

ПРОГРАММА КОНСОРЦИУМА АКАДЕМИЧЕСКОГО СОДРУЖЕСТВА ПО ИЗУЧЕНИЮ COVID-19 ПРОЕКТ

Наблюдаемая в настоящее время пандемия коронавируса SARS-Cov-2, ассоциированного с COVID-19, ясно показала, что проведение интенсивных биомедицинских исследований имеет решающее значение для получения достоверной, научно обоснованной информации, требующейся для принятия решений органами государственного управления, организаторами медицинской науки, региональными властями. В свете текущей пандемии высветилась необходимость создания новых подходов к лечению респираторных инфекций, в частности вызванных SARS-CoV-2, а также налаживания системы мониторинга коронавирусных инфекций и ассоциированных с ними возбудителей ОРЗ и пневмоний. Особый интерес представляют вопросы коллективного ассоциированного взаимодействия коронавируса SARS-Cov-2 с человеком и представителями его биотопов и формирования различных исходов данного взаимодействия – от форм бессимптомного носительства до летального исхода с полиорганной недостаточностью. Исходя из этого, мы ставим основной **ЦЕЛЬЮ ПРОЕКТА** создание предсказательной модели развития коронавирусной инфекции на основании регистрации и обработки мультимодальных данных с выходом на алгоритмы терапевтического воздействия на пациента.

Принимая во внимание эти идеи, предлагаемый проект предусматривает разработку четырех взаимосвязанных блоков задач, которые могут стать основой комплексной программы преодоления коронавирусной инфекции, параллельно решая локальную задачу формирования биобанка образцов, необходимых для реализации экспериментальных работ.

ЗАДАЧИ ПРОЕКТА:

- А.** Поиск пептидомных и протеомных биомаркеров развития COVID с идентификацией цитопатических пептидов и возможностью их нейтрализации.
- Б.** Изучение факторов агрегации эритроцитов при формировании COVID для подбора патогенетической терапии.
- В.** Изучение генетического разнообразия и динамики изменчивости популяции SARS-CoV-2 в ассоциации с микрофлорой природных биотопов человека.
- Г.** Эпитопное картирование антигенов SARS CoV-2 для поиска антиэпитопных пептидов.

А. Поиск пептидомных и протеомных биомаркеров развития COVID с идентификацией цитопатических пептидов и возможностью их нейтрализации

К настоящему моменту накапливаются данные о тех физиологических, клеточных и молекулярных факторах, которые определяют и маркируют различия в течении заболевания, главную трудность в управлении COVID-19. Общеизвестно, что не менее трети случаев инфицирования этим вирусом проходят бессимптомно, а у значительной части пациентов заболевание протекает легко или развивает обратимое состояние средней тяжести, даже при наличии пневмонии. Но немалое количество пациентов разного возраста демонстрируют критическое состояние по типу острого респираторного дистресс-синдрома и требуют интенсивных реанимационных мероприятий. И тяжелое течение наблюдается среди людей разных возрастов и с разными наборами сопутствующих заболеваний (или их отсутствием). Усилия исследователей направлены на выявление факторов прогноза тяжелого течения заболевания, чтобы заранее принять меры и повысить выживаемость пациентов. Уже в течение полугода исследований новой коронавирусной инфекции было предложено несколько десятков параметров, потенциально определяющих прогноз заболевания. Из белковых биомаркеров следует упомянуть компоненты «цитокинового шторма» – белки, участвующие в иммуносупрессии, факторы избыточного свертывания крови, рецепторы и ко-рецепторы проникновения вируса в клетки человека. Имеющаяся информация будет подвергаться мета-анализу с целью формирования тестовой панели белковых биомаркеров, определяемых в плазме крови и способных обеспечить прогноз течения COVID-19. Решение поставленных задач предполагает:

- Создание набора пептидных стандартов для анализа выбранных биомаркеров путем таргетной хроматомасс-спектрометрии.
- Проведение протеомного анализа биологических образцов плазмы крови участников исследования путем таргетной хроматомасс-спектрометрии методом мониторинга выбранных реакций.
- Интеграция клинических, клиничко-лабораторных параметров и параметров протеомного анализа биомаркеров для создания прототипа мультиплексного прогностического теста, оценивающего тяжесть течения COVID-19.

