

Секвенирование – 2015

Прошло 10 лет после появления первого секвенатора нового поколения, разработанного компанией *454 Life Science Inc. (GS20)*. К маю 2007 года его совершенствование позволило оцифровать первый индивидуальный геном человека (Джеймса Уотсона) за миллион долларов. В том же году компания Solexa, вскоре вошедшая в состав Illumina, вывела на рынок первый флуоресцентный секвенатор (*GAI*). Дальнейшее развитие флуоресцентной технологии NGS (Next Generation Sequencing) привело к уменьшению стоимости WGS (Whole Genome Sequencing, т.е. полногеномного секвенирования) человека примерно до двух тысяч долларов. Одним из результатов такого прогресса стало появление проектов, в рамках которых должны быть оцифрованы сотни тысяч или даже миллионы геномов.

В 2011 году китайская компания *BGI* объявила о начале работ по проекту “3-Million Genomes Project”, нацеленному на полногеномное секвенирование миллиона человек, миллиона микроорганизмов и миллиона растений и животных. В конце 2012 года Правительство Её Величества приняло решение о выделении ста миллионов фунтов стерлингов на секвенирование ста тысяч пациентов в рамках проекта “Genomics England”. В 2013 году Саудовская Аравия приступила к созданию национальной сети центров секвенирования, которая позволит провести геномное секвенирование ста тысяч жителей страны. В США «стотысячные» геномные проекты стартовали в 2014 году (*Human Longevity Inc., Regeneron/Geisinger*), а в январе этого года президент Обама предложил выделить из бюджета 2016 года 215 миллионов долларов на проект “Precision Medicine Initiative”, предусматривающий секвенирование миллиона геномов граждан США.

В России имеется около сотни геномных секвенаторов, но почти все они простаивают по причине отсутствия достаточно квалифицированных кадров, дороговизны и сложности приобретения расходных реагентов, а также быстрого морального устаревания подобных приборов. К наиболее заметным российским достижениям в области WGS можно отнести «расшифровку русского генома», завершённую Лабораторией геномики Курчатовского НБИК-центра в 2009 году.

Если пытаться ответить на вопрос «Кто виноват?», то начинать придётся с августовской сессии ВАСХНИЛ 1948 года или даже с Великой октябрьской социалистической революции. Важнее ответить на вопрос «Что делать?». Один из вариантов – ничего не делать. Можно просто смириться с отставанием России в геномных гонках и дожидаться появления дешёвых американских или китайских секвенаторов. Но такое ожидание может затянуться. Да и за державу обидно. Этим определяется актуальность рассмотрения вопроса о возможности разработки отечественного секвенатора и его обеспечения расходными материалами и реагентами.

Задача такой разработки - «догнать и перегнать Америку». Или хотя бы только догнать. Или даже не догнать, а просто постараться сделать секвенирование в России более доступным. В первую очередь - обеспечить импортозамещение хотя бы части расходных материалов и реагентов. Сложнее будет скопировать секвенаторы. Но можно не просто копировать западные разработки, а попытаться их улучшить. А если не улучшить, то хотя бы удешевить. Задача не слишком амбициозная, зато выполнимая.

Отсюда следует необходимость рассмотрения лучших образцов для подражания и определения направлений их совершенствования.

Флуоресцентное секвенирование

Беспорным лидером геномных гонок является компания *Illumina*, недавно объявившая о начале продаж секвенатора *HiSeq 4000* (900 тыс.\$) и его «усеченной» версии - *HiSeq 3000* (740 тыс.\$). Появились в продаже и комплекты из пяти подобных секвенаторов, оснащённых более совершенной системой сканирования (*HiSeq X Five*, 6 млн.\$). В 2014 году те же секвенаторы поставлялись только комплектами по 10 штук (*HiSeq X Ten*, 10 млн.\$) и к концу года было продано 13 таких комплектов.

HiSeq X Five способен за год оцифровать девять тысяч геномов человека, а *HiSeq X Ten* – в 2 раза больше. Производительности *HiSeq 3000*, имеющего одну проточную ячейку, достаточно для секвенирования 6 геномов человека за 3,5 дня (~750 Gb), а двухъячеечный *HiSeq 4000* за это же время способен секвенировать 12 геномов (~1,5 Tb). От ранее выпускавшихся моделей *HiSeq* эти приборы отличаются упорядоченным расположением кластеров ДНК в проточной ячейке и повышенной светочувствительностью системы флуоресцентного сканирования.



Стоимость секвенирования на *HiSeq 3000/4000* примерно в 2 раза ниже, чем на *HiSeq 1000/2000/1500/2500*. В результате все ранее приобретённые российскими научными центрами (ИОГен РАН, МГУ, ЦНИИЭ, РНИМУ, МФТИ, ЦГИ СФУ) секвенаторы данной серии к 2015 году морально устарели. Реакция на это известие многочисленных обладателей подобных приборов по всему миру вызвала в январе снижение стоимости акций компании *Illumina* на 10%.

Более прогрессивная модульная система сканирования с двухцветной идентификацией встраивания в ДНК меченых флуорофорами нуклеотидов реализована в «одногеномной» модели той же фирмы *NextSeq 500* (250 тыс.\$, ~100 Gb/29 часов). В 2014 году было продано около пятисот таких секвенаторов. В начале этого года в продаже появился *NextSeq 550* (275 тыс.\$), который можно использовать и в качестве флуоресцентного сканера ДНК-чипов.



Самым распространённым секвенатором на сегодняшний день является *MiSeq* (99 тыс.\$). Для WGA его производительности (~5 Gb за сутки) недостаточно, поэтому он используется в основном для таргетного секвенирования. Модели с адаптированным программным обеспечением имеют разрешение FDA (US Food and Drug Administration) на применение в медицинской диагностике (*MiSeq Dx*) и в судебно-медицинской экспертизе (*MiSeq FGx*).

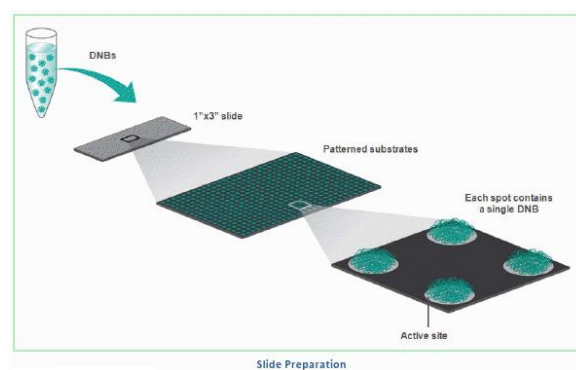
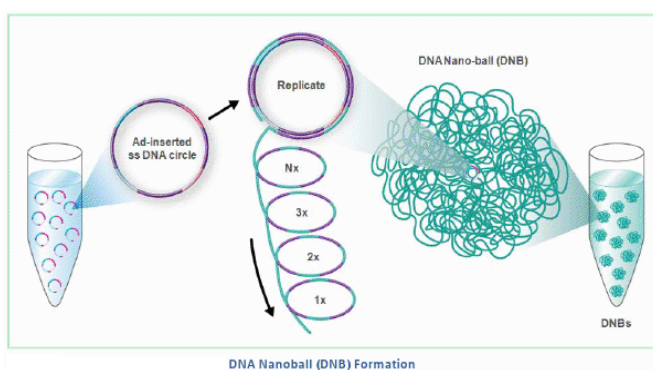
MiSeq Dx (120 тыс.\$) занял второе место в рейтинге инноваций 2014 года редакции журнала *The Scientist* ("Top 10 Innovations 2014"). На третье место в том же рейтинге редакторы поместили *HiSeq X Ten*.



