

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ

на выполнение проекта

«Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека»

1. Цели проекта

Разработка методологии оценки функциональной активности единичных объектов и потенциальных геропротективных соединений для выявления молекулярных основ возраст-зависимых процессов в организме человека и разработки системы определения биологического возраста.

2. Задачи проекта

2.1. Разработка технологии оценки функциональной активности единичных биомакромолекул с помощью молекулярных детекторов, включающей методические, инструментальные и программные решения, необходимые для наблюдения за свойствами единичных молекул ферментов в условиях их функционирования.

2.2. Выбор, создание и характеристика соединений и композиций, способствующих значимому увеличению продолжительности функциональной активности биологических систем.

2.3. Масштабное профилирование биологических образцов с целью определения молекулярных показателей, имеющих потенциал применения в системах оценки биологического возраста.

2.4. Разработка предсказательной модели для оценки биологического возраста.

3. Результаты, которые должны быть получены при выполнении проекта

1-й этап: Разработка методологии исследований

3.1. Результаты АСМ-визуализации модельного белка в условиях ферментной активности, включающие: сведения об олигомерном состоянии белка; рекомендации по выбору объектов наблюдения на поверхности; референсные значения уровней шума измеряемых сигналов.

3.2. Принципиальная схема нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента.

3.3. Стабильный модельный цитохром как мишень для проверки действия эффекторов.

3.4. Модельный(-ые) объект(-ы) для оценки эффективности геропротективных свойств соединений.

3.5. Набор полноатомных трехмерных структур мишеней.

3.6. Валидированные модели зависимостей «структура - геропротекторная активность».

3.7. Коллекция биоматериала и сопутствующая детальная клиническая информация людей разных возрастных групп (Часть1).

3.8. Протокол роботизированной пробоподготовки образцов для протеомного анализа в формате 96 луночного планшета, протокол для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа, протокол биоинформатической обработки данных ультракоротких методов панорамного протеомного анализа.

3.9. Перечень, состоящий из не менее 50 белков, важных для диагностики социально значимых заболеваний и/или заболеваний, связанных с возрастными изменениями.

3.10. Хроматограммы, подтверждающие чистоту стандартов, результаты измерения концентрации стандартных образцов.

3.11. Протокол анализа концентрации белков в плазме крови методом направленного масс-спектрометрического анализа.

3.12. Перечень белков с указанием концентраций в каждом образце, данные депонированы в PeptideAtlas.

3.13. Перечень метаболитов, важных для диагностики социально значимых заболеваний и/или заболеваний, связанных с возрастными изменениями, доступных к детекции подходами на основе ЯМР, жидкостной хроматографии и газовой хроматографии с последующим масс-спектрометрическим анализом.

3.14. Протокол (методика) оценки общего содержания метаболитов в образце.

3.15. Результаты отбора оптимальных параметров проведения эксперимента, включая протокол анализа данных на присутствие 5-метил-цитозина, 6-метиладенина, 5-гидроксиметилцитозина.

3.16. *In vitro* модель старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

2-й этап: Получение экспериментальных данных

3.17. Результаты АСМ-визуализации выбранного цитохрома Р450, включающие сведения об олигомерном состоянии белка.

3.18. Результаты АСМ-визуализации выбранного цитохрома Р450 в условиях ферментной активности, включающие: сведения о гетерогенности определяемых свойств белка; алгоритм обработки АСМ-данных с целью определения ферментативной активности белка.

3.19. Результаты регистрации сигнала нанопорового детектора, включающие референсные значения уровня шума измеряемого сигнала, сведения о зависимости результатов измерений от типа используемой нанопоры.

3.20. Перечень молекул потенциальных ингибиторов и соответствующих мишеней.

3.21. Данные по проверке влияния предложенных эффекторов на свойства модельного цитохрома, включая результаты отбора наиболее эффективных вариантов.

3.22. Препарат формиадегидрогеназы с повышенной температурной и химической стабильностью с рекомендациями по условиям длительного хранения фермента

3.23. Список новых соединений, потенциально обладающих геропротекторной активностью для экспериментального тестирования на модельных объектах.

3.24. Соединения, конъюгированные с фосфолипидными наночастицами в количестве, необходимом для проведения испытаний для оценки специфической фармакологической активности.

3.25. Перечень белков, идентифицированных в ходе проведения панорамного протеомного исследования образцов крови от здоровых доноров с использованием методов ультракоротких градиентов.

3.26. Перечень белков с указанием концентраций в каждом образце, данные депонированы в PeptideAtlas.

3.27. Перечень из не менее, чем 50 белков, охарактеризованных с точки зрения их участия в метаболических путях и биохимических процессах, ассоциированных со старением.

3.28. Перечень метаболитов в переданных образцах с указанием их содержания в каждом образце, данные депонированы в Mendeley.

3.29. Фрагментом и метилом вкДНК здоровых людей из различных возрастных групп (12 образцов) или оптимальные условия амплификации вкДНК фрагмента и метилома. Метод анализа данных секвенирования вкДНК на присутствие 5-метилцитозина, 6-метиладенина, 5-гидроксиметилцитозина.

3.30. In vitro модель старения первичных фибробластов человека, перечень белковых маркеров старения первичных фибробластов человека, результаты исследования геропротекторных свойств разрабатываемых соединений.

3.31. Перечень молекулярных маркеров старения МСК.

