

НАУЧНАЯ СЕССИЯ ОБЩЕГО СОБРАНИЯ ЧЛЕНОВ РАН
“РОЛЬ НАУКИ В ПРЕОДОЛЕНИИ ПАНДЕМИЙ
И ПОСТКРИЗИСНОМ РАЗВИТИИ ОБЩЕСТВА”

ДОКЛАД РУКОВОДИТЕЛЯ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
В.И. СКВОРЦОВОЙ

Ключевые слова: Федеральное медико-биологическое агентство, биомедицина, вирус SARS-CoV-2, тест-системы, врождённый иммунитет, противовирусный препарат “Мир-19”, препарат лейтрагин, вакцина “Конвасэл”.

DOI: 10.31857/S0869587322070209

К основным полномочиям Федерального медико-биологического агентства (ФМБА), его 35 научных центров относится осуществление научной, научно-технической и инновационной деятельности в сфере биомедицины, прежде всего в сфере воздействия особо опасных факторов физической, химической и биологической природы на организм человека.

В апреле 2020 г. ФМБА развернуло многоцентровые исследования на 57 территориях Российской Федерации, цель которых — изучение механизмов влияния вируса SARS-CoV-2 в зависимости от особенностей его структуры на организм человека с учётом индивидуальных особенностей. В исследованиях приняли участие все ведущие научные центры агентства, их координатором стал Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью (генеральный директор С.М. Юдин).

С целью точного определения РНК вируса, в том числе у скрытых носителей и в инкубационном периоде заболевания, в начале 2020 г. был разработан и 6 марта 2020 г. зарегистрирован высокочувствительный набор “АмплиТест”, определяющий до 1000 копий на 1 мл за время от 2.5 часа до 30 минут, а также выявляющий конкретные линии SARS-CoV-2. В июле набор был зарегистрирован в отношении линий от альфа до дельта. Удалось добиться покрытия генома более чем на 97% в 90% проанализированных образцов. Приоритетной задачей нашего исследования явилось изучение функциональной значимости основных мутаций вируса и кластеров мутаций и их влияния на характеристики вируса: патогенность, трансмиссивность, иммуногенность и возможность нейтрализации антителами человека.

С этой целью в Центре стратегического планирования была разработана платформа, созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие все основные белки вируса, как структурные, так и неструктурные, в них вставлялись интересую-

щие нас мутации. Затем происходила трансфекция генно-инженерными конструктами клеток-мишеней, после чего проводился анализ последовательности внутриклеточных событий с изучением метиломы и транскриптомы клеток методом высокопроизводительного секвенирования. Строились сети активируемых генов, что и позволяло оценивать функциональную активность и роль мутаций.

Для изучения трансмиссивности вируса были созданы псевдовиральные частицы на основе лентивируса, типированного разными вариантами S-белка с интересующими нас мутациями. Включение в псевдовиральные частицы зелёного флуоресцентного белка позволяло оценивать скорость и степень проникновения псевдовиральных частиц в клетки с генно-инженерными человеческими рецептами hACE2, ангиотензинпревращающего фермента второго типа. Соединение псевдовиральных частиц с сывороткой переболевших или вакцинированных людей позволяло оценивать нейтрализующую способность антител и эффект ускользания из-под действия антител. Экспериментально валидировалась экспрессия белков. Затем белки нарабатывались и очищались, оценивалась их иммуногенность и мутации на экспериментальных животных. Выявлялся паттерн цитокиновой реакции.

Таким образом, за прошедший период были охарактеризованы все важнейшие мутации вируса SARS-CoV-2 основных линий до дельты включительно. Установлено, что патогенные детерминанты вируса не связаны с S-белком, а локализованы в последовательности генома вируса, кодирующие другие, прежде всего неструктурные вспомогательные белки. Примером является устойчивая мутация дельта-линии вируса SARS-CoV-2 во вспомогательном белке Orf7a. Мутантный белок приобретает новые свойства, и если исходный вариант в уханьско-европейском штамме отвечает за экспрессию генов фолдинга белка и реакцию клетки на изменение фолдинга, то мутантный бе-

лок вызывает выраженную экспрессию генов врождённого иммунитета интерфероновых сигнальных путей фактора системы комплимента, ядерного фактора карра В и целой линейки провоспалительных цитокинов. Таким образом фактически стимулируется выраженная воспалительная реакция.

Наряду с этим мутантный белок ингибирует блокатор выхода вирионов из клетки, в результате чего вирусная нагрузка в клетке резко возрастает: в дебюте заболевания нагрузка в 1000 раз больше, чем при исходном уханьско-европейском штамме. Конечно, это приводит к существенным изменениям клинической картины, к сокращению латентного периода инфекции, к ускорению клинической динамики и к увеличению частоты тяжёлых случаев заболевания. Данные штамм-специфичные различия были подтверждены методом секвенирования транскриптомов единичных иммунокомпетентных клеток периферической крови тяжелобольных с COVID, вызванным дельта и уханьским вариантами.

