

ОТЧЕТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
О ПРИКЛАДНЫХ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Разработка панели маркеров злокачественной трансформации предстательной железы для
проведения ранней неинвазивной диагностики заболевания

по теме:

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОВОКУПНОСТИ
ПРОТЕОГЕНОМНЫХ И ЭПИГЕНОМНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ РАКА ПРОСТАТЫ
ЭТАП 3**

Соглашение о субсидии от «23» сентября 2014 г. № 14.607.21.0068

в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития
научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

Научный руководитель,

чл.-корр. РАН

В.М. Говорун

1. Цель проекта

Целью реализуемого Федеральным научно-клиническим центром физико-химической медицины ФМБА России проекта является создание аналитической тест-системы на основе статических (геномных) и динамических (метилированные ДНК, пул некодирующих РНК, протеомы) биомаркеров для диагностики рака предстательной железы, проведение массированного чтения геномов, анализа протеомов, транскриптомов и абберантного метилирования ДНК опухолей предстательной железы и выявление набора геномных и соматических мутаций, эпигенетических изменений ДНК и спектра некодирующих РНК в качестве маркеров ранних стадий рака предстательной железы.

По результатам реализации проекта на рынок должна быть выведена принципиально новая тест-система мирового уровня (набор реагентов), позволяющая диагностировать ранние злокачественные трансформации предстательной железы на основе имеющегося в большинстве медицинских лабораторий стандартного оборудования для проведения ПЦР в реальном времени. Тем самым должно быть достигнуто повышение эффективности использования находящегося в эксплуатации стандартного лабораторного оборудования и диагностической ценности используемых в рутинной практике тестов.

2. Основные результаты проекта

В отчетный период на этапе 3 проведено масштабное полногеномное параллельное секвенирование кодирующих фрагментов ДНК (экзомов), выделенных из образцов биоптатов пациентов с верифицированным диагнозом рак простаты.

Выполнено масс-спектрометрическое исследование пула пептидов, полученных из образцов сыворотки крови и/или биоптатов пациентов с верифицированным диагнозом рак простаты с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Проведено транскрипционное профилирование с последующей оценкой дифференциально экспрессирующихся генов и поиском некодирующих РНК в образцах биоматериалов пациентов с верифицированными диагнозами – аденома и рак простаты и образцов группы контроля.

Выполнена оценка эпигенетического статуса ДНК и поиск абберантно метилированных областей генома в образцах биоматериалов пациентов с верифицированными диагнозами – аденома и рак простаты и образцов группы контроля.

Проведены дополнительные патентные исследования в соответствии с ГОСТ 15.011-96 и подана заявка на регистрацию полезной модели «Разработка набора реагентов диагностической тест системы для ПЦР в режиме реального времени и способа выявления уровня метилирования 8 позиций в ДНК ткани предстательной железы человека для диагностики рака предстательной железы».

В рамках реализации проекта собраны биообразцы и завершено создание биобанка образцов сыворотки крови и мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома/рак простаты, а также группы контроля. Создан контроль «кДНК культуры клеток DU145, LNCa p, PC3». Проведена отработка и оптимизация молекулярно-биологических методов анализа биоматериала. Проведено масштабное полногеномное параллельное секвенирование кодирующих фрагментов ДНК (экзомов), выделенных из образцов биоптатов пациентов. Выполнено масс-спектрометрическое исследование пула пептидов, полученных из биообразцов с применением метода ВЭЖХ. Проведено транскрипционное профилирование с последующей оценкой дифференциально экспрессирующихся генов и поиск некодирующих РНК в образцах биоматериала. Выполнена оценка эпигенетического статуса ДНК и поиск абберантно метилированных областей генома в образцах биоматериала. Проведены дополнительные патентные исследования и подана заявка на регистрацию полезной модели.

Использованные при выполнении проекта методы соответствуют мировому уровню.

Полученные в рамках проекта результаты соответствуют требованиям Технического задания и Плана-графика исполнения обязательств.