3.32. Предсказательная модель на основе протеомных биомаркеров и консенсусная панель пептидных маркеров для дальнейшей разработки методики оценки биологического возраста.

3.33. Коллекция биоматериала вместе с детальной клинической информацией людей разных возрастных групп (Часть2).

3-й этап: Анализ полученных данных

3.34. Результаты определения функциональной активности цитохрома P450 в условиях воздействия лекарственных соединений, включающие сведения о гетерогенности определяемых свойств белка.

3.35. Результаты определения функциональной активности фермента с помощью нанопорового детектора.

3.36. Результаты молекулярного моделирования стадий каталитического цикла цитохрома P450 – константы скоростей элементарных стадий, конформационные перестройки, интерпретация данных АСМ.

3.37. Веб-ресурс для оценки свойств потенциальных геропротекторов.

3.38. Результаты исследования специфической фармакологической активности полученных геропротективных композиций на модельном объекте.

3.39. Результаты оценки влияния соединений и композиций на молекулярный состав крови человека.

3.40. Перечень белков с указанием концентраций в каждом образце, данные депонированы в PeptideAtlas.

3.41. Карта молекулярных механизмов, обуславливающих старение на разных омиксных уровнях.

3.42. Перечень метаболитов в переданных образцах с указанием их содержания в

каждом образце, данные депонированы в Mendeley.

3.43. Перечень метаболитов, характерно изменяющихся, в каждой возрастной группе.

3.44. Результаты исследования уровня NAD⁺ в крови людей различных возрастных групп.

3.45. Фрагментом и метилом вкДНК здоровых людей из различных возрастных групп (не менее 10 образцов). Биоинформатический конвейер анализа данных фрагментов и метилом вкДНК здоровых людей в целях создания предсказательной модели для оценки биологического возраста на основе анализа характеристик вкДНК.

3.46. Результаты биоинформатического анализа данных протеомного профилирования образцов.

3.47. Сведения о потенциальных геропротекторных свойствах разрабатываемых соединений и/или композиций.

4. Требования к составу работ (исследований), выполняемых по проекту

4.1. Разработка протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным должна включать:

- подбор условий визуализации модельного белка в виде отдельных биомакромолекул;
- реконструкцию ферментной системы модельного белка на поверхности;
- доказательство работоспособности ферментной системы в условиях измерений альтернативными методами исследований;
- разработку способов автоматической обработки данных;
- выбор типа АСМ-данных, используемых для оценки функциональной активности

4.2. Разработка программно-технических решений для системы регистрации ферментной активности с помощью нанопорового детектора должна включать:

- разработку электронных блоков для измерений сигнала,
- разработку конструкции ячейки для аналита,
- разработку методики встраивания белка в нанопору.

4.3. Создание конструкции гибридного цитохрома P450 BM3 с ФДГ, устойчивого к действию компонентов крови для тестирования кандидатных молекул эффекторов должно включать:

- моделирование полноразмерной структуры формитадегидрогеназы из *Pseudomonas* sp.101 длиной 400 аминокислотных остатков на основе полноразмерной холо-формы структуры ФДГ из *Moraxella* sp.C1;
- анализ 7 остатков на С-конце с помощью множественного выравнивания с известными последовательностями ФДГ в Genbank;
- выбор 6-9 наиболее перспективных замен и анализ структуры этих мутантов;
- выбор двух вариантов с оптимальной пространственной структурой;
- проведение направленного мутагенеза и получение генно-инженерных конструкций, кодирующих выбранные белки, анализ кинетических свойств и выбор лучшего мутанта;
- получение генно-инженерных конструкций, кодирующих гибридный цитохром P450; экспрессия и получение препаратов гибридного цитохрома P450;

- анализ протеазной стабильности исходного и полученного препарата гибридных цитохромов P450.

4.4. Выбор модельного объекта для оценки эффективности геропротективных свойств соединений должен включать:

- оценку способности реагировать на фармакодинамические эффекты, фармакокинетический профиль, вид животных, пол, возраст;
- оценку возможности использования соединения в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

4.5. Отбор мишеней для коррекции процессов старения, пригодных для последующего молекулярного моделирования должен включать:

- анализ литературы и имеющихся экспериментальных данных по трехмерным структурам белков/белковых комплексов (данные РСА, 3D ЯМР, крио-ЭМ) для последующего использования при создании полноатомных трехмерных моделей для дальнейшего молекулярного моделирования,
- подготовку молекулярных моделей, проведение тестовых расчётов методом классической молекулярной динамики.

4.6. Построение моделей зависимостей "структура – геропротекторная активность" на основе методов машинного обучения должно включать:

- формирование наборов данных по известным геропротекторам, включая информацию об их структуре и биологической активности;
- разработку (Q)SAR моделей, проведение их валидации, оценку их характеристик и отбор наилучших моделей для конкретных видов геропротекторной активности.

