

Межрегиональная олимпиада школьников

«Будущие исследователи — будущее науки»

Получение моноклонального антитела против респираторно-синцициального вируса с пролонгированным действием

Секция: Биология

Научный руководитель

(ученая степень, звание, должность)

Руднев А.В.  
(подпись) (расшифровка подписи)

Количество баллов,

полученных на защите

70

(заполняется председателем жюри)

Председатель жюри

Григорьев А.М.  
(подпись)

Григорьев А.М.  
(расшифровка подписи)

Работу выполнил(а)  
учащий(ая)ся 11ЕН класса

Университетской Гимназии МГУ  
им. М.В. Ломоносова  
(полное наименование учебного заведения)

г. Москва  
(название населенного пункта)

Кузцова Ксения Андреевна  
(Ф.И.О. учащегося ПОЛНОСТЬЮ)

Саров  
2025 год

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>5</b>
1.1 Респираторно-синцитиальный вирус и методы борьбы с ним	4
1.2 Антитела. Моноклональные антитела. Способы их получения	7
1.3 Сборка по Гибсону	9
1.4 Фактор пролонгированного действия препарата	10
<b>2. Материалы и методы исследования</b>	<b>11</b>
2.1 Секвенирование по Сэнгеру	11
2.2 Ugene	13
<b>3. Практическая часть</b>	<b>15</b>
<b>4. Обсуждение результатов.</b>	<b>17</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>17</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	<b>18</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Респираторно-синцитиальный вирус (РС-вирус) – это один из видов вирусов, вызывающих воспаление нижних дыхательных путей. Он является одной из основных причин бронхолита и пневмонии у детей до двух лет. Взрослые и пожилые люди также могут заразиться РС-вирусом, но у них заболевание протекает в более лёгкой форме. Инфекция, вызванная РС-вирусом, может вызывать следующие симптомы: кашель, заложенность носа, лихорадку, одышку, хрипы, утомление. Самые распознаваемые клинические синдромы – бронхолит и пневмония. Степень выраженности симптомов может быть разной. В некоторых случаях необходима госпитализация и поддерживающая терапия. Люди, находящиеся в группе риска, дети от 8 до 19 месяцев, особенно часто подвержены осложнениям при заражении РС-вирусом, таким как отит, синусит, пневмония, бронхит и бронхолит. Вирус передаётся воздушно-капельным путём, а также через контакт с заражёнными поверхностями. Кроме младенцев в группе риска находятся дети с хроническими заболеваниями, пациенты с сопутствующими сердечно-лёгочными или нервно-мышечными нарушениями.

Распространённость РСВ у детей, госпитализированных с из-за инфекции нижних дыхательных путей в развитых странах, составляет от 18 до 23 процентов[1]. В период сезонного подъёма заболеваемости инфицируется до 30 процентов населения. Практически каждый ребёнок инфицируется РСВ на первом году жизни [1]. После анализа данных, полученных в период с 2009 по 2013 год в рамках надзора за гриппом и ОРВИ Всемирной организацией здравоохранения на территории 49 городов России, и данных клинико-лабораторного обследования госпитализированных больных с тяжёлой острой респираторной инфекцией, полученных в системе Сигнального надзора в 9 городах РФ, было выяснено, что в группе амбулаторных и госпитализированных детей до двух лет (10089 пациентов) среди всех ОРВИ с установленной этиологией на долю РС-вируса инфекции приходился 31 процент случаев заболевания [1]. У детей до двух лет (4076 пациентов), госпитализированных с тяжёлой острой респираторной инфекцией, РСВ инфекция стала самой значимой причиной госпитализации. Таким образом, РС-вирус является основной причиной заболеваемости и госпитализации детей раннего возраста из-за инфекций дыхательных путей тяжёлого течения. Именно эта группа является целевой аудиторией исследования.

Диагностика РСВ основывается на клинических симптомах, но также может быть подтверждена с помощью проведения ПЦР, иммунофлуоресцентному анализу или быстрому антигенному тесту. Специфического лечения РС-вируса на данный момент нет. Терапия РСВ направлена на устранение симптомов. Тем не менее существует ряд профилактических мер.

Анализ научных работ, позволяет утверждать, что в настоящий момент отсутствует безопасная и эффективная вакцина против РСВ. Наиболее действенным способом оказания помощи детям раннего возраста, входящим в группу риска тяжёлого течения РСВ, признается пассивная иммунопрофилактика с помощью моноклональных антител. Преимущество моноклональных антител заключается в их высокой специфичности иммунологических реакций: они распознают только один антиген и взаимодействуют только с ним. Существует два препарата, использующихся для профилактики РСВ инфекции, в основе которых лежит моноклональное антитело: нирсевимаб и павилизумаб. Нирсевимаб показал хорошую эффективность в пассивной иммунопрофилактике, однако в настоящий момент существуют проблемы с доступностью этого препарата в России [2]. Павилизумаб [3] также снижает частоту госпитализаций в связи с РСВ. Тем не менее Павилизумаб экономически выгоден только для младенцев с высоким риском госпитализации и в случае отсутствия доступа к Нирсевимабу. Это связано с непродолжительной длительностью действия Павилизумаба. Существует необходимость в создании более доступного в России препарата для пассивной иммунопрофилактики с пролонгированным действием.

Проблема, решаемая в работе, заключается в том, что для синтеза моноклонального антитела необходимо создать вектор [4], в основе которого лежит последовательность нуклеотидов белка. Современные методы синтеза полинуклеотидных цепей обладают рядом недостатков. Например, появляются многочисленные ошибки в олигонуклеотидах, которые затем переносятся в собранные последовательности. Объективно существует необходимость отобрать клоны (синтезированные последовательности ДНК) с наименьшим количеством ошибок в последовательности нуклеотидов.

Целью обсуждаемого исследования стал анализ последовательности цепей моноклонального антитела, в которых меньше всего ошибок, а также разработка предложений их использования для создания рекомбинантного моноклонального антитела.

Гипотеза: в исходном материале для анализа есть клоны без ошибок, которые можно использовать для дальнейшей работы по созданию моноклонального антитела против РС-вируса с пролонгированным действием.

Задачи исследования:

- 1) изучение теоретических основ проблемы исследования;
- 2) подбор методов биоинформатики для работы с последовательностями ДНК моноклонального антитела.
- 3) анализ клонов для выявления возможных ошибок при сборке последовательностей, отбор клонов с минимальным количеством ошибок.

Для решения задач в работе был использован пакет программ Ugene. Именно в нем был проведен анализ последовательностей клонов.

## 1. Теоретические основы исследования

### 1.1 Респираторно-синцитиальный вирус и методы борьбы с ним

Эпидемиология.

