

ФЕДЕРАЛЬНАЯ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОГРАММА РАЗВИТИЯ СИНХРОТРОННЫХ И НЕЙТРОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ИНФРАСТРУКТУРЫ НА 2019-2027 ГОДЫ

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

Тема проекта: Использование синхротронного излучения для вирусологических исследований.

Цели исследовательской программы:

Проведение синхротронных исследований для изучения структур вирусных белков, молекулярных механизмов взаимодействия потенциальных противовирусных препаратов с вирусными белками, механизмов воздействия вирусов на организм.

Задачи этапа I исследовательской программы:

1. Подготовка к синхротронным исследованиям механизмов воздействия вирусов на организм на примере воздействия безопасных онколитических вирусов на мышей с метастазирующими опухолями.
2. Исследование вирусных белков методами синхротронного излучения.
3. Выбор и подготовка вирусных белков и потенциальных противовирусных препаратов к синхротронным исследованиям методом рентгеновской кристаллографии.

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 12.10.2021 г. № 075-15-2021-1355 на ЭТАПЕ № 1 в период с 12.10.2021 по 31.12.2021 г. для решения поставленных задач выполнялись следующие работы, запланированные в «Плане-графике исполнения обязательств» по Соглашению:

Мероприятие 1.1.1. Разработка сингенной мышшиной модели метастазирующей опухоли для последующей оценки виротерапии с использованием синхротронной рентгеноскопии.

Мероприятие 1.1.2. Исследование и выбор универсальных онколитических вирусов для виротерапии модельных опухолей в условиях иммунокомпетентного организма.

Мероприятие 1.1.3. Исследование и выбор эффективного репортёрного трансгена для усиления визуализации опухоли и метастазов мышей на синхротроне.

Мероприятие 1.1.4. Исследование и выбор культур опухолевых клеток из АТСС или других мировых коллекций для закупки с целью создания трансляционных моделей рака человека.

Мероприятие 1.1.5. Анализ условий кристаллизации опубликованных структур основной протеазы SARS-CoV-2 с ингибиторами.

Мероприятие 1.1.6. Исследование вирусных белков или их комплексов в растворе рентгеновскими методами.

Мероприятие 1.1.7. Анализ белков вирусов – перспективных мишеней для разработки лекарственных средств.

Мероприятие 1.1.8. Нарботка и хроматографическая очистка рекомбинантного аналога основной протеазы SARS-CoV-2 (Mpro), а также других вирусных белков.

Мероприятие 1.1.9. Исследование малых молекул, являющихся потенциальными противовирусными препаратами, на основе литературных данных и компьютерного анализа.

Мероприятие 1.1.10. Исследование белков вирусов из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, гены которых секвенированы в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, с целью выбора объектов для проведения структурных исследований.

Мероприятие 1.1.11. Создание генетических конструкций на основе генов белка VP1 вируса *Kindia tick virus* и отобранных вирусных белков для продукции в клетках млекопитающих.

Мероприятие 1.1.12. Исследование и выбор оптимального буфера для кристаллизации полученных на первом этапе вирусных белков.

Мероприятие 1.1.13. Проведение подготовительных работ для выполнения исследований с использованием синхротронно-нейтронного комплекса на этапе 1.

Мероприятие 1.2.1. Создание лаборатории синхротронных исследований в вирусологии (очередь 1).

Мероприятие 1.3.1. Разработка программы дополнительного профессионального образования «Синхротронные исследования лабораторных животных».

Все мероприятия, заявленные в Плане-графике на 2021 год, были выполнены в полном объеме. При этом были получены следующие результаты:

