крови, слюны и других биологических образцов, проведение полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) с разработанными олигонуклеотидными праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами в режиме амплификации (1 цикл 95°C - 5 мин; 40 циклов 95°C - 10 сек., 65°C - 15 сек., 72°C - 15 сек.) и оценку результата. Оценка результата проводят путем регистрации сигнала флуоресценции по каналам FAM (520 нм) и R6G (557 нм) путем детекции сигнала между 18-38 циклами. Проведенный анализ патентной и научной литературы показал, что предложенный способ отличается от других решений в данной области. Так праймеры и зонды, необходимые для детекции гаплотипов NAT2 с помощью ПЦР-РВ, не были найдены. По сравнению с используемыми методами ПЦР-ПДФ, гибридизации на биочипе и секвенирования сконструированные праймеры и ДНК-зонды позволяют быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью определить генотип NAT2 и тип ацетилирования на основании SNP в позиции 18415371 хромосомы 8: А;А – медленный, А;G – промежуточный, G;G – быстрый. Предлагаемый способ отличается высокой скоростью проведения, доступностью оборудования и реактивов для его проведения и высокой чувствительностью и специфичностью. Было показано, что результаты генотипирования с помощью данного SNP коррелируют с типом ацетилирования, который был предсказан на основании семи SNP в последовательности второго экзона гена NAT2 (Selinski, Silvia, et al. "Genotyping NAT2 with only two SNPs (rs1041983 and rs1801280) outperforms the tagging SNP rs1495741 and is equivalent to the conventional 7-SNP NAT2 genotype." *Pharmacogenetics and genomics* 21.10 (2011): 673-678.).

Конструирование праймеров и зондов осуществлено в ручном режиме исходя из структуры описания SNP rs1495741 в референсных геномах (нуклеотидной

последовательности справа и слева от позиции мишени)  
[\[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1495741\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1495741).

NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3';

NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3';

5 Зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' – BHQ2;

Зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' – RTQ1.

Химический синтез праймеров и зондов осуществляют по нашему заказу в НПФ "Синтол" (Москва), там же определяют концентрацию олигонуклеотидов. Для работы авторы используют разведение олигонуклеотидных праймеров и зондов из лиофильно-высушенного материала. Зонд 1 мечен флуорофором R6G по 5'-концу и гасителем флуоресценции BHQ2 по 3'-концу. Детекцию сигнала проводили по "желтому" (R6G/Yellow) каналу (длина волны 557 нм). Зонд 2 мечен флуорофором FAM по 5'-концу и гасителем флуоресценции RTQ1 по 3'-концу. Детекцию сигнала проводили по "зеленому" (FAM/Green) каналу детекции в термоциклере RotorGene6000 (длина волны 15 520 нм).

Указанные праймеры были подобраны исходя из анализа структуры гена в диапазоне 200 п.н. вокруг tag SNP rs1495741.

Сопоставительный анализ предлагаемого способа и прототипа показывает, что предлагаемый способ отличается тем, что генотипирование ариламин-N-ацетилтрансферазы осуществляют путем детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флуоресцентно-меченных зондов, содержащих участки «замкнутых нуклеотидов»: NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT – BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT – RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95<sup>0</sup> – 5 мин., 40 циклов 95<sup>0</sup> – 10 сек., 65<sup>0</sup> – 15 сек., 72<sup>0</sup> – 15 сек., а оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18—38 циклами, что соответствует критерию «новизна».

Предлагаемый способ позволяет быстро и с высокой чувствительностью и специфичностью определить генотип NAT2 и тип ацетилирования в исследуемом материале. Преимуществом предложенного способа является сокращение времени

исследования, простая и автоматизированная интерпретация результатов, доступность способа для клинических лабораторий.

Способ осуществляют следующим образом.