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) представляет собой широко распространённый патоген, вызывающий эпидемии острых респираторных заболеваний по всему миру. В умеренных климатических зонах инфекция чаще всего проявляется в холодное время года. В северном полушарии эпидемии происходят ежегодно, в основном осенью и зимой, с пиком заболеваемости в феврале и марте, хотя отдельные случаи фиксируются в течение всего года. Продолжительность эпидемического подъёма составляет 3-5 месяцев, а основные пути передачи вируса — воздушно-капельный и контактный [5]. Согласно данным, в развитых странах среди детей, госпитализированных с инфекциями нижних дыхательных путей, распространённость РСВ составляет 18-33%. В период сезонного подъёма заболеваемости до 30% населения может быть инфицировано, при этом 70% детей сталкиваются с РСВ в первый год жизни, а практически каждый ребёнок заражается в течение первых двух лет [1]. Наиболее тяжёлое течение инфекции наблюдается у грудных детей, что приводит к пику госпитализаций среди младенцев в возрасте 2-5 месяцев. Среди детей раннего возраста, госпитализированных с респираторными заболеваниями, вызванными РСВ, случаи бронхолита составляют 50-90%, пневмонии — 5-40%, трахеобронхита — 10-30%. РСВ отличается высокой контагиозностью и часто становится причиной масштабных вспышек в отделениях для новорожденных, детских коллективах, а также среди госпитализированных взрослых и в домах престарелых. Эпидемиологическое исследование, проведённое в России в 2008-2009 годах, выявило значительное влияние РСВ на структуру заболеваемости инфекциями нижних дыхательных путей у детей раннего возраста. В период с сентября 2008 по апрель 2009 года в 11 клинических центрах страны было обследовано 519 детей младше 2 лет, госпитализированных с инфекциями нижних дыхательных путей. РСВ был выявлен в 197 случаях (38%, 95% ДИ: 33,8-42,3). Начало сезона инфекции было зафиксировано в ноябре, а пик заболеваемости пришёлся на март-апрель, когда 62% госпитализированных детей оказались РСВ-положительными. Дальнейшая оценка эпидемиологического и этиологического значения РСВ, проведённая Федеральным центром по гриппу и ОРВИ, подтвердила его ведущую роль в структуре заболеваемости детского населения России. Для анализа использовались статистические данные, собранные с 2009 по 2013 годы в рамках традиционного надзора за гриппом и ОРВИ под эгидой Всемирной организации здравоохранения в 49 городах РФ, а также данные клинико-лабораторного обследования госпитализированных с тяжёлой острой респираторной инфекцией (ТОРИ) в 9 городах. Анализ показал, что среди амбулаторных и госпитализированных пациентов первых двух лет жизни (10089 человек) на долю РСВ приходилось 31% всех случаев ОРВИ с установленной этиологией. У детей младше 2 лет (4076 пациентов), госпитализированных с тяжёлой острой респираторной инфекцией, РСВ оказался наиболее значимой причиной госпитализации в течение всего года (39%). Таким образом, РСВ является основной причиной заболеваемости и госпитализации детей раннего возраста с тяжёлыми инфекциями дыхательных путей [6].

Возбудитель.

Респираторно-синцитиальный вирус человека принадлежит к роду *Pneumovirus* семейства *Paramyxoviridae*. Вирионы РСВ являются сферическими частицами неправильной формы, содержащими несегментированную однонитиевую антисмысловую «минус» РНК. Десять генов РСВ кодируют синтез 11 белков: M2-1, M2-2, L, N, M, SH, G, F, P и двух регуляторных неструктурных белков NS1 и NS2, не включаемых в состав взрослого вириона. Капсид вируса представляет собой три

гликопротеида: F, G, SH, белок присоединения G и белок слияния F – количественно доминирующие.

#### Патогенез.

Вирус проникает в клетки, осуществляя слияние своей оболочки с мембраной клетки. В этом процессе G-белок функционирует как вирусный рецептор, в то время как F-белок играет ключевую роль в прикреплении вируса к клетке и обеспечивает слияние мембран как инфицированных, так и здоровых клеток. В результате этого слияния формируются многоядерные гигантские клетки, известные как синцитии, как в условиях клеточной культуры (*in vitro*), так и в эпителии дыхательных путей (*in vivo*). У большинства новорожденных присутствуют антитела, переданные от матери, однако врожденный пассивный иммунитет быстро ослабевает. Уже к 4-6 месяцам жизни антитела становятся трудноуловимыми, что делает детей особенно уязвимыми к РСВ и приводит к увеличению заболеваемости. РСВ не способствует формированию стойкого защитного иммунного ответа, что объясняет возможность повторных инфекций. У детей в возрасте от 5 до 10 лет антитела к РСВ обнаруживаются в 63-68% случаев, и аналогичная частота выявления антител наблюдается и у здоровых взрослых (67%). Ряд уникальных характеристик респираторно-синцитиального вируса (РСВ) позволяет ему избегать иммунного ответа, размножаться в клетках иммунной системы и проявлять как иммуносупрессивные, так и иммуномодулирующие свойства. Это приводит к повторным инфекциям и развитию иммунопатологических процессов в организме.

В группу риска развития тяжелой РСВ инфекции входят недоношенные дети, рожденные на сроке 35 недель и ранее; дети со значимыми пороками сердца в первые два года их жизни; дети с бронхолегочной дисплазией, то есть с легочными проблемами, которые развиваются с рождения в первые два года жизни; дети, не достигшие 3-месячного возраста и 5 кг веса к моменту инфицирования.

Респираторная синцитиальная вирусная инфекция может проявляться в виде обструктивного бронхита, бронхоолита или пневмонии, особенно у детей раннего возраста с незрелостью или патологией кардио-респираторной системы. Недоношенные дети, родившиеся до 35 недель гестации, включая тех, кто страдает от бронхолегочной дисплазии (БЛД), а также пациенты с гемодинамически значимыми врожденными пороками сердца (ВПС), относятся к группе повышенного риска тяжелого течения РСВ инфекции. Это может потребовать госпитализации, дополнительной оксигенации и даже искусственной вентиляции легких. По данным зарубежных исследований, летальность среди этой группы составляет от 1% до 6% [1]. Также в зону риска попадают дети, не достигшие трехмесячного возраста и весом менее 5 кг на момент инфицирования, а также пациенты с тяжелыми нейромышечными заболеваниями и выраженной интоксикацией. Отягощенная наследственность по бронхиальной астме может служить дополнительным предрасполагающим фактором. Известно, что риск госпитализации из-за тяжелого течения РСВ инфекции в первые шесть месяцев жизни у детей с БЛД возрастает в 13 раз по сравнению с доношенными детьми, не имеющими респираторных заболеваний. Кроме того, госпитализация этих детей часто требует реанимационных мероприятий. Летальность среди недоношенных детей, госпитализированных по поводу РСВ инфекции, по данным некоторых исследователей, составляет около 5%. У недоношенных детей, родившихся на 29-32 и 32-35 неделях гестации и не имеющих хронических заболеваний легких, частота госпитализации составляет 10,3% и 9,8% соответственно. Дети с врожденными пороками сердца также находятся в группе высокого риска развития тяжелой РСВ инфекции. Так, 33% детей с ВПС, госпитализируемых по поводу РСВ, требуют интенсивной терапии, а летальность среди них варьируется от 2,5% до 37%. В развивающихся странах распространенность РСВ достигает 70% всех инфекций нижних дыхательных путей у детей, а уровень смертности составляет 7% среди детей до 2 лет. Недавние исследования также показали, что тяжелое течение РСВ бронхоолита в первый год жизни значительно увеличивает риск развития

бронхиальной обструкции и бронхиальной астмы в будущем, как у детей и подростков, так и у взрослых.

**Симптомы.** У здоровых детей и взрослых РСВ инфекция чаще всего проявляется как заболевание верхних дыхательных путей, включая ринит, фарингит и ларингит. Бессимптомное течение этой инфекции встречается редко. Инкубационный период составляет от 3 до 5 дней, а общее время болезни может варьироваться от 5-7 дней до 3 недель. У новорожденных и детей до года РСВ является основной причиной поражения нижних дыхательных путей, и заболевание обычно протекает в тяжелой форме, что может привести к летальному исходу. К осложнениям РСВ инфекции относятся гипоксемия, апноэ и дыхательная недостаточность, что может потребовать дополнительной оксигенации или искусственной вентиляции легких. Факторы, способствующие тяжелому течению бронхиолита, включают недоношенность и возраст младше 3 месяцев.

**Лечение.** К сожалению, на сегодняшний день не разработано эффективных методов лечения, включая препараты для этиотропной терапии РСВ инфекции. Лечение бронхиолита, вызванного РСВ, в основном симптоматическое, и количество вмешательств, признанных эффективными с точки зрения доказательной медицины, остается ограниченным.

