

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090578** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.30

(51) Int. Cl. *A61K 31/405* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.24

(54) СПОСОБ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(31) 2019111245

(74) Представитель:
Пилишкина Л.С. (RU)

(32) 2019.04.15

(33) RU

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
КИСЕЛЁВ ВСЕВОЛОД ИВАНОВИЧ
(RU)

(57) Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для проведения лекарственной профилактики рака молочной железы. Изобретение решает проблему создания нового алгоритма профилактических мероприятий, основанных на формировании групп риска по развитию РМЖ на основе молекулярных маркеров-предвестников раннего канцерогенеза и лекарственной коррекции этих параметров с последующим контролем заболеваемости РМЖ. Способ профилактики РМЖ заключается в том, что из женщин в возрасте 45-65 лет, имеющих диагноз узловая или диффузная форма мастопатии или повышенная маммографическая плотность, отбирают женщин, имеющих по женской линии злокачественные образования репродуктивных органов, проводят у отобранных женщин исследование на уровень метилирования одного из генов BRCA1, WIF1 и RASSF1A и отбирают в группу риска женщин, у которых уровень метилирования одного из генов составляет не менее 50%, и женщины группы риска принимают препарат на основе индол-3-карбинола в дозировке от 400 до 600 мг индол-3-карбинола в сутки в течение от 6 до 8 месяцев ежегодно. Рекомендуется принимать пожизненно.

A1

202090578

202090578

A1

Способ лекарственной профилактики рака молочной железы

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для проведения лекарственной профилактики рака молочной железы.

Рак молочной железы (РМЖ) – одна из самых актуальных проблем современной онкологии. В большинстве экономически развитых стран РМЖ занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости и смертности женского населения и является одной из главных причин смерти среди женщин среднего возраста (40-55 лет).

Факторами риска, повышающими вероятность возникновения РМЖ, считаются:

- избыточный вес;
- гормональные и обменные нарушения, в частности, пониженное (<2) соотношение метаболитов эстрогена: 2-гидроксиэстрона и 16 α -гидроксиэстрона (2-OHE1/16 α -OHE1);
- нарушение менструальной функции;
- сопутствующие гинекологические заболевания;
- ограничение естественных репродуктивных функций (снижение числа родов, отказ от грудного вскармливания);
- стрессовые ситуации;
- травмы и операции на молочной железе;
- генетический фактор, а именно, наличие онкологических заболеваний молочной железы у кровных родственников по женской линии (у матери, бабушки, сестры, тети и т.п.).
- Следует также отметить, что важнейшим фактором риска развития РМЖ является возраст после 40 лет (Фиг. 1).

Сегодня во всех экономически развитых странах заинтересованные в онкопрофилактике органы здравоохранения и общественные организации проводят масштабное расширение и активную пропаганду среди женского населения профилактического рентгенологического обследования – *маммографического скрининга*. В этом случае маммография проводится с целью выявления ранних (доклинических) и, как правило, не пальпируемых форм РМЖ.

По результатам большого числа обширных рандомизированных исследований регулярный (с интервалом 1-2 года) маммографический скрининг у женщин в возрасте

от 50 до 69 лет, проводившийся вместе или без физикального обследования, снижал смертность от РМЖ приблизительно на 30%.

Чувствительность маммографии зависит от качества оборудования, компетентности обслуживающего его персонала, а также плотности исследуемой ткани молочной железы, которая, помимо всего прочего, зависит от возраста и гормонального статуса. Известно, что плотная ткань молочной железы, характерная для здоровых женщин молодого возраста, часто является препятствием для успешной доклинической диагностики очагов РМЖ [Haars G, van Noord PA, van Gils CH, Grobbee DE, Peeters PH. Measurements of breast density: no ratio for a ratio. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2005); 14 (11 Pt 1):2634–2640]. Есть данные, что повышенная плотность молочной железы у молодых женщин может быть ключевым фактором риска, поскольку отражает количество недифференцированных клеток, наиболее подверженных злокачественной трансформации, до того, как проявится защитный эффект их дифференцировки во время беременности и возрастной инволюции [Boyd N, Martin L, Chavez S et al (2009) Breast-tissue composition and other risk factors for breast cancer in young women: a cross-sectional study. *Lancet Oncol.*, 10(6), 569–580].

Наиболее близким к предложенному является способ лекарственной профилактики развития рака молочной железы, заключающийся в том, что отбирали женщин со сниженным уровнем экспрессии гена/белка *BRCA1*, приводящим к повышенному риску развития РМЖ, в возрасте от 25 до 63 лет, которые в течение 4-6 недель получали 3, 3'-дииндолилметан (ДИМ) в дозировке 300 мг/сут, оценивали экспрессию мРНК *BRCA1* исходно и через 4-6 недель, при этом применение ДИМ в течение 4-6 недель привело к повышению экспрессии мРНК *BRCA1* в среднем на 34% [А.А.Сметник, В.П.Сметник, В.И.Киселев. Опыт применения индол-3 карбинола в лечении заболеваний молочной железы и профилактике рака молочной железы. Журнал «Акушерство и гинекология» №2, 2017, с. 106-112].

Демонстрация возможности активации гена *BRCA* с помощью ДИМ – исключительно важное научное наблюдение, которое показывает, что индольные соединения способны активировать экспрессию гена супрессора опухолевого роста. Однако, следует отметить, что с практической точки зрения, этот результат не доказывает профилактический эффект данного подхода, поскольку не прослежена судьба этих женщин, не известно развился ли у них рак молочных желез. Кроме того,

наследственный рак груди, зависимый от мутации в гене BRCA, составляет только 3-5% от всего рака молочной железы. Поэтому, если даже будет показан профилактический эффект, то он касается незначительной доли всех больных и не решает проблему sporadического рака, на долю которого приходится около 95% всех заболевших.