Во второй половине 2015 года компания *Qiagen* обещает вывести на рынок NGS флуоресцентный секвенатор *GeneReader*, предназначенный для таргетного секвенирования ДНК. Его «карусельная» конструкция должна обеспечить сканирование двух десятков проточных ячеек. Планируется также замена ДНК-кластеров ДНК-наноболлами, что должно упростить подготовку ДНК к секвенированию на этом приборе. Правда, выпуск данного секвенатора уже не раз откладывался. По этой причине в конце прошлого года некоторые специалисты и руководитель группы разработчиков были уволены, что может стать хорошим стимулом для вновь набранной команды специалистов.



В этом году должен появиться и первый флуоресцентный китайский геномный секвенатор *BGISEQ-1000* компании *BGI (Beijing Genomics Institute)*. Он построен на базе платформы *CGA* американской компании *Complete Genomics*, приобретённой китайцами в позапрошлом году. Отсюда следует, что в нём также будут использоваться проточные ячейки (или слайды) с упорядоченным расположением ДНК-наноболлов. Более подробную информацию компания *BGI* обещала представить к середине года.



Флуоресцентные секвенаторы – это сканирующие эпифлуоресцентные микроскопы, настроенные на регистрацию четырёх (у NextSeq 500/550 - двух) флуорофоров и оснащённые системой автоматической подачи реагентов в проточные ячейки. Высокая специализация секвенаторов обеспечивает высокую скорость сканирования ячеек, но некоторые флуоресцентные микроскопы, если их оснастить системой подачи реагентов с проточной ячейкой, могли бы составить конкуренцию MiSeq. Если не по производительности, то по цене. Особенно если они будут работать на реагентах для NextSeq 500 и регистрировать только два флуорофора.

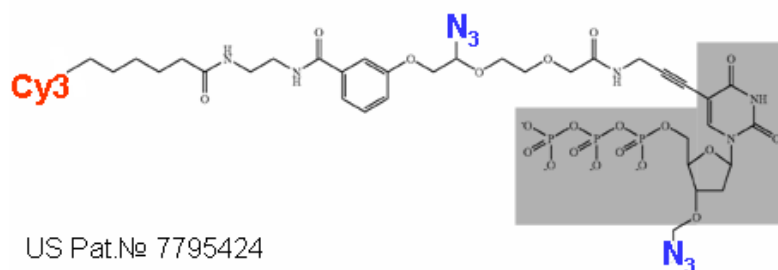
В качестве флуоресцентных сканеров для секвенирования ДНК подходят и конфокальные микроскопы. Некоторые их модели по производительности сопоставимы с регистрирующими системами секвенаторов, а по разрешающей способности оптической системы значительно их превосходят. Примером может служить занявший шестое место в рейтинге “Top 10 Innovations 2014” конфокальный микроскоп *TCS SP8 STED 3X* компании *Leica Microsystems* с разрешением сканирования 30(X)x30(Y)x100(Z) нм.

В одном кубическом миллиметре прозрачного геля, сканируемого конфокальным микроскопом, может содержаться больше миллиарда ДНК-наноболлов диаметром 200...300 нм. При толщине такого геля 100 мкм площадь сканирования составит всего 10 мм², что позволяет значительно уменьшить объём

проточной ячейки и, соответственно, расход реагентов. К преимуществам конфокального сканирования можно отнести и необязательность упорядоченного расположения кластеров ДНК или ДНК-наноболлов в проточной ячейке.

Снижение стоимости секвенирования лимитируется не столько дороговизной секвенаторов, сколько расходными материалами и реагентами. Затраты на их приобретение за год работы секвенатора могут превышать стоимость самого прибора, поэтому уменьшение этой статьи расходов является наиболее важной задачей. Вариантов здесь несколько. Можно, например, освоить регенерацию и повторное использование проточных ячеек. Можно наладить производство их аналогов. Если же ориентироваться на использование в качестве секвенаторов эпифлуоресцентных или конфокальных микроскопов, то и ячейки, и систему подачи реагентов придётся разрабатывать заново, но это не самая большая проблема.

Наиболее дорогими компонентами расходуемых реагентов являются меченые флуорофорами дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ), содержащие метил-азидные 3'-блокаторы и азидные линкеры, соединяющие флуорофоры с пуриновыми или пиримидиновыми основаниями. Именно сложность их синтеза защищает компанию Illumina от конкурентов.



Важной особенностью подобных азидных производных, синтез которых был разработан российскими учёными (ИБХ РАН) в начале 90-х годов прошлого века, является их сравнительно высокая стабильность, сочетающаяся с простотой и быстротой деблокирования при обработке ДНК-кластеров раствором трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР).

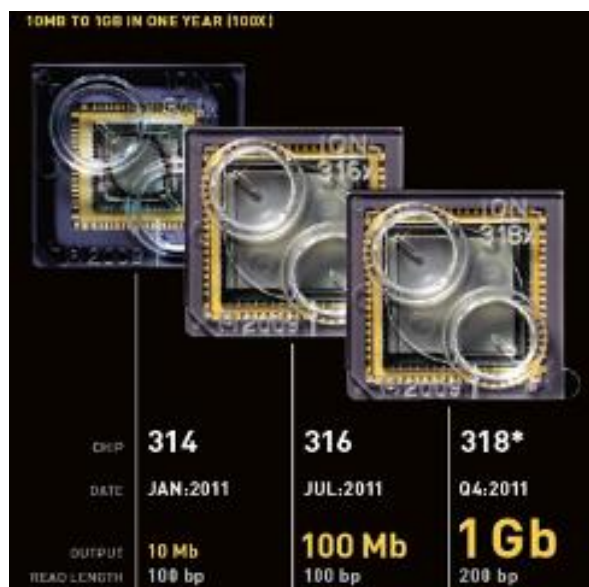
На начальных стадиях разработки флуоресцентной технологии NGS предлагались и другие варианты модификации дНТФ. Например, компания *Solexa*, вошедшая в состав *Illumina*, пыталась использовать разработку швейцарской фирмы *Monteia* - дНТФ с флуорофорами, соединёнными с основаниями нуклеотидов дисульфидными линкерами. Разработчики дНТФ для секвенатора *Qiagen* начинали с аллильных блокаторов и фотоотщепляемых флуоресцентных меток, но впоследствии остановились на сочетании флуоресцентно меченых дидезоксинуклеозидтрифосфатов и немеченых дНТФ с метил-азидными 3'-блокаторами. Т.е. они также выбрали азидные блокаторы, но не смогли полностью скопировать сложную структуру дНТФ, расходуемых секвенаторами компании *Illumina*. Возможно, это и является причиной, мешающей компании *Qiagen* сделать свой *GeneReader* конкурентоспособным.