**Профилактика.** В мире накоплен опыт разработки профилактических мер, направленных на предотвращение тяжелого течения РСВ инфекции у детей из групп риска. К наиболее простым и легко осуществимым мерам относятся соблюдение гигиенических норм в быту (мытье рук, ограничение контактов в период эпидемий и т.д.) и следование санитарно-эпидемическим правилам в медицинских учреждениях. Попытки создать безопасную и эффективную вакцину против РСВ пока не увенчались успехом. Учитывая отсутствие эффективной вакцины и потенциальную серьезность заболевания, наиболее действенной мерой для помощи детям раннего возраста из группы риска тяжелого течения РСВ инфекции считается пассивная иммунопрофилактика с использованием моноклональных антител.

Моноклональные антитела — это антитела, которые синтезируются и выделяются одним клоном клеток, вырабатывающих антитела. Все свойства моноклональных антител (класс иммуноглобулинов, структура полипептидных цепей и активные центры) идентичны, что позволяет им распознавать только один антиген и взаимодействовать исключительно с ним. Это значительно повышает специфичность всех иммунологических реакций, в которых участвуют моноклональные антитела.

Для пассивной иммунопрофилактики РСВ инфекции используется паливизумаб — гуманизированное моноклональное антитело IgG1, воздействующее на эпитоп А антигена белка слияния F оболочки вируса. Молекула паливизумаба состоит на 95% из человеческих и на 5% из мышинных аминокислотных последовательностей. Он обладает выраженной нейтрализующей и ингибирующей активностью против штаммов РСВ. Пассивная иммунизация с помощью готовых антител обеспечивает быструю компенсацию иммунологической недостаточности организма, не затрагивая при этом иммунитет ребенка. На данный момент паливизумаб применяется более чем в 60 странах мира. В Российской Федерации препарат имеет регистрационное удостоверение No ЛСР 001053/10, выданное 16.02.2010, и представлен в виде лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного введения во флаконах по 50 и 100 мг. Применение паливизумаба позволяет снизить частоту госпитализаций по поводу инфекции, сократить их продолжительность, уменьшить время кислородотерапии, а также предотвратить необходимость перевода в отделение интенсивной терапии или сократить время пребывания в нем. Однако высокая стоимость курса терапии на сегодняшний день не позволяет охватить иммунизацией всех пациентов, для которых применение препарата могло бы принести значительную пользу. В настоящее время разработаны

дифференцированные критерии для назначения данной терапии пациентам различных групп риска по развитию РСВ инфекции [1].

## 1.2 Антитела. Моноклональные антитела. Способы их получения

Антитела представляют собой крупные глобулярные белки, находящиеся в плазме крови, которые производятся плазматическими клетками иммунной системы. Их основная функция заключается в нейтрализации патогенных клеток, включающих бактерии, грибы, многоклеточных паразитов, вирусов, белковых токсинов и ряда других веществ.

Каждое антитело состоит из пары тяжёлых цепей (Heavy) и двух легких (Light). Тяжелые цепи формируются из варибельного домена (Variable Heavy) и трех константных доменов (Constant Heavy 1, CH2, CH3). Лёгкие цепи включают один варибельный (Variable Light) и один константный (Constant Light) домен. Варибельный и константный домен, соединенные дисульфидным мостиком, образуют Fab-фрагмент. Сайт связывания антигена формируется из варибельных доменов одной тяжелой и одной легкой цепи. Антигенный участок, который обнаруживается антителом, называется эпитопом, в то время как часть антитела, взаимодействующая с эпитопом, называется паратопом [7].

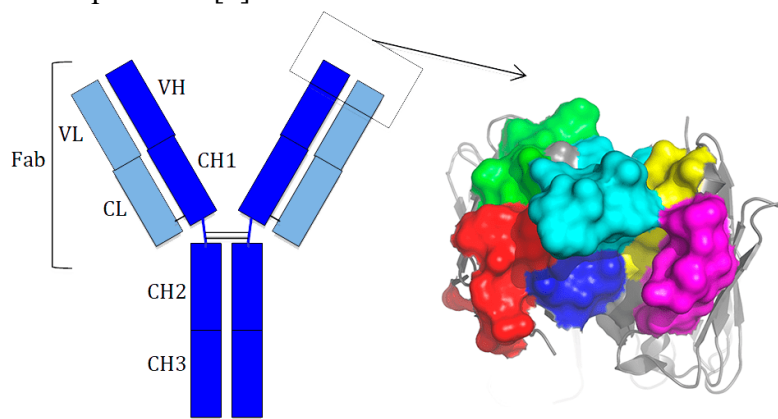


Рисунок 1. Строение антител (<https://biomolecula.ru/articles/monoklonalnye-antitela>)

На рисунке 1 представлен вид «сверху» на паратоп антитела, специфичного к трансмембранному белку вируса иммунодефицита человека. Паратоп состоит из соответствующих участков (complementarity-determining regions, CDR) варибельных доменов. Каждый варибельный домен включает три CDR-участка для тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2, CDRH3) и три для легкой (CDRL1, CDRL2, CDRL3).

Каждое антитело может быть протеолитически расщеплено на три фрагмента – два фрагмента Fab и фрагмент Fc. Fab, сокращение от фрагмента, связывающегося с антигеном, включает варибельные концы антитела. Фрагмент Fc, сокращенно обозначающий кристаллизующийся фрагмент, определяет биологические эффекторные функции антитела, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). При ADCC фрагмент Fc антитела связывается с рецепторами Fc (FcγR) на поверхности лейкоцитов, что приводит к фагоцитозу или лизису клеток-мишеней. В центре контроля заболеваний антитела запускают каскад реакций комплемента на поверхности клеток, что приводит к гибели клеток. Антитела можно разделить на пять изотипов. Разделение проводится по биологическим свойствам антител, их структуре и способности бороться с антигеном. Сравнение пяти различных изотипов представлено в таблице 1. Большинство антител для анализа относятся к подклассу IgG, который делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у человека.

Таблица 1. Сравнение разных видов антител ( <https://biocommerce.ru/spravochnik-po-tehnologiyam/antitela-reafinity-podrobno-ob-ih-ispolzovanii-v-protochnoy-tsitometrii/>)



Изотип	Субкласс	Структура	Главная иммунная функция	Распределение
IgA	IgA1 и IgA2	Мономер, димер	Нейтрализация	Внеклеточная жидкость (мономерный IgA), секреция через эпителий как в случае грудного молока (димерный IgA)
IgD		Мономер	Функция не ясна	В основном связан с В-клетками
IgE		Мономер	Активация тучных клеток	Тучные клетки под поверхностями эпителия (а именно, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и кожи)
IgG	IgG 1-4 (в человеке)	Мономер	Нейтрализация, опсонизация, активация системы комплемента, подготовка к цитотоксической функции NK-клеток	Плазма, внеклеточная жидкость
IgM		Пентамер	Активация системы комплемента	Плазма, экстраваскулярные пространства

Поликлональные антитела (pAbs) представляют собой разнообразную смесь антител, вырабатываемых различными клонами В-лимфоцитов. Они в основном состоят из различных подтипов IgG и способны распознавать несколько эпитопов на антигене. Сыворотка с поликлональными антителами может быть получена в течение 4–8 недель после инъекции интересующего антигена подопытному животному, за которой следует наблюдение за иммунным ответом и сбор антисыворотки.

Моноклональные антитела (mAb) вырабатываются одним клоном В-лимфоцитов и способны связываться только с определенным эпитопом антигена. Они состоят исключительно из одного подтипа. Моноклональные антитела, полученные из гибридом [8], могут содержать примеси из двух источников: легких цепей иммуноглобулинов, происходящих от миеломы, и иммуноглобулинов класса G (IgG), извлеченных из сыворотки. Эти примеси могут снижать специфичность антител, что приводит к непредсказуемым результатам. Таким образом, моноклональные антитела, полученные из гибридом, часто загрязнены легкими цепями IgG и иммуноглобулинами IgG из сыворотки. Одним из решений проблемы непредсказуемости результатов является использование антител с помощью технологии рекомбинантных антител [9]. Они проявляют более высокую чистоту и согласованность между партиями благодаря стандартизированным системам клеточных культур и доступности последовательностей ДНК по сравнению с гибридными моноклональными антителами.