Биоинформатический анализ позволил кластеризовать иммунокомпетентные клетки периферической крови и визуализировать различия между уханьско-европейским и дельта штаммами. Причём эти различия носят не только количественный, но и качественный характер. Так, Центр стратегического планирования впервые выявил уникальный клон моноцитов периферической крови у тяжелобольных штаммом дельта, особенностью которого — гиперэкспрессия эндоплазматических toll-рецепторов 3-го, 7-го, 8-го типов, являющихся сенсорами РНК, а также провоспалительных факторов, факторов дегрануляции нейтрофилов и тромбинового сигналинга, что сопровождается соответствующими изменениями микроциркуляции.

Важно отметить, что провоспалительные реакции, экспрессия провоспалительных факторов наблюдаются у больных со среднетяжёлым течением COVID на второй неделе заболевания и сохраняются долго, выявляются на 42-й день после выздоровления. Фактически создаётся воспалительная основа для возникновения многочисленных и многообразных постковидных осложнений. Необходимо отметить, что на 42-й день после вакцинации “Спутником V” при наличии высокой экспрессии генов, связанных с клеточным и гуморальным ответом, мы не видим экспрессии провоспалительных факторов. Таким образом, вакцинация защищает не только от тяжёлых форм заболевания, но и от постковидных осложнений, что имеет особое значение.

Для изучения механизмов длительного сохранения провоспалительной реакции у переболевших COVID было проведено динамическое исследование метиломы переболевших, которое

выявило выраженное эпигенетическое влияние вируса SARS-CoV-2 на человека, устойчивое не менее семи месяцев наблюдения деметилирование функционально значимых генов в 60 регионах генома, связанных преимущественно с врождённым иммунитетом, с Т-клеточным ответом и метаболизмом РНК. Аналогичные эпигенетические изменения с гипометилированием генома характерны для преждевременного старения при раннем возникновении неинфекционных хронических заболеваний. Таким образом, COVID провоцирует и ускоряет процессы, аналогичные перестройкам при старении. На первых этапах эти изменения потенциально обратимы и могут быть скорректированы, а значит, требуются новые подходы к восстановительному лечению людей, перенёсших COVID-19.

В настоящее время центры ФМБА характеризуют кластеры уже известных мутаций, которые одновременно присутствуют в варианте омикрон, а также несколько новых мутаций. Разработаны тест-системы для детекции омикрон-варианта, в том числе все регламентные технические документы для начала выпуска серий для клинической валидации.

Особый интерес представляло изучение наследуемых полиморфных вариантов toll-рецепторов врождённого иммунитета (особенно эндоплазматических, которые распознают паттерны РНК) с учётом доказанной его роли в развёртывании патогенетических реакций на COVID. Был создан специальный классификатор, который позволил кластеризовать полиморфизмы в зависимости от их ассоциации с тяжёлым течением COVID или лёгким скрытым. Оказалось, что ассоциированные с тяжёлым течением заболевания полиморфизмы встречаются у таких больных в 86% и 72% случаев для toll-рецепторов 3-го и 7-го типов соответственно, в то время как в здоровой популяции они представлены минимально (4.6–7.5%). При этом географическое распределение частоты представленности данных полиморфизмов в популяциях субъектов Российской Федерации во многом соответствует картине распределения смертности на 100 тыс. населения в этих регионах. Таким образом, очевидно, что наследственная структура рецепторов врождённого иммунитета влияет на риск развития тяжёлого COVID.

Полногеномный ассоциативный анализ (GWAS), проведённый у перенёсших COVID, выявил более 2000 однонуклеотидных полиморфизмов, высокодостоверно ассоциированных с тяжёлым течением заболевания. Из них только шесть находились в кодирующих областях генов, остальные — в интронах, в нетранслируемых участках генов и в тех последовательностях, функции которых до сих пор неизвестны. Биоинформационный анализ этого круга выявленных полиморфизмов поз-

волил отнести их к разным генным сетям. Оказалось, что они фактически полностью воспроизводят полный жизненный цикл вируса, а также реализацию иммунного ответа человеческим организмом. Была также выстроена шкала полигенного риска тяжести течения COVID, которая с точностью более 99% позволяла прогнозировать тяжёлую форму. Проведённые исследования, безусловно, создают основу для разработки средств защиты от COVID.

Для прогнозирования тяжёлых форм COVID разработан калькулятор, который с учётом паспортных данных, коморбидного состояния, огромного числа других факторов позволяет предсказывать течение болезни. Роль наследственности здесь составляет 20–25%. Но внутри этих 20–25% с высокой точностью (более 99%) можно предсказать, что в случае инфицирования человек будет болеть тяжело.

Позвольте очень коротко остановиться на трёх разработках агентства, касающихся этиотропного и патогенетического лечебных средств, а также вакцины.