Технической проблемой, решаемой настоящим изобретением, явилось создание нового алгоритма профилактических мероприятий основанных на формировании групп риска по развитию РМЖ на основе молекулярных маркеров-предвестников раннего канцерогенеза и лекарственной коррекции этих параметров с последующим контролем заболеваемости РМЖ.

Техническая проблема решается способом профилактики РМЖ, заключающимся в том, что из женщин в возрасте 45-65 лет, имеющих диагноз узловая или диффузная форма мастопатии или повышенная маммографическая плотность, отбирают, имеющих по женской линии злокачественные образования репродуктивных органов, проводят у отобранных женщин исследование на уровень метилирования одного из генов *BRCA1*, *WIF1* и *RASSF1A* и отбирают в группу риска женщин, у которых уровень метилирования одного из генов составляет не менее 50%, и женщины группы риска принимают препарат на основе индол-3-карбинола в дозировке от 400 мг до 600 мг индол-3-карбинола в сутки в течение периода от 6 до 8 месяцев ежегодно. Рекомендуется принимать пожизненно.

Хорошо известен тот факт, что огромную роль в развитии онкологических заболеваний играют генетические мутации. Описаны многие из этих мутаций и степени риска развития неоплазий, связанных с ними. Однако, несмотря на всю критическую важность «генетической основы», не менее существенную роль в развитии этих патологий могут играть эпигенетические процессы [Киселев В.И. и др. РМЖ: практический курс выключения генов. Эпигенетическое регулирование маммарного канцерогенеза и возможности его фармакологической коррекции (2014) Журнал «StatusPraesens», №4 (21), стр. 35–43].

Эпигенетические изменения не нарушают последовательности нуклеотидов в ДНК и не передаются по наследству, но за счет химической модификации определенных хромосомных локусов и связанных с ними генов критически изменяют их доступность для транскрипционного аппарата клетки. Примерами эпигенетических изменений являются ацетилирование и метилирование гистонов, метилирование ДНК. Такое

эпигенетическое «включение/выключение» генов, в частности, лежит в основе дифференцировки – приобретения необходимого фенотипа – всех типов соматических клеток. И наоборот, изменение характерной «эпигенетической маркировки» клетки того или иного типа приводит к де-дифференцировке или смене фенотипа (транс-дифференцировке) в другой клеточный тип, например, из эпителия в мезенхиму. Учитывая такие масштабы эффектов эпигенетической регуляции, нетрудно понять, что нарушения этого процесса могут приводить к развитию таких патологий, как канцерогенез [R.S.DeVaux et al Beyond DNA: the Role of Epigenetics in the Premalignant Progression of Breast Cancer (2018) *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*].

Метилирование ДНК, как один из важнейших механизмов эпигенетической регуляции, был открыт на рубеже восьмидесятых годов прошлого столетия. Суть этого процесса заключается в конверсии цитозинового нуклеотидного остатка в 5-метилцитозин [K.Yamashita et al. Epigenetic biomarkers of promoter DNA methylation in the new era of cancer treatment (2018) *Cancer Science*, 109:3695–3706].

В ходе неопластического перерождения картина эпигенетической модификации, как правило, меняется таким образом, что общий уровень метилирования генома существенно снижается, в то время как регуляторные участки существенно меньшей части генов (чаще всего, генов-онкосупрессоров), наоборот, гиперметируются и подавляются. Соответственно, если изменение нормального метилирования в каком-либо из генов играет важную роль в развитии определенной формы рака, то установление такого феномена будет способствовать не только лучшему пониманию патогенеза этого заболевания, но и может оказаться своего рода эпигенетическим маркером данного заболевания [S.B. Baylin et al, Epigenetic Determinants of Cancer (2016) *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8].

В последние годы эта область исследований развивается очень активно. Установлена целая панель генов, метилирование которых является предвестником злокачественного процесса. Дело в том, что метилирование генов-супрессоров опухолевого роста приводит к блокаде их экспрессии, что снимает эволюционный запрет на малигнизацию клеток. Это явление запускает постепенный процесс канцерогенеза и начинается задолго до клинического проявления рака. Изменение генетической программы через эпигенетические механизмы происходит достаточно медленно и на начальных этапах запускает эпителиально-мезенхимальные превращения

(ЭМП). Это явление развивается как результат накопления критической массы эпигенетических модификаций в эпителиальных клетках молочной железы и приводит к превращению эпителия в мезенхимальные клетки. Этот тип клеток формирует в ткани фиброз, что клинически проявляется в повышенной маммографической плотности, и развитию фиброзно-кистозной болезни. Кроме того, ЭМП с высокой вероятностью запускает процессы злокачественного перерождения клеток и несет в себе признаки раннего канцерогенеза. Особенность этого явления состоит в том, что ЭМП это обратимое состояние и при правильном лекарственном воздействии можно индуцировать обратный процесс, а именно мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) [Drasin et al. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity (2011) *Breast Cancer Research*, 13:226; P.G.Santamaria et al. EMT: Present and future in clinical oncology (2017) *Molecular Oncology* 11, 718–738; Voon et al. The EMT spectrum and therapeutic opportunities (2017) *Molecular Oncology* 11,) 878–89; Sun and Fang Epigenetic Regulation of Epithelia-Mesenchymal Transition (2016) *Cell Mol Life Sci* 73(23): 4493–4515; Douglas S. Micalizzi et al. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression (2010) *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15:117–134].