Результатом будет определение набора белков плазмы крови человека, который в сочетании с другими лабораторными и клиническими параметрами позволит отличать образцы от пациентов с легким/средним и тяжелым (потребность в ИВЛ) течением COVID-19 на начальных стадиях развития инфекции.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ОБЪЕМ РАБОТ

Для белков – потенциальных биомаркеров – будут специальным образом выбраны их прототипы – протеотипические пептиды, получающиеся после расщепления белков пробы трипсином (по 2 на белок). Для выбора будет использовано свободно расширяемое программное обеспечение, например, находящееся в составе пакета Peptide Atlas, а также PeptideManager и др. Будет проведена инспекция выбранных пептидов на предмет отсутствия «проблемных» с точки зрения модификаций аминокислотных остатков (C, M, W), участков природных модификаций и распространенных в популяции участков аминокислотного полиморфизма.

После этого методом твердофазного синтеза будут получены пептидные стандарты, меченные стабильными (нерадиоактивными) изотопами органических атомов (^{13}C , ^{15}N) для того, чтобы они при масс-спектрометрическом анализе по молекулярной массе были отделены от аналогичных пептидов образца. Далее при помощи хромато-масс-спектрометра с детектором типа тройного квадруполь (QTRAP TripleQuad, ABI Sciex, США) будет разработан метод количественного анализа интересующих белков на основе полученных стандартов по принципу мониторинга выбранных реакций. По отношению молекулярной массы и заряда исходного пептидного иона они будут отфильтрованы в масс-спектрометре и фрагментированы, а по интенсивности выбранных фрагментов («переходов», или «реакций») будет осуществляться количественный анализ. Масс-спектрометрические исследования будут реализованы с использованием свободного программного обеспечения Skyline.

Затем будет проведена пробоподготовка образцов плазмы крови для таргетного протеомного анализа. Белки будут солюбилизованы неионными детергентами, например, ProteaseMax (Promega, США). Затем будут проведены восстановление и алкилирование остатков цистеина дитиотреитом и хлорацетамидом, соответственно. К обработанным белкам будет добавлена смесь протеаз (трипсин и Lys-C), после чего будет проводиться гидролиз белков с получением пептидов.

Смесь пептидов будет загружаться в аналитическую систему высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (QTRAP, ABI Sciex, США) вместе с полученной ранее смесью меченных стабильными изотопами стандартов. Разработанный ранее метод количественного анализа будет использован для определения концентрации интересующих биомаркеров в образцах плазмы крови пациентов.

Помимо изучения сывороточных белков, проект предполагает идентификацию циркулирующих в кровотоке больных COVID-19 пептидов вируса SARS-CoV-2 – как растворенных в плазме крови, так и ассоциированных с главными комплексами гистосовместимости I класса мононуклеаров периферической крови. Исследование планируется проводить методами высокопроизводительного масс-спектрометрического анализа.

На основании критериев включения и невключения будут отобраны добровольцы для исследования, имеющие клинически подтвержденный диагноз короновиральной инфекции. В исследование будут включены не менее 20 участников. В исследовании примут участие как пациенты с легкой формой течения COVID-19 (КТ-1, КТ-2; процент поражения легочной ткани менее 30%), так и с тяжелой формой (КТ-3, КТ-4; процент поражения легочной ткани более 50%); как пациенты, только поступившие для лечения, так и после 7–10 дней пребывания в больнице. У выбранных для исследования пациентов будет проведен забор крови из локтевой вены и будет получена плазма крови.

