

Целью 4 этапа выполнения ПНИ являлось определение комбинации наиболее информативных биомаркеров, ассоциированных с разными стадиями трансформации клеток предстательной железы.

Согласно Плану-графику выполнения обязательств в задачи этапа входило:

а) Определение и валидация независимым методом геномных биомаркеров, выявленных в ходе проведения масштабного полногеномного параллельного секвенирования кодирующих фрагментов ДНК (экзомов), выделенных из образцов биоптатов пациентов с верифицированным диагнозом рак простаты.

б) Определение протеомных биомаркеров ранних и поздних этапов патогенеза рака простаты и/или стадий гиперплазии и злокачественного перерождения.

в) Определение комбинации статистически значимых генов, дифференциально транскрибирующихся в образцах опухолей против группы контроля. Выявление пула РНК, различающихся в группах пациентов с верифицированным диагнозом рак простаты и контроля.

г) Валидация биомаркеров aberrантного метилирования ДНК независимым методом, достоверно отличающихся в группах сравнения.

д) Определение статистически значимой комбинации протеогеномных и эпигеномных биомаркеров рака простаты на основании проведенных исследований.

е) Разработка набора реагентов МРП4 на основе выявленных биомаркеров.

ж) Разработка лабораторного регламента изготовления аналитической тест-системы, основанной на определении совокупности биомаркеров рака простаты.

з) Разработка Программы и методик исследовательских испытаний экспериментальных образцов аналитической тест-системы.

и) Проведение дополнительных патентных исследований в соответствии с ГОСТ 15.011-96.

к) Материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа 4.

л) Проведение работ по биоинформационному поиску статистически значимых протеогеномных биомаркеров в группах сравнения и создание клинико-генетического регистра пациентов с диагнозом рак простаты.

м) Проведение работ по валидации полученных комбинаций протеогеномных биомаркеров рака простаты.

н) Разработка брошюры для врачей-клиницистов с описанием панели, переводами отзывов FDA на аналоги и т.д.

о) Проведение серии образовательных семинаров для врачей и медицинских представителей.

Научно-исследовательские работы на данном этапе выполнялись в строгом соответствии с Техническим заданием:

В результате выполнения работы 4.1 были определены и валидированы независимым методом геномные биомаркеры, выявленные в ходе проведения масштабного полногеномного параллельного секвенирования кодирующих фрагментов ДНК (экзомов), выделенных из образцов биоптатов пациентов с верифицированным диагнозом рак простаты. Было выявлено 1823 нон реф основания в 770 генах анализируемых образцов, при этом частота их присутствия в генах не отличается в раковых и не раковых образцах.

Проведенные исследования протеомных биомаркеров в рамках пункта 4.2 не показали различий между 2-мя из 3-х стадий гиперплазии, а именно между стадией аденомы и нормальной тканью, что позволило объединить пациентов с аденомой и пациентов без рака и гиперплазии в контрольную группу. Иерархическая кластеризация так же не показала группировки образцов с суммой Глиссона 6 и 8 в разные участки на дендрограмме, т.е. на уровне протеома удается увидеть различия только между состоянием с опухолевым ростом и без опухолевого роста. Поэтому нами был сформирован перечень из 93 генов, белковые продукты которых отличают не рак от рака как крайние стадии реализации гиперплазии и злокачественного перерождения.

В результате проведенных исследований в рамках пункта 4.3 был сформирован пул из 1391 РНК, отличающихся в группах пациентов с верифицированным диагнозом рака простаты и контроль. Так же была сформирована итоговая комбинация статистически значимых 7 генов, дифференциально транскрибирующихся в образцах опухолей против группы контроля - TDRD1, DLX1, ACSM1, AMACR, PCA3, KCNG3, NEK5. Именно экспрессия данных генов будет исследована в моче при проведении исследовательских испытаний макета аналитической тест-системы.