В основе ЭМП лежат эпигенетические изменения, в частности, метилирование генов, в результате чего формируется новая генетическая программа клетки. Особенность таких изменений в экспрессии генов состоит в том, что структура генов сохраняется, и эти модификации обратимы, что открывает уникальную возможность восстановления активной экспрессии генов-супрессоров, а следовательно, не только остановить этот процесс, но повернуть его вспять [Киселев В.И. и др. Регуляция активности генов и новые лекарственные средства (2016) *Вестник Российской Академии Наук*, 2016, том 86, № 6, с. 512–518; Edward A. Ratovitski Anticancer Natural Compounds as Epigenetic Modulators of Gene Expression (2017) *Current Genomics*, 18, 175-205; Subramaniam et al. DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy (2014) *Frontiersin Oncology* V 4, Art 80]. Таким образом, своевременная регистрация таких изменений путем определения спектра метилированных генов позволяет с высокой достоверностью прогнозировать развитие злокачественного процесса. Возможность клинического применения таких подходов открылась сравнительно недавно и основана на так называемой жидкостной биопсии. Смысл этого подхода состоит в том, что

вследствие гибели клеток, вставших на путь злокачественной трансформации, их ДНК попадает в кровяное русло. Современные методы ДНК анализа позволяют анализировать и оценивать уровень их метилирования! [Sandra P. Nunes et al Cell-Free DNA Methylation of Selected Genes Allows for Early Detection of the Major Cancers in Women (2018) *Cancers* 10, 357; D. Lissa et al. Methylation analyses in liquid biopsy, (2016) *Transl Lung Cancer Res*;5(5):492-504]. Установлено также, что состояние ДНК опухоли в плазме крови отражает ее состояние в опухолевой ткани. [Martínez-Galán et al. ESR1 gene promoter region methylation in free circulating DNA and its correlation with estrogen receptor protein expression in tumor tissue in breast cancer patients (2014) *BMC Cancer*, 14:59].

Прогностическая значимость таких исследований существенно зависит от выбора генов-мишеней, метилирование которых сигнализирует о начавшейся доклинической стадии канцерогенеза. Мы выбрали для своей работы маркеры, в отношении которых накоплен большой клинический материал. Это гены-супрессоры опухолевого роста *BRCA1*, *WIF1*, *RASSF1A* [L.Ai et al. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer (2006) *Carcinogenesis* vol.27 no.7 pp.1341–1348; Vivek Shukla et al *BRCA1* affects global DNA methylation through regulation of DNMT1 (2010) *Cell Research* 20:1201-1215; Otani et al. *BRCA1* promoter methylation of normal breast epithelial cells as a possible precursor for *BRCA1*-methylated breast cancer (2014) *Cancer Sci* , vol. 105, 1369-1376; Trang Lan Vu et al Methylation Profiles of *BRCA1*, *RASSF1A* and *GSTP1* in Vietnamese Women with Breast Cancer (2018) *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 19, 1887-1893; Hoda A. Hagrass et al. Methylation status and protein expression of *RASSF1A* in breast cancer patients (2014) *Mol Biol Rep* 41:57–65; L.B. Hesson et al. The role of *RASSF1A* methylation in cancer (2007) *Disease Markers* 23: 73–87]. Для этих генов установлена не только диагностическая значимость ранних доклинических стадий канцерогенеза, но и возможность восстановления их экспрессии на фоне применения препаратов с выраженной эпигенетической активностью. В случае восстановления экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста в результате их деметилирования, наблюдается торможение процессов малигнизации. Поэтому для осуществления программы по лекарственной профилактике РМЖ необходимо применение препаратов, обладающих способностью восстанавливать исходную генетическую программу клеток, вставших на

путь малигнизации. Такого рода препараты должны обладать выраженной эпигенетической активностью и действовать на разные стадии канцерогенеза. К числу таких препаратов относятся лекарственные средства на основе индол-3-карбинола, который является ингибитором гистондеацетилаз и ДНК-метилтрансфераз, ферментов, влияющих на эпигенетические механизмы злокачественного перерождения клеток [Lyn-Cook B.D. et al. Gender differences in gemcitabine (Gemzar) efficacy in cancer cells: effect of indole-3-carbinol (2010) *Anticancer Res.*, 30(12), 4907-4913; Li Y., Li X., Guo B. Chemopreventive agent 3,3'-diindolylmethane selectively induces proteasomal degradation of class I histone deacetylases (2010) *Cancer Res.*, 70(2), 646-654].

Возможно широкий спектр противоопухолевой активности индол-3-карбинола обусловлен еще и его способностью превращения в дииндолилметан, для которого также установлена эпигенетическая активность и свойство ингибировать опухолевые стволовые клетки [Gregory W. Watson et al. Phytochemicals from Cruciferous Vegetables, Epigenetics, and Prostate Cancer Prevention (2013) *The AAPS Journal*, Vol. 15, No. 4, 951-961; A. Semov et al. Diindolylmethane (DIM) selectively inhibits cancer stem cells (2012) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424:45-51; Shishinn Sun et al Endoplasmic reticulum stress as a correlate of cytotoxicity in human tumor cells exposed to diindolylmethane in vitro Breast Cancer Patients in Indonesia (2004) *Cell Stress & Chaperones* 9 (1), 76-87].

