

ФЕДЕРАЛЬНАЯ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА РАЗВИТИЯ СИНХРОТРОННЫХ И НЕЙТРОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ИНФРАСТРУКТУРЫ НА ПЕРИОД ДО 2030 ГОДА И ДАЛЬНЕЙШУЮ ПЕРСПЕКТИВУ

Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации от 12.10.2021 г. № 075-15-2021-1355

РЕЗЮМЕ ОТЧЕТА О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (Заключительный, 4 этап)

Очень часто на сложные биологические вопросы нельзя ответить, изучая их с помощью одного лишь инструмента, каким бы мощным он ни был. Биологические явления происходят в пространстве и времени, в различных масштабах, в различных условиях. Широкий спектр этих явлений требует гибридных подходов, использующих множество взаимодополняющих инструментов, каждый из которых охватывает различные аспекты проходящих процессов в различных пространственно-временных диапазонах. В идеале для получения полной картины изучаемого явления мы стремимся объединить как можно больше этих инструментов в отлаженный рабочий процесс. Рентгеновские методы, реализованные на источниках синхротронного излучения и используемые в данной научно-исследовательской работе, составляют фундаментальную основу этих гибридных подходов, приобретая все большее значение для вирусологических исследований.

Синхротронные методы в виротерапии и диагностике опухолей

Неинвазивный мониторинг опухоли и метастазов в процессе лечения является актуальной задачей онкологии для оценки эффективности терапии. Онколитический вирус, направленный на поиск в организме и разрушение высокочувствительных к нему клеток опухоли и метастазов, представляет собой эффективный инструмент онкотерапии. Если такой вирус экспрессирует дополнительный нетоксичный репортерный трансген, например симпортер натрия/йодида, он может использоваться для диагностики и детектировать доставку вируса в опухоли и метастазы, а также динамику терапии с использованием неинвазивных методов рентгеноскопии, в частности, такой высокоточной, как синхротронная.

С целью оптимизации экспрессии трансгена симпортера натрия/йодида сконструированы три новых рекомбинантных штамма вируса осповакцины VV-P11mNIS-NS1, VV-P11mNIS-Apo и VV-P11mNIS-dGF. В отличие от ранее исследованных рекомбинантов VV-mNIS-NS1, VV-mNIS-Apo, VV-mNIS-dGF, в которых mNIS экспрессируется под контролем ранне-позднего промотора P7,5, в новых рекомбинантах трансген mNIS экспрессируется под контролем сильного позднего промотора вируса осповакцины P11. Сравнительный анализ, проведенный методом ПЦР-РВ, показал, что в раковых клетках человека через 24 часа после инфекции рекомбинантными вирусами уровень экспрессии mNIS под контролем ранне/позднего промотора P7,5 в 2,2 раза превышает аналогичный показатель для позднего промотора P11.

При цитометрическом анализе клеток U343MG, проведенном также через 24 часа, зарегистрирована эффективная транслокация mNIS на поверхностной мембране клеток при их инфицировании всеми рекомбинантными вирусами. При этом количество NIS⁺ клеток

меньше всего в популяциях клеток, обработанных рекомбинантами VV-mNIS-NS1 и VV-P11mNIS-NS1. Такой результат может быть обусловлен апоптоз-индуцирующим действием белка NS1 парвовируса. При активации апоптоза в клетках происходит экстернализация фосфотидилсерина на поверхность мембраны, что может мешать как транслокации NIS, так и его эффективному взаимодействию со специфическими антителами. Кроме того, через 24 ч инкубации с рекомбинантами VV-P11mNIS-NS1, VV-P11mNIS-Apo и VV-P11mNIS-dGF культура U343MG характеризуется большей представленностью NIS⁺ клеток, чем с соответствующими штаммами с встройкой mNIS под ранне-поздним промотором P7,5.

Такое противоречие в результатах ПЦР-РВ и цитометрии связано с тем, что под контролем ранне-позднего промотора P7,5 происходит более интенсивная продукция белка mNIS и, как следствие, его агрегация, препятствующая эффективной экстернализации белка на мембране клетки.

Согласно полученным данным рекомбинанты, экспрессирующие mNIS под контролем ранне-позднего промотора, обладают большей цитотоксической активностью в отношении клеток культур глиом человека, чем рекомбинанты, экспрессирующие mNIS под контролем позднего промотора P11. Самую высокую цитотоксическую активность демонстрируют рекомбинанты, несущие трансген онкотоксического белка NS1 парвовируса, а самой низкой – рекомбинанты, не несущие трансгенов онкотоксических белков (VV-mNIS-dGF и VV-P11mNIS-dGF).