Сравнение с аналогичными по используемым методам и технологиям проектами подтверждают высокий уровень выполнения прикладных научных исследований, направленных на выявление и анализ молекулярно-биологических маркеров в биообразцах, полученных от пациентов с верифицированными диагнозами аденома/рак простаты, а также группы контроля.

3. Охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности (РИД), полученные в рамках прикладного научного исследования и экспериментальной разработки

Подана заявка на регистрацию полезной модели «Разработка набора реагентов диагностической тест системы для ПЦР в режиме реального времени и способа выявления уровня метилирования 8 позиций в ДНК ткани предстательной железы человека для диагностики рака предстательной железы» (заявка №2015156953 от 30.12.2015 г.).

4. Назначение и область применения результатов проекта

Рак предстательной железы или рак простаты (РП) - одно из самых распространенных злокачественных заболеваний, диагностируемых у мужчин. Заболеваемость РП неуклонно растет, что определяется в большей степени бессимптомным течением и поздней диагностикой патологии.

Результаты научных исследований, проведенных в последнее десятилетие, позволили существенно улучшить понимание молекулярных механизмов патогенеза данного заболевания. Установлено, что в трансформированных клетках простаты наблюдаются многочисленные изменения экспрессии генов, контролирующей пролиферативные процессы. В частности, регистрируется повышенный уровень образования факторов роста и их рецепторов; активируются сигнальные каскады, ассоциированные с андрогеновыми рецепторами и рецепторами эстрогенов. В простатических клетках, вставших на путь злокачественной трансформации, отмечены также значительные изменения экспрессии генов и белков, вовлеченных в регуляцию апоптоза. Появилось большое количество экспериментальных данных, раскрывающих роль генетических (мутации) и эпигенетических факторов в возникновении РП. Так, недавно охарактеризован спектр типичных соматических мутаций, ассоциированных с РП, что позволяет рассматривать наиболее часто встречаемые генетические нарушения в качестве потенциальных маркеров для диагностики.

Результаты молекулярно-генетических исследований предназначены для трансляции в клиническую диагностику и медицинскую практику. В настоящее время в США одобрен управлением контроля качества продуктов и лекарственных средств (FDA) и введен в практическое использование новый маркер для диагностики рака простаты PCA3. В отличие от традиционного сывороточного маркера ПСА - простатспецифического антигена, PCA3 представляет из себя специфическую мРНК антигена рака простаты, уровень которой измеряется в осадке мочи после пальцевого ректального исследования предстательной железы. Преимущества использования такого маркера состоит в его большей чувствительности и специфичности, относительно определяемого традиционно ПСА в сыворотке крови. Кроме того, количество PCA3 тесно коррелирует с агрессивностью опухолевого роста, согласно ряду исследований. По оценкам компании держателя лицензии на PCA3 общий объем продаж теста в мире составляет 11,5 млн. долларов в год (по состоянию на 2014 г.), при этом темпы роста составляют 16% в год. На

этапах клинических испытаний находится еще целый ряд перспективных диагностических маркеров.

С учетом возможности относительно малоинвазивного способа получения биологического материала для исследования, рак предстательной железы является одной из патологий, которую можно рассматривать в качестве эффективной модели поиска и валидации молекулярно-биологических маркеров. Обилие экспериментально полученных данных и новых современных технологических возможностей в области молекулярной биологии позволит произвести отбор наиболее эффективных и значимых маркеров рака предстательной железы, что станет основой создания диагностической тест системы.

В настоящее время на рынке существуют конкурирующие диагностические решения, такие как: PSA (простат специфический антиген), [-2]proPSA, PCA3 (антиген рака простаты 3), ProteomediX (комплекс пептидных простат специфических антигенов), которые отличаются одним или несколькими недостатками, такими как: требования специального лабораторного оборудования для проведения анализа, особыми требованиями к квалификации медицинского персонала, высокой стоимости реактивов, низкими показателями чувствительности и/или специфичности диагностического теста, инвазивностью анализа. Таким образом, актуальной становится задача создания неинвазивной диагностической тест системы для выполнения анализа на стандартном лабораторном оборудовании, при минимальных требованиях к квалификации медицинского персонала.