4.7. Сбор биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) 900 здоровых людей разных возрастных групп: 18-44 года (молодой возраст), 45-59 лет (средний возраст), 60-74 года (пожилой возраст), 75-90 лет (старческий возраст), более 90 лет - долгожители и передача образцов в головную организацию для проведения масс-спектрометрического анализа должен включать:

- сбор первой части коллекции биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) — не менее 150 здоровых людей из трех когорт (молодые, 18-25 лет; среднего возраста, 45-55 лет; и старческого возраста, от 75 лет), для проведения первого этапа протеомного анализа на втором году реализации проекта;
- сбор второй части коллекции биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) — не менее 750 здоровых людей из трех когорт (молодые, 18-25 лет; среднего возраста, 45-55 лет; и старческого возраста, от 75 лет), для проведения второго этапа протеомного анализа на третьем году реализации проекта;
- ответственное хранение биоматериала в биобанке до передачи в головную организацию;
- создание предварительной панели протеомных маркеров (AP-маркеров) на основе открытых литературных источников и баз данных.
- работы по построению и тестированию предсказательной модели на основе ранее разработанной предварительной панели протеомных биомаркеров и данных протеомного профилирования, полученных на выборке из 150 образцов (на базе головной организации);

- построение консенсусной панели пептидных маркеров для дальнейшей разработки методики оценки биологического возраста на основе протеомных маркеров;

4.8. Проведение панорамного протеомного исследования 10% образцов крови здоровых доноров с использованием методов ультракоротких градиентов должно включать:

- роботизированную пробоподготовку образцов, в том числе солюбилизацию белков образцов и их расщепление трипсином при помощи протокола «гидролиз белков трипсином в растворе».

4.9. Определение перечня белков, перспективных для анализа в плазме крови доноров различных возрастных групп должно включать:

- анализ литературы и данных публичных репозиторий.

4.10. Получение не менее 30 ти пептидных стандартов для направленного масс-спектрометрического профилирования должно включать:

- присоединение одного изотопно-меченого аминокислотного остатка.

4.11. Разработка протокола анализа концентрации белков в плазме крови должна включать:

- применение хромато-масс-спектрометрии на массы-спектрометре типа тройной квадруполь с хроматографическим градиентом

4.12. Направленный масс-спектрометрический анализ образцов плазмы крови людей различных возрастных групп в соответствии с разработанным протоколом должен включать:

- измерения на масс-спектрометре типа тройной квадруполь по разработанному методу мониторинга множественных реакций.

4.13. Определение перечня метаболитов, перспективных для анализа в плазме крови доноров различных возрастных групп, доступных для идентификации разными метаболомными подходами должно включать:

- анализ литературы и данных метаболомных репозиторий.

4.14. Разработка протокола (методики) оценки общего содержания метаболитов в образце для последующей нормировки при сопоставлении образцов должно включать:

- измерения на хромато-масс-спектрометрическом оборудовании, адаптированном для анализа низкомолекулярных соединений;

- оценку полноты экстрагируемых низкомолекулярных соединений из целевых биологических образцов;

- контроль качества проведения преаналитических стадий, в т.ч. оценку полноты экстракции низкомолекулярных соединений из целевых биологических образцов,

- оценку воспроизводимости хромато-масс-спектрометрических экспериментов с помощью рекомендованных стандартных соединений;

- формирование полуколичественных профилей метаболомов исследуемых образцов.

4.15. Тестовое нанопоровое секвенирование модельной и/или внеклеточной (вк)ДНК - подбор условий пробоподготовки внеклеточной ДНК и проведения эксперимента должно содержать:

- проверку распределения модельной ДНК и/или вкДНК по длинам фрагментов;

- подбор условий пробоподготовки модельной ДНК для получения достаточного количества данных при нанопоровом секвенировании без амплификации ДНК;

- выбор алгоритма анализа данных при обработке результатов нанопорового секвенирования вкДНК.

4.16. Разработка протокола получения *in vitro* модели старения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека должна включать:

- подбор условий получения *in vitro* модели старения МСК человека;
- доказательство работоспособности выбранного метода получения *in vitro* модели старения МСК человека.

4.17. Адаптация протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая системы выбранного цитохрома Р450 должна включать:

- подбор условий сорбции на поверхность и визуализации цитохрома Р450 в виде отдельных биомакромолекул.

4.18. Определение функциональной активности единичной молекулы цитохрома Р450 по АСМ-данным в условиях классического ферментного цикла должно включать:

- подбор компонентов ферментной системы;
- доказательство работоспособности ферментной системы в условиях измерений альтернативными методами исследований;
- определение гетерогенности определяемых свойств белка;
- разработку алгоритма обработки АСМ-данных с целью определения ферментативной активности белка.

4.19. Регистрация электрических сигналов в процессе функционирования фермента, встроенного в нанопору должна включать:

- определение референсных значений уровня шума измеряемого сигнала;
- определение зависимости результатов измерений от типа используемой нанопоры.

4.20. Поиск эффекторов новых мишеней методами молекулярного моделирования, био- и хемоинформатики должен включать:

- отбор структур потенциальных ингибиторов выбранных мишеней методом молекулярного докинга;
- оценку констант связывания и стабильности комплекса наиболее перспективных кандидатов методом классической молекулярной динамики;
- формирование набора низкомолекулярных соединений, перспективных для синтеза, или относящихся к категории репозиционирования лекарств, исходя из расчетных данных.

4.21. Исследование влияния отобранных кандидатных молекул эффекторов в водных растворах на химерной молекуле цитохрома Р450 ВМЗ должно включать:

- определение кинетических параметров цитохрома Р450 ВМЗ в присутствии эффекторов стандартными методами стационарной кинетики;
- определение типа эффектора по полученным данным.