Процесс создания рекомбинантных антител включает несколько ключевых этапов:

- 1) определение последовательности генов, отвечающих за кодирование антител;
- 2) синтез этих генов и их клонирование в экспрессионные векторы;
- 3) экспрессия фрагментов антител в клетках млекопитающих или бактерий;
- 4) очистка и анализ полученных продуктов.

Для производства рекомбинантных антител часто применяются стабильные клеточные линии, такие как CHO [11] и HEK293 [12]. Фрагменты антител, используемые для разработки рекомбинантных антител, могут быть извлечены из уже существующих моноклональных антител или выбраны из библиотек генов, которые кодируют слегка измененные белки антител, в зависимости от их сродства к целевым антигенам.

Методы получения рекомбинантных антител, основанные на библиотеках, делятся на *in vitro* дисплейные платформы, такие как фаговый и рибосомный дисплей [13], а

также на *in vivo* дисплейные платформы, включая бактериальный, дрожжевой и млекопитающий дисплей на поверхности клеток.

Фаговый дисплей представляет собой один из наиболее популярных методов, который включает в себя несколько ключевых шагов.

1. Создание библиотеки. Фрагменты генов, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител, клонируются в фаговые векторы, что приводит к формированию фаговой библиотеки, экспонирующей антитела с разнообразными сайтами связывания антигена.

2. Отбор с использованием пэннинга. Этот процесс включает инкубацию фаговой библиотеки с антигеном-мишенью, который иммобилизован на твердой поверхности. Несвязанные фаги удаляются, а связанные фаги элюируются и размножаются в бактериях *E. coli*.

3. Клонирование и отбор. ДНК антител, полученные на предыдущем этапе, клонируются в векторы экспрессии и экспрессируются в *E. coli*.

4. Скрининг и улучшение аффинности: для повышения аффинности антитела в выбранные молекулы вводятся разнообразные последовательности с использованием методов, таких как ПЦР с высокой частотой ошибок или сайт-направленный мутагенез. Антитела оцениваются на предмет улучшенной аффинности, и из отобранных клонов производится экспрессия.

### 1.3 Сборка по Гибсону

Сборка Гибсона [14] представляет собой инновационный метод молекулярного клонирования, который позволяет объединять несколько фрагментов ДНК в рамках одной изотермической реакции. Для успешного выполнения этой реакции требуется всего несколько компонентов и минимальные манипуляции. Данный метод способен одновременно комбинировать до 15 фрагментов ДНК, основываясь на их последовательной идентичности. Для этого необходимо, чтобы фрагменты, длиной около 20-40 пар оснований, перекрывались с соседними сегментами. Эти фрагменты смешиваются с коктейлем из трех ферментов и других буферных компонентов. Ключевыми ферментами в этом процессе являются экзонуклеаза, ДНК-полимераза и ДНК-лигаза. Экзонуклеаза удаляет нуклеотиды с 5'-конца, не подавляя активность полимеразы и позволяя реакции проходить в одном этапе.

Образовавшиеся одноцепочечные участки на соседних фрагментах могут спариваться. ДНК-полимераза заполняет любые пробелы, добавляя недостающие нуклеотиды. ДНК-лигаза ковалентно соединяет соседние сегменты, устраняя повреждения в ДНК. В результате образуются различные фрагменты, объединенные в одну молекулу, что позволяет создавать как линейные, так и замкнутые кольцевые структуры.

Существует два подхода к сборке по Гибсону: одноэтапный и двухэтапный. Оба метода могут быть реализованы в одном реакционном сосуде. Одноэтапный метод позволяет объединить до 5 различных фрагментов за один изотермический этап, при этом фрагменты и ферментная смесь инкубируются при температуре 50 °C в течение часа.

Для более сложных конструкций, содержащих до 15 фрагментов или фрагменты длиной от 100 до 10 КБ, используется двухэтапный подход. Он требует двух отдельных добавлений мастер-смеси: первая реакция предназначена для экзонуклеазной обработки и отжига, а вторая — для полимеразной и лигазной стадий. При этом используются различные температуры инкубации.

Метод сборки ДНК Гибсона обладает множеством преимуществ по сравнению с традиционными методами клонирования рекомбинантной ДНК, основанными на рестрикции и лигировании. Например, после ПЦР не требуется рестрикционный анализ фрагментов ДНК, хотя основной вектор может быть подвергнут такому анализу или синтезирован с помощью ПЦР. Этот метод более экономичен и быстр, так как требует

меньше этапов и реагентов. При объединении двух фрагментов ДНК не остаются шрамы от рестрикционных сайтов, хотя область между двойными цепями и свободными концами может быть подвержена мутациям, когда ДНК-полимераза заполняет промежутки. Одновременно в одной пробирке можно объединить до 5 фрагментов с помощью одношаговой универсальной смеси ферментов, а с помощью двухэтапной реакции — до 15 фрагментов. В двухэтапном подходе сначала выполняются экзонуклеазная обработка и отжиг, а затем добавляются ДНК-полимераза и лигаза. Метод сборки Гибсона также может быть использован для направленного мутагенеза, позволяя вносить точечные мутации, такие как вставки, делеции и точечные изменения.

#### 1.4 Фактор пролонгированного действия препарата

Антитела к иммуноглобулину G (IgG), которые поддерживаются на втором по величине уровне (7-16 г/л) в сыворотке крови человека (после альбумина), являются ключевыми факторами как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Кроме того, материнские IgG передаются развивающейся иммунной системе плода, которая уязвима к заражению различными чужеродными патогенами и имеет решающее значение для иммунитета новорожденных. IgG может выполнять свои различные важнейшие иммунологические функции на переднем крае иммунной системы человека, сохраняя при этом постоянный уровень в сыворотке крови благодаря его взаимодействию с Fc новорожденных детей рецептор (hFcRn). FcRn, который относится к основному семейству I класса гистосовместимости (MHC-I), представляет собой гетеродимерную сложную молекулу, состоящую из  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ 2-микроглобулина. Он защищает молекулы IgG от катаболизма и рециркулирует их посредством особого pH-зависимого взаимодействия с Fc-областью IgG [16].

Fc Silent представляет собой генетически модифицированный домен Fc. Он содержит ключевые точечные мутации, которые препятствуют связыванию Fc-рецепторов (Fc $\gamma$ R, FcR), устраняя эффекторную функцию антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC).

На рисунке 2 представлен фрагмент антитела, в который была внесена мутация.