Для индол-3-карбинола показана также способность ингибировать процессы эпителиально-мезенхимального перехода, как начальной стадии канцерогенеза [HO et al. I3C and ICZ inhibit migration by suppressing the EMT process and FAK expression in breast cancer cells (2013) *Molecular Medicine Reports* 7: 384-388].

Кроме того, индол-3-карбинол обладает высокой избирательной ингибирующей активностью по отношению к трансформированным клеткам и очень низкой токсичностью к нормальным клеткам [KM Wahidur Rahman et al. Indole-3-Carbinol (I3C) Induces Apoptosis in Tumorigenic but Not in Nontumorigenic Breast Epithelial Cells (2009) *Nutrition and Cancer*, 45:1, 101-112].

Этот параметр также очень важен для профилактических препаратов, который следует принимать довольно длительное время. Следует подчеркнуть также важность лекарственной формы, которая потенцирует противоопухолевый потенциал данного

соединения. В частности, его эпигенетическую активность. Такая лекарственная форма индол-3-карбинола была нами ранее разработана и зарегистрирована в качестве лекарственного средства [Патент RU 2601893, Автор Киселев В.И. Лекарственное средство на основе индол-3-карбинола с повышенной эпигенетической активностью]. По этим причинам именно лекарственное средство на основе индол-3-карбинола было использовано для разработки профилактического алгоритма по предупреждению рака молочной железы.

Изобретение иллюстрируется графическим материалом.

На фиг. 1 представлены данные, иллюстрирующие риск развития РМЖ у женщин в зависимости от возраста, по данным национального Института Рака США.

На фиг. 2 показан молекулярный механизм влияния метилирования промотора гена *WIF1* на экспрессию гена *CCND1* и развитие злокачественной опухоли.

На фиг. 3 представлен график скорости пролиферации клеточной культуры MCF-10A в среде с различной концентрацией индол-3-карбинола (И-3-К).

На фиг. 4 – график скорости пролиферации клеточной культуры MDA-MB-231 в среде с различной концентрацией И-3-К.

На фиг. 5 показаны сайты метилирования промотора гена *WIF1* при концентрации И-3-К 0 и 100мкМ в клеточной культуре MCF-10A.

На фиг. 6 показаны сайты метилирования промотора гена *WIF1* при концентрации И-3-К 0 и 100мкМ в клеточной культуре MDA-MB-231.

Пример 1

Исследование деметилирующей и противоопухолевой активности индол-3-карбинола на клеточных линиях рака молочной железы.

Целью данного эксперимента была демонстрация деметилирующей активности индол-3-карбинола в отношении гена *WIF1*, кодирующего ингибитор Wnt-сигнального каскада, который является важнейшим фактором канцерогенеза клеток молочной железы. [L.Ai et al. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer (2006) Carcinogenesis vol.27 no.7 pp.1341–1348]. В результате метилирования гена *WIF1* блокируется его экспрессия и активируется Wnt-сигнальный каскад, что запускает процессы малигнизации клеток (Фиг. 2). Деметилирование гена *WIF1* восстанавливает его активность и приводит к блокаде

важнейшего механизма злокачественного роста, что является значимым критерием противоопухолевого действия индол-3-карбинола. И вторая задача исследования – показать высокую избирательную активность индол-3-карбинола по отношению к злокачественным клеткам РМЖ. В ходе работы использовались 2 клеточные культуры раковых клеток молочной железы: MDA-MB-231 и MCF-10A, полученные из коллекции клеточных культур ATCC.

MDA-MB-231

Культура клеток *Homo sapiens*, эпителиальные адгерентные клетки аденокарциномы молочной железы, были выделены из метастазов в плевральной полости пациентки с аденокарциномой молочной железы (злокачественное новообразование). Данная клеточная линия наиболее часто используется как модель метастатической формы РМЖ.

MCF-10A

Культура клеток *Homo sapiens*, эпителиальные адгерентные клетки, были выделены из ткани молочной железы пациентки с фиброзно-кистозной мастопатией (доброкачественное новообразование). Данная клеточная линия является наиболее часто используемой как модель неопухолевой ткани.

Культивирование клеточных культур

Клетки культуры MDA-MB-231 культивировались в среде DMEM (1x) «Gibco» с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (FBS), L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин. Клетки культуры MCF-10A культивировались в среде DMEM/F12 (1:1) «ООО НПП ПанЭко» с добавлением 10% FBS, L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллин/стрептомицин. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе Sanyo (Panasonic) при температуре 37°C и 5% содержания CO₂.

Клетки высаживали в 6-луночные культуральные планшеты TPP в объеме 1×10^6 клеток на лунку для последующего выделения из них ДНК на анализ степени метилирования промотора гена *WIF1* и в объеме 5×10^5 для последующего выделения РНК и анализа уровня экспрессии таргетных генов Wnt-каскада. Подсчет клеток проводился с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen).

Исследование влияния индол-3-карбинола проводили при следующих концентрациях: 0, 50, 75 и 100 μM в 4 биологических повторах. Клетки инкубировались с препаратом на протяжении 48 часов. После этого клетки, предназначенные для

выделения РНК, лизировали регантом QIAzol (QIAGEN) и хранили до выделения РНК при температуре -70°C . Клетки для выделения ДНК открепляли с помощью раствора трипсина-ЭДТА 0,25% (ООО НПП «ПанЭко»), промывали 2 раза раствором DPBS («ООО НПП ПанЭко») и хранили до выделения ДНК при температуре -20°C .

