

ОТЧЕТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ
О ПРИКЛАДНЫХ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

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

по теме:

ОПТИМИЗАЦИЯ И ОТРАБОТКА МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА РАКА ПРОСТАТЫ

ЭТАП 2

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 НИИ физико-химической медицины 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 2 был продолжен сбор образцов и пополнение биобанка образцов сыворотки крови и мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля. Выделены ДНК и РНК из образцов биоматериала пациентов с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, и группы контроля, в том числе из архивного и/или свежего опухолевого биоматериала (биоптатов). Проведена отработка и оптимизация методов высокопроизводительного полногеномного секвенирования нуклеиновых кислот выделенных из биологических образцов биоптатов пациентов с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, а также группы контроля без патологии предстательной железы. Выполнена оптимизация метода количественного анализа дифференциально транскрибирующихся генов в образцах сыворотки крови и/или мочи пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля. Отработан метод эпигеномного анализа с применением биоинформационного поиска областей абберантного метилирования генома в образцах биоптатов пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля. Оптимизирован метод протеомного анализа образцов сыворотки крови и/или биоптатов пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля. Создан контроль «кДНК культуры клеток DU145, LNCap, PC3» на 100 реакций. Проведены дополнительные патентные исследования в соответствии с ГОСТ 15.011-96.

За счет внебюджетных средств были приобретены реактивы и материалы для работ по оптимизации экспериментальных методов исследования биологических образцов рака простаты, организовано участие в научно-образовательном мероприятии, выполнено материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа 2.

В отчетный период был выполнен 2 этап сбора биобанка образцов. На базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ РНИОИ Минздрава России) (г.Ростов-на-Дону) и ФГБУ «НИИ онкологии им.Н.Н.Петрова» Минздрава России (г.Санкт-Петербург) был сформирован биобанк свежих образцов для исследования неоттрансформации ткани простаты на основании критериев, сформированных на 1 этапе с уточнением численных значений уровня ПСАобщ. Всего было собрано 315 образцов 50 пациентов как с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, так и пациентов группы контроля, из них 70 образцов сыворотки крови, 70 образцов мочи, 175 образцов ткани простаты. В соответствии с пунктами ТЗ требовалось собрать биобанк в количестве не менее 300 образцов от 50 пациентов. Таким образом, данные требования ТЗ полностью выполнены.

В результате реализации работ 2 этапа было проведено выделение ДНК из образцов, выделение РНК из образцов. Выделение произведено как из образцов биоматериала пациентов с верифицированными диагнозами аденома и рак простаты, так и из образцов группы контроля, в том числе из архивного биоматериала, что полностью соответствует ТЗ ПНИ.

В результате реализации работ 2 этапа так же была создана кДНК на основе РНК клеточных линий Du145, LNCaP, PC3. Количество созданной кДНК достаточно для проведения 100 реакций, что полностью соответствует ТЗ ПНИ.

Проведена отработка и оптимизация методов полногеномного и полноэкзомного секвенирования. При выполнении полноэкзомного секвенирования была отсеквенировано 6 экзомов, достигнута глубина прочтения от 44 до 82, что превышает заявленный в ТЗ показатель 30-кратного прочтения. Было проведена отработка полногеномного секвенирования на 2-х образцах.

Проведена отработка и оптимизация методов количественного анализа дифференциально транскрибирующихся генов на 3-х образцах. Нами было выполнено условие как по количеству суммарного числа прочтений не менее 20 млн. на транскриптом, так и условие прохождения ограничений по статистической значимости при нахождении дифференциально транскрибированных участков p_value не более 10^{-2} .

Проведена отработка метода эпигеномного анализа с применением бионформационного поиска областей aberrантного метилирования генома в образцах биоптатов пациентов с верифицированными диагнозами аденома и/или рак простаты, а также группы контроля отработка, разработана методика эпигеномного анализа. При этом использованы значения $p_value < 0,05$, что превышает требования ТЗ.

Анализ рекомендаций и стандартов лечения злокачественной трансформации предстательной железы показал значительное сходство в подходах к диагностике в РФ и за рубежом в связи с использованием в качестве базовых рекомендации европейской ассоциации урологов. В мире уже разработаны сложные сигнатуры, использующие экспрессионные панели маркеров для диагностики и выработки прогноза протекания рака предстательной железы. Однако в нашей стране отсутствует в виде предложения даже одобренный за рубежом тест ПСА3, не говоря уже о дополнительных экспериментальных биомаркерах. Таким образом, представляется обоснованной и возможной технологически разработка панели биомаркеров для ранней диагностики рака простаты, позволяющая увеличить специфичность и чувствительность диагностики до первичной биопсии.

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

В рамках выполнения работ на этапе 2 охраноспособные результаты интеллектуальной деятельности не заявлялись.

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 2 соисполнители по проекту не привлекались.