4.22. Получение методами белковой инженерии высокостабильного препарата фермента для разработки набора по определению NAD⁺ в крови должно включать:

- анализ ранее неиспользованных подходов по стабилизации ФДГ (анализ двугранных углов);
- получение мутантных ферментов с помощью направленного мутагенеза;
- анализ влияния замен на стабильность с помощью исследования кинетики термоинактивации;
- эксперименты по определению оптимальных условий длительного (не менее 1 года) хранения препаратов при 4°C.

4.23. Оценка потенциальных геропротекторных свойств известных фармацевтических субстанций и природных соединений должна включать:

- виртуальный скрининг базы данных известных фармацевтических субстанций World Wide Approved Drugs (WWAD, Свидетельство Роспатента № 2024621221 от 21.03.2024 г.)
- виртуальный скрининг базы данных природных соединений Phyto4Health (Свидетельство Роспатента № 2023622658 от 14.07.2023 г.)

4.24. Получение соединений, конъюгированных с фосфолипидными наночастицами (далее – композиций) должно включать:

- наработку фосфолипидных композиций с соединениями, обладающими геропротекторной активностью.

4.25. Анализ данных результатов молекулярного профилирования образцов клеточных линий и образцов плазмы крови должен содержать:

- характеристику белков с точки зрения их участия в молекулярных механизмах старения;
- анализ данных с использованием литературы и специализированных баз данных.

4.26. Метаболомное профилирование образцов плазмы крови методом газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, должно содержать:

- хромато-масс-спектрометрические измерения в соответствии с разработанным протоколом;
- работы по пробоподготовке;
- интерпретацию полученных масс-спектров.

4.27. Нанопоровое секвенирование вкДНК здоровых людей из различных возрастных групп должно включать:

- проведение *in vitro* метилирования и нанопорового секвенирования модельной ДНК;
- создание протокола анализа данных профиля метилирования (метилома) модельной ДНК;
- получение и пробоподготовка вкДНК здоровых людей (до 12 образцов);
- анализ фрагмента и метилома;
- разработку протокола бисульфитной конверсии и амплификации вкДНК для нанопорового секвенирования в случае невозможности проведения безамплификационного протокола.

4.28. Разработка *in vitro* стресс индуцированной модели старения первичных фибробластов человека. должна включать:

- исследования потенциальных геропротекторных свойств разрабатываемых соединений и/или композиций на модели стресс-индуцированного старения первичных фибробластов человека с использованием различных методов;

4.29. Анализ молекулярных маркеров старения модельных клеток, в том числе, с использованием омиксных технологий включает:

- исследование содержания в секрете мезенхимальных клеток человека, подвергнутых старению, отдельных молекул, исследованных методами ИФА и/или протеомного панорамного исследования.

4.30. Определение функциональной активности единичной молекулы цитохрома P450 по АСМ-данным в условиях воздействия соединений и композиций соединений должно включать:

- подбор лекарственных соединений для введения в ферментную систему, реконструированную на поверхности;
- оценку воздействия лекарственного соединения на физико-химические и функциональные свойства фермента.

4.31. Разработка алгоритмов обработки электрических сигналов с целью определения активности фермента, встроенного в нанопоровый детектор должна включать:

- сравнение сведений о функциональной активности с данными, полученными классическими методами определения функциональной активности фермента;
- разработку методики измерения функциональной активности фермента с помощью нанопорового детектора;
- разработку протокола определения функциональной активности фермента.

4.32. Молекулярное моделирование ферментативной активности единичной молекулы цитохрома P450 для интерпретации результатов экспериментов методом атомной силовой микроскопии включает:

- расчеты методом молекулярной динамики с потенциалами комбинированного метода квантовой механики/молекулярной динамики и с классическими потенциалами;
- построение энергетических профилей элементарных стадий методом зонтичной выборки;
- расчёт констант скоростей элементарных стадий и определение эффективных кинетических параметров из численного решения дифференциальных кинетических уравнений, полученных из рассчитанного энергетического профиля.

4.33. Разработка веб-ресурса для прогноза потенциальных геропротекторов на платформе Way2Drug должна включать:

- разработку инструментов для обеспечения возможности ввода пользователем структурных формул анализируемых соединений в форматах MOL и SMILES;
- разработку инструментов для расчета вероятности наличия различных видов геропротекторной активности на основе наилучших (Q)SAR моделей;
- разработку форм для выдачи пользователю списка наиболее вероятных видов геропротекторной активности с соответствующими оценками вероятностей проявления активности.

4.34. Оценка специфической фармакологической активности полученных геропротективных композиций на модельном объекте должны включать:

- определение показателей специфической активности (ЭД₅₀ - среднеэффективные дозы, вызывающие определенный фармакологический эффект у 50% животных).

4.35. Разработка протокола оценки влияния соединений и композиций на молекулярный состав крови человека должно содержать:

- исследование распределения соединений и композиций по компонентам крови.

4.36. Построение карты молекулярных механизмов, обуславливающих старение на разных -омиксных уровнях должно включать:

- анализ перечней белков и метаболитов, полученных на предыдущих этапах, а также анализ литературных источников:

- анализ сведений о внутриклеточной локализации белков, а также метаболических путях, характеризующих отобранные белки и метаболиты.

