

## §2 Второй отборочный этап

Второй отборочный тур делится на 2 этапа. Победители определяются по сумме победных очков за оба этапа. Одновременно доступен только один из этапов. После окончания текущего этапа и начала следующего, набор задач меняется, вернуться к задачам из предыдущего этапа невозможно.

Этапы:

14 дней - Гепатит С. Участникам предстоит разрабатывать методы диагностики и лечения этой опасной болезни.

14 дней - Муковисцидоз. Участникам предлагается разработать методы диагностики и терапии моногенного заболевания.

Каждому из этапов соответствует свой набор задач, решение каждой задачи моделирует процесс разработки и тестирования фармакологического продукта. В каждом из этапов ваша команда получает фиксированный стартовый объем денег. Деньги тратятся на проведение лабораторных испытаний и регистрацию разработок.

Задания делятся на 3 основных типа: средства диагностики, системы доставки лекарств и терапия. Процесс решения задания начинается с анализа проблемы, продолжается определением параметров вашей научной разработки и лабораторными испытаниями. В качестве результата лабораторных испытаний, команда получает небольшой текст, подтверждающий успех и/или указывающий на ошибки, если поля были заполнены неправильно либо неоптимальным образом. На этом этапе можно вернуться на этап разработки и сделать задание заново. Если лабораторные испытания успешны, команда может зарегистрировать разработку.

Команда может показать инвесторам одну из ваших зарегистрированных разработок (только один раз для каждого задания) и получить деньги для дальнейшей работы. Сумму выделяемых инвесторами денег можно оценить по формуле:  $MP = M_{fix}Q^{100 + M_{inn}n + 1}$ , где  $M_{fix}$  фиксированная сумма,  $Q$  - качество вашей разработки,  $M_{inn}$  - бонус за инновацию,  $n$  - число команд, которые уже привлекли инвестиции на разработку по данному заданию.

Качество - скрытый параметр, который можно узнать только ПОСЛЕ регистрации разработки. Качество может принимать значения от 0% до 100% и отражает, насколько удачным было предложенное решение.

Значения  $M_{fix}$  и  $M_{inn}$  (в Ru) для различных заданий можно посмотреть в таблице.

| Задание                          | $M_{fix}$ | $M_{inn}$ |
|----------------------------------|-----------|-----------|
| Гепатит С. Диагностика.          | 60        | 30        |
| Гепатит С. Терапия.              | 120       | 60        |
| Муковисцидоз. Создание эффектора | 60        | 30        |
| Гепатит С. Доставка.             | 60        | 30        |
| Муковисцидоз. Определение цели.  | 60        | 30        |
| Муковисцидоз. Доставка эффектора | 120       | 60        |

Также один раз за этап команда можете создать лекарство, используя любые свои зарегистрированные разработки. Лекарство может включать в себя диагностику и терапию

или терапию и систему доставки, либо сразу все 3 вида разработок. Качество лекарства равно произведению качеств входящих в него разработок.

За созданное лекарство команда получает прибыль, пропорциональную его качеству.

В случае, если ваше лекарство - это комбинация из двух разработок:

$$\text{Прибыль} = 200 * QQ$$

Если лекарство - это комбинация из трех разработок:

$$\text{Прибыль} = 400 * QQ$$

Для того, чтобы пройти в очный этап, команде необходимо зарабатывать победные очки.

Формула расчета победных очков на этапе (WP)

$$WP = MP + QR \quad WP = MP + QR$$

MP - заработанные на эта командой игровые деньги. Это разница между стартовыми деньгами и финальной суммой на вашем счете на момент окончания этапа. Если команда закончила с суммой меньше начальной, то MP = 0.

QR - по каждому из заданий определяется разработка с наивысшим качеством, качество всех таких разработок суммируется.

**Для работы над задачами командам предлагались следующие теоретические материалы:**

#### **Общие сведения о методах молекулярной биологии.**

Данное методическое пособие предназначено для краткого знакомства с основными методами, применяющимися в современной молекулярной биологии, понимание которых необходимо для решения задач симулятора. От участников не требуется досконально разобраться в тонкостях каждого из них, однако общее представление о механизмах, ограничениях и ожидаемом выходе метода необходимы для осмысленного выбора вариантов решения задач.

ПЦР и связанные методы.

ПЦР - полимеразная цепная реакция. Ферментный анализ, позволяющий амплифицировать определенный фрагмент ДНК из большого пула. ПЦР-анализ требует следующих компонентов: шаблонной ДНК, праймеров, нуклеотидов и ДНК-полимеразы. Праймеры в реакции определяют какой именно ДНК продукт будет амплифицирован. Они представляют собой короткие фрагменты ДНК с определенной последовательностью, комплементарной целевой последовательности ДНК. Праймеры служат точками удлинения для ДНК полимеразы.