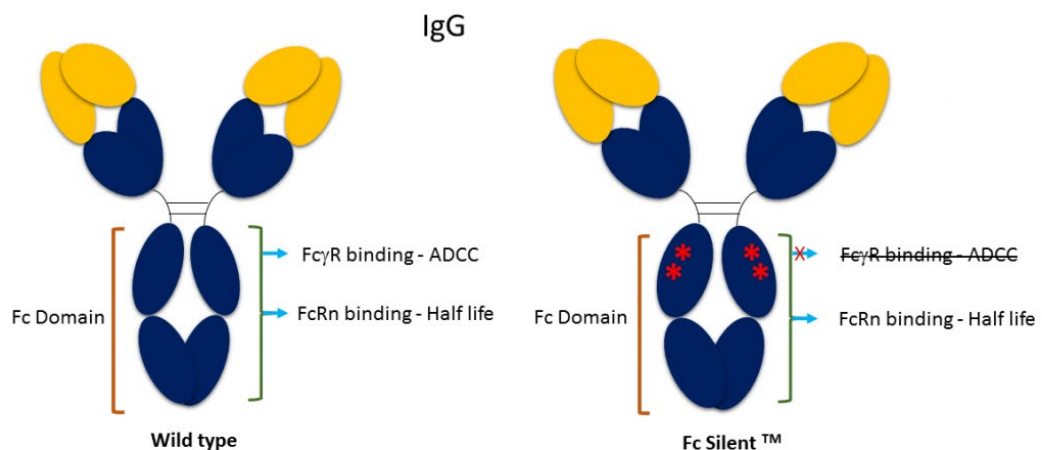


Рисунок 2. Строение антитела с мутацией в Fc-фрагмента (<https://absoluteantibody.com/our-technology/formats-we-have-made/fc-silent-antibodies/>)

Таким образом, антитела Fc Silent позволяют исследователям блокировать эффекторную функцию *in vivo*. *In vivo* антитела обладают длительным периодом полувыведения из плазмы ( $t_{1/2}$ ), связанным с Fc-доменом, и не вызывают цитотоксических иммунных механизмов, связанных с Fc-доменом дикого типа. Мутации Fc Silent не влияют на другие свойства антител, в том числе на их совместимость со вторичными антителами [15].

## 2. Материалы и методы исследования

### 2.1 Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру — метод, который используется в лабораторной практике для определения последовательности ДНК. Первоначально Ф. Сэнгер и Алан Коулсон разработали так называемый «плюс-минус» метод секвенирования ДНК [18].

Рисунок 3 иллюстрирует принцип метода, рассматривая его применение к небольшой гипотетической последовательности в цепи ДНК. ДНК-полимераза I используется для удлинения олигонуклеотида праймера и копирования матрицы в присутствии четырех дезоксирибо-трифосфатов, один из которых помечен  $^{32}\text{P}$ . В идеале этот синтез должен быть несинхронным и как можно более случайным, чтобы получить максимальное количество олигонуклеотидов разной длины, начиная с праймера. Затем эту смесь очищают на агарозной колонке для удаления избытка трифосфатов и образцы обрабатываются различными способами следующим образом:

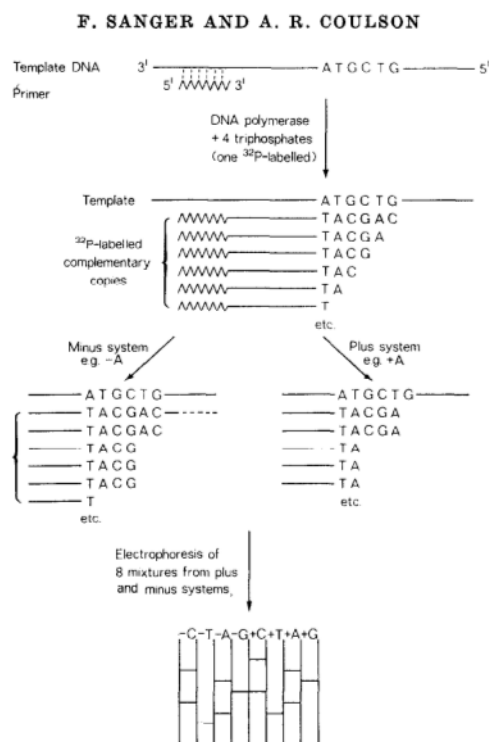


Рисунок 3. Принцип метода секвенирования (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283675902132?via%3Dihub, страница 442)

Минус система. В оригинальной работе о “липких концах” ДНК было показано, что если бы ДНК-полимераза действовала в отсутствие одного трифосфата, синтез протекал бы точно до того момента, когда должен был быть включен недостающий трифосфат, и они использовали этот принцип для определения последовательностей путем анализа относительного количества каждого нуклеотида, включенного в присутствии различных смесей трифосфатов. Описанная здесь система minus использует аналогичный принцип.

Случайная смесь олигонуклеотидов, которая все еще гибридизуется с матрицей ДНК предварительно инкубируют с ДНК-полимеразой I в присутствии трех дезоксирибозотрифосфатов. Затем синтез продолжается, насколько это возможно, в каждой цепи: таким образом, если дАТФ является недостающим трифосфатом (система - At), каждая цепь будет заканчиваться на своем 3'-конце в позиции перед остатком А.

Инкубируют отдельные образцы, в каждом из которых отсутствует один из четырех трифосфатов. Затем четыре инкубационные смеси денатурируют для отделения вновь синтезированных нитей от матрицы, подвергают электрофорезу в акриламидном геле в присутствии 8 М-мочевины и готовят радиоавтограф. В этой системе фракционирования подвижность, по существу, пропорциональна размеру, так что различные синтезируемые олигонуклеотиды (которые имеют общий 5'-конец) будут расположены в соответствии с размером. В идеале каждый олигонуклеотид должен быть отделен от своего соседа, который содержит один такой олигонуклеотид больше остатков. Автограф радиосигнала из системы -А будет содержать полосы, соответствующие позициям перед остатками А в синтезированной цепочке. Таким образом, будут определены позиции Аs. Аналогичным образом можно определить взаимное расположение других остатков и, в идеале, последовательность ДНК, считанную с радиоавтографа.

Одной этой системы обычно недостаточно для установления последовательности, поэтому обычно используется вторая аналогичная система в сочетании с ней.

Плюс система. В этой системе используется метод Энглунда (Englund, 1971-1972), который показал, что в присутствии одного дезоксириботрифосфата ДНК-полимераза из *Escherichia coli*, инфицированной бактериофагом Т4, разрушает двухцепочечную ДНК-цепочку. ДНК с ее 3'-конца, но действие экзонуклеазы прекращается на остатках, соответствующих одному присутствующему трифосфату. Этот метод применяется к смеси случайных олигонуклеотидов, полученной выше. Образцы инкубируют с полимеразой Т4 и одним трифосфатом, а затем фракционируют с помощью электрофореза в акриламидном геле.

Таким образом, в системе +А присутствует только дАТФ, и все цепочки будут заканчиваться остатками. Положения остатков будут обозначены полосами на радиоавтографе. Обычно в продуктах их количество на один остаток больше, чем соответствующие полосы в системе -А, но если имеется более одного последовательного остатка, расстояние между полосами в системах -А и +А будет указывать количество таких последовательных остатков. В примере, показанном на рисунке 3, наименьший олигонуклеотид образует полосу в положении -Т, указывая на то, что следующий остаток после его 3'-концом будет буква Т. Это подтверждается наличием полосы в позиции +Т в следующем по величине олигонуклеотиде. Полосы в положениях +Т и -А в этом продукте показывают, что его 3'-конец равен Т, а следующий за ним остаток равен А, что определяет динуклеотидную последовательность Т-А. Аналогично, следующий по величине олигонуклеотид определяет динуклеотид А-С и, таким образом, устанавливает последовательность Т-А-С.

Спустя пару лет Сэнгер с коллегами предложил еще один способ секвенирования, получивший название метода «терминаторов» или метода «обрыва цепи» [19]. Этот метод является более точным в сравнении с методом «плюс-минус». Принцип метода заключается в том, что ингибирующая активность 2',3'-дидезокситимидинтрифосфата (ddTTP) на ДНК-полимеразу I зависит от ее включения в растущую олигонуклеотидную цепь вместо тимидиловой кислоты (dT). Поскольку ddT не содержит 3'-гидроксильной группы, дальнейшая протяженность цепи невозможна, так что обрыв происходит именно в тех положениях, где должен быть включен dT.

Если праймер и матрица инкубируются с ДНК-полимеразой в присутствии смеси ddTTP и dTTP dTTP, а также трех других дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, получается смесь фрагментов, все из которых имеют одинаковые 5' и с остатками ddT на 3' концах. Когда эту смесь фракционируют с помощью электрофореза на денатурирующих акриламидных гелях, рисунок полос показывает распределение dTs во вновь синтезированной ДНК. При использовании аналогичных терминаторов для других нуклеотидов в отдельных инкубациях и параллельном нанесении образцов на гель получается узор из полос, по которому можно считывать последовательность.