Из собранных образцов плазмы крови пациентов с COVID-19 будут выделены пептиды по ранее отработанным и опубликованным нами протоколам. Как показывают опубликованные данные, практически все растворенные в плазме крови пептиды сорбированы на поверхности высоко представленных белков-переносчиков (альбумин, иммуноглобулины и другие), что защищает эти пептиды от выведения из кровотока. В результате инкубации образцов плазмы крови с хаотропным агентом (гуанидин гидрохлорид) происходит десорбция пептидных молекул, ранее ассоциированных на мажорных белках плазмы крови. С помощью ультрафильтрационных картриджей с пропускной способностью 10 кДа десорбированные пептиды очищают от высокомолекулярных белков. Последующая обращенно-фазовая твердофазная экстракция избавляет от солей, в том числе от гуанидин гидрохлорида, и окончательно подготавливает пептиды для масс-спектрометрического анализа. Оценка общего количества выделенных пептидов будет проведена с помощью разработанного нами протокола и метода окраски пептидов с использованием бицинхониновой кислоты.

Выделенные пептиды плазмы крови пациентов с COVID-19 будут идентифицированы на современном масс-спектрометре Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap в ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Масс-спектрометрические данные будут проанализированы на высокопроизводительных вычислительных системах для идентификации пептидных последовательностей, фрагментов как известных белков человека и вируса SARS-CoV-2, так и возможных новых сплайс вариантов геномной РНК вируса. Так, в статье “The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome” авторы показали наличие в клетках, зараженных SARS-CoV-2, не только канонических субгеномных РНК, начинающиеся с лидирующей последовательности геномной РНК, но и множество неканонических вариантов сплайсинга вирусной геномной РНК¹. Все эти предсказанные варианты будут учтены для получения исчерпывающего представления о пептидах, генерируемых вирусом SARS-CoV-2.

Полученная информация позволит выяснить пул циркулирующих в крови потенциально биоактивных компонент вируса SARS-CoV-2. Данные об идентифицированных

¹Dongwan Kim, Joo-Yeon Lee, Jeong-Sun Yang et al. “The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome” *Cell* 181(4), 914–21. e10 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>

пептидах могут быть использованы в рамках настоящего проекта для поиска ранее неизученных проявлений вируса в части секреции зараженными клетками специфических вирусных пептидов в кровотоки. На основании биоинформатического анализа будут предсказаны потенциальные активности идентифицированных пептидов.

Синтез предсказанного пула пептидов открывает возможность изучения их цитопатического эффекта при воздействии на клеточные линии, чувствительные к SARS-CoV-2 инфекции. При этом предполагается регистрация ответа на уровне изменения транскриптома и пептидома тестируемой линии клеток.

Для культивирования вируса SARS-CoV-2 лучше всего подходит линия почек приматов, отличных от человека, VeroE6, а из клеточных линий человека – CaCo2, линия гетерогенных клеток эпителиальной колоректальной аденокарциномы человека. Конфлюэнтные слои этих клеток будут инфицированы вирусом при MOI (multiplicity of infection) 0,01–0,05 и после инкубирования с вирусом откреплены и лизированы. Для определения пептидов, генерируемых зараженными вирусом клетками на разных стадиях развития заражения, инкубация будет проводиться через разные промежутки времени: от 24 часов до 5 суток. После лизиса клеточный дебрис будет осажден центрифугированием, а для анализа пептидов будет взята надосадочная жидкость. Клеточный дебрис будет исследован транскриптомными методами анализа.

Для выделения общего пептидома клеточных лизатов, по аналогии с плазмой крови, будут использованы ранее отработанные нами протоколы с использованием гуанидин гидрохлорида, ультрафильтрационных картриджей с пропускной способностью 10 кДа и обращенно-фазовой твердофазной хроматографии. Выделенные пептиды клеточных лизатов будут идентифицированы на современном масс-спектрометре Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap в ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Масс-спектрометрические данные будут проанализированы на высокопроизводительных вычислительных системах для идентификации пептидных последовательностей, фрагментов как известных белков человека и вируса SARS-CoV-2, так и возможных новых сплайс-вариантов геномной РНК вируса. Полученная информация позволит более полно описать пул потенциально биоактивных пептидов SARS-CoV-2, продуцируемых зараженными вирусом клетками.

Для выявленных биоактивных пептидов вируса SARS-CoV-2, обладающих негативным влиянием на организм человека, биоинформатическими методами будут подобраны потенциально блокирующие их пептиды. Данные пептиды, блокирующие активность вируса, можно в дальнейшем использовать для частичного устранения негативного влияния вируса на организм пациентов.