Эти компоненты смешиваются и помещаются в аппарат, обеспечивающий повторяемые циклы амплификации ДНК, состоящие из 3 последовательных стадий. Аппарат обеспечивает последовательную смену температур с высокой точностью. При это двойная спираль ДНК денатурирует (расплетается, плавится), затем праймеры связываются с комплементарными им фрагментами шаблонной ДНК (процесс гибридизации), после чего ДНК-полимераза удлиняет праймеры по шаблону связанной с ними ДНК. При каждом повторении этих трех стадий число копий шаблонной ДНК удваивается.

Наиболее распространенным методом анализа продуктов ПЦР является электрофорез в агарозном геле.

Подробнее про сам метод и его вариации можно прочитать здесь: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>

Nested PCR - модификация метода ПЦР, позволяющая увеличить чистоту продукта, за счет уменьшения амплификации ДНК с нежелательных сайтов связывания праймеров. Идея его состоит в том, чтобы в начале амплифицировать больший фрагмент ДНК, такой, что содержит необходимый фрагмент и может быть амплифицирован без ошибок. После чего, используя его как шаблонный и новый сет праймеров амплифицировать нужный внутренний фрагмент. Таким образом для этого метода необходимо использовать 2 пары праймеров - для внешнего и внутреннего фрагмента. Подробнее этот метод рассмотрен

здесь:

[http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/Nested\\_PCR.html](http://resources.qiagenbioinformatics.com/manuals/clcgenomicsworkbench/650/Nested_PCR.html)

Метод транскрипционной амплификации (Nasba) - одноступенчатый изотермальный (в отличие от RT-PCR) метод амплификации РНК. Реакционная смесь состоит из образца РНК, обратной транскриптазы (RT), T7 РНК-полимеразы и РНКазы H с 2 олигонуклеотидными праймерами. В образце присутствует фрагмент РНК, который нужно амплифицировать. Праймер Р1 связывается с ним и удлиняется обратной транскриптазой. При этом цепь РНК гидролизуется РНКазой H. После посадки праймера Р1, праймер Р2 также может связаться, и после его удлинения получается двухцепочечная молекула ДНК. Праймер Р1 имеет такой дизайн, что когда образуется двухцепочечная ДНК, она кодирует промотор для T7 РНК-полимеразы. Это позволяет создать антисенс копии с матрицы ДНК. С них создаются новые копии ДНК, только в случае с антисенс-РНК праймер Р2 будет связываться

первым.  
Подробнее о методе (и анализе продукта):  
[http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/NASBA.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/NASBA.html)

Иммуноферментный анализ.

Иммуноферментный анализ (ELISA) - лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Существует несколько типов этого анализа. Один из них мы рассмотрим подробно, об остальных вы можете прочитать самостоятельно : <https://rockland-inc.com/elisa.aspx> ; <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

Прямой ИФА - самая простая конфигурация, в которой антиген связывается с нерастворимой фазой путем пассивной адсорбции. Затем производится отмывка, для удаления не связавшегося антигена, после чего антиген инкубируется с конъюгированными (связанным с молекулой, обеспечивающей сигнал). После периода инкубации и отмывки добавляется субстрат для получения сигнала. После определенного времени субстратная реакция останавливается и полученный сигнал измеряется. Такой вариант метода используется для определения титра конъюгированных антител, а также очень полезен для оценки кросс-реактивности антигена. Остальные типы ИФА, в целом, являются модификациями этого варианта.

Взаимодействие антиген-антитело. Иммобилизация на полистирольной подложке

Ознакомиться со структурами, классами и подклассами антител, а так же с тем, что такое поли - и моноклональные антитела вы можете здесь: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/antibody-methods/immunoglobulin-structure-classes.html>

[http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA\\_superficie.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_superficie.pdf) Рекомендуем сделать это перед чтением дальнейших источников.

Гидрофобный полистирол - наиболее распространенный материал твердой фазы в иммуноферментных анализах. Он обладает способностью адсорбировать на себе белки ( хотя это может приводить к частичной денатурации). Так же в качестве твердой фазы часто используется полиакриламид.

Про использование адсорбированных антигенов и антител говорилось в предыдущем разделе.

В качестве дополнительного материала, здесь можно прочесть об одной из попыток оптимизации твердой фазы на основе полиакриламида: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55337/> (доп)

Химический синтез пептидов и олигонуклеотидов

В настоящий момент, методом твердотельного синтеза удастся получить пептиды и олигонуклеотиды небольшой длины и заданной последовательности. Этот процесс

многостадийный, циклический, требует блокировки и активации функциональных групп. Хорошо и подробно описан здесь (источник на русском языке): <http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/1091.html> или <http://web.snauka.ru/issues/2016/07/69677>

А здесь можно приблизительно оценить стоимость такого синтеза (цены “актуальные” как минимум не ниже указанных на сайте) <http://www.almabion.ru/sintez-peptidov-i-konyugirovanie/>

Таким образом, метод практически неприменим для массового синтеза из-за высокой стоимости.

Рекомбинантные белки. Бактериальные системы синтеза белка.

