

ЗАТВЕРДЖУЮ
Заступник директора Інституту молекулярної
біології та генетики НАН України
проф. д.б.н. Дядевин С.В.



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок
Комбіновані тест-системи для діагностики та аналізу експресії
генів вродженого імунітету при небезпечних вірусних інфекціях

Назва конкурсу: Наука для безпеки людини та суспільства

Реєстраційний номер Проєкту: 2020.01/0091

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.01/0091 «Комбіновані тест-системи для діагностики та аналізу експресії генів вродженого імунітету при небезпечних вірусних інфекціях»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу Наука для безпеки людини та суспільства протокол від «16-17» « вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту:

Початок – 21 жовтня 2020 року

Закінчення – 15 грудня 2021 року.

Загальна вартість Проєкту, грн.: 7 809 400,00

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 3 000 000,00

2-й рік 4 809 400,00

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 9 виконавців, з них:

доктори наук 3;

кандидати наук 4;

інші працівники 2.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(І) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Організація-виконавець: Інститут молекулярної біології і генетики, код за ЄДРПОУ 05417101, КВЕД 72.11; 72.19, відомча підпорядкованість Національна академія наук України.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту: створення комбінованих тест-систем як засобів ефективної діагностики особливо небезпечних вірусних інфекцій (ОНВІ) та коінфекцій, що включають в себе також можливість аналізу експресії генів вродженого імунітету при цих захворюваннях.

1. Визначення нуклеотидної послідовності геномів низки поширених в Україні штамів вірусу SARS-CoV-2;
2. Дизайн, синтез та очистка олігонуклеотидів для створення тест-систем;
3. Збір біологічних рідин здорових та інфекційних хворих та створення колекцій ДНК та РНК;
4. Напрацювання рекомбінантного ферменту Bst ДНК-полімерази для створення мультиплексної експрес тест-системи на основі ізотермічної ПЛР;
5. Створення бібліотеки праймерів та позитивних контролей для тестування особливо небезпечних вірусних інфекцій;
6. Відпрацювання умов для ізотермічної та кПЛР реакцій для створення тестів;
7. Тестування клінічних зразків з відомими діагнозами для встановлення наявності інфекції і рівнів відносної експресії відібраних генів імунної системи людини та системи згортання крові та проведення статистичного аналізу;
8. Проведення аналізів на достатніх клінічних вибірках та отримання статистично значущих результатів для розробки тест-систем;
9. Валідація тест-систем на «невідомих» зразках для встановлення специфічності та чутливості діагностикумів;
10. Створення протоколів проведення аналізу;
11. Написання звіту, статей, оформлення патентів.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Оцінку захворюваності на особливо небезпечні вірусні інфекції (ОНВІ) можна визначити за допомогою методу ПЛР. Більшість ПЛР тестів для виявлення ОНВІ в Україні є іноземного походження. Тому вкрай важливим є розробка вітчизняних засобів ефективної діагностики виявлення вірусу SARS-CoV-2, його варіацій та встановлення рівнів відносної експресії генів імунної системи та системи згортання крові людини.

Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Проведено аналіз нуклеотидної послідовності геномів низки штамів вірусу SARS-CoV-2. Проведено дизайн праймерів для тест-системи, які дозволять визначати особливості та динаміку важких вірусних захворювань. Опрацьовано дані літератури та власних попередніх досліджень комбінованої тест-системи для визначення низки вірусних агентів та експресії низки генів вродженого імунітету та згортання крові. На сьогодні таких багатофункціональних тест-систем в медичній практиці ще не існує.

Методологія дослідження (до 400 знаків)

Застосовано біоінформатичний аналіз отриманих геномів вірусу SARS-CoV2 та інших вірусних патогенів, підбір, синтез та очистка специфічних олігонуклеотидів. Підготовлено послідовності позитивних контролів для тест-систем. Проведено клонування, експресія та напрацювання рекомбінантного ферменту Bst ДНК-полімерази для створення експрес тест-систем на основі ізотермічної ПЛР. Відпрацьовано умови проведення кПЛР аналізу та встановлено рівні відносної експресії десяти генів вродженого імунітету.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

У результаті проведеної роботи проаналізована нуклеотидна послідовність геномів низки поширених штамів вірусу SARS-CoV-2, грипу та інших особливо небезпечних вірусних інфекцій (ОНВІ). Проведено біоінформативний аналіз вивчених геномів вірусів та дизайн праймерів для створення тест-систем на основі кПЛР реакцій та комбінованих тест-систем для визначення

вірусних патогенів та експресії генів вродженого імунітету та згортання крові. Проведено підбір, синтез та очистку специфічних олігонуклеотидів для ПЛР аналізу патогенних вірусів та експресії низки генів імунної системи людини для дослідження, створення та відпрацювання комбінованих тест-систем. Проведено збір біологічних рідин здорових та інфекційних хворих та створено колекцій РНК та кДНК.

Відпрацьовано методики отримання РНК зі зішкрібів для прямої детекції експресії генів для кПЛР методу та з використанням ізотермічної полімерази Bst 3.0. Клоновано, експресовано в клітинах бактерій та напрацьовано рекомбінантний фермент Bst ДНК-полімерази для створення експрес тест-системи на основі ізотермічної ПЛР.