Б. Изучение факторов агрегации эритроцитов при формировании COVID для подбора патогенетической терапии

До недавнего времени считалось, что больше всего от коронавирусной инфекции страдают легкие. Однако косвенные данные позволяют предположить, что главной мишенью COVID-19 на самом деле становятся эритроциты. Неоднократно зафиксированное образование монетных столбиков в капиллярах существенным образом снижает газообмен в органах и тканях. Эритроциты при поражении теряют способность выполнять свою главную роль – переносить кислород. Поэтому внутренние органы в ходе болезни страдают от кислородной недостаточности. В такой ситуации человек даже на аппарате ИВЛ (искусственной вентиляции легких) испытывает кислородное голодание и, в конце концов, умирает.

Образование монетных столбиков эритроцитов существенным образом изменяет капиллярный кровоток, поскольку они ухудшают текучесть крови, ее реологические свойства, что в значительной степени снижает газообмен эритроцитами. Вероятнее всего, причина кроется в изменении свойств поверхности эритроцитов, а именно, в нарушении электрических, физико-химических и механических свойств их плазматической мембраны. Изменение поверхностного потенциала эритроцитов, увеличение жесткости (уменьшение эластичности) плазматической мембраны эритроцитов – два важнейших фактора, способствующих агрегации эритроцитов. Нарушение электрических и структурных свойств плазматической мембраны эритроцитов существенным образом влияет на ее проницаемость для ионов и жизненно важных молекул, каковыми являются АТФ, витамины, субстраты ферментов и др.

Регистрировать описанные выше изменения поверхности эритроцитов можно при помощи набора физико-химических и биофизических методов, указанных ниже.

- Осмотическая резистентность эритроцитов существенным образом зависит от жесткости мембраны, ее проницаемости и электрических свойств поверхности. Измерение спектрофотометрическим методом гипотонического гемолиза эритроцитов по уменьшению светорассеяния суспензии клеток или по выходу из них гемоглобина дает интегральную характеристику эритроцитам больных и позволяет выявить их отличие от показателя для клеток здорового организма.
- Удобным показателем является нарушение проницаемости эритроцитов, которое можно регистрировать по выходу из клеток АТФ. Регистрация осуществляется методом хемилюминесценции с использованием фермента люциферазы и его субстрата – люциферина.
- Весьма информативным методом, позволяющим выявлять изменение физико-химических свойств поверхности эритроцитов, является метод с исполь-

зованием спиновых или флуоресцентных зондов. Применение зондов различной химической природы дает возможность регистрировать изменение электрических свойств поверхности, жесткость мембраны, ее проницаемость.

- При изменении свойств поверхности эритроцитов часто меняется их форма, что можно выявить путем количественного анализа эритроцитарной формулы (процентное соотношение различных форм эритроцитов: нормоциты, эхиноциты, микроциты, стоматоциты, сфероциты и др.). Этот метод позволяет также визуализировать агрегаты эритроцитов в мазках крови.

Надо отметить, что стэкинг эритроцитов может происходить в результате изменения поверхностного потенциала и физико-химических свойств их мембран. Одним из факторов, влияющих на поверхностный потенциал эритроцитов, могут быть короткие пептиды, формирующиеся при расщеплении белков коронавируса SARS-2. Для проверки данной гипотезы планируется провести исследование влияния пептидов, образующихся при трипсинолизе белков вируса SARS-2, на электрофоретическую подвижность эритроцитов. Для этого будет проводиться измерение скорости прохождения отдельных эритроцитов здоровых и больных коронавирусом SARS-2 через микроканал под действием постоянного электрического поля. Микроканал длиной 13,8 мм, глубиной и шириной 36 и 20 мкм соответственно будет сделан в микрофлюидном чипе, созданном в Центре технологий и микрофабрикации ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Также будет установлена зависимость скорости прохождения эритроцитов здоровых пациентов через микроканал от концентрации пептидов вируса коронавируса SARS-2. Кроме того, методами пэтч-клампа будет проведено исследование влияния пептидов на трансмембранный потенциал эритроцитов здоровых испытуемых, значение которого коррелирует с поверхностным потенциалом; и будет выявлено влияние пептидов вируса на ионную проницаемость мембраны. Для изучения влияния вируса на упругие характеристики мембран эритроцитов будет измеряться модуль Юнга мембран эритроцитов здоровых и заболевших коронавирусом методом атомно-силовой микроскопии. Также будет проверено влияние пептидов вируса на проницаемость и механические параметры мембраны в модельных системах – бислойные липидные мембраны и липосомы, для чего планируется использовать стандартные методы электрофизиологии.