Выделяют ДНК из крови, слюны или других биологических образцов. Материал помещают в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производят набором ДНК-сорб-В согласно протоколу производителя (Интерлабсервис, Москва). Осуществляют идентификацию генотипа NAT2. К 12,5 мкл пробы добавляют 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для полимеразной цепной реакции, праймер NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3', NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3', зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' – BHQ2, зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' – RTQ1, сульфат магния, смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси – 25 мкл. Проводят полимеразную цепную реакцию с детекцией в реальном времени с разработанными олигонуклеотидными праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами в режиме амплификации. Режимы амплификации ДНК на амплификаторе CFX БиоРад: 1 цикл 95°C - 5 мин; 40 циклов 95°C - 10 сек., 65°C - 15 сек, 72°C - 15 сек. Оценку результата проводят путем регистрации сигнала флуоресценции по каналам FAM (520 нм) и R6G (557 нм) путем детекции сигнала между 18-38 циклами. Предложенный способ позволяет быстро, с высокой специфичностью выявить аллель 1495741A, связанный с медленным ацелированием ксенобиотиков, и аллель 1495741G, связанный с быстрым ацелированием ксенобиотиков. Присутствие обоих аллелей 1495741A и 1495741G оценивают как генотип, связанный с умеренной скоростью ацелирования.

Примеры конкретного выполнения способа

Пример 1. Производили соскоб буккального эпителия с внутренней стороны щеки у добровольца А. Материал помещали в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Москва) согласно протоколу производителя. К 12,5 мкл пробы добавили 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для ПЦР; праймер NAT2F 5'-AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3'; NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3'; зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCA(C-LNA)ATT-3' – BHQ2; зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' – RTQ1; сульфат магния; смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов; TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси – 25 мкл. При

регистрации сигнала наблюдали экспоненциальный рост флюоресценции по FAM между 18-38 циклами, что свидетельствует о наличии двух аллелей 1495741A. Таким образом результат оценивается как генотип, связанный с медленной скоростью ацетилирования субстрата.

5 Для подтверждения полученного результата образец был отправлен в ЗАО «Евроген» для секвенирования с второго экзона NAT2. Интерпретация результатов проводилась с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov I. B., McDuffie M., Moslehi R., "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186. ). В  
10 результате был подтвержден генотип с медленным типом ацетилирования.

Пример 2. Производили соскоб буккального эпителия с внутренней стороны щеки у добровольца П. Материал помещали в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Москва) согласно протоколу производителя. К 12,5 мкл пробы добавили 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для ПЦР;  
15 праймер NAT2F 5'- AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3'; NAT2R 5'- GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3'; зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCCA(C-LNA)ATT-3' – BHQ2; зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' – RTQ1; сульфат магния; смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов; TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси – 25 мкл. При  
20 регистрации сигнала наблюдали экспоненциальный рост флюоресценции по R6G между 18-38 циклами, что свидетельствует о наличии двух аллелей 1495741G, ассоциированных с быстрой скоростью ацетилирования.

Для подтверждения полученного результата образец был отправлен в ЗАО «Евроген» для секвенирования с второго экзона NAT2. Интерпретация результатов проводилась с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186.). В результате был подтвержден генотип с быстрым типом ацетилирования.

30 Пример 3. Производили соскоб буккального эпителия с внутренней стороны щеки у добровольца К. Материал помещали в пробирку с винтовой крышкой. Выделение ДНК производили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Москва) согласно протоколу производителя. К 12,5 мкл пробы добавили 12,5 мкл смеси, содержащей буфер для ПЦР;

праймер NAT2F 5'- AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA-3'; NAT2R 5'-GCCACTCATGGTCACTTCGGC-3'; зонд 1 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCCA(C-LNA)ATT-3' – BHQ2; зонд 2 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT-3' – RTQ1; сульфат магния; смесь четырех 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов; TaqF-полимераза. Конечный объем реакционной смеси – 25 мкл. При регистрации сигнала наблюдали экспоненциальный рост флюоресценции по R6G и FAM между 18-38 циклами, что свидетельствует о наличии двух аллелей 1495741G и 1495741A. Таким образом, генотип NAT2 ассоциирован с умеренной скоростью ацетилирования субстратов.

10 Для подтверждения полученного результата образец был отправлен в ЗАО «Евроген» для секвенирования с второго экзона NAT2. Интерпретация результатов проводилась с использованием алгоритма классификации NAT2PRED (Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186). В результате был подтвержден генотип с промежуточным (умеренным) типом ацетилирования.