У результаті проведеної роботи проведено відпрацювання умов та складу реакційних сумішей для постановки різних варіантів кПЛР для визначення SARS-CoV-2 у біологічних рідинах на основі одиничних аналізів та комбінованих тест-систем. Відпрацьовано низку варіантів тестів для визначення вірусу SARS-CoV-2 та інших респіраторних вірусів на основі ПЛР та кПЛР для отримання комбінованих тест-систем. Доведено високу ефективність та специфічність запропонованих тестів на вибірках зразків.

Відпрацьовано умови та поставлено метод секвенування нового покоління для повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2 у хворих на COVID-19 в Україні. Створено колекцію РНК зі зішкрібів хворих на COVID-19 для проведення повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2. Вперше в Україні за допомогою повногеномного генотипування виявлено два нові небезпечні варіанти вірусу SARS-CoV-2 - Альфа варіант (B.1.1.7) – у лютому 2021 року та Дельта варіант (B.1.617.2) – у червні 2021 року. Загалом проаналізовано 234 зразки РНК вірусу SARS-CoV-2, виділеного з назофарингеального епітелію хворих на COVID-19 з 20 регіонів України.

Проведено добір зразків та створено колекції РНК зі зразків крові здорових донорів та хворих на COVID-19, створено колекцію РНК зі зішкрібів хворих на COVID-19 для проведення повногеномного генотипування вірусу SARS-CoV-2.

Відпрацьовано умови проведення кПЛР аналізу та встановлено рівні відносної експресії десяти генів вродженого імунітету 59 здорових донорів та 52 хворих на гостру форму COVID-19 для створення комбінованої експресійної тест-системи, зокрема MX1, OAS1, RNASEL, EIF2AK2, IL8, IL6, TNF α , IL10, CD4, F5. Для 8 з них знайдено значущі різниці рівнів відносної експресії між контрольною групою та хворими на COVID-19. Завдяки проведеному статистичному та біоінформатичному аналізу запропоновано експресійні набори біомаркерів з 3-8 генів, які дозволяють діагностування запалення, гіперкоагуляцію та лімфопенію у периферичних клітинах крові пацієнтів з COVID-19 з високими показниками чутливості, специфічності та точності для розробки комбінованої експресійної тест-системи. Найвищі показники чутливості, специфічності та точності виявлено для комбінації трьох експресійних біомаркерів: F5, MX1, CD4 (Ac.0,9; Se.0,92; Sp.0,88), тоді як найвищий показник прогностичної цінності набору біомаркерів (OR) має комбінація з 6-и генів: F5, MX1, RNASEL, CD4, IL10, EIF2AK2 (OR=134,37).

У результаті виконання даного проєкту було розроблено 7 різних прототипів тест систем, зокрема дві комбінованих тест-системи. Для запропонованих ПЛР тестів для визначення вірусу SARS-CoV-2 та експресійної системи розроблено протоколи для проведення аналізів.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами.

Перевагами отриманих тест систем у порівнянні з існуючими аналогами є перш за все їх універсальність для аналізу широкого спектру вірусних інфекцій. Використання 96-ти коміркового планшета дозволяє проведення одночасного аналізу на наявність низки вірусів та експресії генів вродженого імунітету та системи згортання крові не менше ніж в 2-х повторях. За рахунок ампліфікації дослідних генів забезпечується неймовірно висока чутливість діагностиків при незначній кількості доступного біологічного матеріалу. Усі варіанти тестів на детекцію вірусу SARS-CoV-2 є робочими та можуть використовуватись на різні типи приладів – як сучасні кПЛР термоциклери з режимом у реальному часі, так і більш дешеві ампліфікатори для простої ПЛР. Їх невисока собівартість, простота і доступність у використанні робить його вкрай необхідним для пандемічної та епідемічної безпеки держави. Розроблені тест-системи є високоселективними і стійкими відносно різноманітних інтерферуючих речовин, що наявні в біологічних зразках, та

стійкими відносно різноманітних інтерферуючих речовин, що наявні в біологічних зразках, та придатні для роботи в реальних умовах з біологічними рідинами. Використання тест-систем на основі ізотермічної ампліфікації робить можливим проведення процедури діагностики як в лікарнях (навіть сільських), так і в будь-яких публічних установах - школах, офісах, аеропортах і вокзалах. На основі отриманих результатів можна приймати рішення про наступне лікування, що створює передумови для переходу до персоналізованої медицини.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Створення лабораторних зразків тест-систем для визначення патогенних вірусів та аналізу експресії генів уродженого імунітету, оптимізація їх роботи, а також їх апробація на зразках біологічного матеріалу пацієнтів зі встановленням показників діагностичної цінності розроблених тест-систем є першим етапом впровадження розробки. Це дозволить розпочати процес впровадження у виробництво. Для цього буде створено проєкт технологічного регламенту для виготовлення дослідних серій тест-систем в умовах масштабного виробництва. Виготовлення дослідних серій тест-систем дозволить розпочати її впровадження в медичних закладах України та діагностичних лабораторіях. Оскільки у даної розробки не існує комерційних аналогів, розроблені діагностичні системи мають високий потенціал для впровадження не тільки на теренах нашої держави, але і в інших країнах та вносять суттєвий вклад в забезпечення належного рівня здоров'я населення і сталий розвиток держави.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування.

Науковий керівник Проєкту

Директор Інституту молекулярної
біології та генетики НАН України
д.б.н., проф., академік НАН України

М. А. Тукало



(підпис)