Предложенный набор физико-химических и биофизических методов обеспечивает полное и всестороннее исследование свойств поверхности эритроцитов, выявление их изменений, способствующих образованию «монетных столбиков», которые характерны для капилляров больных, пораженных коронавирусной инфекцией. В случае успешной реализации проекта будет выявлен молекулярный механизм, лежащий в основе стэкинга эритроцитов, что может являться одной из причин эмболии, наблюдаю-

щейся у больных коронавирусом SARS-2. Это позволит существенно ускорить поиск потенциальных лекарственных средств, ингибирующих слипание эритроцитов и понижающих вероятность образования тромбов у людей, заразившихся коронавирусом.

В. Изучение генетического разнообразия и динамики изменчивости популяции SARS-CoV-2 в ассоциации с микрофлорой природных биотопов человека

Третий блок проекта предусматривает изучение генетического разнообразия и природной изменчивости возбудителя коронавирусной инфекции в исследуемых регионах.

Важно выявить и идентифицировать вирусный агент, с которым мы столкнулись на территории РФ. Для этого необходимо проанализировать до 300 различных геномов коронавируса, выделенных от пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19. Кроме того, необходимо оценить в динамике, как применяемое лечение пациентов приводит к изменению генетического статуса самого вируса, насколько это может привести к мутационному всплеску или дрейфу в геноме SARS-Cov-2. Определить, как назначаемые схемы лечения влияют на цикл репликации вируса и его генетическое постоянство. Однозначно, необходимо постоянное наблюдение за циркулирующими в популяции людей вариантами возбудителя коронавирусной инфекции для максимально быстрой коррекции имеющихся тестов и выявления вирионов с повышенными вирулентными свойствами. Последние потребуют валидирующих тестов *in vitro* с использованием клеточных культур.

Для понимания причины тяжелого протекания заболевания видится необходимым выявление сопутствующих вирусных, бактериальных и грибковых инфекций. Важно понять, как та или иная сочетанная инфекция может привести к осложнению или, напротив, к ослаблению протекания данного коронавирусного заболевания. Решение этих задач видится через метагеномный анализ респираторного биотопа отдельных групп пациентов.

За три года исследования в работу планируется включить не менее 500 образцов биологического материала от пациентов с COVID-19 и другими ОРВИ, отобранных на географически удаленных территориях в эпидемические сезоны 2020–2021 гг. Поставленные задачи будут решены методами геномики, метагеномики и биоинформатики.

- Выделение тотальной РНК/ДНК из образцов биологического материала от пациентов с COVID-19.
- Геномное секвенирование возбудителя COVID-19, метагеномный анализ вирусной и бактериальной флоры отобранных образцов
- Анализ генетической вариабельности вируса SARS-CoV-2, в том числе, гетерогенности популяции вируса внутри одного пациента, анализ ассоциаций с течением инфекции.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ ОБЪЕМ РАБОТ

Из собранных образцов назофарингеальных мазков, мокроты (при наличии) и бронхолегочного лаважа (при наличии), кала (при наличии) участников исследования будут выделены ДНК и РНК с помощью набора AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen, Германия).