Освоение синтеза флуоресцентно меченых дНТФ с азидными блокаторами можно считать ключевой задачей, решение которой позволит России включиться в геномные гонки. Способны ли на это российские химики? Судя по ссылкам в патентах компании *Illumina*, в 90-е годы прошлого века это сомнений не вызывало. Да и сейчас в России есть 3...4 группы химиков, способных справиться с этой задачей (ИХБФМ СО РАН, ООО «Синтол», ИБХ РАН, ИМБ РАН).

Полупроводниковое секвенирование

Первый полупроводниковый секвенатор PGM (Personal Genome Machine, 49,5 тыс.\$), разработанный компанией *Ion Torrent*, появился в продаже в начале 2011 года. Его начальные характеристики были сравнительно скромными (10...15 Мб), но к 2013 году производительность выросла примерно на два порядка. Такой скачок производительности произошёл благодаря увеличению длины ридов со ста до двухсот пар нуклеотидов и наращиванию количества рН-чувствительных полевых транзисторов в КМОП-чипах, образующих основания проточных ячеек.

В рабочей зоне основания проточной ячейки у сенсорного чипа Ion 314 содержится 1,2 млн. (Mr) таких ячеек (пикселей), у Ion 316 – 6,3 Mr, а у Ion 318 – 11,3 Mr. Благодаря дальнейшему совершенствованию чипов и оптимизации состава реагентов длину ридов удалось увеличить до 400 п.о. и к 2014 году повысить производительность PGM до 2 Gb (с чипом Ion 318 v2).



Следующая, более производительная модель полупроводникового секвенатора (Ion Proton, 150 тыс.\$), появилась в сентябре 2012 года. Для неё также планировалось сделать три чипа – P1 (165 Mr), P2 (660 Mr) и P3 (1,2 Gr). У первого из них длина и точность чтения ДНК оказались хуже, чем у любого из чипов PGM.

Доработка чипа (P1 v2) позволила довести длину чтения до 200 п.о. и повысить производительность до 10...15 Gb. В результате Proton смог конкурировать с MiSeq, но не с NextSeq 500. Да и с чипом P2 возникли проблемы. Его выпуск неоднократно откладывался и сейчас перенесён на 2015 год. Что касается чипа P3, то перспективы его появления совсем уж туманны.

Увеличить производительность секвенатора разработчики хотели миниатюризацией сенсорных пикселей и повышением плотности их расположения, т.е. приёмом, стандартным для микроэлектроники. Похоже, это оказалось ошибкой. В основе полупроводниковой технологии секвенирования лежит регистрация снижения рН при встраивании нуклеотидов в ДНК, а миниатюризация клонов ДНК уменьшила и величину, и продолжительность сигналов (смещений рН), которые и без того регистрировались на пределе чувствительности рН-сенсорных полевых транзисторов.



Ion 314™



Ion 316™



Ion 318™



Ion PI™

Более перспективным на сегодняшний день может оказаться простое увеличение количества сенсоров с шагом 4,1 мкм, характерным для чипа Ion 318. Тогда чип формата 24x72 мм будет иметь разрешение ~100 Мр, и при длине чтения 400 п.о. производительность рабочего цикла составит ~30 Gb. Если учесть, что продолжительность рабочих циклов у полупроводниковых секвенаторов измеряется часами, а у флуоресцентных – сутками, то прибор, считывающий информацию с таких чипов, сможет конкурировать не только с MiSeq, но и с NextSeq 500/550.

Со временем могут появиться полупроводниковые секвенаторы, регистрирующие выделение пирофосфата или общее увеличение заряда ДНК. Снижение или отсутствие характерных для локальных изменений pH диффузионных потерь позволит уменьшить сенсоры до субмикронных размеров и разработать гигапиксельные чипы с пониженным расходом реагентов.

В менее отдалённой перспективе можно надеяться на появление аналогов PGM. Например, в начале 2014 года компания *GenapSys* продемонстрировала прототип компактного секвенатора GENIUS 110™, работающего на чипах оригинальной конструкции. Судя по отсутствию в дальнейшем каких-либо новостей, это был не прототип, а муляж.



Попытка корпорации *Roche* разработать собственные pH-сенсорные чипы также оказалась неудачной. Контракт на выполнение этой работы с компанией *DNA*

electronics (UK) был расторгнут в середине 2014 года. Аналогичные попытки предпринимает компания *InSilixa* (США). В Великобритании чипы для диагностики и секвенирования со встроенной системой подачи реагентов разрабатывает группа проф. D. Cumming (Univ. of Glasgow).

Интересно, что продаваемые в США полупроводниковые секвенаторы PGM производятся в Сингапуре, а в 2015 году должен появиться их китайский «клон» под названием BGISEQ-100. Скорее всего, на первых порах работать он будет на импортных чипах серии Ion 31x, но вряд ли китайцам понадобится много времени на освоение производства их аналогов. Хорошим стимулом для них будет то, что цены на pH-сенсорные КМОП-чипы завышены примерно на два порядка. При себестоимости 2...3 \$ чип Ion 314 стоит 101\$ (v2 BC), Ion 316 – 317\$ и Ion 318 – 325\$ (v2). Себестоимость чипов PI не превышает 7\$, но продаются они по 713\$ (v3).

Простое копирование таких чипов вряд ли улучшит их рабочие характеристики. Тем более что в них используется далеко не оптимальная конфигурация ион-селективных полевых транзисторов (ISFET), формируемых при помощи КМОП-технологии. Поверхностный электрический потенциал передаётся к лежащим под слоями проводников и изоляторов транзисторам через металлизированный мостик, что может повышать инерционность сенсоров и снижать их чувствительность.

Аналогичные проблемы с передачей сигнала сквозь слои проводников и изоляторов в КМОП-сенсорах изображения были решены переходом на BSI-сенсоры, у которых светочувствительный слой полупроводника обращён к поверхности чипа. Применение ион-чувствительных BSI-сенсоров может совершить переворот в полупроводниковом секвенировании, но для этого нужно заинтересовать в их разработке крупные компании, владеющие сложными технологиями производства BSI-сенсоров изображения. Нынешний сравнительно небольшой рынок NGS (~2,5 млрд.\$ в 2014 г.) для монстров микроэлектроники пока недостаточно привлекателен.