Рекомендуется к прочтению эта статья (источник на русском) <http://pharmjournal.ru/articles/stati/rekombinantnye-mikroorganizmy-i-kletochnye-kultury-v-tehnologii-polucheniya-preparatov-belkov-n13-noyabr-2016>

Плазмидный вектор. Полилинкер.

Плазмидный вектор - небольшая кольцевая молекула ДНК, используемая для трансформации бактерий и трансфекции эукариотических клеток для получения продукции нехарактерных для клетки белков, либо для наработки самого вектора. Первыми плазмидными векторами были естественные бактериальные плазмиды так называемого дикого типа, обнаруженные ранее в клетках кишечной палочки *E. coli* как экстрахромосомальные элементы. Никаких генно-инженерных манипуляций по их изменению не проводилось, и экспериментаторы лишь охарактеризовывали их как могли. Одним из таких векторов, который широко использовался в те первые годы молекулярного клонирования, была плаزمида pSC101 [Cohen, Chang, 1973; Cohen et al., 1973]. Она удовлетворяла лишь самым основным требованиям, предъявляемым к вектору для клонирования чужеродных фрагментов ДНК, обладая автономной репликацией со строгим контролем, селективным маркером в виде устойчивости к тетрациклину и уникальным сайтом гексануклеотидной рестрикционной эндонуклеазы. Низкая копияность (до пяти копий на клетку), большой размер (около 10 тпн) и единственный уникальный сайт рестрикционной эндонуклеазы *EcoRI*, по которому только и можно было осуществить клонирование (остальные уникальные сайты приходились на функционально важные участки вектора и не могли быть использованы), являлись основными ее недостатками. В настоящий момент получено 6 поколение плазмидных векторов, в которые, помимо уменьшения размера был встроен полилинкер ([http://humbio.ru/humbio/tarantul\\_sl/000010d4.htm](http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/000010d4.htm) <http://what-when-how.com/molecular-biology/polylinker-molecular-biology/>), в котором были сосредоточены сайты узнавания нескольких гексануклеотидных рестрикционных эндонуклеаз, что позволяет встраивать в плазмиду сразу несколько генов. Прочсть о поколениях плазмидных векторов можно здесь (<http://enc.sci-lib.com/article0001435.html>)

Трансформация бактерий

Для трансформации клетки бактерий должны быть компетентны - иметь способность принимать экзогенную ДНК ([http://humbio.ru/humbio/tarantul\\_sl/00000adb.htm](http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00000adb.htm)). Этого добиваются с помощью культивации бактерий на средах с антибиотиками и определенных химических и термических воздействий (например, так: [http://www.personal.psu.edu/users/d/s/dsg11/labmanual/DNA\\_manipulations/Comp\\_bact\\_by\\_TSS.htm](http://www.personal.psu.edu/users/d/s/dsg11/labmanual/DNA_manipulations/Comp_bact_by_TSS.htm) [http://molbiol.edu.ru/protocol/03\\_04.html](http://molbiol.edu.ru/protocol/03_04.html)). Затем клетки могут быть трансформированны, например методом теплового шока. При этом добавленная в суспензию клеток ДНК (плазмидный вектор) попадает внутрь клетки. (см. вторую часть протокола в первой ссылке). После этого осуществляют наработку биомассы бактерий, чтобы затем выделить собственно вектор.

Что такое упомянутые в этом разделе эндонуклеазы рестрикции и экзонуклеазы можно прочитать по ссылкам.

[http://humbio.ru/humbio/tarantul\\_sl/000012cc.htm](http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/000012cc.htm)

<https://en.wikipedia.org/wiki/Exonuclease>

Вообще, для уточнения деталей и функций отдельных ферментов мы рекомендуем вам пользоваться англоязычной версией Википедии. Например, вот неплохая статья про рибонуклеазы, которая может послужить отправной точкой. <https://en.wikipedia.org/wiki/Ribonuclease>

**Везикулы и липосомы**

Экстраклеточные везикулы - отделяемые мембраной частицы, окруженные фосфолипидным би-слоем, выделяемые клетками человеческого тела. В дополнении к функциям прямого контакта между клетками и выделению растворимых факторов, экстраклеточные везикулы представляют собой дополнительный механизм обмена информацией между клетками. Они способны эффективно доставлять вещества, синтезированные их родительской клеткой в другие клетки, что может приводить к структурным изменениям на уровне РНК, белков и даже фенотипа. Поэтому ЭВ представляют интерес для разработки систем доставки лекарств. В противоположность этим "естественным системам доставки" синтетические фосфолипидные везикулы, или липосомы, используются как переносчики лекарств десятилетия, включая несколько нано-лекарств, широко использующихся в практике.

Липосомы представляют собой самособирающиеся в водной среде сферы, размеры которых могут варьироваться от 30нм до нескольких микрометров. Они могут иметь одну или несколько оболочек и содержать гидрофильные вещества во внутреннем пространстве, гидрофобные в оболочке или амфифильные, распределенные в обеих фазах. Основным местом накопления введенных в вену липосом является печень и селезенка (хотя при низком клиренсе вовлекаются и другие органы). Там липосомы преимущественно захватываются макрофагами.