Можно использовать два типа конечных трифосфатов - дидезоксипроизводные и арабинонуклеозиды. Арабиноза представляет собой стереоизомер рибозы, в котором 3'-гидроксильная группа ориентирована в транс-положении по отношению к 2'-гидроксильной группе.

Арабинозильные (ara) нуклеотиды действуют как ингибиторы ДНК-полимеразы I, замыкающие цепь *Escherichia coli*, аналогично ddT, хотя синтезированные цепи, оканчивающиеся на 3'-AraC может быть дополнительно расширен некоторыми ДНК - полимеразам млекопитающих. Для получения подходящего набора полос, из которых может быть считана обширная последовательность, необходимо чтобы соотношение концевой трифосфата к нормальному трифосфату было таким, чтобы происходило только частичное включение концевой трифосфата. Для дидезоксильных производных это соотношение составляет около 100, а для арабинозильных производных - около 5000.

Автоматизированные модификации метода «терминаторов» активно применяют до сих пор в специальных приборах — секвенаторах. Открытие многочисленных флуоресцентных молекул позволило отказаться от использования радиоактивной метки и сделало возможным проведение реакции в одной пробирке. Реакционную смесь разделяют капиллярным электрофорезом, а выстроившиеся в синтезируемую цепочку ДНК меченые нуклеотиды затем регистрируют детекторами флуоресценции, предоставляя возможность считывать последовательность всего секвенируемого ДНК-фрагмента.

## 2.2 Ugene

Unipro UGENE — это мультиплатформенное программное обеспечение с открытым исходным кодом, основная цель которого — помочь биологам управлять данными, анализировать и визуализировать их. UGENE объединяет широко используемые инструменты биоинформатики в едином пользовательском интерфейсе [20].

Набор инструментов поддерживает несколько форматов биологических данных и позволяет получать данные из удалённых источников. Он предоставляет модули визуализации для биологических объектов, таких как аннотированные последовательности генома, данные сборки секвенирования нового поколения (NGS), множественное выравнивание последовательностей, филогенетические деревья и трёхмерные структуры. Большинство встроенных алгоритмов оптимизированы для максимальной производительности за счёт использования многопоточности и специальных инструкций процессора. UGENE включает в себя визуальную среду для создания многократно используемых рабочих процессов, которые можно запускать на локальных ресурсах или в среде высокопроизводительных вычислений (HPC). UGENE написан на C++ с использованием фреймворка Qt [20].

Встроенная система плагинов и структурированный API UGENE позволяют расширять набор инструментов новыми функциями. В настоящее время UGENE поддерживает чтение и запись в более чем 20 популярных форматах биологических данных. Среди них FASTA, GenBank, Clustal, GFF и SAM/BAM [20]. Он способен работать с локальными файлами и получать доступ к данным из ключевых биологических онлайн-баз данных, включая NCBI GenBank, UniProt и PDB. Для упрощения управления биологическими наборами данных UGENE использует концепцию проекта — абстрактной структуры, содержащей информацию о файлах и настройках визуализации. Проект можно сохранить или экспортировать со всеми данными в указанное место и восстановить в любое время. С помощью визуального интерфейса с функцией «наведи и щёлкни» можно управлять группами элементов в проекте.

Набор инструментов позволяет визуализировать биологические объекты, такие как аннотированные последовательности ДНК/РНК и белков, множественное

выравнивание последовательностей, филогенетические деревья, хроматограммы, макромолекулярные трёхмерные структуры и сборки NGS. Все компоненты визуализации используют общие принципы для обеспечения функциональности для пользователей и позволяют экспортировать изображения, пригодные для публикации. Большинство компонентов визуализации позволяют редактировать биологические объекты. Например, программа просмотра последовательностей позволяет визуализировать и редактировать геномы в линейном и циклическом режимах. UGENE включает в себя большую библиотеку вычислительных методов. В настоящее время библиотека состоит из более чем 30 методов и постоянно пополняется. Интегрированные инструменты и алгоритмы решают различные задачи в области биоинформатики, в том числе поиск шаблонов, локальное выравнивание последовательностей, поиск повторов, множественное выравнивание последовательностей, инструменты для создания профилей HMM, анализ сайтов рестрикции, разработку праймеров, выравнивание коротких прочтений и многое другое.

Существует два типа инструментов UGENE: те, которые напрямую интегрированы в приложение UGENE, и внешние инструменты. Чтобы использовать внешний инструмент, он должен быть доступен в виде двоичного исполняемого файла. Все необходимые двоичные файлы можно скачать с веб-сайта UGENE в виде отдельного пакета или в составе полного пакета UGENE.

Ключевым преимуществом UGENE является то, что все встроенные алгоритмы адаптированы для использования внутренней модели данных UGENE. Это позволяет избежать ручного преобразования данных между входными и выходными данными инструментов.

В UGENE существует схема для обработки данных секвенирования по Сэнгеру. Входные данные схемы – это набор файлов с последовательностями (ридами) и их хроматограммами. В процессе работы схема производит следующие операции:

- 1) обрезает концы ридов с низким качеством секвенирования;
- 2) фильтрует полученные последовательности по минимальной длине;
- 3) выравнивает обработанные риды на референсную последовательность;
- 4) автоматически определяет, нужно ли заменить последовательность рида на обратно-комплементарную.

Результатом работы схемы является:

файл с множественным выравниванием, содержащим референсную последовательность и выровненные риды;

файл с референсной последовательностью в формате GenBank, аннотированной регионами выровненных ридов.

### 3. Практическая часть

Этапы работы.

Первым этапом работы стало картирование хроматограмм на референсную последовательность. Была предоставлена последовательность ДНК вектора (референсная последовательность), с которой сравнивались последовательности ДНК клонов, собранных по методу Гибсона. С помощью инструмента анализа данных секвенирования по Сэнгеру в Ugene была выровнена последовательность прямой и обратной цепи клона на референсную последовательность.

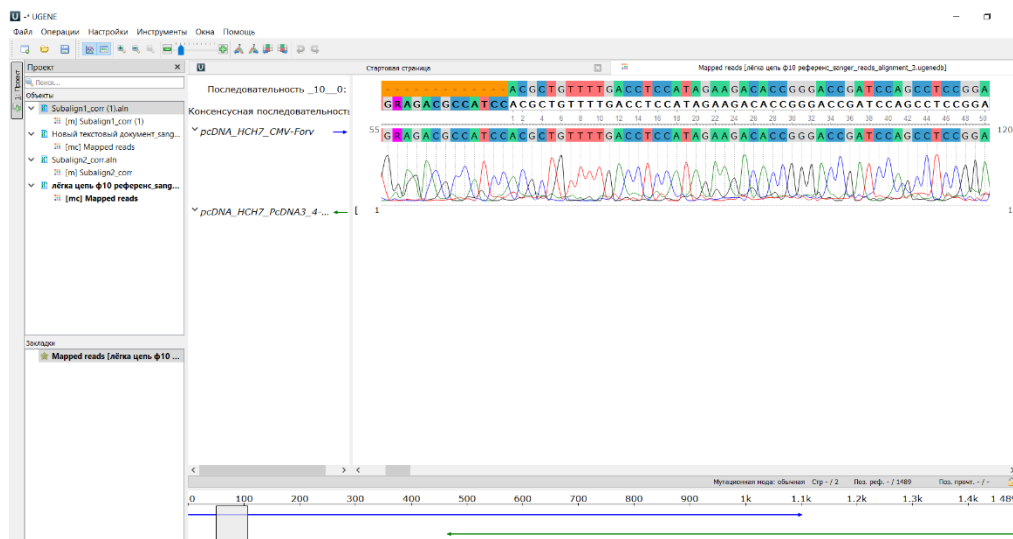


Рисунок 3. Выровненные последовательности клонов на референсную последовательность.