Институт иммунологии ФМБА под руководством члена-корреспондента РАН М.Р. Хаитова разработал высокоспецифичный противовирусный препарат “Мир-19”, действие которого основано на механизме РНК-интерференции, то есть таргетном подавлении экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Этот подход является высокоспецифичным, низкотоксичным и биосовместимым. А уровень блокады экспрессии выше белков делает этот подход наиболее эффективным. В состав препарата входят малоинтерферирующие РНК, а также катионный дендримерный пептид, который обеспечивает адресную доставку препарата в верхние и нижние дыхательные пути. Научная группа М.Р. Хаитова спроектировала 15 тыс. последовательностей микро-РНК, из которых для синтеза отобрано 15 на основе сравнительного анализа теоретической эффективности, отсутствия гомологии с геномом человека и сходством с геномом SARS-CoV-2. Эти 15 последовательностей были изучены, из них выбрана одна наиболее эффективная, которая соответствует самому консервативному сайту генома вируса NPS12 или РНК-полимеразы. Важно отметить, что было проанализировано более 800 последовательностей геномов основных значимых линий SARS-CoV-2 – от уханьской до омикрона включительно, выявлена полная гомология “Мир-19” и последовательности мишеней без единой мутации, что делает этот препарат практически универсальным.

Результаты доклинических исследований были опубликованы в ведущем в мире журнале по иммунологии. Эти исследования доказали низкую токсичность и очень высокую противовирус-

ную активность “Мир-19” со снижением вирусной нагрузки в 10 тыс. раз на модели *in vitro*, а также с определённой протективностью на моделях *in vivo*. Первая фаза клинических исследований доказала хорошую переносимость и безопасность препарата. В настоящее время завершена вторая фаза, которая продемонстрировала высокодостоверное преимущество этого средства по сравнению со стандартной терапией. Сейчас препарат проходит процедуру регистрации.

Экспериментальные исследования, проведённые в Научном центре биомедицинских технологий, которым руководит профессор В.Н. Каркищенко, доказали ключевую роль в гиперактивации иммунного ответа и в запуске цитокинового шторма высокомолекулярного гистонного ядерного белка, который находится в деацетилированном состоянии в ядре, но его ацетилирование приводит к выходу в цитоплазму, а затем к внеклеточной секреции. Внеклеточный белок является главным медиатором поздней стадии воспаления и одним из самых мощных провоспалительных цитокинов. Его естественным ингибитором является внутриклеточный сиртуин, или гистоновая деацетилаза.

Учёные Института биомедицинских систем и биотехнологий разработали препарат лейтрагин, агонист дельта-опиоидных рецепторов, который увеличивает экспрессию сиртуина и таким образом приостанавливает развитие последующих воспалительных реакций. Доклинические исследования подтвердили высокую эффективность препарата в снижении и профилактике воспалительного ответа, а также его протективность и безопасность. Клинические исследования показали, что при своевременном применении данного препарата возможна профилактика последующего утяжеления заболевания и летальности, подтверждено достоверное снижение госпитализации тяжёлых больных в 1.5 раза. Препарат зарегистрирован для пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID.

Хотелось бы отметить, что огромную роль в сдерживании эпидемии новой коронавирусной инфекции сыграли вакцины первого поколения, действие которых преимущественно направлено на выработку вирус-нейтрализующих антител против эпитопов S-белка. Вместе с тем накопленные данные об активном мутировании S-белка, в том числе в рецептурном домене, вызвало озабоченность международного экспертного сообщества в плане последующей эффективности и даже безопасности этих вакцин. Был сделан вывод о том, что необходимо искать альтернативные варианты, создавать вакцины, которые вызывают активность разных ветвей иммунитета с потенциальным протективным действием.

Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток ФМБА под руководством В.П. Трухина и С.А. Ракелова разработал инновационную вакцину на основе рекомбинантного нуклеокапсидного белка. N-белок является самым иммуногенным с точки зрения клеточного и гуморального ответов с ранних стадий заболевания. Это высококонсервативный белок, который не только практически идентичен штаммам SARS-CoV-2, но имеет более 92% гомологии с другими бета-коронавирусами. Доклинические исследования подтвердили высокую иммуногенность вакцины “Конвасэл”, а также её протективность, имея в виду профилактику морфологических изменений в лёгочной ткани у экспериментальных животных, отсутствие алергогенности и других выраженных побочных эффектов. Основные механизмы действия “Конвасэл” – выработка специфиче-

ского клеточного иммунного ответа, поляризованного по Th1-траектории, выработка фенотипа центральных клеток памяти, развитие антителозависимой цитотоксичности и антителозависимого внутриклеточного нейтрализующего ответа. 19 июля начаты клинические исследования объединённых первой и второй фазы этой вакцины.

В рамках Года науки и технологий в Санкт-Петербургском институте вакцин и сывороток в сентябре сдан цех рекомбинантных препаратов, который соответствует самым строгим критериям, полностью гарантирует чистоту белка и антигена, качество и безопасность продукта, обеспечивает возможность масштабирования производства конечного продукта, а при необходимости – перепрофилирования на другие рекомбинантные препараты.