Важно отметить, что клетки нормального мозга NB1.22 продемонстрировали устойчивость к действию исследуемых рекомбинантных вирусов осповакцины ($CD50 > 400$ БОЕ/клетка), что свидетельствует об их высокой онкоселективности и безопасности для окружающих опухоль тканей мозга в процессе виротерапии.

Таким образом, с точки зрения виротерапии глиом наиболее перспективным оказался рекомбинант VV-mNIS-NS1, а с точки зрения диагностики опухоли с использованием нерадиоактивного йода, как мы предполагаем, является рекомбинант VV-P11mNIS-Apo, который характеризуется наибольшей представленностью NIS⁺ клеток (63,3 %, рисунок 4) при инфекции. В настоящее время мы исследуем сравнительную эффективность аккумуляции йода при инфекции раковых клеток всеми рекомбинантными вариантами (VV-mNIS-NS1/ VV-P11mNIS-NS1, VV-mNIS-dGF/VV-P11mNIS-dGF, VV-mNIS-Apo/VV-P11mNIS-Apo) методом рентгенофлуоресцентного элементного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ), чтобы оценить корреляцию количество NIS⁺ клеток/концентрация йода в клетке.

Структурные исследования новых вирусов

За последние несколько лет при помощи технологии метагеномного секвенирования обнаружено большое количество новых вирусов, которые могут представлять потенциальную угрозу для человека и требуют детального изучения. Однако на сегодня имеются очень ограниченные данные о структуре белков этих новых вирусов. Во многих случаях могут помочь методы вычислительного моделирования пространственных структур, например, нейросети AlphaFold2/AlphaFold3, но для получения надежных результатов необходимо иметь гомологичную структуру с уровнем идентичности более 30%, полученную экспериментально, что невозможно, когда речь идет о недавно открытых новых вирусах.

В 2024 году была разработана биомедицинская технология по получению *de novo* рекомбинантных нуклеопротеинов новых ортонайровирусов неизвестной структуры для исследования их структуры на источниках синхротронного излучения и получения иммунологических препаратов. Настоящая биомедицинская технология, позволяет получить высокоочищенные (более 95% чистоты) рекомбинантные нуклеопротеины новых вирусов: *Orthonairovirus yezoense*, *Orthonairovirus beijiense* и *Orthonairovirus songlingense* в растворимой форме, в высокой концентрации (более 10 мг/мл), без аффинных меток и белков слияния, пригодные для последующей кристаллизации, рентгеноструктурного анализа и других биомедицинских исследований. Для рекомбинантных нуклеопротеинов *Orthonairovirus beijiense* и *Orthonairovirus songlingense*, полученных указанным способом, были проведены эксперименты методом МУРР на источнике синхротронного излучения в Шанхае (станция

BL19U2). Были получены начальные условия кристаллизации нуклеопротеина *Orthonairovirus songlingense*. Для поиска условий кристаллизации каждого белка использовалось 576 различных кристаллизационных растворов. С учетом варьирования соотношения белка к осадителю был выполнен перебор 1152 кристаллизационных условий. Кристаллы нуклеопротеина *Orthonairovirus songlingense* были исследованы на источнике синхротронного излучения в Шанхае (станция BL17B). В результате для нуклеопротеина *Orthonairovirus songlingense* было подтверждено образование кристаллов белковой природы в двух кристаллизационных условиях. Начаты работы по подбору условий кристаллизации домена I нуклеопротеина *Orthonairovirus yezoense*, оптимизация условий кристаллизации нуклеопротеинов *Orthonairovirus beijiense* и *Orthonairovirus songlingense* продолжается.

Кроме того, в настоящем исследовании мы впервые структурно аннотировали предполагаемые: NS3 геликазу, NS3 протеазу, NS5 метилтрансферазу и РНК-зависимую РНК-полимеразу нового клещевого вируса Хасеки, которые имеют чрезвычайно низкие коэффициенты идентичности первичной структуры по сравнению с со структурами белков из PDB. Кроме того, мы предложили структуру трансмембранных белков в полипротеине вируса Хасеки и модели биомолекулярных комплексов вируса Хасеки. Высокое структурное сходство неструктурных белков вируса Хасеки с неструктурными белками ортофлавивирусов позволяет выдвинуть гипотезу о возможном общем происхождении этих вирусов и эволюционном или таксономическом единстве. Наши результаты дают представление о геномной структуре и эволюции клещевого вируса Хасеки, который в ближайшие годы может стать серьезной проблемой для общественного здравоохранения, поскольку клещи расширяют ареал своего распространения. Будущие исследования будут направлены на подтверждение третичных структур неструктурных белков вируса Хасеки с помощью получения рекомбинантных белков вируса Хасеки и синхротронной рентгеновской кристаллографии, чтобы получить фундаментальные знания о структуре генома вируса Хасеки для разработки новых РОС-тестов и биологических препаратов.