Количественная оценка выделенных нуклеиновых кислот будет проведена с помощью спектрофлуориметрического анализа с использованием наборов Qubit RNA Assay Kit и Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific, США) и прибора Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Геномное секвенирование РНК вируса SARS-CoV-2 будет выполнено для SARS-CoV-2 позитивных образцов (не менее 150) с помощью панели праймеров Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel (Thermo Fisher Scientific, США) или Qiaseq SARS-CoV-2 primer panel (Qiagen, Германия) для получения полной последовательности вирусного генома. Метагеномный анализ будет производиться ампликонным секвенированием участка региона V3-V4 16S субъединицы рРНК. Метагеномный анализ вирусных инфекционных агентов будет проводиться shotgun секвенированием РНК-библиотек. Для определения наличия прочих вирусных инфекционных агентов будет использована реал-тайм ПЦР с использованием специфических праймеров² или NGS панель со специфическими зондами³.

Полученный массив данных будет использован для биоинформатического анализа с целью реконструкции и описания бактериального (метагеном) и вирусного (метавиром) разнообразия исследуемых биотопов и поиска ассоциаций с формами течения заболевания и возможностью прогнозирования исхода на основании имеющихся метаданных об участниках исследования. На основании данных о вариативности последовательности РНК вируса SARS-CoV-2 будут сделаны выводы о генетическом разнообразии вируса, циркулирующего в регионах РФ – местах проживания участников исследования.

²I-Siyabi T, Binkhami K, Wilco M. et al. A cost-effective real-time PCR for the detection of adenovirus from viral swabs. *Virology*, 2013, 10, 184. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-184>

³Metsky HC, Siddle KJ, Gladden-Young A et al. Capturing sequence diversity in metagenomes with comprehensive and scalable probe design. *Nat Biotechnol.* 2019;37(2):160-168. doi:10.1038/s41587-018-0006-x

Г. Эпитопное картирование антигенов SARS CoV-2 для поиска антиэпитопных пептидов

Четвертое мероприятие предполагает построение детальной протеомной карты при регулируемой экспрессии основных структурных белков SARS-Cov-2 и определение партнеров по взаимодействию между белками вируса и эукариотическими белками, а также выявление характерных паттернов протеолиза белков вируса в культуральной жидкости и в плазме крови человека, больного COVID-19.

Мировое сообщество пока не уверено в существовании эффективной долгосрочной реакции организма человека на SARS-Cov-2. Проведенное в Шанхае исследование по анализу плазмы крови 175 пациентов, которые перенесли COVID-19 и выздоровели, показало, что у некоторых пациентов был выявлен стойкий ответ на антитела, а у других такой ответ не наблюдался⁴. При этом пока неизвестно, как уровень антител влияет на иммунитет к коронавирусу. В связи с этим, чтобы понять перспективы развития эпидемической ситуации, угрозы повторных заражений уже переболевших людей, в частности, и новых волн повышения уровня заболеваемости в популяции, в целом, важно провести ряд иммунологических исследований, направленных на выявление стабильного титра антител у пациентов с COVID, для понимания механизма развития заболевания, а также схемы предотвращения его развития. Для этого важно определить иммуногенность различных белков вируса SARS-Cov-2, причем данный анализ необходимо выполнить на разных фазах заболевания, поскольку на разных циклах развития данный вирус может активировать абсолютно разные механизмы для инфицирования и персистенции в организме хозяина. Запланированные исследования включают в себя решение следующих задач:

- Получить клеточные линии, продуцирующие по отдельности все канонические белки вируса SARS-CoV-2
- Выявить иммуногенность разных белков вируса и зависимость появления антител классов IgM и IgG на протяжении инфекционного процесса и после выздоровления.
- Определить на панели белков капсида, короны и внутренних белков вируса профили реактивности пациентов с различными формами течения и параллельно провести анализ вируснейтрализующей активности.
- Построить детальную протеомную карту при регулируемой экспрессии основных структурных белков SARS-Cov-2 и определить партнеров по взаимодействию между белками вируса и эукариотическими белками, а также выявить

⁴Fan Wu, Aojie Wang, Mei Liu et al. "Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications" doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>

характерные паттерны протеолиза белков вируса в культуральной жидкости и в плазме крови человека, больного COVID-19.