Стоимость полупроводникового секвенирования может уменьшиться как в результате улучшения качества и удешевления чипов, так и в результате их многократного использования. Последний вариант предпочтителен, но разработчики полупроводниковой технологии NGS не поощряют подобные инициативы. Тем не менее, многие пользователи успешно экспериментируют с регенерацией чипов. Например, в России есть опыт одиннадцатикратного использования чипа Ion 314. В Китае чип PI удавалось использовать пятикратно.

Проблема в том, что программное обеспечение секвенаторов PGM и Proton не предназначено для регенерации использованных чипов, а его модификация или нестандартное использование приборов может осложнить их гарантийное обслуживание. Поэтому желательно разработать специальное устройство для просмотра (Chip Viewer) или регенерации и контроля качества чипов (Chip Washing Station). При высоком быстродействии и большом динамическом диапазоне оцифровки выходных сигналов его можно будет использовать в качестве электронного блока отечественного полупроводникового секвенатора.

Расходными реагентами для всех подобных секвенаторов служат особо чистые дезоксирибонуклеозидтрифосфаты. Производство менее чистых дНТФ в России налажено, и вряд ли их доочистка окажется слишком сложной задачей.

Тупиковое секвенирование

В США разработка новых способов секвенирования нуклеиновых кислот поощряется программой “Advanced DNA Sequencing Technology”. Ежегодно, начиная с 2004 года, в рамках этой программы финансируется примерно дюжина грантов. Например, в 2014 году на подобные гранты было выделено 14,5 млн.\$.

Но столь «ничтожные» деньги предназначены только для начинающих. При наличии научных заделов частные инвесторы и крупные корпорации вкладывают в приобретение и разработку новых технологий секвенирования намного больше. Так, Юрий Мильнер и другие инвесторы в конце 2013 года выделили компании *GenapSys* на разработку полупроводникового секвенатора 37 млн.\$.

В 2010 году корпорация *Life Technologies* приобрела компанию *Ion Torrent*, разработавшую полупроводниковую технологию секвенирования, за 725 млн.\$.

В 2013 году корпорация *Terumo Fisher Scientific* приобрела *Life Technologies* со всеми её активами за 13,6 млрд.\$.

Ажиотажный спрос инвесторов и крупных корпораций на технологии NGS рождает предложение. Количество предлагаемых способов секвенирования нуклеиновых кислот, их вариантов и патентов на эту тему измеряется сотнями. Трудно перечислить и начинающие зарубежные компании, которые пытаются разработать новые технологии секвенирования. Для успешного завершения разработки им, как правило, не хватает нескольких десятков миллионов долларов.



На сегодняшний день только трём подобным компаниям удалось довести свои технологии до работоспособного состояния.

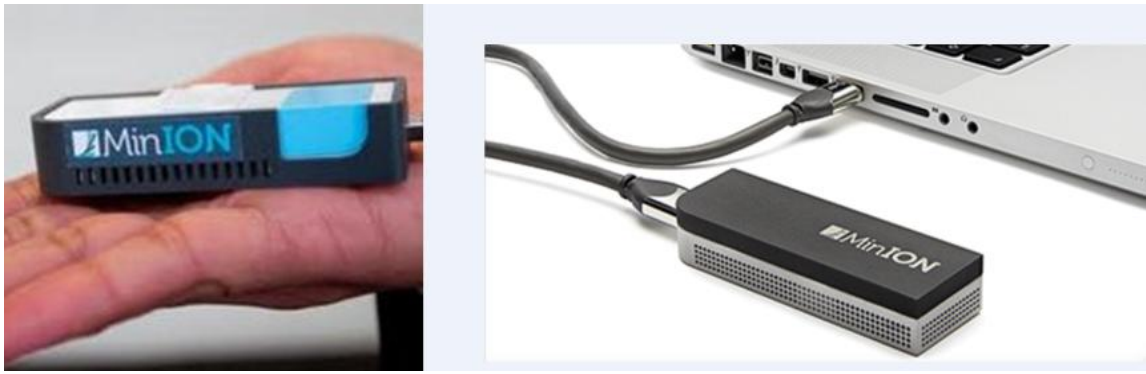


Первой была компания *Helicos BioScience*, которая в 2009 году выпустила на рынок мономолекулярный флуоресцентный секвенатор HeliScore. Прибор оказался очень дорогим (900 тыс.\$), громоздким (~1 т), да ещё и неточным, и в 2010 году эта компания выбыла из геномных гонок.

Более успешной оказалась судьба мономолекулярного флуоресцентного секвенатора компании *Pacific Biosciences*, появившегося на рынке в 2010 году (PacBio RS). Прибор также оказался дорогим (695 тыс.\$) и громоздким (~1 т). Тем не менее, компании удалось продержаться до сегодняшнего дня и даже выпустить его усовершенствованную модель (PacBio RS II). Всего к началу 2015 года было продано 125 секвенаторов такого типа, но в последнее время перспективы дальнейшего развития и конкурентоспособность данной технологии вызывают большие сомнения.



На фоне этих машин очень выигрышно смотрится миниатюрный («размером с флешку») полупроводниковый секвенатор MinION, разработанный компанией *Oxford Nanopore*. В продаже он до сих пор не появился, но в прошлом году несколько лабораторий смогли поучаствовать в его бета-тестировании и даже опубликовать полученные результаты.



Результаты этих испытаний подтвердили работоспособность MinION, но качество получаемой информации оказалось неудовлетворительным. Похоже, что этот секвенатор придётся ещё основательно дорабатывать. Да и разработчики спешить с выводом на рынок этой модели не торопятся. В 2015 году они намерены переключиться на доработку более производительных моделей - GridION и PromethION. При этом вопрос о возможности повышения качества используемого во всех этих моделях нанопорного секвенирования остаётся открытым. Возможно, нанопорная технология *Oxford Nanopore* окажется тупиковой ветвью эволюции NGS, но её ошибки могут послужить хорошим уроком для многочисленных разработчиков других технологий мономолекулярного секвенирования.

Весьма поучительна и судьба компании *454 Life Science Inc.*, приобретённой корпорацией *Roche*. Её лучшие в мире (в 2005...2007 годах) пиросеквенаторы не выдержали конкуренции и в середине прошлого года были сняты с производства. Примерно в это же время была завершена разработка китайского пиросеквенатора BIGIS-4, который по всем параметрам не уступал рошевскому, но появился слишком поздно.

В 2015 году у двух основных лидеров рынка NGS могут появиться первые серьёзные конкуренты, но ориентироваться они будут не на принципиально новые технологии, а на копирование или совершенствование флуоресцентной технологии *Illumina* и полупроводниковой технологии *Ion Torrent*. «Новички» же вроде *Pacific Biosciences* и *Oxford Nanopore* уже сейчас ориентируются в основном на секвенирование длинных последовательностей ДНК – слабое место всех современных геномных секвенаторов. Но и в этой рыночной нише им придётся столкнуться с серьёзной конкуренцией. В первую очередь – со стороны оптического картирования ДНК.