В ходе реализации работы 4.4 была проведена валидация независимым методом данных метилирования по наиболее информативным кандидатным CpG сайтам, охарактеризованным ранее с использованием технологии ДНК чипов Infinium HumanMethylation450 BeadChips: *LRRIC17* (cg02724472), *LRRIC18* (cg10927449), *KCNJ3* (cg01231108), *ZIC5* (cg09333221), *PON3* (cg07121856), *PON3* (cg23230584). Обоснованность выбора панели для валидации была подтверждена ранее проверкой статуса метилирования этих же сайтов в независимо предоставленной выборке международного проекта Атлас Ракового Генома (TCGA). Применение технологии бисульфитного секвенирования ДНК для валидации этих сайтов показала хорошую

сходимость результатов, полученную с использованием обоих методов. При этом наибольшие коэффициенты корреляции были получены для сайтов cg10927449 и cg01231108, локализованных в генах *LRRCL8* и *KCNJ3*, соответственно. Указанные сайты следует рассматривать в качестве первоочередных кандидатов для дальнейшей разработки, так как их потенциальная диагностическая ценность обусловлена как высокими и достоверными показателями метилирования, дискриминирующими патологические и нормальные образцы, так и хорошей воспроизводимостью измерений метилирования, полученных на разных технологических платформах. Была проведена валидация биомаркеров aberrантного метилирования ДНК независимым методом, достоверно отличающихся в группах сравнения. Часть маркеров прошла валидацию, часть маркеров не прошла.

В рамках выполнения работ пункта 4.5 ПГ была сформирована статистически достоверная комбинация протеогеномных биомаркеров, состоящая из 35 генов, уровень экспрессии которых не противоречит уровню метилирования их промоторов или количеству белка, и одновременно достоверно чаще мутирующих в раке по сравнению с группой контроля.

В рамках реализации пункта 4.8 была разработана программа и методики исследовательских испытаний Аналитической тест-системы для диагностики опухолей предстательной железы. по форме ТЗ «МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ по оформлению отчетной документации к мероприятиям и проектам, реализуемым в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

В ходе выполнения работ пункта 4.12 ПГ на данных TCGA нами была проведена первичная проверка статистической достоверности комбинации из 35 протеогеномных маркеров, которая не подтвердила маркерность данной комбинации. Однако экспериментальная валидация ранее обнаруженных на 3 этапе ПНИ комбинаций эпигеномных и транскриптомных биомаркеров окончилась успешно. Поэтому итоговый протокол валидации был сформирован для подтвердивших статистическую значимость комбинаций эпигеномных и транскриптомных маркеров.

Была проведена лабораторная разработка набора реагентов МРП4 на основе скомпонованных наборов биомаркеров. так же была проведена разработка программы и методик исследовательских испытаний экспериментальных образцов аналитической тест-системы.

Был разработан лабораторный регламент изготовления аналитической тест-системы, основанной на определении совокупности биомаркеров рака простаты.

Так же были проведены дополнительные патентные исследования в соответствии с ГОСТ 15.011-96.

За внебюджетные средства было проведено материально-техническое обеспечение экспериментальных работ этапа 4.

Так же были проведены работы по биоинформационному поиску статистически значимых протеогеномных биомаркеров в группах сравнения и создан клинико-генетического регистр пациентов с диагнозом рак простаты. Также в лаборатории постгеномных исследований в биологии и молекулярной генетики человека ФНКЦ ФХМ ФМБА России был создан клинико-генетический регистр пациентов с раком простаты (компьютерная база клинико-генетических и молекулярно-биологических данных – более 50000 записей) на основе банка охарактеризованного биоматериала (более 400 образцов).

Был разработан протокол валидации и проведены работы по валидации полученных комбинаций протеогеномных биомаркеров рака простаты. Была разработана брошюра для врачей-клиницистов с описанием панели, переводами отзывов FDA на аналоги и т.д. Так же на базе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России и кафедре урологии МГМСУ им. Евдокимова была проведена серия образовательных семинаров для врачей и медицинских представителей.