Пример 4. Апробацию предложенного способа проводили у 50 человек, добровольно принявших участие в исследовании. Информированное согласие было получено от каждого участника исследования, а проведение настоящей работы было одобрено комитетом по этике Иркутского государственного медицинского университета. Генетический материал (буккальный эпителий) был исследован двумя способами: секвенирование второго экзона NAT2, которое проводилось компанией «Евроген», и по предлагаемому способу, которая выполнялась на базах ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ и ГБОУ ВПО ИГМУ. При оценке результатов предлагаемого способа было выявлено 29 проб с медленным типом ацетилирования (A;A), 16 с промежуточным (A;G) и 5 проб с быстрым (G;G). В дальнейшем ДНК была отправлена на секвенирование второго экзона NAT2 на базе компании ЗАО «Евроген». Определение генотипа проводилось с использованием алгоритма классификации NAT2PRED. ([Kuznetsov, Igor B., Michael McDuffie, and Roxana Moslehi. "A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (NAT2) enzymatic phenotype from NAT2 genotype." *Bioinformatics* 25.9 (2009): 1185-1186). В результате только два образца были классифицированы неверно: 1 образец имел генотип с промежуточным типом ацетилирования и 1 образец с медленным типом ацетилирования. Таким образом, чувствительность и специфичность предлагаемого метода относительно референсного исследования составили 96,6% и 95,2% соответственно.

## Формула изобретения

Способ определения генотипа человека, связанного с ацелированием ксенобитиков путем обнаружения полиморфизма гена ариламин-N- ацетилтрансферазы с использованием флуоресцентной количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, отличающийся тем, что генотипирование ариламин-N-ацетилтрансферазы осуществляют путем детекции tag SNP rs1495741 с использованием специфических праймеров NAT2F 5'- AGCCTCTCTCAGGAAAGGAGCA и NAT2R 5'- GCCACTCATGGTCACTTCGGC и двух флуоресцентно-меченных зондов, содержащих участки «замкнутых нуклеотидов» NAT2 5'-R6G - AAGCTACTGTGAA(T-LNA)GCCCCA(C-LNA)ATT – BHQ2 и 5'-FAM - AAGCTACTGTGAAT(G-LNA)CCCA(T-LNA)ATT – RTQ1 в режиме амплификации, а именно 1 цикл 95<sup>0</sup> – 5 мин., 40 циклов 95<sup>0</sup> – 10 сек., 65<sup>0</sup> – 15 сек., 72<sup>0</sup> - 15 сек., а оценку результатов проводят регистрацией сигнала флуоресценции по каналам FAM и R6G путем детекции сигнала между 18—38 циклами.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:  
**202192485**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
C12Q 1/6813, 1/6827, 1/6844

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	CN 102876775 A (LUO ZIYI et al.) 16.01.2013, реферат, формула	1
A	HEIN David W. et al. TaqMan Real Time-Polymerase Chain Reaction Methods for Determination of Nucleotide Polymorphisms in Human N-Acetyltransferase-1 (NAT1) and -2 (NAT2). Current Protocols in Toxicology, 2005, doi:10.1002/0471140856.tx0415s22, реферат	1
A	RU 2445372 C1 (УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН и др.) 20.03.2012, реферат, формула	1
A	GRA O. A. et al. Genetic Polymorphism of GST, NAT2, and MTRR and Susceptibility to Childhood Acute Leukemia. Molecular Biology, 2008, Vol. 42, No. 2, pp. 187-197, реферат	1

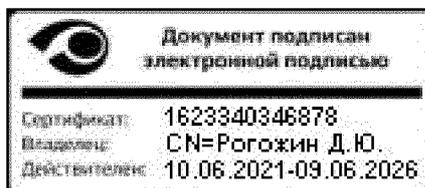
последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:  
«А» - документ, определяющий общий уровень техники  
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 15 апреля 2022 (15.04.2022)

Уполномоченное лицо:  
Заместитель начальника Управления экспертизы -  
начальник отдела формальной экспертизы



Д.Ю. Рогожин

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202192485**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C12Q 1/6813 (2018.01)  
C12Q 1/6827 (2018.01)  
C12Q 1/6844 (2018.01)  
C12Q 1/686 (2018.01)  
C12Q 1/682 (2018.01)