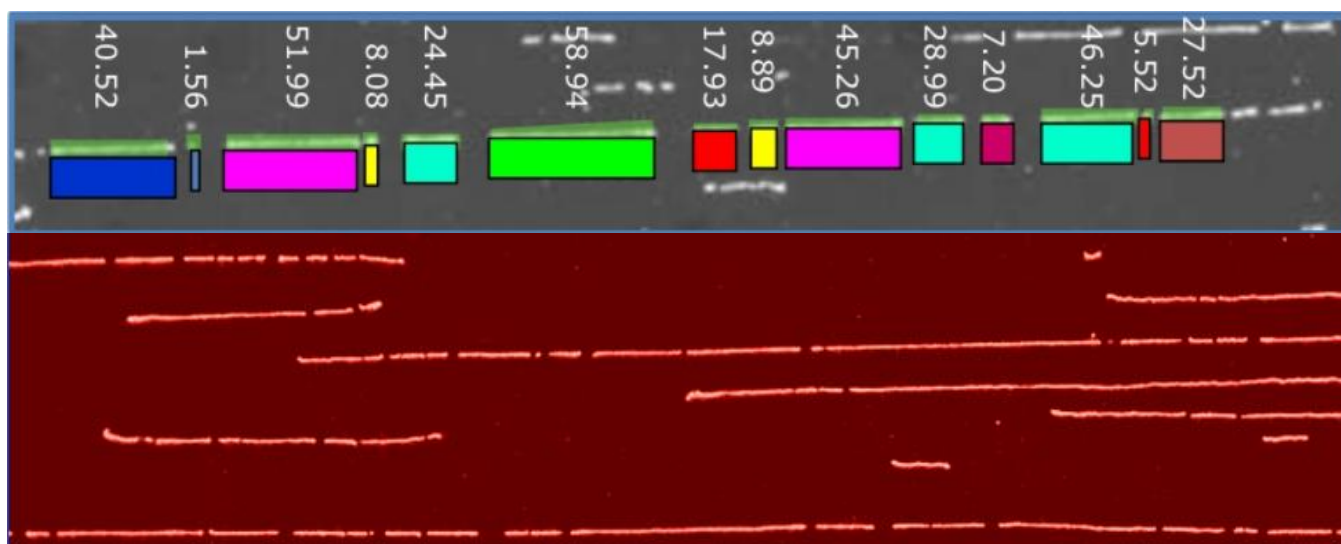
Оптическое картирование

Длина читаемых геномными секвенаторами нуклеотидных последовательностей (ридов) сравнительно невелика - до 600 п.о. (300x2) у MiSeq и до 400 п.о. у PGM. Поэтому они выявляют в основном однонуклеотидные мутации (SNP), а также небольшие инсерции и делеции. Но геномы эукариот содержат крупные инсерции, делеции, инверсии, транспозиции, тандемные повторы, гомологии, вариации количества копий (CNV) и т.п., без учёта которых качественное полногеномное секвенирование невозможно. Поэтому разработчики секвенаторов большое внимание уделяют увеличению длины ридов и парноконцевому секвенированию, а разработчики наборов реагентов –

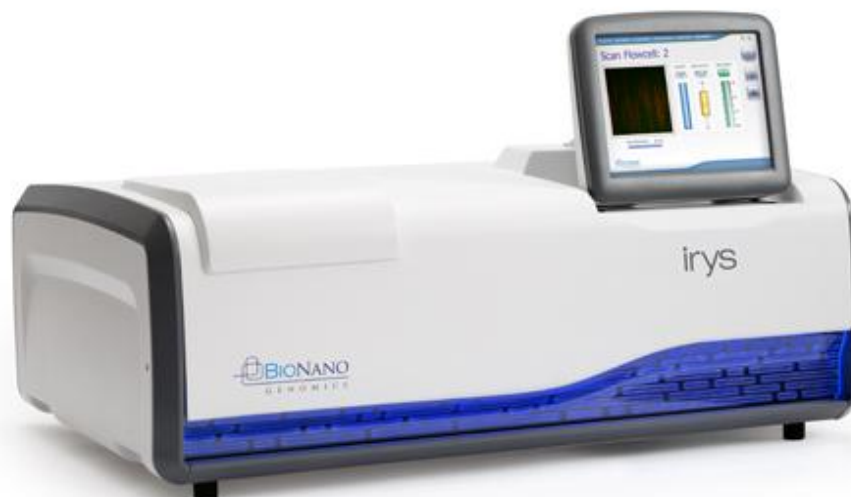
сцепленноконцевому секвенированию. И при этом финишная сборка даже референсного генома человека до сих пор не завершена.

Секвенатор PacBio RS II способен читать нуклеотидные последовательности длиной 10...15 т.п.о., но только в «стробоскопическом» режиме («пунктиром»), снижающем фотоинактивацию ДНК-полимеразного комплекса, и с недостаточной для генома человека производительностью (1 Gb на ячейку). В 2015 году компания *Pacific Biosciences* планирует увеличить среднюю длину чтения до 15...20 т.п.о. и производительность до 4 Gb, но этого также будет недостаточно для развития структуральной геномики.

В качестве альтернативного решения предлагается оптическое картирование - технология построения карт рестрикции длинных фрагментов ДНК, дополняющих данные секвенирования. Предназначенная для такого картирования система Argus производится компанией *OpGen* с 2011 года, но из-за низкой производительности применяется в основном в качестве вспомогательного средства при финишной сборке прокариотических геномов.

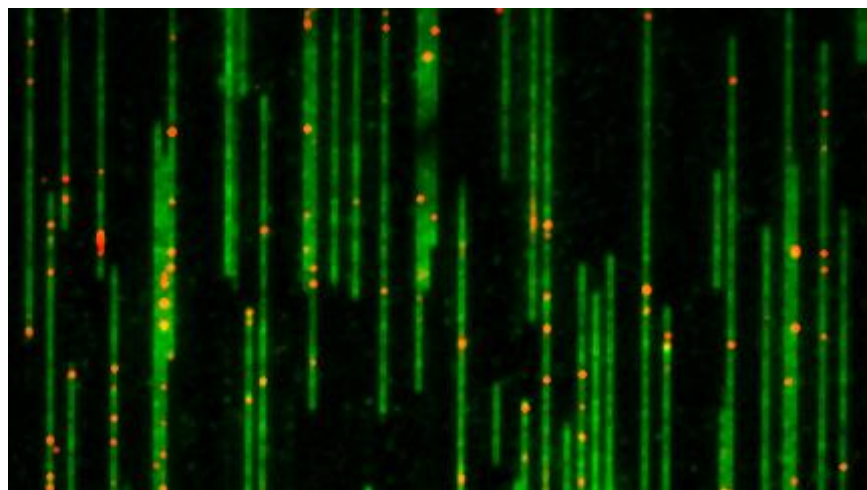


В конце 2013 года компания *BioNano Genomics* выпустила на рынок чипы IrysChip v2 для своего специализированного флуоресцентного сканера Irys (300 тыс.\$). За сутки эта система способна картировать никазные сайты генома (50...100 Gb на чип) на фрагментах ДНК длиной более 100 т.п.о.. В рейтинге “Top 10 Innovations 2014” чип IrysChip v2 занял четвёртое место.