4.37. Выявление специфичных метаболомных сигнатур для различных возрастных групп путем сопоставления полученных результатов метаболомного профилирования включает:

- сопоставление полученных профилей низкомолекулярных соединений;
- оценку частотных закономерностей встречаемости конкретных метаболитов в биологических образцах;
- построение возрасто-зависимого портрета метаболома по полученным данным и с учетом доступных в открытых источниках данных.

4.38. Исследование уровня NAD⁺ в крови людей из различных возрастных групп включает:

- оптимизацию условий предобработки препаратов крови;
- детекцию образующегося NADH методом спектрофлуориметрии.

4.39. Нанопоровое секвенирование вкДНК здоровых людей из различных возрастных групп должно включать:

- формирование набора требований к программному обеспечению рабочего места для анализа данных секвенирования вкДНК;
- составление последовательности действий и команд для анализа фрагментов и метилом вкДНК здоровых людей.
- создание биоинформатического конвейера анализа данных фрагментов и метилом вкДНК

4.40. Проведение биоинформатического анализа данных протеомного профилирования образцов биоматериала людей разных возрастных групп и клеточных моделей, создана предсказательная модель для оценки биологического возраста на основе анализа протеомных биомаркеров должно включать:

- анализ данных протеомного профилирования 900 образцов (150+750) биоматериала людей разных возрастных групп и клеточных моделей;
- создание предсказательной модели для оценки биологического возраста на основе анализа протеомных биомаркеров

5. Требования к выполняемым работам

5.1. Разработка протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным должны соответствовать следующим условиям:

- работа с модельным объектом должна выполняться с использованием активной и инактивированной формы фермента;
- реконструкция ферментной системы должна быть выполнена в условиях, близких к нативным;
- протокол оценки функциональной активности должен учитывать олигомерное состояние белка на поверхности;
- алгоритмы автоматической обработки данных должны включать возможность выбора объектов для наблюдений из совокупности АСМ-визуализированных объектов

5.2. Разработка программно-технических решений для системы регистрации ферментной активности с помощью нанопорового детектора должна соответствовать следующим условиям:

- электронные блоки регистрации ионных токов должны иметь уровень собственных шумов в не хуже 0,5 пА в диапазоне частот 0-10 кГц;
- частота оцифровки сигнала должна быть в пределах от 1 до 50 кГц;
- программное обеспечение должно позволять проводить первичную фильтрацию и обработку статистических характеристик токовых сигналов нанопоры в режиме реального времени, а также реализовать алгоритмы регистрации сигналов ферментной активности;
- конструкция нанопорового детектора, должна включать измерительную ячейку размером 50x50x20 мм и предусматривать возможность использования двух типов нанопор, неорганической на основе кремниевой структуры SixNy и органической, на основе полимерной мембраны.

5.3. Создание конструкции гибридного цитохрома P450 BM3 с ФДГ, устойчивого к действию компонентов крови для тестирования кандидатных молекул эффекторов:

- работы должны выполняться с использованием биоинформатических компьютерных методов для анализа первичной и четвертичной структуры фермента;
- нуклеотидные последовательности полученных конструкций должны подтверждаться секвенированием на наличие только требуемых замен;
- анализ протеазной стабильности должен быть проведен как с помощью аналитического электрофореза в денатурирующих условиях, так и с помощью гельпроникающей хроматографии.

5.4. Выбор модельного объекта для оценки эффективности геропротективных свойств соединений:

- должен проводиться с использованием животных, не подвергшихся анестезии при условии избежания боли и дискомфорта;
- должен проводиться с использованием группы животных достаточными, сопоставимыми по полу и возрасту;
- методы оценки геропротекторных свойств должны проводиться по методикам, характеризующую, в том числе «метабомику возраста» (metabolomic aging).

5.5. Отбор мишеней для коррекции процессов старения, пригодных для последующего молекулярного моделирования должен соответствовать следующим условиям:

- при поиске трехмерных структур необходимо использовать только экспериментальные данные;

- депонированные трехмерные структуры, полученные с помощью AlphaFold2, требуют дополнительной валидации,

- получаемые модельные структуры должны быть собраны для соответствующих условий кислотности среды, при которых планируется проведение последующих экспериментов.

5.6. Построение моделей зависимостей "структура – геропротекторная активность" на основе методов машинного обучения:

- данные для построения моделей должны быть отобраны из опубликованных в научных журналах статей и баз данных, с учетом особенностей экспериментов, в которых эти данные были получены;

- должна быть выполнена предобработка информации по структуре и биологической активности согласно широко применяемым при моделировании (Q)SAR требованиям;

- при построении моделей должны быть сопоставлены результаты применения разных методов и отобраны наилучшие модели для конкретных видов геропротекторной активности;

- валидация моделей должна быть осуществлена на основе критериев, широко применяемых при моделировании (Q)SAR.