Получены модели вторичной структуры 5' и 3' UTR РНК недавно открытого флавиподобного вируса с сегментированным геномом (*Kindia tick virus*). Регуляторные элементы, выявленные в ходе анализа структур 5' и 3' UTR вирусной РНК, указывают на эволюционную связь между *Kindia tick virus* и классическими представителями рода *Orthoflavivirus*. В целях получения информации о структуре 5' и 3' UTR методом МУРР и РСА были собраны синтетические ДНК копии «нативных» и «химерных» 5' и 3' UTR РНК *Kindia tick virus*, для части из них получены РНК-транскрипты, также получен штамм-продуцент белка оболочки фага MS2, который должен выступить модельным белком для сокристаллизации с химерными 5' и 3' UTR РНК. Дальнейшее изучение каждого отдельного компонента основных элементов 5' и 3' UTR вирусных РНК будет способствовать пониманию путей реализации генетической информации ортофлавиподобных вирусов. Результаты этого исследования могут быть полезны в будущих исследованиях, направленных на изучение эпидемиологии, структурной организации, репликации и патогенеза этих загадочных многокомпонентных ортофлавиподобных вирусов.

Структурные исследования вирусов, представляющих социальное значение

На декабрь 2024 года база данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) содержит ~ 1,7 миллионов полногеномных вирусных последовательностей, а база данных белковых структур PDB (<https://www.rcsb.org>) содержит ~ 16 тысяч структур вирусных белков. Разрыв между количеством известных первичных структур вирусных белков и количеством известных их пространственных структур огромен. Однако, для создания эффективных вакцин и терапевтических противовирусных препаратов необходимо знать тонкое устройство вириона и специфику взаимодействия вирусных белков с различными клеточными структурами, чему и была посвящена значимая часть настоящего исследования.

Исследована структура инактивированного формальдегидом вируса клещевого энцефалита штамма Софьин-Чумаков (иВКЭ) из препарата вакцины ТВЕ-, что представляет

собой первую структурную характеристику вакцины, используемой в клинической практике. Метод МУРР был использован как дополнительный физический метод для оценки степени гетерогенности образца. Показано, что частицы иВКЭ имеют узкое распределение со средним радиусом 25 нм и шириной распределения 1,5 нм. Структура иВКЭ, полученная методом криоэлектронной микроскопии, была реконструирована по карте электронной плотности со средним разрешением 3,0 Å, проведено сравнение полученной структуры с уже известными структурами других ортофлавивирусов. Детальное картирование эпитопов инактивированной структуры вириона и сравнительная оценка спектров антител, индуцированных вакциной и болезнью, в будущем должны определять рациональный дизайн антигена для улучшенных вакцин следующего поколения и служить золотым стандартом при разработке вакцин.

Разработана стратегия синтеза низкомолекулярного ингибитора основной протеазы коронавируса SARS-CoV-2, субстанция получена в количестве необходимом для эксперимента по сокристаллизации с белком основной протеазы SARS-CoV-2. Ингибитор охарактеризован физико-химическими методами. Получены и проанализированы структуры основной протеазы коронавируса SARS-CoV-2 с ингибиторами PA244 и PA247. Кристаллы принадлежат к моноклинной сингонии. В независимой части находится одна субъединица.

Экспериментально изучено взаимодействие рекомбинантного тримера эктодомена S-белка коронавируса SARS-CoV-2 с монослоями двух нейтральных фосфолипидов, которые относятся к основным компонентам клеточных мембран животных клеток – дипальмитойлфосфатидилхолин и дипальмитойлфосфатидилэтанолламин. Показано, что взаимодействие фосфолипидов с S-белком коронавируса SARS-CoV-2 не приводит к дестабилизации монослоя. Согласно измерениям с помощью метода изотерм сжатия, в обоих случаях после введения раствора S-белка коронавируса SARS-CoV-2 под монослой наблюдалось изменение в релаксационном поведении монослоя, причем для монослоя дипальмитойлфосфатидилэтанолламина эти изменения были более заметны. Метод поверхностной дифракции с использованием синхротронного излучения показал, что S-белок коронавируса SARS-CoV-2 не разрушает структуру монослоя дипальмитойлфосфатидилхолина.