На рисунке 3 видны области, которые необходимо вырезать (обозначены оранжевыми прочерками). Эти области возникают из-за того, что длина последовательностей клонов больше длины референсной последовательности. Далее определялись нечитаемые участки хроматограммы. В предоставленных для анализа хроматограммах они находились в начале и в конце.

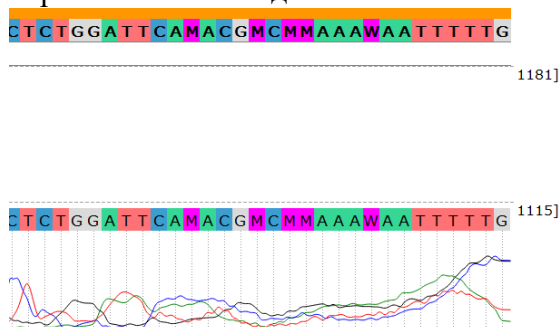


Рисунок 4. Нечитаемый участок хроматографии.

Из-за шумов при проведении хроматографии познिकाют области, в которых не удаётся точно идентифицировать пик, принадлежащий определённому нуклеотиду. На рисунке 4 представлен нечитаемый участок хроматограммы в конце ряда. Нечитаемые участки вырезались.

Дальнейшая работа заключалась в поиске несостыковок последовательности клона с референсной последовательностью. Из-за наличия шумов в некоторых местах хроматограммы можно заметить проблемные нуклеотиды.



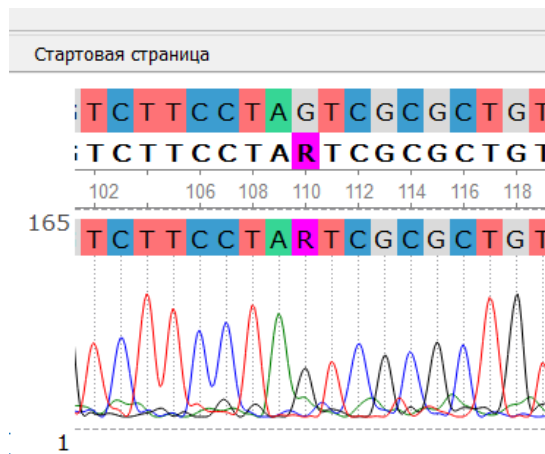


Рисунок 5. Проблемный нуклеотид.

На рисунке 5 видно, что программа не смогла определить нуклеотид на месте гуанина на референсной последовательности. Буква R на хроматограмме в контексте программы UGENE означает неточность в прочтении, которую заменили на R. Это нуклеотиды, которые программа не смогла идентифицировать из-за наличия нескольких пиков, соответствующих разным нуклеотидам в прямой или обратной последовательности клона. В случае, представленном на рисунке всё же видно, что наиболее выраженным пиком является пик гуанина, поэтому можно исправить букву R на G. Для того, чтобы точно идентифицировать нуклеотид, анализировались обе цепи: и прямая, и обратная.

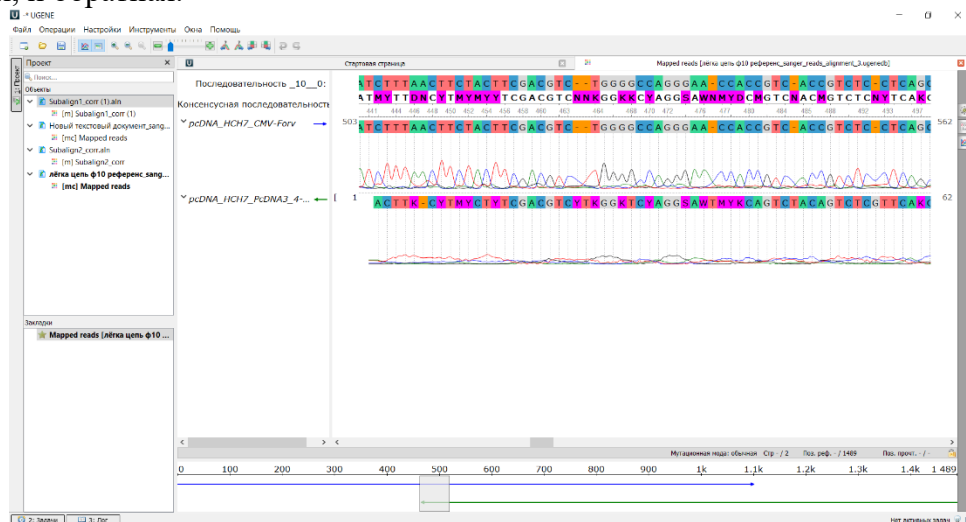


Рисунок 6. Хроматограммы прямой и обратной последовательностей.



Рисунок 7. Хроматограммы прямой и обратной последовательностей.

На рисунках 6 и 7 видно, что в разных частях хроматограммы качество лучше либо в прямой, либо в обратной последовательности. При возникновении сомнений в нуклеотиде необходимо анализировать пики на обеих хроматограммах.

Таким образом, было проведено редактирование всех проблемных нуклеотидов и была получена консенсусная последовательность. Консенсусная последовательность представляет собой результат множественного выравнивания последовательностей, в которых гомологичные последовательности сравниваются друг с другом. Далее консенсусная последовательность сравнивалась с референсной для выявления мутаций. Все мутации подробно описывались и составлялся подробный отчет предоставленных для анализа последовательностей клона. Был произведен отбор последовательностей не содержащих мутаций.

#### **4. Обсуждение результатов.**

В ходе исследования было проанализировано 4 вида последовательностей клонов: фланкированная последовательность нуклеотидов легкой цепи с сигнальным пептидом L1 (808 nt),

фланкированная последовательность нуклеотидов тяжелой цепи с сигнальным пептидом H7 (1510 nt),

фланкированная последовательность нуклеотидов легкой цепи с сигнальным пептидом F10 (802 nt),

фланкированная последовательность нуклеотидов тяжелой цепи с сигнальным пептидом F10 (1513 nt).

В последовательностях тяжелых цепей было найдено 2 клонa, не содержащих ошибок с сигнальным пептидом F10. Не было найдено ни одного клонa без ошибок в последовательностях тяжелой цепи с сигнальным пептидом H7. В последовательностях легких цепей с сигнальным пептидом L1 было найдено 5 клонов без ошибок. В последовательностях легких цепей с сигнальным пептидом F10 был найден 1 клон без ошибок. Полученные результаты в дальнейшем использовались для производства моноклонального антитела против респираторно-синцитиального вируса с пролонгированным действием. Была произведена транзientная трансфекция [22] культуры клеток СНО. Дальнейшими задачами исследования стали подбор оптимальных условий для наработки белка, очистка продукта и оценка нейтрализующей способности полученного моноклонального антитела. Была выполнена реакция микронейтрализации на культуре клеток Vero с двумя штаммами РСВ: А2 (подтип А) и 9320 (подтип В). Все образцы моноклональных антител проявляли нейтрализующую способность как в отношении РСВ подтипа А, так и РСВ В.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Анализ статистической информации подтвердил, что респираторно-синцитиальный вирус является одной из основных причин бронхолита и пневмонии у детей до двух лет.

Выявлено, что в условиях отсутствия эффективной вакцины и потенциальной серьезности заболевания, наиболее действенной мерой для помощи детям из группы риска тяжелого течения РСВ инфекции считается пассивная иммунопрофилактика с использованием моноклональных антител. На практике применяется паливизумаб — гуманизированное моноклональное антитело IgG1, однако курс терапии с применением препарата вне его основе дорогостоящий и не обладает пролонгированным действием.