- Исследовать эффекты взаимодействия пептидов – продуктов протеолиза белков SARS-Cov-2 и иммунокомпетентных клеток человека. Определить активацию макрофагов, нейтрофилов и Т-клеток с использованием их синтетических аналогов (пептидов, производных внутриклеточного протеолиза белков вируса SARS-Cov2).
- Провести картирование пептидных детерминант SARS-Cov2, связанных с циркулирующими рецепторами главного комплекса гистосовместимости.

Решение последней задачи открывает путь к разработке терапевтического препарата. Белки, продуцируемые клетками, в том числе вирусные, деградируя по протеосомальному пути, презентуются в виде определенных антигенов на поверхности клеток на главном комплексе гистосовместимости I класса. Данный путь презентации может быть использован для активации Т-клеточного иммунитета.

Из лизатов клеточных культур иммунохимически будут выделены пептиды, ассоциированные с главным комплексом гистосовместимости I класса. Для этого клетки будут лизированы, а из лизата будут выделять главные комплексы гистосовместимости I класса по ранее отработанным протоколам с помощью антител к комплексу, иммобилизованным на поверхности магнитных частиц. После связывания комплексов с антителами пептиды, ассоциированные с комплексом, будут элюированы и очищены на обращенно-фазовом сорбенте. Оценка общего количества выделенных пептидов будет проведена с помощью разработанного нами протокола и метода окраски пептидов с использованием бицинхониновой кислоты.

В ряде публикаций, посвященных как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2, было показано, что тяжесть течения заболевания напрямую ассоциирована с наличием в геноме пациента определенных аллелей главного комплекса гистосовместимости I класса. То есть скорость и успешность выработки Т-клеточного иммунного ответа на данные вирусы напрямую зависит от генетики пациента. Биоинформатически были предсказаны генотипы, потенциально легко или тяжело переносящие заражение данными вирусами. Кроме того, были предсказаны эпитопы вируса, потенциально лучше всего презентруемые главным комплексом гистосовместимости I класса. Полученная нами информация о пептидах вируса, реально презентруемых клетками, позволит выяснить пул потенциально иммуногенных компонент вируса SARS-CoV-2 и уточнить перечень генотипов, по-разному переносящих заражение вирусом SRAS-CoV-2.

Заявленные мероприятия потребуют **формирования биобанка образцов** с одновременным сбором и организацией хранения метаданных участников проекта.

Забор биологического материала планируется от пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19, протекающим с разной степенью тяжести – от легкого и бессимптомного до осложненного вирусной пневмонией. Процесс сбора анамнестических данных пациента и регистрацию образцов планируется реализовать в электронном формате с использованием блока МИС, разработанной под задачи текущего проекта. После подписания пациентом добровольного информированного согласия на участие в настоящем исследовании врач-исследователь производит сбор данных об особенностях течения заболевания и используемых при его лечении препаратах, а также собранных биологических образцах в электронной системе ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Сбор биоматериала предусмотрен как минимум в трех временных точках: на момент установления диагноза, через 2–3 дня от этого времени и через 10 дней (фактически на момент выздоровления).

У участников исследования будут собираться следующие биологические образцы:

- ✓ сыворотка крови,
- ✓ плазма крови,
- ✓ цельная кровь,
- ✓ кал,
- ✓ моча,
- ✓ назофарингеальный мазок,
- ✓ мокрота (при наличии),
- ✓ бронхолегочный лаваж (при наличии).

Каждый образец от пациента будет сопровождаться значительным объемом медицинской информации в виде оценок и измерений, а также совокупностью клинических, клинико-лабораторных характеристик и параметров, накопленных в ходе реализации проекта. Под реализацию сбора и хранение этих данных предполагается настроить базу данных с пользовательским интерфейсом. Приложение к собранным данным методов машинного обучения (метод опорных векторов, нейронные сети и др.) позволит в перспективе формировать оптимальный набор признаков, позволяющих оценивать как можно раньше перспективу тяжести заболевания. На основе мультипараметрического теста будет разработан специальный прогностический коэффициент (скоринг), который может быть использован в прототипе тест-системы, содержащей методы анализа и программное обеспечение для прогноза тяжести COVID-19.

Руководитель проекта
Генеральный директор
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России
академик РАН, профессор, д.б.н.

В.М. Говорун