На сегодняшний день (февраль 2015 г.) в США инсталлированы 34 системы Irys. Картировано 100 геномов различных видов эукариот и 20 индивидуальных геномов человека. В 2015 году компания планирует повысить производительность чипов до 10 геномов человека в сутки (0,5...1,0 Тб).

Особую привлекательность данной системе оптического картирования придаёт её простота. Правда, сканером служит флуоресцентный микроскоп с высоким разрешением и системой автофокусировки, но подобные микроскопы уже не редкость. Что касается двухъячеечного чипа IrysChip v2, то главной его особенностью является наличие 13 тысяч каналов шириной 50 нм, через которые под действием электрического поля движутся окрашенные флуоресцентными красителями молекулы двунитевой ДНК.



Изготовление подобных «чипов» (электрофоретических ячеек) не является слишком сложной задачей, поскольку для этого используются стандартные технологии ионного травления, наноимпринтинга и т.п., применяемые при производстве некоторых микросхем и микроэлектромеханических систем. Создание и совершенствование систем оптического картирования (если поторопиться) могло бы обеспечить России достойное место в геномных гонках разработчиков технологий NGS.

Особенности национального секвенирования

Отставание всех прочих стран от США в геномных гонках настолько велико, что «догнать Америку» уже невозможно. Во всяком случае, если точно следовать проложенным ей курсом. Характерным примером может служить китайский пиросеквенатор BIGIS-4 – проходящий сейчас бета-тестирование, но уже морально устаревший. Более успешная судьба может ожидать полупроводниковый секвенатор BGISEQ-100 («клон» PGM). Особенно если китайцам удастся освоить производство pH-сенсорных чипов и расходных реагентов, и продавать всё это по демпинговым ценам. Не менее перспективным выглядит налаженное недавно американско-китайское производство секвенаторов NextSeq CN500 (*Berry Genomics – Illumina*).

Что касается флуоресцентного секвенатора BGISEQ-1000, то в его прототипе (CGA компании *Complete Genomics*) наиболее прогрессивные принципы NGS (упорядоченные ДНК-наноболлы) сочетаются с давно устаревшим лигазным секвенированием. Пока неясно, смогут ли китайские разработчики заменить лигазное секвенирование полимеразным и, соответственно, наладить собственное производство флуоресцентно меченых ДНТФ с азидными блокаторами. Тем более что все эти разработчики по-прежнему трудятся в США (в *Complete Genomics*) и могут столкнуться с патентными претензиями компании *Illumina*. Правда, реагенты для секвенаторов *Illumina*, да и сами секвенаторы, производятся в Великобритании (в *Solexa*), но это не меняет дела.

Можно отметить и другие «географические» особенности NGS. Например, pH-сенсорные чипы для PGM делают в Германии (X-Fab Semiconductors foundries AG, Erfurt) и в Великобритании (Plessey Semiconductor, Plymouth, UK), а сам PGM – в Сингапуре. Чипы для PacBio RS производятся тайваньской корпорацией TSMC, а землетрясение в Японии, вызвавшее в 2011 аварию на атомной электростанции в Фукусиме, привело к задержке поставок лигазных секвенаторов SOLiD 5500 (Life Technologies) и ускорило прекращение их производства в 2012 году.

В России география попыток разработки секвенаторов нового поколения очень широка. Включает Москву (ООО «Синтол», ООО «Растр Технолоджи», ООО «Компания Хеликон», ИМБ РАН и др.), Новосибирск (ИАиЭ СО РАН, ИХБФМ СО РАН, ИФП СО РАН, ООО «БИОССЕТ»), Зеленоград (ООО «Гамма», ООО «Элем Инфо», ООО «НАНО ВИЖИН», ЗАО «НТ-МТД»), Санкт-Петербург (ИАП РАН, ООО НПК «Орион Медик»), Протвино (ООО «НПО ДНК-Технология»), Владикавказ (ООО ВТЦ «Баспик»), Иркутск (ЛИН СО РАН), Уфу (ИБГ УНЦ РАН / ООО «Биофорт»), Красноярск (ИИФиРЭ / ООО «ВИТИМ-ЛАБ»), Черноголовку (ИФТТ РАН), Долгопрудный (ООО «Карбонлайт») и Саратов (СГТУ).

Идей много, но только одна из них прорабатывалась более или менее всерьёз – разработка аналога мономолекулярного секвенатора PacBio RS силами пяти институтов Сибирского отделения РАН, закончившаяся созданием прототипного устройства. Отсутствие финансирования или мизерное финансирование подобных проектов приводит к тому, что обычно они заканчиваются на стадии обсуждения или самой общей прорисовки. Типичным примером может служить саратовский «акустический» секвенатор, муляж которого демонстрировался на Форуме «РОСНАНОТЕХ-2011» и даже получил Гран-при VII Саратовского Салона изобретений, инноваций и инвестиций.



Получившие финансирование проекты можно пересчитать по пальцам.

№ п/п	Наименование проекта и источник финансирования	Объёмы финансирования (млн.руб.)	Сроки	Исполнители
1	«Разработка нового метода высокопроизводительного секвенирования протяжённых фрагментов ДНК с помощью сканирующего зондового микроскопа» - Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа «Умник»	0,4	2008-2009	ООО «Биофорт» (Уфа)
2	«Разработка новой технологической платформы для секвенирования ДНК на основе чипа ВИТИМ (вакуумные интегральные технологии информационных матриц)» - Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа «Старт»	1,0	2013-2014	ООО «ВИТИМ-ЛАБ» (Красноярск)
3	«Разработка и апробация платформы для быстрого секвенирования отдельных молекул ДНК в реальном времени с использованием флуоресцентных аналогов субстратов в нанореакторах объемом 50 зептолитров» - Сибирское отделение РАН	3,0	2012-2014	ИХБФМ СО РАН, ИФП СО РАН, ИАиЭ СО РАН (Новосибирск), ЛИН СО РАН (Иркутск)
4	«Развитие рамановских методов секвенирования ДНК с применением SERS-технологий на нанопористых мембранах» - Государственная программа Московской области «Предпринимательство Подмосковья» при участии венчурного фонда «Тройка Венчурс» инвестиционной компании «Тройка Диалог»	5	2010-2012	ООО «ИнСпектр» (Черноголовка)
5	«Разработка основ биосенсорных технологий для создания новых устройств полупроводникового секвенирования ДНК» - Министерство образования и науки РФ, ФЦП «Исследования и разработки ... »	5,5	2013-2014	ООО «Гамма» (Зеленоград)
6	«Разработка спектро-секвенатора ДНК/РНК» - ОАО «Российская корпорация нанотехнологий»	~20*	2013-2014	ООО «НАНО ВИЖИН» (Зеленоград)

* Получить точную информацию от разработчиков не удалось.