Существует несколько методов загрузки липосом. Пассивные методы, использующие образование липосом в растворе лекарства не слишком эффективны. Активные или отдаленные методы основаны на том факте, что небольшие амфифильные молекулы способны проходить через липидный би-слой в незаряженном состоянии и не способны - в заряженном. Появление заряда обеспечивается, например, за счет разности рН между внешней и внутренней средой липосом. Так же, для повышения эффективности внутри липосомы может содержаться ион, образующий нерастворимую соль с действующим веществом, что позволяет поддерживать его концентрацию в растворе внутри липосомы постоянно низкой и таким образом накапливать значительные его количества из окружающего раствора.

Липосомы так же используются для доставки ми-РНК. При это в качестве материала для би-слоя берутся ионизируемые катионные липиды, протонирующиеся при низких значениях рН, что позволяет им связываться с РНК и имеющие почти нулевой заряд при физиологических значениях рН что обеспечивает их доступность в организме. Подробнее об этом, а так же об экстраклеточных везикулах, методах их загрузки и использования можно прочитать здесь: <https://sci-hub.io/10.1016/j.jconrel.2014.07.049>

### **Линейка задач «Муковисцидоз».**

Муковисцидоз - заболевание, основной причиной которого считают мутации в гене CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - трансмембранный регулятор муковисцидоза). Продукт этого гена - белок, являющийся трансмембранным каналом для ионов хлора. Муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости состоит из 1480 аминокислотных остатков, его ген длиной примерно из 230000 пар оснований находится в 7й хромосоме . В результате мутации нарушается структура белка, что приводит к нарушению функции. Патологическим процессом является сгущение секрета желез внешней секреции.

Известно более тысячи различных мутаций в этом гене, из них существует несколько наиболее распространенных. С какой-либо из них вам и предстоит работать. В качестве примера можно привести наиболее распространенную мутацию, которая приводит к делеции

фенилаланина в 508 позиции белка. Это трансмембранный участок, удаление фенилаланина здесь приводит к нарушению структуры мембранной части белка.

#### Система CRISPR/Cas9

Система CRISPR-Cas впервые была обнаружена у бактерий. Это часть их адаптивного иммунитета, хотя есть данные и о других функциях. В её состав входят два основных компонента: CRISPR-локусы и расположенный рядом с ними кластер генов *cas*.

CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). Палиндромные последовательности - это такие последовательности, которые зеркальны сами себе, т.е. одинаково читаются и с начала, и с конца. Типичным примером аналога этого явления в русском языке является фраза-перевертыш “А роза упала на лапу Азора”. **Палиндромные повторы** длиной около 30-50 пар нуклеотидов, они способны складываться в шпильки за счет своей зеркальности. В CRISPR-локусах повторы чередуются со **спейсерами**. Спейсеры - это уникальные последовательности, которые заимствуются из чужеродных генетических элементов (вирусов, плазмид), с которыми имела дело клетка. Длина спейсера примерно такая же, как у палиндромных повторов - примерно 30-50 пар нуклеотидов.

Кластер генов *cas* включает в себя гены множества белков, отвечающих за разные этапы функционирования всей системы - от включения в систему новых спейсеров, до разрушения чужеродной ДНК, комплементарной какому-либо из спейсеров. **Cas9** это эндонуклеаза, разрезающая целевую ДНК, внося двуцепочечный разрыв.

Система CRISPR/Cas работает по принципу в чем-то схожему с РНК-интерференцией. Весь набор генов спейсеров и повторов находится под одним промотором и экспрессируется совместно. После транскрипции начинается процессинг коротких CRISPR-РНК - *cr*РНК, нацеленных на какую-либо конкретную мишень. В процессинге *cr*РНК участвует *tracr*РНК (trans-activated CRISPR РНК), закодированная рядом с белками Cas. *cr*РНК это спейсер и кусочки двух повторов по бокам от него. В результате процессинга для узнавания остается короткий фрагмент *cr*РНК длиной 20-25 нуклеотидов. Довольно быстро стало понятно, что в генноинженерных целях *cr*РНК и необходимую для работы с Cas9 *tracr*РНК можно объединить, эту молекулу называют гидовой РНК. Комплекс гидовой РНК с белком Cas распознаёт нуклеиновую кислоту-мишень за счёт комплементарного спаривания с *cr*РНК, после чего разрезает мишень. На этом работа CRISPR/Cas9 системы заканчивается, и начинается работа систем репарации клетки. Белков Cas много и у каждого своя функция, но выяснено, что для вырезания из генома заданной последовательности достаточно только белка Cas9. Именно такой набор стали пробовать применять в генной терапии.

#### Адаптация для применения на эукариотах с целью редактирования генома

Cas9 - нуклеаза, которая разрезает двуцепочечную ДНК в одном месте. Чтобы вырезать участок гена, нужно внести 2 разрыва в разных местах, по сторонам от участка, содержащего мутацию. Таким образом, необходимы 2 гидовых РНК для Cas9, комплементарные двум разным участкам.