5.7. Сбор биоматериала (и сопутствующей детальной клинической информации) 900 здоровых людей разных возрастных групп: 18-44 года (молодой возраст), 45-59 лет (средний возраст), 60-74 года (пожилой возраст), 75-90 лет (старческий возраст), более 90 лет - долгожители и передача образцов в головную организацию для проведения масс-спектрометрического анализа:

- сбор биоматериала должен выполняться согласно требованиям законодательства, под контролем квалифицированного персонала, с соблюдением требований безопасности к выполнению данного вида работ, биоматериал должен депонироваться в биобанк для обеспечения надежного криохранения с использованием морозильных камер;

- образцы должны быть подготовлены для передачи в специальных условиях с соблюдением температурного режима. Образцы должны храниться с использованием лабораторного пластика (пробирок), устойчивого к заморозке, с применением штативов для хранения биоматериала. Сопутствующая клиническая информация передается в виде предварительно подготовленной базы данных с использованием любого подходящего программного обеспечения (Excel, Access или их аналогов);

- передача биоматериала должна выполняться согласно требованиям безопасности, при участии специально обученного и квалифицированного персонала;

- биоматериал должен транспортироваться с соблюдением температурного режима не ниже -20С с применением либо морозильного оборудования для транспортировки, либо хладагентов;

- должна быть исключена разморозка или частичная разморозка биоматериала на всех этапах транспортировки от исполнителя в головную организацию.

5.8. Проведение панорамного протеомного исследования образцов крови здоровых доноров с использованием методов ультракоротких градиентов должен:

- проводиться на масс-спектрометре высокого разрешения типа OrbiTrap:

- проводиться в двух технических повторах с хроматографическим градиентом длительностью не более 15 мин.

5.9. Определение перечня белков, перспективных для анализа в плазме крови доноров различных возрастных групп должно включать анализ литературы и данных публичных репозиториев:

- для составления перечня белков должны быть проведены работы по оценке возможности детекции белков с использованием масс-спектрометрического детектора.

5.10. Получение не менее 30 ти пептидных стандартов для направленного масс-спектрометрического профилирования должно соответствовать следующим условиям;

- степень чистоты пептида после очистки, определяемая с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), должна составлять не менее 90%;

- определение концентрации синтезированных пептидов должно осуществляться при помощи аминокислотного анализа;

- количество каждого синтезированного пептидного стандарта должно составлять не менее 100 мкг.

5.11. Направленный масс-спектрометрический анализ образцов плазмы крови людей различных возрастных групп в соответствии с разработанным протоколом:

- проводиться на масс-спектрометре типа тройной квадруполь по разработанному методу мониторинга множественных;

- включать в себя измерение в одном техническом повторе количественного содержания пептидов, соответствующих синтезированным стандартам для белков в каждом из представленных образцов

- идентификация белков по полученным спектрам должна проводиться в подходящем программном обеспечении.

5.12. Определение перечня метаболитов, перспективных для анализа в плазме крови доноров различных возрастных групп, доступных для идентификации разными метаболомными подходами:

- для составления перечня перспективных метаболитов должны быть проведены работы по унификации наименования низкомолекулярных соединений (из-за существования не менее четырех систем зачастую конфликтующих обозначений).

5.13. Разработка протокола (методики) оценки общего содержания метаболитов в образце для последующей нормировки при сопоставлении образцов:

- экстракция низкомолекулярной фракции, дериватизация и допирование стандартами, а также хромато-масс-спектрометрические измерения и последующий биоинформатический анализ должны быть проведены в соответствии со стандартными протоколами при метаболомном профилировании образцов плазмы крови.

5.14. Тестовое нанопоровое секвенирование модельной и/или внеклеточной (вк)ДНК - подбор условий пробоподготовки внеклеточной ДНК и проведения эксперимента:

- протокол пробоподготовки модельной ДНК должен наиболее полно соответствовать протоколу работы с вкДНК и сохранять фрагменты ДНК малых размеров;

- протокол обработки данных секвенирования вкДНК должен минимизировать потери данных при анализе коротких последовательностей ДНК.

5.15. Разработка протокола получения *in vitro* модели старения мезенхимальных

стволовых клеток (МСК) человека:

- работы должны выполняться с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека в стерильных условиях клеточного бокса.

5.16. Адаптация протокола оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая системы выбранного цитохрома Р450 должна:

- реконструкция ферментной системы цитохрома Р450 должна быть выполнена в условиях, близких к нативным;
- включать протокол оценки функциональной активности учитывающий олигомерное состояние белка на поверхности;
- содержать алгоритмы автоматической обработки данных обеспечивающие возможность выбора объектов для наблюдений с учетом олигомерного состояния белка.

5.17. Определение функциональной активности единичной молекулы цитохрома Р450 по АСМ-данным в условиях классического ферментного цикла:

- должна быть выполнена в условиях, близких к нативным;
- должны быть предложены способы сравнения данных оценки функциональной активности, полученных классическими ансамблевыми методами и методом АСМ.

5.18. Регистрация электрических сигналов в процессе функционирования фермента, встроенного в нанопору должна соответствовать следующим условиям:

- референсное значение уровня шума измеряемого сигнала не менее 2-3 пА.

5.19. Поиск эффекторов новых мишеней методами молекулярного моделирования, био- и хемоинформатики должен содержать:

- проведение расчётов методом молекулярного докинга для отобранных мишеней со стандартными базами соединений, а также с базой лекарственных средств.
- расчет молекулярно-динамических траекторий для наиболее перспективных кандидатов в комплексе с мишенями длиной не менее 50нс.

5.20. Исследование влияния отобранных кандидатных молекул эффекторов в водных растворах на химерной молекуле цитохрома Р450 ВМ3 должно:

- выполняться с использованием методов стационарной кинетики при постоянной температуре;
- эксперименты должны выполняться в трех повторах;
- расчет максимальной скорости и констант Михаэлиса должно проводится методом нелинейной регрессии.