Бессистемность отечественного «секвенаторостроения» сочетается с отставанием технологий, нехваткой (утечкой) квалифицированных кадров и отсутствием как моральной, так и материальной поддержки со стороны госструктур и бизнес-сообщества. Тем не менее, Россия в геномных гонках занимает далеко не последнее место. Точнее – пятое (после США, Великобритании, Китая и Японии) или седьмое (после Сингапура и Тайваня).

В Китае быстрые темпы развития геномного секвенирование обусловлены именно государственной поддержкой, но информация об этом в доступных источниках практически отсутствует. Поэтому лучше ориентироваться на опыт Великобритании, в которой развитие геномной медицины возведено в ранг государственной политики.

В конце 2012 года Премьер-министр Дэвид Камерон представил Программу “Strategy for UK Life Sciences – One Year One”, в которой была сформулирована амбициозная задача - сделать Великобританию мировым лидером в геномике и биоинформатике. В ней подробно описаны основные ожидаемые результаты и меры, которые будут предприниматься Правительством для достижения этой цели. Одной из таких мер стало выделение 100 млн. £ на секвенирование 100 тысяч геномов онкологических больных и других пациентов, которым это может спасти жизнь.

Утверждённая Премьер-министром Программа Правительства Её Величества базируется на менее амбициозной Программе Министерства Предпринимательства, Инноваций и Ремёсел “Strategy for UK Life Sciences”, утверждённой им же в конце 2011 года. В министерской Программе генетические аспекты отражены, но не превалируют, тогда как и в более поздней Программе Правительства, и в предисловии Премьер-министра к ней основное внимание сосредоточено на необходимости первоочередного развития геномики и её внедрения в здравоохранение.

Необходимо отметить, что инициировало разработку данной Программы не Правительство Великобритании, а Парламент (Палата Лордов). Его Комитет по науке и технологиям в июле 2009 года представил объёмный доклад под названием “Геномная медицина” (Том I - Доклад, 127 с.). Всего в Докладе содержится 54 рекомендации по ускорению и улучшению развития геномной медицины в Великобритании (п. 8.1...8.54). В частности, Комитет Парламента рекомендовал Совету технологической стратегии Великобритании (Technology Strategy Board - UK’s national innovation agency) сделать геномику ключевой технологической платформой для продвижения коммерческого развития и клинических приложений на следующие 5 лет, и поддержать лидерство Великобритании в геномной медицине (п. 3.60 и Рекомендация 13 Доклада). Обоснование выработанных рекомендаций опубликовано во втором, ещё более объёмном томе (646 с.), прилагавшемся к Докладу. В нём собраны заключения, меморандумы и результаты опроса сотен ведущих организаций и специалистов Великобритании.

Реакцией Правительства на рекомендации Комитета Парламента стала организация в 2010 году Группы стратегической геномики человека (Human Genomics Strategy Group, HGSG), которая в январе 2012 года опубликовала программный документ “Building on our inheritance. Genomic technology in healthcare” с подробным изложением стратегии Великобритании в этой области.

Основные положения этой стратегии и рекомендации HGSG стали ключевыми пунктами утверждённой в конце того же года Премьер-министром Программы Правительства Её Величества.

Опыт Великобритании интересен ещё и тем, что России брать пример с США уже поздно. Там геномное секвенирование имеет четвертьвековую историю, причём пользуется постоянной поддержкой не только госструктур, инвесторов и крупных корпораций, но и всех президентов конца XX – начала XXI века. В результате секвенирование в США стало реальным сектором экономики, в котором в прямой или косвенной форме задействовано около 300 тысяч человек.

Развитие отечественных технологий NGS должно учитывать вышеописанные особенности национального секвенирования, требующие принятия экстраординарных мер для ликвидации отставания в геномных гонках. Проблема в том, что предпринимать такие меры некому. Министерства и ведомства в целом не против инициатив в этой области (см. исх. № МОН-П-2127 от 11.06.2013 Минобрнауки России), но только если они смогут конкурировать с разработчиками прочих критических технологий Российской Федерации, утверждённых указом Президента РФ № 899 от 07.07.2011. Секвенирование в перечне этих технологий замаскировано под «геномные, протеомные и постгеномные технологии» (п.5).

Шансов на победу в такой конкурентной борьбе у российских разработчиков NGS маловато. Да и самих разработчиков маловато, а достаточно серьёзные попросту отсутствуют. Отсюда следует необходимость целенаправленной поддержки этого направления со стороны профильных министерств, ведомств и государственных фондов. Для этого необходимо формирование госзаказа на проведение комплекса поисковых и прикладных исследований и разработок, направленных на выполнение целевой программы разработки импортозамещающих технологий секвенирования ДНК. Нужно только определить, кто будет заниматься подготовкой такой Программы, контролировать её выполнение и отвечать за невыполнение.

О Программе

Прежде всего, необходимо заинтересовать профильные министерства и ведомства в подготовке и выполнении Целевой программы. Пробудить такой интерес могло бы поручение Председателя Правительства РФ по итогам совещания о мерах по разработке импортозамещающих технологий секвенирования ДНК (или поручение Правительства РФ, данное в целях обеспечения исполнения поручения Президента РФ). На подготовку подобных поручений потребуется время, но ожидать проявления инициативы от профильных министерств и ведомств можно ещё дольше.

Предварительная проработка вопроса ими уже проводилась в ответ на Поручение Правительства РФ («О поддержке проекта ...», № АД-П12-3550 от 29.05.2013) по поводу обращения фракции ЛДПР в Государственной Думе к Президенту Российской Федерации по вопросу о поддержке проекта разработки отечественного полупроводникового геномного секвенатора (350 млн. руб., ООО «Гамма»). Сам проект, продвигаемый руководством ЛДПР, вызвал большие сомнения, но необходимость развития данного направления была поддержана безоговорочно всеми организациями, включающими Минобрнауки (исх. № МОН-П-2127 от 11.06.2013), Минздрав (исх. № 27-0/10/1-2570 от 05.06.2013), Минпромторг

(исх. № СЮ-6946/13 от 05.06.2013), Минэкономразвития (№ 11628-ОФ/Д19и от 10.06.2013), РАН (исх. № 1-10005-2110/210 от 10.06.2013) и РАМН (исх. № 1118/04-04 от 07.06.2013). Проиллюстрировать это могут выдержки из Заключения Минобрнауки (Приложение к исх. № МОН-П-2127 от 11.06.2013), суммирующего мнения всех привлечённых к выполнению данного Поручения организаций:

“... говоря в целом о создании в стране доступного отечественного геномного секвенатора последнего поколения ..., о готовности принять участие в его реализации ведущих российских учёных и специалистов, разработка отечественного секвенатора несомненно является перспективной и заслуживает поддержки. ...