Кроме того, в данном исследовании был получен очищенный рекомбинантный гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8) в тримеризованной форме, который обладал высокой иммуногенностью и протективными свойствами. Выполнен поиск условий его кристаллизации. Проведен тест дифракции кристаллов тримера гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8) на источнике синхротронного излучения в Шанхае (станция BL17B). Полученный рекомбинантный белок будет полезен как для использования в серологической диагностике, так и в качестве компонента вакцины для эффективной борьбы с вирусом гриппа А (H5N8).

Также получен и охарактеризован оптимизированный стабилизированный Env тример ВИЧ-1 gp140.SOSIP.664.opt на основе актуального циркулирующего генетического варианта рекомбинантной формы CRF63_02A6. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения его структурных особенностей, иммуногенности и возможности использования в качестве вакцинного антигена.

Подобраны условия кристаллизации пикорнаина 3С риновируса А28, в результате получены кристаллы в форме пластин размерами до 10 мкм.

Мы успешно экспрессировали и очистили ортопоксвирусный белок F13 в виде слитого белка GST (GST-F13) в клетках *E.coli* BL21 (DE3) путем его совместной экспрессии с шаперонами GroEL/ES и TF. Нацеливание белка на инклюзионные тельца оказалось эффективной стратегией, поскольку это позволило увеличить выход белка и после повторного сворачивания получить функциональный белок. Очищенный белок GST-F13 продемонстрировал ожидаемую молекулярную массу ~69 кДа и фосфолипазную активность, что было подтверждено гидролизом хромогенного субстрата pNPPC. Таким образом, это исследование не только подчеркивает важность оптимизации систем экспрессии токсичных белков, но и закладывает основу для дальнейших структурных исследований с целью разработки эффективных средств лечения.

Помимо всего вышеизложенного был получен огромный задел для будущих структурных исследований вирусов с использованием синхротронных источников в части разработки методик выделения и очистки Fab-фрагментов моноклональных антител и рекомбинантных вирусных белков (мишеней): Fab-фрагментов рекомбинантных моноклональных человеческих антител к рецептор-связывающему домену (RBD) S-белка коронавируса SARS-CoV-2, моноклональных антител семейства верблюдовых, специфичных к эпитопам коронавируса SARS-CoV-2, одноцепочечных антител, нацеленных на RBD коронавируса SARS-CoV-2, моноклонального антитела 10H10 распознающего эпитоп на поверхности E белка ортофлавириусов, одноцепочечного моноклонального антитела 900 против вируса западного Нила, поверхностного белка слияния A21 вируса Оспа Аляски, тримеризованного рекомбинантного гликопротеина вируса Марбург и тримеризованного рекомбинантного гликопротеина GPC вируса Ласса.

Поиск и изучение свойств новых потенциальных противовирусных препаратов на основе структурных данных

Известной тенденцией в медицинской химии является использование природных соединений, таких как монотерпены и монотерпеноиды, в качестве стартовых молекул при разработке новых потенциальных лекарственных препаратов. Благодаря присущему природным веществам свойству комплементарности к многим биологическим мишеням в организме, наличию значительного количества sp³-атомов углерода и асимметрических центров, природные соединения являются уникальной базой для разработки новых противовирусных биопрепаратов. Анализ структуры позволяет выявить ключевые взаимодействия между исследуемым низкомолекулярным соединением и вирусным белком, что приводит к более детальному пониманию механизмов действия противовирусного агента. Это, в свою очередь, открывает новые возможности для рациональной модификации исследуемого соединения и создания более эффективных и специфичных ингибиторов на основе химического остова исследуемого ранее низкомолекулярного соединения.

В ходе выполнения работ были обнаружены одиннадцать низкомолекулярных органических соединений, обладающих противовирусной активностью в отношении ортопоксвирусов, SARS-CoV-2, вируса гриппа А и соединения с широкой противовирусной активностью. Выполнены работы по поиску условий их кристаллизации в результате которых получены монокристаллы для всех соединений. Для монокристаллов восьми из одиннадцати исследуемых веществ методом рентгеноструктурного анализа была установлена кристаллическая структура. Исследования были проведены, как с использованием лабораторного дифрактометра, так и синхротронного излучения. Для соединения C₂₄H₂₆BrClN₂O₅, обладающего противовирусной активностью в отношении коронавируса SARS-CoV-2, была установлена структура сольватоморфной модификации. Структура соединения C₁₀H₁₄N₄S₁, обладающего широкой противовирусной активностью, депонирована в Кембриджский банк структурных данных под номером 2372012.