Подтверждено наличие проблемы создания нового препарата.

В исследовании использовался материал, предоставленный лабораторией института системной биологии и медицины.

Для создания и выявления клона с отсутствием ошибок при сборке применялись методы биоинформатики и биотехнологии: получение рекомбинантных антител, сборка по Гибсону, секвенирование по Сэнгеру, работа в биоинформатической программе Ugene. Далее с помощью программы Ugene был произведён отбор клонов, содержащих наименьшее количество ошибок.

В ходе данной работы подтвердилась гипотеза: в исходном материале были найдены клоны, не содержащие ошибок, которые будут использоваться в дальнейшей работе для получения моноклонального антитела против РСВ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Клинические рекомендации по иммунопрофилактике респираторно-синтициальной инфекции у детей: Ассоциация детских врачей Союз педиатров России [Текст] / под ред. акад. РАН А. А. Баранова, чл.- корр. Л. С. Намазовой-Барановой. – М., 2016. – 12 с.
2. Nirsevimab for Prevention of RSV in Healthy Late-Preterm and Term Infants / L. Hammitt Laura, D. 1. Ron, Y. 1. Yuan [и др.]. // The new England journal of medicine . — 2022. — № 9. — С. 10.
3. Павилизумаб. [сайт]. — URL: <https://www.lsgeotar.ru/palivizumab.html> (дата обращения: 09.02.2025).
4. Вектор (молекулярная биология). — URL: [https://ru.ruwiki.ru/wiki/Вектор\\_\(молекулярная\\_биология\)](https://ru.ruwiki.ru/wiki/Вектор_(молекулярная_биология)) (дата обращения: 09.02.2025).
5. Хлынина Ю. О. Респираторно-синтициальная инфекция у детей / Ю. О. Хлынина, А. А. Арова, Т. Ю. Ларина. // Лекарственный вестник. — 2020. — № 2. — С. 53-57.
6. Umer M. Computational modeling of balloon-expandable stent deployment in coronary artery using the finite element method / M. Umer, Ali Najabat, A. Mubashar, M. Muhammad // Research Reports in Clinical Cardiology. — 2019. — № 10. — С. 43-56.
7. Антитела — подробно об их использовании в проточной цитометрии. — URL: <https://biocommerce.ru/spravochnik-po-tehnologiyam/antitela-reafinity-podrobno-ob-ih-ispolzovanii-v-protochnoy-tsitometrii/> (дата обращения: 09.02.2025).
8. Моноклональные антитела. — URL: <https://biomolecula.ru/articles/monoklonalnye-antitela> (дата обращения: 09.02.2025).
9. Матвеев А. Л. Проективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеристика; дис. ... канд. биол. наук 03.01.03. М: ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН». — Новосибирск, 2019. — 150 с.
10. Способ получения рекомбинантных антител, продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной рекомбинантными аденовирусами / Е. С. Седова, Д. Н. Щербинин, А. С. Банделюк [и др.]. // Тонкие химические технологии = Fine Chemical Technologies. — 2023. — № 18. — С. 48-64.
11. Jee Y. K. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential / Y. K. Jee, Kim Yeon-Gu, M. L. Gyun. // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2012. — № 93. — С. 917-930.
12. Stepanenko A. A. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution / A. A. Stepanenko. // ELSEVIER. — 2015. — № 2. — С. 182-190.
13. Технологии создания вируснейтрализующих антител человека на примере SARS-COV-2 / В. П. Баклаушев, Е. М. Самойлова, С. М. Кузнецова [и др.]. // Медицина экстремальных ситуаций. — 2022. — № 4. — С. 1-13.
14. Создание библиотек баркодированных плазмид с помощью метода клонирования по Гибсону / А. В. Смирнов, А. М. Юнусова, А. А. Муравьева [и др.] //

Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции / Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding. — 2021. — № 7. — С. 34-35.

15. An Fc variant with two mutations confers prolonged serum half-life and enhanced effector functions on IgG antibodies / Ko Sanghwan, Park Sora, H. S. Myung [и др.]. // Experimental & Molecular Medicine. — 2022. — № 54. — С. 1-12.

16. Fc Silent™ Antibodies. // Absolute Antibody : [сайт]. — URL: <https://absoluteantibody.com/our-technology/formats-we-have-made/fc-silent-antibodies/> (дата обращения: 09.02.2025).

17. Fc-silenced antibodies to remove effector functions. — URL: <https://www.evitria.com/recombinant-antibody-expression-service/fc-silenced-antibodies/> (дата обращения: 02.11.2024).

18. Daoud D. S. A splitting up algorithm for the determination of the control parameter in multi dimensional parabolic problem / D. S. Daoud, D. Subasi. // ELSEVIER. — 2005. — № 166. — С. 584-595.

19. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — № 74. — С. 5463-5467.

20. Konstantin, Okonechnikov Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / Okonechnikov Konstantin, Golosova Olga, Fursov Mikhail. // Bioinformatics. — 2012. — № 28. — С. 1166–1167.

21. Анализ результатов секвенирования по Сэнгеру. Сборка консенсусной последовательности по прочтениям. — URL: <https://kodomio.fbb.msu.ru/~mileykopeter/term3/senger.html> (дата обращения: 09.02.2025).

22. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В ТРАНЗИЕНТНОЙ ТРАНСФЕКЦИИ. ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ. — Текст : электронный // ИСТИНА : [сайт]. — URL: <https://istina.msu.ru/conferences/presentations/112129313/#:~:text=%D0%A2%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B7%D0%B8%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BD%D0%B0%D1%8F%20%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D1%81%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F%20%E2%80%93%D1%8D%D1%82%D0%BE%20%D1%83%D0%B4%D0%BE%D0%B1%D0%BD%D1%8B%D0%B9%20%D0%B8,%D0%BD%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%B0%D0%BC%D0%B8%2C%20%D0%B2%D0%BA%D0%BB%D1%8E%D1%87%D0%B0%D1%8E%D1%89%D0%B8%D0%BC%D0%B8%20%D0%B2%D1%81%D0%B5%20%D0%BD%D0%B5%D0%BE%D0%B1%D1%85%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D0%BC%D1%8B%D0%B5%20%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D0%BE%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%8B.> (дата обращения: 10.02.2025).

Фамилия И.О. Кутузова К.А.

Шифр

Шифр

Город Москва

Школа Университетская гимназия МГУ им. М.В. Ломоносова

### ЛИСТ ОТВЕТОВ

на задания теоретического тура олимпиады школьников

г. Саров 2025 г.

Внимание! Образец заполнения матрицы:

Правильный ответ	×	Отмена ответа	⊗	Отмена исправления	■
------------------	---	---------------	---	--------------------	---

Задание А. Один правильный ответ (максимально 60 баллов)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
а				×										×	×					×
б			×					×	×										×	
в	×	×			×	×				×	×	×				×	×	×		⊗
г							×			×										

13

№	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
а	×			×		×				×		⊗							×	
б					×							×	×			×	×	×		
в							×		×		×			×	×					×
г		×	×					×												

18

№	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
а	×					×							×			×				
б		×					×			×		×					×			×
в			×	×	×			×	×		×			×	×			×		
г																			×	

17

Задание Б. Множественные ответы (максимально 30 баллов)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
а	×				×		×					×		■	×	×		×		×
б		×	×	×	×	×	×		×	×	×	×							×	×
в		×		×						×	×			×		×	×	×	×	
г	×		×		×	×	×	×	×				×	×	×	×	×			
д	×	×	×			×		×		×		×	×	⊗	×		×	×		×
е				×			×	×		×		×	×						×	

26

Задание В. Суждения (максимально 10 баллов)

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ДА		×		×		⊗				×
НЕТ	×		×		×	×	×	×	×	

8

Максимальное количество баллов – 100

ИТОГО: 82