Исследование скорости пролиферации

Клеточную пролиферацию индол-3-карбинола оценивали с помощью МТТ-теста. В основе метода МТТ лежит способность живых клеток восстанавливать желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия (МТТ) в пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза, растворимые в ДМСО. О цитотоксическом воздействии препарата на клетку указывает уменьшение плотности образцов по сравнению с контрольными.

Клеточные культуры MCF-10A и MDA-MB-231 высаживали в 96-луночный культуральный планшет TPP с плотностью 5000 клеток в лунке (MCF-10A) и 10.000 клеток в лунке (MDA-MB-231). Клетки инкубировались в средах с препаратом индол-3-карбинолом с концентрацией 0, 50, 75 и $100\mu\text{M}$ и 0, 50, 75 и $100\mu\text{M}$ (во время этого теста также измерялось изменение оптической плотности при использовании свежеразведенного препарата И-3-К и заранее разведенного, хранившегося до этого месяц при температуре -4°C). Инкубировались клеточные культуры 24, 48, 72 и 96 часов. Каждый планшет измерялся на спектрофотометре VERSA max microplate reader (Molecular Devices) при длине волны 470нм.

Полимеразная Цепная Реакция

Конвертированную ДНК подвергали полимеразной цепной реакции с помощью амплификатора DTrime («ДНК-Технология»), используя для этого метод, описанный в статье [Сухих Г.Т., и др. Метилирование гена *WIFI* при цервикальных плоскоклеточных интраэпителиальных поражениях. Акушерство и гинекология №5, 2017 стр. 114-123].

Бисульфитное секвенирование

На секвенирование вместе с праймером упаривали 16 нг ДНК каждого образца с помощью концентратора Concentrator plus (Eppendorf). Бисульфитное секвенирование промоторной области генов *BRCA1*, *WIFI* и *RASSF1A* проводили в соответствии с ранее описанными протоколами.

Результаты эксперимента.

Инкубирование клеток модели нормальной ткани молочной железы (MCF-10A) с индол-3-карбинолом не выявило значимых различий в скорости пролиферации при всех исследуемых концентрациях, в отличие от результатов, полученных на клетках MDA-MB-231. Из данных рисунков видно, что концентрация 50 мкМ не оказывала значимого эффекта, однако при концентрации 100 мкМ скорость пролиферации снижалась в 1,46 раза, что подтверждает избирательность ингибирующей активности индол-3-карбинола в отношении злокачественных клеток (Фиг. 3 и 4).

На Фиг. 5 и 6 приведены результаты анализа степени метилирования промотора гена *WIF1* в клеточных культурах MDA-MB-231 и MCF-10A.

Анализ метилирования не выявил деметилирующего эффекта в модели неопухолевых клеток MCF-10A. Как видно из Фиг. 5, метилировано 66,7% сайтов на исследуемой области промотора. Это значение не изменилось после инкубирования клеток с индол-3-карбинолом с концентрацией 100 мкМ.

В опухолевых клетках MDA-MB-231 наблюдается другой результат: при изначальном метилировании 100% сайтов после инкубирования с индол-3-карбинолом с концентрацией 100 мкМ метилирование осталось лишь в 40,7% сайтов (Фиг. 6). Это говорит о возможности использования индол-3-карбинола в качестве деметилирующего препарата в опухолевых клетках.

Несмотря на то, что с помощью ПЦР в реальном времени мы не смогли определить повышение экспрессии гена *WIF1*, по полученным результатам можно предположить, что происходит восстановление его экспрессии.

Таким образом, в результате работы было показано, что под действием индол-3-карбинола происходит деметилирование промотора гена *WIF1*, что приводит, по видимому, к восстановлению его экспрессии и снижению скорости пролиферации злокачественных клеток (Фиг. 4 и 6).

Для генов *BRCA1*, и *RASSF1A* также были проведены аналогичные исследования и показана способность индол-3-карбинола снижать уровень метилирования этих генов.

Пример 2

Формирование групп риска по развитию РМЖ.

Риск заболевания раком молочной железы существенно увеличивается с возрастом. По данным Национального института Рака США в возрасте 39-49 лет РМЖ может

заболеть 1 из 220 женщин. В возрасте 49-59 этот показатель составляет 1 из 50. Известно также, что риск заболеваемости возрастает при наличии в анамнезе родственников по женской линии гинекологического рака. На заболеваемость РМЖ влияет также наличие фиброзно-кистозной мастопатии, высокая маммографическая плотность и даже продолжительная болезненность молочных желез. С общепрофилактической точки зрения профилактический прием препаратов с онкопротективными свойствами необходим любой из перечисленных категорий женщин. Однако для получения достоверных доказательств профилактического эффекта любого лекарственного препарата с учетом параметров общей заболеваемости клиническое исследование должно охватить как минимум 10 000 женщин в возрасте 39-49 лет. Проведение такого масштаба исследования крайне затруднительно. Именно поэтому мы попытались выбрать несколько критериев для формирования группы риска, в которой вероятность развития РМЖ в течение 5-летнего наблюдения будет максимально высока, и в такой группе оценить эффективность лекарственной профилактики по наиболее важному показателю – заболеваемость РМЖ в сравнении с группой, не принимающей профилактические препараты. При таком подходе масштабы исследования были бы значительно меньше, а доказательства более достоверны.