5. Эффекты от внедрения результатов проекта

Оценка народно-хозяйственного эффекта основана на следующих фактах: в структуре смертности населения России злокачественные новообразования занимают второе место (15,4%; 2012 г. 14,9%) после болезней системы кровообращения (53,5%; 2012 г. 54,8%), опередив травмы и отравления (9,9%; 2012 г. 10,1%). В связи с несвоевременным обнаружением патологии эпидемиологи назвали рак простаты «онкологической бомбой замедленного действия», в зоне риска которого находятся в России более 520 тыс. мужчин ежегодно. Полученные при выполнении ПНИ результаты должны быть использованы при проведении диагностических исследований в медицинских учреждениях общего и специализированного профиля, подведомственные Министерству здравоохранения РФ, ФМБА России, региональным департаментам здравоохранения.

Решение о проведении анализа на основе созданной тест-системы, как правило, будет принимать врач-уролог, направляя пациента на проведение лабораторного анализа. При этом диагностическая ценность результатов тестирования будет превышать существующие аналоги. В основе диагностической тест-системы будет положена новая, не имеющая аналогов разработка, основанная на использовании анализа протеогеномных маркеров при выявлении злокачественных новообразований, выполняемого неинвазивно на стандартном лабораторном оборудовании. Использование научного задела создаваемой диагностической тест системы позволит повысить регистрацию первичных стадий заболевания среди мужского населения до среднемировых – до более чем 3-х кратного роста выявления заболевания на ранней стадии.

6. Формы и объемы коммерциализации результатов проекта

Внедрение и доведение до потребителя ожидаемых результатов будет достигнуто за счет проведения Индустриальным партнером специальных исследовательских работ - анализа и исследования сегментов рынка для четкого позиционирования разработки среди конкурентов. А также за счет проведения специальных исследовательских маркетинговых мероприятий - научно-образовательных конференций и семинаров для врачей-урологов и онкологов по проблематике современного состояния дел в ранней диагностике злокачественных трансформаций предстательной железы.

По итогам реализации проекта должны быть получены научно-техническая, конструкторская и медицинская документация для 1) организации серийного производства тест-системы на производственной базе индустриального партнера; 2) подготовки комплекта заявочной документации на регистрацию диагностического набора в Росздравнадзоре и получении регистрационного медицинского удостоверения.

Пользователями полученных в рамках реализации проекта научно-технических результатов в виде наборов МРП4 и КРП1 станут научно-клинические учреждения здравоохранения, специализированные лечебно-профилактические учреждения, учреждения высшего профессионального образования и науки.

Индустриальным партнером по данному проекту является ООО Лаборатория «Литех». Компания оснащена самым современным оборудованием и обладает всеми необходимыми средствами для производства диагностических ПЦР наборов. Направления деятельности ООО Лаборатория «Литех» включают научные исследования, направленные на разработку новых технологий для диагностики социально-значимых заболеваний человека; производство тест-систем для ИФА и ПЦР диагностики. Внедрение диагностической тест-системы позволит расширить ассортимент производимой продукции и улучшить её характеристики.

Помимо Индустриального партнера, потребителями созданного в результате ПНИ результата будут выступать медицинские учреждения общего и специализированного профиля, подведомственные Министерству здравоохранения РФ, ФМБА России и региональным департаментам здравоохранения.

7. Наличие соисполнителей

На этапе 3 были привлечены соисполнители работ по проекту:

1. Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации - для выполнения научно-исследовательских работ "Оценка диагностической значимости дифференциально экспрессирующихся генов в образцах биоматериала пациентов с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, и образцов группы контроля".

2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский (Приволжский) федеральный университет" - для выполнения научно-исследовательских работ "Анализ экзоминых библиотек методом ПЦР в реальном времени и оценка их пригодности для последующего секвенирования на платформе Ion Proton" (выполнена в Междисциплинарном центре коллективного пользования К(П)ФУ).