1. Было определено, что меланома B16-F10 может использоваться в качестве сингенной модели метастазирующей опухоли при внутрисердечном, внутримышечном и внутрибрюшинном способах её имплантации мышам линии C57B1/6. Данная модель послужит для работ по синхротронным исследованиям животных на следующих этапах проекта.
2. В качестве онколитического вируса для виротерапии опухолей в условиях иммунокомпетентного организма нами был выбран вирус осповакцины (VACV), российский штамм Л-ИВП. Вирус будет использоваться для синхротронных исследований процесса терапии модельной опухоли у мышей.
3. В качестве репортёрного трансгена для усиления визуализации опухоли и метастазов мышей на синхротроне нами был выбран ген симпортера йодида натрия (NIS), который представляет собой трансмембранный гликопротеин и обеспечивает поглощение и концентрацию йодида локально в месте своей экспрессии. мы сможем использовать NIS для оценки перспектив использования синхротронного излучения для визуализации опухолевых узлов и метастазов, биораспределения онколитического вируса в организме и для мониторинга эффективности онколитической терапии.
4. При анализе культур опухолевых клеток из ATCC и других мировых коллекций для закупки с целью создания трансляционных моделей рака человека, наиболее перспективными для проводимых нами работ являются (кроме имеющейся у нас меланомы B16-F10) опухоль молочной железы мыши 4T1 и карцинома кишечника CT26. Клетки будут использованы в экспериментах с синхротронным излучением для оценки противоопухолевой и антиметастатической активности онколитических вариантов вируса осповакцины.
5. Был проведен литературный анализ условий кристаллизации основной протеазы SARS-CoV-2 с различными ингибиторами. Результаты помогут быстрее подобрать условия кристаллизации в экспериментах по получению пространственной структуры комплексов белков с потенциальными противовирусными препаратами методом белковой кристаллографии.

6. Были получены результаты измерения малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора комплекса RBD-домена белка-шипа S вируса SARS-CoV-2 с синтетическим антителом 6B3 и его индивидуальных компонентов, а также от белка E вируса клещевого энцефалита. Для белка E было показано наличие вытянутых тетрамеров. Для RBD-домена было показано взаимодействие с антителом 6B3 и наличие крупных олигомеров, это послужило дополнительной характеристикой RBD-домена, технология получения которого в данный момент находится на стадии внедрения. Технология описана в документе «Инструкция по получению рецептор-связывающего домена спайкового белка S, субстанция (RBD субстанция)» от 27 декабря 2021 года. Основным преимуществом технологии является возможность получения высокоочищенной субстанции с заданными антигенными свойствами.

7. Соисполнитель НИЦ "Курчатовский институт" выбрал белки вирусов - перспективные мишени для разработки лекарственных средств. В список вошли белок E вируса клещевого энцефалита, белок M2 вируса гриппа А. Белки будут использоваться для исследования методами синхротронного излучения структур комплексов белков с потенциальными противовирусными препаратами.

8. Была проведена наработка и хроматографическая очистка рекомбинантного аналога основной протеазы SARS-CoV-2 (Mpro), а также RBD-домена белка-шипа S SARS-CoV-2. Белки будут использоваться для исследования методами синхротронного излучения структур комплексов белков с потенциальными противовирусными препаратами.

9. Было проведено исследование малых молекул, являющихся потенциальными противовирусными препаратами, на основе литературных данных и компьютерного анализа. В результате для дальнейшей работы было выбрано 86 индивидуальных соединений и смесь производных глицирризиновой кислоты. Противовирусные свойства смеси были частично охарактеризованы на примере псевдовирусов ВИЧ-1 и вирусов SARS-CoV-2 и опубликованы <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/1/295>.

10. Были выбраны объекты для структурных исследований методом синхротронного излучения: тример белка S вируса SARS-CoV-2, белок NP вируса Пуумала, протеаза 3С риновируса. На следующих этапах проекта будут созданы продуценты этих рекомбинантных белков, и после наработки и очистки белки будут использоваться для исследования структур белков методами синхротронного излучения.

11. Были созданы генетические конструкции на основе генов белка VP1 вируса Kindia tick virus и нуклеопротеина N вируса Yezo virus. Конструкции будут использоваться для исследования структур белков методами синхротронного излучения.

12. Было проведено исследование и выбор оптимального буфера для кристаллизации методом дифференциальной сканирующей флуориметрии. Оптимальным для протеазы 3CL вируса SARS-CoV-2 оказался какодилатный буфер с pH 6.5 без добавления солей, для RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 - бисиноновый буфер с pH 7.5 без добавления солей с сахарозой в концентрации до 250-500 мМ.

Кристаллы комплексов белков с ингибиторами будут использоваться для исследования структур белков методами синхротронного излучения.

13. Были проведены подготовительные работы для выполнения исследований с использованием синхротронно-нейтронного комплекса на этапе I, а конкретно - обеспечена работоспособность станции малоуглового рассеяния "БиоМУР".

14. Были проведены работы по созданию лаборатории синхротронных исследований в вирусологии, очередь I.

15. Была подготовлена и утверждена программа повышения квалификации "Синхротронные исследования лабораторных животных".

Работы, запланированные на этап I, были выполнены в полном объеме. Полученные результаты позволяют приступить к выполнению этапа II.