Первичный отбор пациенток в группу риска проходил по критерию возраста 45-65 лет и диагноза фиброзно-кистозная мастопатия или высокая маммографическая плотность. Из этой категории женщин для дальнейшего исследования отбирали пациенток, у которых по женской линии были гинекологические раки. Среди отобранных пациенток проводили исследование по уровню метилирования одного из генов-супрессоров опухолевого роста *BRCA1*, *WIF 1* и *RASSF1A*. Для окончательного включения в группу высокого риска отбирали женщин, у которых уровень метилирования одного из генов по результатам анализа ДНК в плазме пациентов составлял 50% и более.

Отбор женщин в группу высокого риска по РМЖ проводили среди пациенток Московского маммологического Центра. В основном пациентки предъявляли жалобы на болезненные ощущения в молочных железах и наличие пальпируемых образований. Около 15% пациенток соответствовали нашим критериям отбора.

По данным критериям было отобрано 40 пациенток, которые были разделены на две однородные группы по 20 человек. 10 человек первой группы получали ежегодно 6

месячный курс индол-3-карбинола в виде лекарственного средства с повышенной эпигенетической активностью Индинол® Форто в дозировке 200 мг 2 раза в день в течение 5 лет. Другие 10 человек первой группы получали ежегодно 8 месячный курс индол-3-карбинола в виде лекарственного средства с повышенной эпигенетической активностью Индинол® Форто в дозировке 200 мг 3 раза в день в течение 5 лет. Вторая группа служила контролем. Обе группы проходили клиническое обследование 1 раз в год и завершающие обследования после 5-летнего наблюдения. На 2-й год наблюдений у всех участников исследования был проведен анализ метилирования выбранных генетических маркеров. Результаты клинического исследования представлены в таблице. Как видно из таблицы, проведение лекарственной профилактики с использованием описанного алгоритма позволяет значительно снизить развитие злокачественных явлений в группах риска по РМЖ.

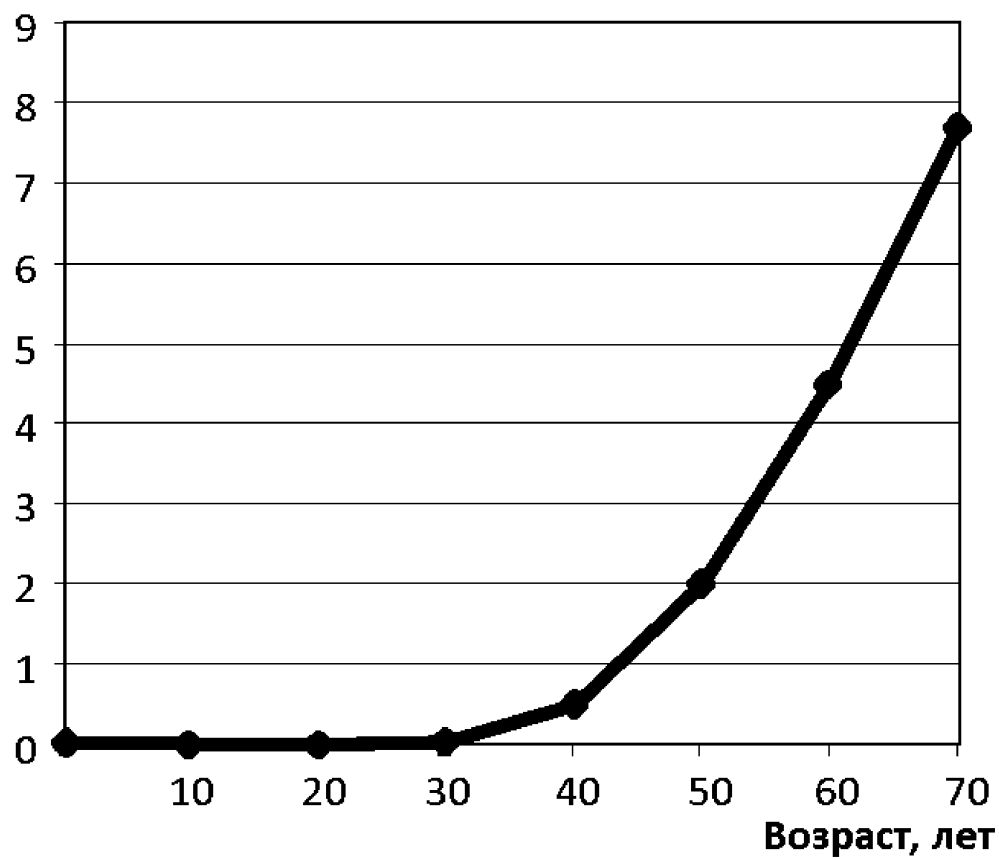
Таблица

Пациенты	Уровень метилирования гена	Число пациенток с установленным диагнозом РМЖ
Контрольная группа (n 20)	Не изменялся	6, стадии заболевания 1-2В
Опытная группа (n 20)	Снижался	1, стадия заболевания 2А