Как уже писалось выше, для целей редактирования генома эукариот достаточно только Cas9 из белков Cas, кроме того, необходим CRISPR-кластер, включающий в себя свой промотор, повторы и спейсеры.

Для восстановления нормальной функции гена, а в случае муковисцидоза это полноценный белок CFTR, нужно применить гомологичную рекомбинацию с “правильной” последовательности. Так как муковисцидоз это рецессивное заболевание, то повреждены копии гена на обеих хромосомах. Если от родителей перешли вариации гена с разными мутациями, то задача упрощается, но надежнее ввести “правильную” последовательность дополнительно ко всему остальному.

Таким образом задача сводится к тому, что в клетку пациента должны попасть и не разрушиться там за короткое время CRISPR-кластер, белок Cas9, последовательность, с которой должна быть списана правильная версия гена.

## **Методическое пособие к задачам линейки “Муковисцидоз”**

Лечение генетических заболеваний - активно развивающееся направление в науке. Наибольшие успехи достигнуты в изучении моногенных болезней - заболеваний, развитие которых обусловлено одним единственным геном. Одним из таких заболеваний является муковисцидоз. Именно над одним из потенциально возможных способов терапии этого заболевания мы предлагаем вам поработать.

Вашей задачей является определение участка генома, который вы будете редактировать, сборка системы для редактирование гена и создание конструкции для доставки этого в клетку. За основу мы предлагаем вам взять систему CRISPR/Cas9.

В первой задаче линейки вам предложат для работы обработанные результаты секвенирования гена CFTR человека. В этой ДНК есть конкретная мутация и именно её вам предстоит исправить. Вам нужно найти точное место, где произошла мутация и выбрать участок для редактирования. Во второй задаче вам предстоит написать последовательность РНК-гидов для системы CRISPR/Cas9, чтобы вырезать участок гена с мутацией. В третьей задаче вам нужно определиться со всеми необходимыми компонентами и собрать работающую систему доставки препарата в организм человека. В рамках данной линейки задач мы сохраняем общую логику, но для упрощения опускаем некоторые биологические нюансы, которые учитывают в реальных исследованиях.

В рамках данного методического пособия мы предоставляем только минимально необходимую для решения задачи теорию. Более глубокое самостоятельное изучение теории может помочь вам лучше понять задачу.

### **Задача “Муковисцидоз. Определение мишени”**

В качестве начального условия, вы получаете две последовательности: последовательность участка гена CFTR, с которого экспрессируется нормально функционирующий белок, и последовательность участка гена CFTR, содержащая в себе мутацию, которая приводит к тому, образуется нефункционирующий или неправильно сворачивающийся белок. Это - обработанные результаты секвенирования гена CFTR пациента.

Вам нужно сопоставить две последовательности и определить где находится мутация. Это можно сделать разными способами. Самый простой, но долгий путь - ручное побуквенное выравнивание в тексте средствами любого текстового редактора или иной программы, позволяющей это. Для этого вам нужно использовать моноширинный шрифт (например Courier), затем расположить исследуемые последовательности друг под другом и сверять по букве друг с другом. Кроме того, поиск можно сделать автоматическим с помощью программ MEGA 7.0, JalView (в бесплатном открытом доступе в интернете) или любой иной программы для выравнивания последовательностей, если вы умеете с ними обращаться.

Затем, после того, как вы локализовали мутацию, вам нужно написать последовательность РНК, комплементарной участку, который вы будете вырезать. Длина участка не более 50 нуклеотидов и не менее 11 нуклеотидов.

### **Поля задачи и варианты ответов:**

Участникам предлагался один из 9 существующих вариантов мутантного гена (Данные 1), последовательность без мутации (Данные 2) и поле, в которое необходимо было ввести последовательность РНК, комплементарную участку, который необходимо вырезать. В качестве верного ответа принимались и зеркально отраженные последовательности РНК (комплементарные РНК, комплементарной представленной последовательности, при условии считывания от 3' к 5')

Для удобства ниже мутации выделены цветом, при выдаче участникам никак не выделялись