5.21. Получение методами белковой инженерии высокостабильного препарата фермента для разработки набора по определению NAD⁺ в крови должно соответствовать следующим условиям:

- отбор аминокислотных остатков для замен проводится по результатам анализа двугранных углов;
- введение требуемых нуклеотидных замен подтверждается секвенированием двух цепей;
- термостабильность мутантного фермента на 25% (или более) выше, чем у исходного препарата;
- подобранные условия обеспечивают сохранение не менее 70% исходной активности фермента при хранении в течение 6 месяцев при 4°C.

5.22. Оценка потенциальных геропротекторных свойств известных фармацевтических субстанций и природных соединений должна соответствовать следующим условиям:

- отбор соединений, потенциально обладающих геропротекторной активностью, для экспериментального тестирования на модельных объектах, должен быть проведен с использованием сведений об известных фармацевтических субстанциях и природных соединениях, для которых геропротекторная активность не была обнаружена ранее;
- виртуальный скрининг должен быть проведен для информационных массивов, содержащих информацию о не менее чем 3000 природных соединений и не менее чем 4000 фармацевтических субстанций.

5.23. При получении соединений, конъюгированных с фосфолипидными наночастицами (далее – композиций) должны быть:

- получены фосфолипидные композиции, охарактеризованные по физико-химическим показателям: описание, подлинность, однородность массы, растворимость в воде и прозрачность, pH,
- проведены количественные определения активной субстанции и фосфатидилхолина.

5.24. Анализ данных результатов молекулярного профилирования образцов клеточных линий и образцов плазмы крови должен проводиться в соответствии со стандартами международного протеомного сообщества (HUPO).

5.25. Метаболомное профилирование образцов плазмы крови методом газовой хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией должно быть обеспечено:

- надлежащим уровнем надежности и достоверности результатов хромато-масс-спектрометрического анализа (идентификации с высокими показателями Similarity и Probability);
- калиброванной аналитической системой;
- контролем качества на протяжении всего эксперимента.

5.26. Нанопоровое секвенирование вкДНК здоровых людей из различных возрастных групп должно выполняться по следующим требованиям:

- протокол пробоподготовки модельной ДНК должен наиболее полно соответствовать протоколу работы с вкДНК и сохранять фрагменты ДНК малых размеров;
- протокол анализа метилома вкДНК должен отражать всю информацию о распределении метилированных оснований в вкДНК, как на уровне суммарной ДНК, так и на уровне единичных молекул.

5.27. Разработка *in vitro* стресс индуцированной модели старения первичных фибробластов человека должны выполняться:

- с использованием первичных фибробластов человека в стерильных условиях клеточного бокса с соблюдением требований безопасного проведения работ с биологическим материалом.

5.28. Анализ молекулярных маркеров старения модельных клеток должен:

- выполняться с использованием *in vitro* модели старения МСК человека;
- выполняться с использованием омиксных технологий;

- разработка протокола пробоподготовки клеток к протеомному исследованию должна включать: подбор условий пробоподготовки клеток к протеомному исследованию; результаты протеомного исследования клеток, для различных условий пробоподготовки.

5.29. Проведение биоинформатического анализа данных протеомного профилирования образцов биоматериала людей разных возрастных групп и клеточных моделей должны быть проведены:

- на лицензированном ПО или ПО с открытой лицензией;
- с использованием суммарно данных протеомного профилирования 900 образцов.

5.30. Определение функциональной активности единичной молекулы цитохрома P450 по АСМ-данным в условиях воздействия соединений и композиций соединений должно осуществляться с контролем за олигомерным состоянием белка.

5.31. Разработка алгоритмов обработки электрических сигналов с целью определения активности фермента, встроенного в нанопоровый детектор должна соответствовать следующим условиям:

- определение функциональной активности по данным измерения электрических сигналов должна быть проведена для фермента с молекулярной массой порядка 50 кДа;
- измерения должны учитывать тип используемой нанопоры - органической и неорганической;
- обработка полученных данных должна предусматривать усреднение сигнала по времени.

5.32. Молекулярное моделирование ферментативной активности единичной молекулы цитохрома P450 для интерпретации результатов экспериментов методом атомной силовой микроскопии должны соответствовать следующим требованиям:

- расчеты методом молекулярной динамики с потенциалами комбинированного метода квантовой механики/молекулярной механики должны проводиться с гибридными функционалами в квантовой подсистеме и двухэкспонентными базисными наборами с поляризационными функциями;
- длины классических траекторий должны быть не менее 100 нс, комбинированных – не менее 10 пс.

5.33. Разработка веб-ресурса для прогноза потенциальных геропротекторов на платформе Way2Drug должна учитывать:

- использование современных веб-технологий на основе фреймворка Bootstrap с сервисными элементами, написанными на языке программирования JavaScript;
- разработку сценариев исполняемых динамических веб-приложений, реализованных с использованием С-подобного языка PHP.
- представление рекомендаций по его практическому использованию пользователями;
- свободный доступ в сети Интернет для академических исследователей.

5.34. При оценке специфической фармакологической активности полученных геропротективных композиций на модельном объекте должен быть:

- использован клинический путь введения;
- должна быть установлена зависимость "доза-эффект" в отношении терапевтических и нежелательных явлений.

5.35. При разработке протокола оценки влияния соединений и композиций на молекулярный состав крови человека, распределение по компонентам крови должно быть исследовано методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности с последующим количественным определением методом ВЭЖХ/МС.