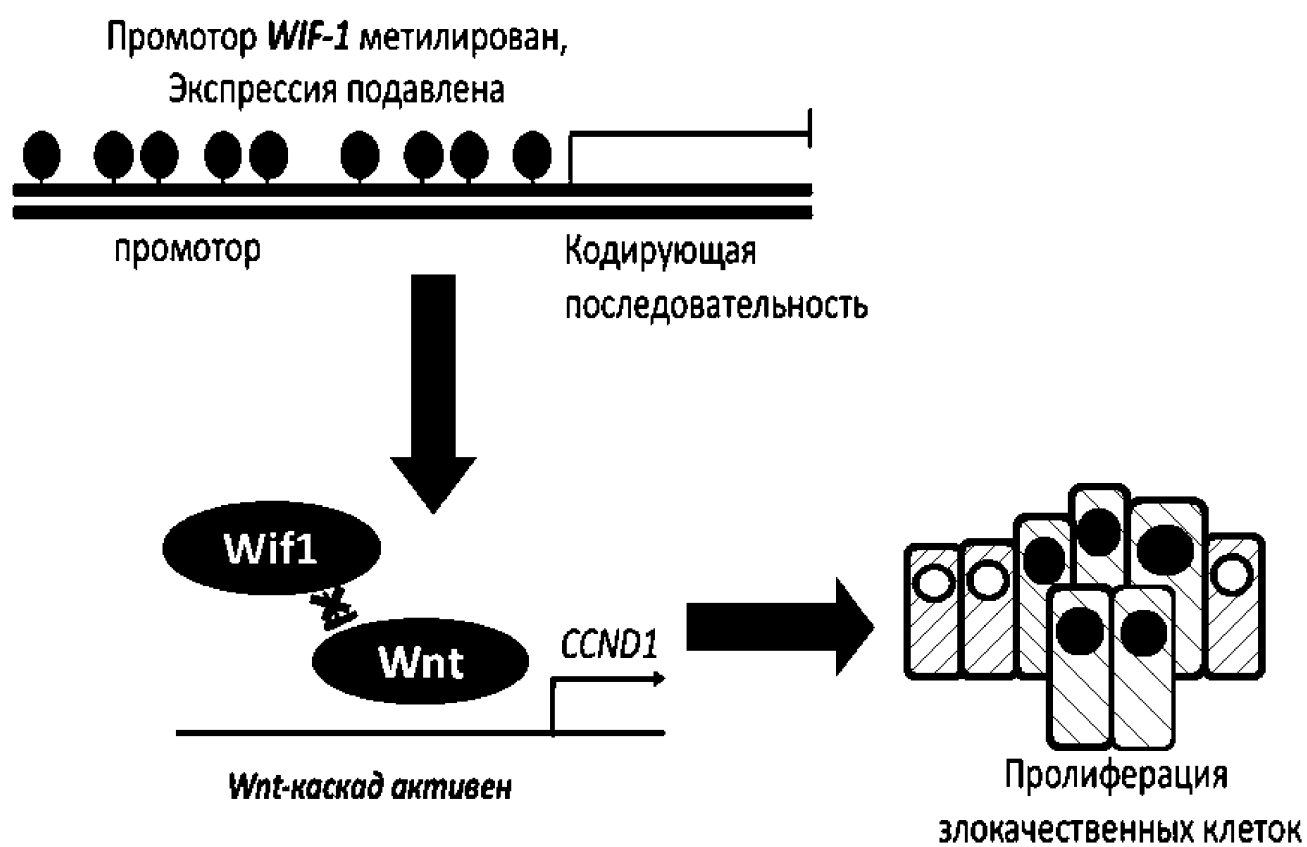
Формула изобретения

Способ профилактики рака молочной железы, заключающийся в том, что из женщин в возрасте 45-65 лет, имеющих диагноз узловая или диффузная форма мастопатии или повышенная маммографическая плотность, отбирают женщин, имеющих по женской линии злокачественные образования репродуктивных органов, проводят у отобранных женщин исследование на уровень метилирования одного из генов *BRCA1*, *WIF1* и *RASSF1A* и отбирают в группу риска женщин, у которых уровень метилирования одного из генов составляет не менее 50%, и женщины группы риска принимают препарат на основе индол-3-карбинола в дозировке от 400 мг до 600 мг индол-3-карбинола в сутки в течение от 6 до 8 месяцев ежегодно.