| Вариант | Поле                                       | ДНК мутации  |
|---------|--|--|
| 1       | ДНК мутантного гена (Данные 1)             | TCTGTTCCCTCTCTTTATTTTAGCTGGACCAGACCAA<br>TTTTGAGGAAAAGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCA<br>GACATATACCAAATCCCTTCTGTT    |
|         | ДНК без мутации (Данные 2)                 | TCTGTTCCCTCTCTTTATTTTAGCTGGACCAGACCAA<br>TTTTGAGGAAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTGTCA<br>GACATATACCAAATCCCTTCTGTT   |
|         | РНК комплементарная мутантной ДНК (Поле 1) | AGACAAGGAGGAGAGAAAUAAAAUCGACCUGGUCUG<br>GUUAAAACUCCUUUCUAUGUCUGUCGCGGACCUUAA<br>CAGUCUGUAUAUGGUUUAGGGAAGACAA   |
|         | РНК зеркально                              | UUGUCUUCCCUAAACCAUAUACAGACUGUUAAGGUCC<br>GCGACAGACAUAGAAAAGGAGUUUUAACCAGACCAGG<br>UCGAUUUUAUUUCUCUCCUCCUUGUCU  |
|         | ключевой фрагмент (5н+мутация+5н)          | CCUUUUCUAUG  |
|         | ключевой фрагмент зеркально                | CAUAGAAAAGG  |
|         |  |  |
| 2       | ДНК мутантного гена                        | ACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATACCAAATCCCTT<br>CTGTTGATTCTGTTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAA<br>GGTATGTTTCATGTACATTGTTTAG |
|         | ДНК без мутации                            | ACAGCGCCTGGAATTGTCAGACATATACCAAATCCCTT<br>CTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAA<br>GGTATGTTTCATGTACATTGTTTAG |
|         | РНК комплементарная мутантной ДНК          | UGUCGCGGACCUUAACAGUCUGUAUAUGGUUUAGGG<br>AAGACAACUAAGACAACUGUUAGAUAGACUUUUUAA<br>CCUUUCCAUAACAAGUACAUGUAACAAAUC |
|         | РНК зеркально                              | GAUUUGUUACAUGUACUUGUAUGGAAAGGUUAAAAA<br>GUCUAUCUAACAGUUGUCUUAGUUGUCUCCCUAAAC<br>CAUAUACAGACUGUUAAGGUCCGCGACA   |
|         | ключевой фрагмент (5н+мутация+5н)          | AAGACAACUGU  |
|         | ключевой фрагмент зеркально                | ACAGUUGUCUU  |
|         |  |  |
| 3       | ДНК мутантного гена                        | TTTGCACATGCAACTTATTGGTCCCACCTTTTATTCTTTT<br>GCAGAGAATGAGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAA<br>TCCTAAACTCATTAATGCCCTTCG  |
|         | ДНК без мутации                            | TTTGCACATGCAACTTATTGGTCCCACCTTTTATTCTTTT<br>GCAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAA<br>TCCTAAACTCATTAATGCCCTTCG  |
|         | РНК комплементарная мутантной ДНК          | AAACGUGUACGUUGAAUAACCAGGGUGAAAAAUAAG<br>AAAACGUCUCUACUCUAUCUCUCGACCGAAGUUUCU<br>UUUUAGGAUUUGAGUAAUUACGGGAAGC   |
|         | РНК зеркально                              | GCUUCCCGUAAUACUCAAAUCCUAAAAAGAAACUUC   |



|   |   |  |
|---|---|--|
|   |   | GGUCGAGAGAUAGAGUAAGAGACGUUUUCUUAUUUU<br>UCACCCUGGUUAUUCAACGUACACGUUU   |
|   | ключевой фрагмент<br>(5н+мутация+5н)    | CUUACUCUAUC  |
|   | ключевой фрагмент<br>зеркально          | GAUAGAGUAAG  |
|   |   |  |
| 4 | ДНК мутантного<br>гена                  | CACATGCAACTTATTGGTCCCCTTTTATTCTTTTGCA<br>GAGAATGGGATAAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATC<br>CTAAACTCATTAATGCCCTTCGGCG    |
|   | ДНК без мутации                         | CACATGCAACTTATTGGTCCCCTTTTATTCTTTTGCA<br>GAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCT<br>AAACTCATTAATGCCCTTCGGCG     |
|   | РНК<br>комплементарная<br>мутантной ДНК | GUGUACGUUGAAUAACCAGGGUGAAAAUAAGAAA<br>CGUCUCUUAACCUAUUCUCUCGACCGAAGUUUCUUU<br>UAGGAUUUGAGUAAUUAACGGGAAGCCGC    |
|   | РНК зеркально                           | GCGGCUUCCCGUAAUACUCAAAUCCUAAAAAGAAAC<br>UUCGGUCGAGAGAAUAGGGUAAGAGACGUUUUCUUA<br>UUUUUCACCCUGGUUAUUCAACGUACAC   |
|   | ключевой фрагмент<br>(5н+мутация+5н)    | CCUAUUCUCUC  |
|   | ключевой фрагмент<br>зеркально          | GAGAGAAUAGG  |
|   |   |  |
| 5 | ДНК мутантного<br>гена                  | ATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATT<br>AATGCCCTTCGGTGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTC<br>TATGGAATCTTTTTATATTTAGGG   |
|   | ДНК без мутации                         | ATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAACTCATT<br>AATGCCCTTCGGCGATGTTTTTCTGGAGATTTATGTTC<br>TATGGAATCTTTTTATATTTAGGG   |
|   | РНК<br>комплементарная<br>мутантной ДНК | UAUCUCUCGACCGAAGUUUCUUUUUAGGAUUUGACUA<br>AUUACGGGAAGCCACUACAAAAAGACCUCUAAAUAC<br>AAGAUACCUUACAAAAUAUAAAUCCC    |
|   | РНК зеркально                           | GGGAUUUAUAUUUUUGUAAGGUAUCUUGUAUUUAGA<br>GGUCUUUUUUGUAGUGGCUUCCCGUAAUAGUCAAA<br>UCCUAAAAAGAAACUUCGGUCGAGAGUA    |
|   | ключевой фрагмент<br>(5н+мутация+5н)    | AAGCCACUACA  |
|   | ключевой фрагмент<br>зеркально          | UGUAGUGGCUU  |
|   |   |  |
| 6 | ДНК мутантного<br>гена                  | AAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGA<br>ATCATAGCTTCCGGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCT<br>CTATCGCGATTTATCTAGGCATAGG  |
|   | ДНК без мутации                         | AAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGA<br>ATCATAGCTTCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACG<br>CTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGG |

|   |   |   |
|---|---|---|
|   | РНК<br>комплементарная<br>мутантной ДНК         | UUCAGUGGUUUCGUCAUGUCGGAGAGAAUGACCCUUC<br>UUAGUAUCGAAGGCCUGGGCCUAUUGUUCCUCCUUGC<br>GAGAUAGCGCUAAAUAGAUCCGUAUCC |
|   | РНК зеркально                                   | GGAUACGGAUCUAUUUAGCGCUAUCUCGCAAGGAGGA<br>ACAAUAGGCCCAGGCCUUCGAUACUAAGAAGGGUCAU<br>UCUCUCCGACAUGACGAAACCACUGAA |
|   | ключевой фрагмент<br>(5н+мутация+5н)            | GAAGGCCUGGG   |
|   | ключевой фрагмент<br>зеркально                  | CCCAGGCCUUC   |
|   |   |   |
| 7 | ДНК мутантного<br>гена                          | ATAGCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTC<br>TATCGCGATTTAACTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTT<br>TATTGTGAGGACACTGCTCCTACA |
|   | ДНК без мутации                                 | ATAGCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTC<br>TATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTT<br>TATTGTGAGGACACTGCTCCTACA |
|   | РНК<br>комплементарная<br>мутантной ДНК         | UAUCGAAGGAUACUGGGCCUAUUGUUCCUCCUUGCGA<br>GAUAGCGCUAAAUUGAUCCGUAUCCGAAUACGGAAGA<br>GAAUAACACUCCUGUGACGAGGAUGU  |
|   | РНК зеркально                                   | ACAUCCUCGUCACAGGAGUGUUAUUUCUCUCCGUAU<br>UCGGAUACGGAUCAUUUAGCGCUAUCUCGCAAGGAG<br>GAACAAUAGGCCCAGUAUCCUUCGAUA   |
|   | ключевой фрагмент<br>(5н+мутация+5н)            | UAAAUUGAUCC   |
|   | ключевой фрагмент<br>зеркально                  | GGAUCAAUUUA   |
|   |   |   |
| 8 | ДНК мутантного<br>гена                          | CGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTG<br>TGAGGACACTGTCCTACACCCAGCCATTTTGGCCTTCA<br>TCACATTGGAATGCAGATGAGA   |
|   | ДНК без мутации                                 | CGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTG<br>TGAGGACACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTGGCCTTC<br>ATCACATTGGAATGCAGATGAGA  |
|   | РНК<br>комплементарная<br>мутантной ДНК         | GCUAAAUAGAUCCGUAUCCGAAUACGGAAGAGAAAU<br>AACACUCCUGUCACAGGAUGUGGGUCGGUAAAAACCG<br>GAAGUAGUGUAACCUUACGUCUACUCU  |
|   | РНК зеркально                                   | AGAGUAGACGUAAGGUUACACUACUCCGGUUUUUAC<br>CGACCCACAUCCUGUGACAGGAGUGUUAUUUCUCUUC<br>CGUAUUCGGAUACGGAUCUAUUUAGC   |
|   | ключевой фрагмент<br>(5н. - выпадение -<br>6н.) | GUGACAGGAUG   |
|   | ключевой фрагмент<br>зеркально                  | CAUCCUGUGAC   |
|   |   |   |
| 9 | ДНК мутантного                                  | TGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAA  |

|  |   |   |
|--|---|---|
|  | гена  | GAAAATATCATTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATAC<br>AGAAGCGTCATCAAAGCATGCC  |
|  | ДНК без мутации                                 | TGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCTGGCACCATTA<br>GAAAATATCATCTTTGGTGTTCCTATGATGAATATAG<br>ATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCC |
|  | РНК<br>комплементарная<br>мутантной ДНК         | ACAAGAGUCAAAAGGACC UAAUACGGACCGUGGUA<br>UUCUUUUAUAGUAACCACAAAGGAUACUACUUAUAUC<br>UAUGUCUUCGCAGUAGUUUCGUACGG |
|  | РНК зеркально                                   | CCGUACGAAACUACUGCGAAGACAUAAGAUUAAGUAG<br>UAUCCUUUGUGGUUACUAUAAAAGAAUUACCACGG<br>UCCGUAAUAGGUCCUUUUGACUCUUGU |
|  | ключевой фрагмент<br>(5н. - выпадение -<br>6н.) | UAGUAACCACA   |
|  | ключевой фрагмент<br>зеркально                  | UGUGGUUACUA   |

Ответ: В качестве правильного ответа принималась любая последовательность РНК содержащая ключевой фрагмент, являющаяся частью полной последовательности РНК и имевшая длину от 11 до 50 символов.