Кроме того, при помощи моделирования было обнаружено 21 новое соединение, обладающее потенциальной противовирусной активностью в отношении ортопоксвирусов. Результаты расчетов находятся в согласии с биологическими тестами. Анализ данных, полученных в результате молекулярного моделирования, позволяет сделать предварительные выводы, что соединения, содержащие оксадиазолоновый фрагмент, могут рассматривать в качестве потенциальных ингибиторов мембранного вирусного белка p37. Предполагаемый механизм противовирусного действия данных соединений заключается в ингибировании фосфолипазной активности высококонсервативного вирусного белка p37. Результаты, полученные в настоящем исследовании, могут быть использованы для разработки и синтеза принципиально новых противовирусных агентов активных в отношении ортопоксвирусов.

Разработка и усовершенствование синхротронных методов исследования вирусных биомолекул

В ходе анализа дифракционных изображений от образцов инактивированного вируса клещевого энцефалита, были выявлены новые особенности данных, которые не проявлялись в предыдущих экспериментах: наличие пикселей детектора с нестабильным соотношением количества регистрируемых фотонов и уровня выходного сигнала, необходимость коррекции данных о положении панелей детектора в ходе эксперимента, а также наличие сигнала паразитного рассеяния на дифракционных изображениях, средняя интенсивность которого сравнима со средней интенсивностью дифракционного рассеяния. Для коррекции таких особенностей были разработаны новые методы обработки данных, которые позволили уменьшить негативное влияние таких особенностей сохранив максимум информации о структуре исследуемых образцов на дифракционных изображениях.

Продемонстрирована принципиальная возможность мониторинга процесса образования микрокристаллов растворимых белков в кристаллизационных условиях по данным МУРР. В настоящей работе получены микрокристаллы размера, укладывающегося в этот диапазон 5–200 мкм, что позволяет легко проводить визуальную оценку. В случае GDVN-инжектора используются кристаллы меньшего размера, <20 мкм, однако условия кристаллизации могут быть легко оптимизированы для получения кристаллов такого размера. Таким образом, использование МУРР позволяет оптимизировать определение условий получения суспензий микрокристаллов растворимых белков для экспериментов по серийной кристаллографии, а также расход белков для экспериментов. Кроме того, рентгеновские капилляры, используемые в экспериментах, являются хорошим контейнером для транспортировки микрокристаллических суспензий на источники синхротронного излучения.

Разработана метрологическая синхротронная методика для эксперимента по малоугловому рентгеновскому рассеянию от инактивированных\атенуированных вирусных частиц в растворе. Проведены подготовительные работы для выполнения исследований с использованием синхротронно-нейтронного комплекса НИЦ «Курчатовский институт».

Результаты проекта «Использование синхротронного излучения для вирусологических исследований» получены на современной методической базе мирового уровня, в том числе с использованием источника синхротронного излучения в Шанхае, Китай. Полученные синхротронными методами новые знания, например, о патогенезе инфекционных заболеваний, структуре вирионов, мишенях для лечебных препаратов и наиболее значимых антигенных детерминантах вирусных белков, обеспечат прорыв в прикладных исследованиях и значительно сократят срок разработки лекарственных препаратов, сократив тем самым социально-экономические потери, которое несет государство от ежегодных вспышек инфекционных заболеваний. Ввод в эксплуатацию Сибирского кольцевого источника фотонов «СКИФ» вблизи крупнейшего вирусологического центра «Вектор» сделает подобные исследования более доступными, решив многие проблемы, связанные с транспортировкой вирусных биомолекул.

По результатам научно-исследовательской работы в 2024 году опубликовано 13 научных статей, подано 4 заявки на патентование изобретений, депонировано 4 рекомбинантных вируса в государственную коллекцию, разработана 1 биомедицинская технология и 1 синхротронная методика. Обучено более 100 специалистов. Результаты работы были неоднократно представлены молодыми учеными на научных конференциях различного уровня.

Все мероприятия, заявленные в плане-графике работ на 2024 год, были выполнены в полном объеме.