Риск РМЖ, %

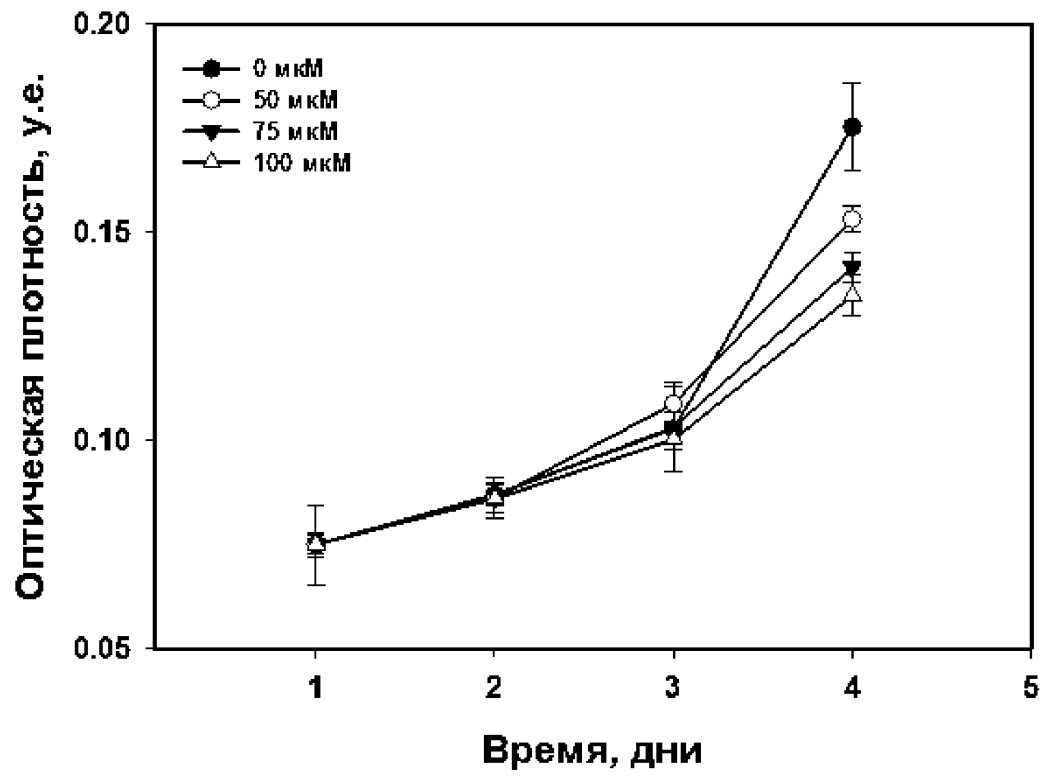


Фиг. 1



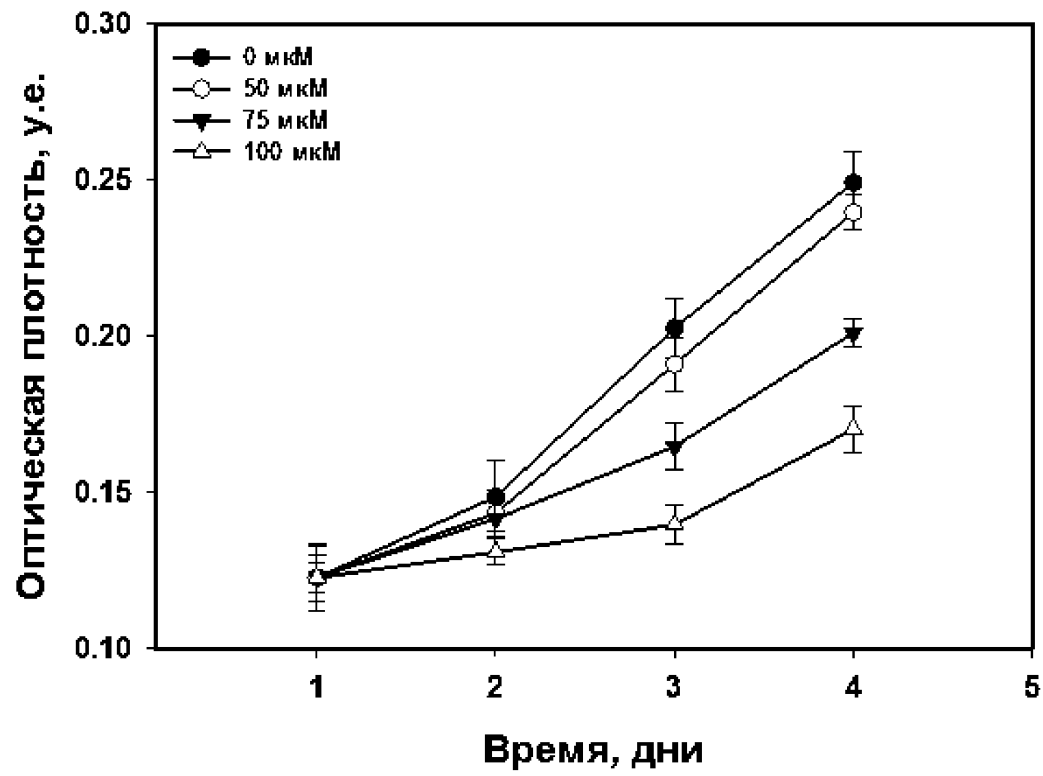
Фиг. 2

MCF-10A

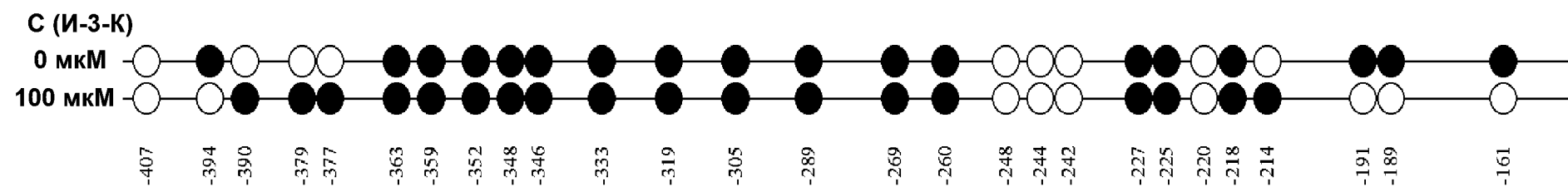


Фиг. 3

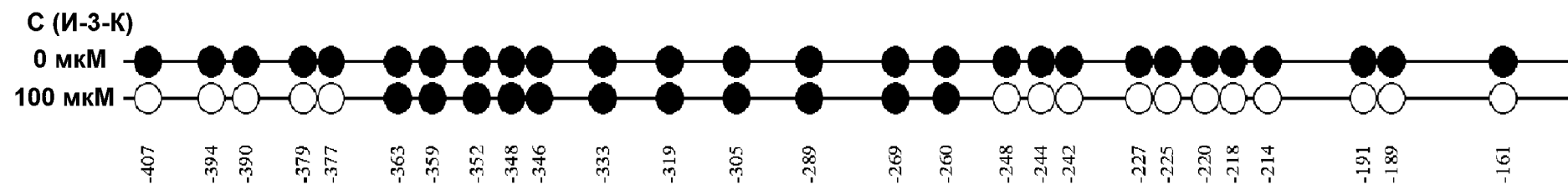
MDA-MB-231



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6