5.36. Построение карты молекулярных механизмов, обуславливающих старение на разных -омиксных уровнях должно учитывать следующее:

- полученные на предыдущих этапах перечни белков и метаболитов должны быть внесены на карту с учетом их участия в молекулярных механизмах старения, в том числе: нестабильность генома, укорочение теломер, эпигенетические альтерации, нарушение структуры белка.

5.37. Выявление специфичных метаболомных сигнатур для различных возрастных групп путем сопоставления полученных результатов метаболомного профилирования должно учитывать следующие условия:

- хромато-масс-спектрометрические эксперименты должны быть надлежащего качества (пройден контроль качества, выполнены калибровки, геометрические характеристики пиков удовлетворительны, учтен батч-эффект, коэффициент вариации площади под кривой пиков <10% для технических повторений);

- списки характеристичных для определенных возрастных групп метаболитов должны быть оформлены в унифицированной форме, обеспечивающей однозначную трактовку.

5.38. Исследование уровня NAD⁺ в крови людей из различных возрастных групп проводится в соответствии со следующими требованиями:

- проводится с образцами здоровых пациентов, подготовленными (предобработанными) соисполнителями на стадии отбора образцов крови;

- определение концентрации окисленного кофермента проводится с использованием внутренних стандартов NAD⁺;

- количество анализируемых образцов определяется результатами работ на предыдущих этапах.

5.39. Исследование потенциальных геропротекторных свойств разрабатываемых соединений и/или композиций на модели стареющих МСК, в том числе, с использованием омиксных технологий:

- выполняться с использованием разработанной *in vitro* модели старения МСК человека;

- выполняться с использованием омиксных технологий.

6. Требования к разрабатываемой документации

6.1. При выполнении проекта должна быть разработана следующая научно-техническая и иная документация:

6.1.1 Промежуточные и заключительный отчеты по этапам выполнения работ в соответствии с ГОСТ 7.32-2017.

6.1.2 Протокол оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая модельного объекта.

6.1.3 Схема нанопорового детектора, как основы системы регистрации функциональной активности фермента.

6.1.4 Акт о создании коллекции биоматериала с метаданными. Акт приемки-передачи образцов биоматериала.

6.1.5 Протокол роботизированной пробоподготовки образцов для протеомного анализа в формате 96 луночного планшета, протокол для ультракоротких методов панорамного протеомного анализа, протокол биоинформатической обработки данных ультракоротких методов.

6.1.6 Акт получения (синтез или приобретение коммерчески доступных) пептидных стандартов для направленного масс-спектрометрического профилирования.

6.1.7 Протокол анализа концентрации белков в плазме крови методом направленного масс-спектрометрического анализа.

6.1.8 Протокол (методика) оценки общего содержания метаболитов в образце.

6.1.9 Протокол проведения секвенирования вкДНК.

6.1.10 Протокол *in vitro* моделирования старения МСК человека.

6.1.11 Протокол оценки функциональной активности единичной молекулы фермента по АСМ-данным для случая, выбранного цитохрома P450.

6.1.12 Паспорт полученного препарата, состав буферной системы для длительного хранения фермента.

6.1.13 Протокол наработки композиции, акт наработки композиции, паспорт композиции. 6.1.14 Протокол анализа профиля метилирования ДНК.

6.1.15 Протокол *in vitro* моделирования старения первичных фибробластов человека.

6.1.16 Протокол и акт испытаний, разрабатываемых геропротекторных соединений. 6.1.17 Протокол пробоподготовки клеток к протеомному исследованию.

6.1.18 Акт испытаний разработанного протокола пробоподготовки клеток к протеомному исследованию.

6.1.19 Протокол определения функциональной активности цитохрома P450 по АСМ данным.

6.1.20 Методика измерения функциональной активности фермента с помощью нанопорового детектора.

6.1.21 Протокол определения функциональной активности фермента с помощью нанопорового детектора.

6.1.22 Заявка на регистрацию веб-ресурса в Роспатенте.

6.1.23 Протокол оценки влияния соединений и композиций на молекулярный состав крови человека.

6.1.24 Протокол исследования уровня NAD⁺ в крови людей.

6.1.25 Протокол биоинформатического анализа данных протеомного профилирования, перечень протеомных маркеров, используемых в предсказательной модели.

6.1.26 Заявка на регистрацию РИД (способ оценки биологического возраста).

6.1.27 Протоколы и акты испытаний разрабатываемых соединений и/или композиций.

6.2. Состав и отчетной документации, подлежащей представлению Получателем Минобрнауки России на этапе выполнения работ (исследований, мероприятий), определяется условиями Соглашения о предоставлении гранта и актами Минобрнауки России.

7. Этапы работ и сроки их выполнения

7.1. Этапы, состав и содержание выполняемых работ (исследований, мероприятий), перечень документов, разрабатываемых на этапах, и сроки выполнения работ

(исследований, мероприятий) приведены в Плане-графике исполнения обязательств при выполнении работ по проекту (Приложение № 10 к Соглашению от « » 2024 № 075-15-2024-XXX).

7.1.1 Этап 1: с даты подписания Соглашения до 31.12.2024 г.;

7.1.2. Этап 2: с 01.01.2025 г. до 31.12.2025 г.;

7.1.3. Этап 3: с 01.01.2026 г. до 31.12.2026 г.