... Минэкономразвития России с учётом материалов, подготовленных технологической платформой «Медицина будущего», считает, что разработка отечественного полупроводникового секвенатора может послужить рывком в молекулярно-генетической диагностике и может способствовать ускоренному переходу на стандарты персонализированной медицины, являющейся одним из приоритетов Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года

... Минпромторг России и Минобрнауки России готовы рассмотреть предложения о разработках в области создания отечественных технологий полупроводникового геномного секвенирования и соответствующего оборудования в случае их поступления в установленном порядке.»

К сожалению, позапрошлогоднее единодушное проявление готовности министерств и ведомств оказать всемерное содействие разработке отечественных технологий секвенирования (в ответ на Поручение Правительства РФ) до сих пор не получило широкой поддержки со стороны научной общественности. Объяснить это можно как недостаточной информированностью потенциальных разработчиков о нарастающем интересе госструктур к проектам с подобной тематикой, так и отсутствием механизмов целенаправленного сбора, оценки и продвижения таких проектов.

Для улучшения ситуации можно воспользоваться опытом Правительства Её Величества, организовавшего в 2010 году Группу стратегической геномики человека (**HGSG**). Правда, наше Правительство ещё не готово к столь кардинальным переменам, поэтому на первых порах можно ограничиться созданием группы с менее амбициозным названием (и с менее обширными задачами). И не при Правительстве Российской Федерации, а в любом профильном министерстве или ведомстве. Например, в РАН. Что-нибудь вроде «Группы технологий геномного секвенирования» (**GTGS**), которая сосредоточится исключительно на импортозамещении геномных секвенаторов и расходуемых ими реагентов.

Прогресс в этой области практически непредсказуем и со временем может привести к появлению более эффективных технологий, но это произойдёт ещё не скоро. И, если трезво оценивать ситуацию, то не в России. Тем не менее, поддержка даже сумасшедших российских проектов могла бы быть полезной для привлечения внимания к геномному секвенированию изобретателей, молодых учёных и студентов. Такую поддержку способен обеспечить Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программам «Умник» и «Старт» (0,4/1,0 млн.руб.). Проблема в том, что среди фокусных тематик этого Фонда технологии секвенирования отдельной строкой не прописаны. Правда, в

разделе Б (Прибор/устройство) есть подраздел Б2 (Медицина) с пунктом Б2.04 (Приборы для медицинской диагностики и лечения), а в разделе В (Продукт/материал) имеется пункт В2.05 (Наборы реагентов для медицинской диагностики *in vivo* и *in vitro*), но этого явно недостаточно для фокусировки внимания экспертов и конкурсантов фонда на технологиях секвенирования.

Темы перспективных разработок должны предлагать сами заявители проектов. Что касается проектов импортозамещения, то их тематика должна определяться Программой, разрабатываемой Группой технологий геномного секвенирования.

Фокусная тематика Программы

Можно выделить четыре основных направления развития отечественных технологий NGS:

- флуоресцентные технологии;
- полупроводниковые технологии;
- технологии оптического картирования;
- перспективные и вспомогательные разработки.

Наиболее привлекательны (и наименее эффективны) многочисленные перспективные разработки принципиально новых технологий секвенирования ДНК. Их необходимо рассматривать и оценивать очень внимательно, но в последнюю очередь.

На втором месте (с конца) – технологии оптического картирования, дополняющего данные геномного секвенирования. Они чрезвычайно интересны и полезны, но сначала нужно изучить опыт лучших разработчиков (BioNano Genomics), т.е. приобрести систему Irys (300 000\$ в США) и оценить её возможности.

Первоочередной задачей является разработка технологии синтеза флуоресцентно меченых дНТФ с метил-азидными 3'-блокаторами и освоение их производства. Это может сделать Россию достойным соперником США (и партнёром Китая) на рынке NGS. Проблема в том, что справиться с этой задачей могут только немногие химики высшей квалификации, а все они имеют и неплохие зарплаты, и гранты, поэтому заинтересовать их синтезом модифицированных дНТФ будет не так-то просто.

После освоения синтеза расходных реагентов для флуоресцентного секвенирования можно будет подумать и о секвенаторах. Правда, рассчитывать на ощутимое улучшение и удешевление эпифлуоресцентных сканирующих систем не приходится. Более перспективными могут оказаться оптоэлектронные чипы, содержащие встроенную систему подсветки флуорофоров. Такие чипы разрабатывает тайваньская компания Personal Genomics, которая в 2016 году обещает выпустить секвенаторы стоимостью чуть больше 10 тыс. \$. В подобные обещания верится с трудом, но сама по себе идея использования оптоэлектронных чипов для флуоресцентного секвенирования ДНК в перспективе выглядит очень привлекательно.

В полупроводниковом секвенировании первоочередной задачей является разработка устройства для оценки качества pH-сенсорных чипов, которое обеспечит их многократное использование. Это же устройство после доработки и оснащения системой подачи реагентов сможет послужить прототипом для отечественного полупроводникового секвенатора. Разработка (очистка) расходных реагентов

(дНТФ) не менее важна, но экспериментировать с ними лучше на многоразовых чипах. И не на фирменном приборе, не позволяющем слишком сильно модифицировать рабочие протоколы и программное обеспечение.

Если группировать тематику Целевой программы по срочности и важности выполнения, то первоочередными задачами будут импортозамещение расходных материалов и реагентов для флуоресцентных секвенаторов компании Illumina и полупроводниковых секвенаторов компании Ion Torrent (Thermo Fisher). В последнем случае вместо замещения pH-сенсорных чипов достаточно будет отработать их многоразовое использование. Серьёзного внимания также требуют находящиеся на ранней стадии развития технологии оптического картирования, но пока речь идёт не более чем о поддержке научно-исследовательских работ с тематикой подобного рода.

Наибольший вред развитию импортозамещающих технологий может нанести увлечение перспективными и вспомогательными разработками. Встречаются идеи, авторы которых обещают «отсеквенировать» (или «секвенировать») всю страну «секвенаторами» собственной конструкции, но это, пожалуй, наименее опасная категория конкурентов. Намного опаснее высокообразованные пользователи NGS, ориентирующиеся на клинические приложения технологий секвенирования, и биоинформатики, занимающиеся обработкой массивов генетической информации. Проблема в том, что при несомненной актуальности таких разработок количество их потенциальных исполнителей и, соответственно, соискателей конкурсных грантов, может «зашкаливать». Поэтому одной из обязанностей Группы технологий геномного секвенирования может стать их передача в Фонд «Сколково», который специализируется на финансировании разработок подобного рода:



Социальная сеть на основе интерпретации результатов NGS-генотипирования



Неонатальная NGS-генодиагностика



Облака и Big Data WGS



Ранняя генодиагностика онкозаболеваний



ООО «НИИ атеросклероза»

Выявление предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям секвенированием митохондриальной ДНК



InSilico Medicine, Inc.

Персонализация лечения онкозаболеваний

Если не отсекаемый создаваемый такими проектами информационный шум, то технологии секвенирования ДНК в нём просто утонут.