В случае ввода в поле правильного ответа система выдавала сообщение «Вы правильно определили место произошедшей мутации и корректно выбрали участок для вырезания нуклеазой Cas9»

Неправильным считался ответ, содержащий участок верной последовательности РНК, но не содержащий ключевую последовательность. В этом случае участники получали следующее сообщение «На этапе тестов in vitro вы обнаружили, что ген CFTR действительно разрезается нуклеазой Cas9, однако участок с мутацией остается невырезанным. Вы или неверно определили место мутации, или неверно выбрали вырезаемую область».

Если ответ не совпадал с верной последовательностью, участники получали сообщение «На этапе тестов in vitro вы обнаружили, что целевая ДНК (ген CFTR) вообще не разрезается, вместо него разрезаются какие-то другие участки ДНК. Вы, вероятно, ошиблись с последовательностью и ваша система стала специфична к другой мишени».

### Задача “Муковисцидоз. Создание эффектора”

После того, как вы определили место мутации, вам необходимо написать последовательность РНК гидов, которые позволят Cas9 вырезать намеченный вами участок гена. Вам будет предложено 2 поля. В каждое из них нужно ввести последовательность той части гидовой РНК, комплементарность которой к ДНК будет проверять Cas9. Cas9 вносит двунитевой разрыв после третьего нуклеотида с 3'-конца узнаваемой последовательности ДНК.

Вводите последовательности, пожалуйста, заглавными латинскими буквами без пробелов, каких-либо еще знаков препинания, букв, цифр и пояснительных записок. Пример правильного введения: "UAGGCUAACU". Пример неправильного введения номер один: "u a g g c u a a c u". Пример неправильного введения номер два: "УАГГЦУААЦУ"

### Поля задачи и варианты ответов:

|            | Поле 1. Варианты ответа |  | Поле 2. Варианты ответа |  |
|------------|-------------------------|--|-------------------------|--|
| № варианта | Последовательность 1.   | Последовательность 1 в зеркальном виде | Последовательность 2    | Последовательность 2 в зеркальном виде |

|    |  |  |  |  |
|----|--|--|--|--|
| 1. | AGACAAGGA<br>GGAGAGAAA<br>UAAAUCGA<br>CCUGGUCUG<br>GUUAAAACU<br>CCUUUCU    | AGAAAAGGAGUU<br>UUAACCAGACCAG<br>GUCGAUUUUAUU<br>UCUCUCCUCCUUG<br>UCU  | GUUAAAACUCCU<br>UUUCUAUGUCUG<br>UCGCGGACCUUA<br>ACAGUCUGUAUA<br>UGGUUUAGGGAA<br>GACAA  | ACAUCCUCGUCACA<br>GGAGUGUUUUUUC<br>UCUCCGUAUUCGG<br>AUACGGAUCAUUU<br>AGCGCUAUCU    |
| 2. | UGUCGCGGA<br>CCUUAACAG<br>UCUGUAUUAU<br>GGUUUAGGG<br>AAGACAACU<br>AAGACAAC | GUUGUCUUAGUU<br>GUCUUCCCUIAAC<br>CAUAUACAGACUG<br>UUAAGGUCCGCGA<br>CA  | AAGACAACUAAG<br>ACAACUGUUAGA<br>UAGACUUUUUAA<br>CCUUUCCAUAACA<br>AGUACAUGUAAC<br>AAUUC | GGAUACGGAUCUAU<br>UUAGCGCUAUCUCG<br>CAAGGAGGAACAAU<br>AGGCCAGGCCUUC<br>GAUACUAAG   |
| 3. | AAACGUGUA<br>CGUUGAAUA<br>ACCAGGGUG<br>AAAAUAAG<br>AAAACGUCU<br>CUUACUCU   | AGAGUAAGAGAC<br>GUUUUCUUAUUU<br>UUCACCCUGGUUA<br>UUCAACGUACACG<br>UUU  | AAAACGUCUCUU<br>ACUCUAUCUCUC<br>GACCGAAGUUUC<br>UUUUUAGGAUUU<br>GAGUAAUUACGG<br>GAAGC  | GGGAUUUAUUAUUU<br>UUGUAAGGUUUCU<br>UGUAUUUAGAGGU<br>CUUUUUUGUAGUG<br>GCUUCCCGUAAUU |
| 4. | GUGUACGUU<br>GAAUAACCA<br>GGGUGAAAA<br>AUAAGAAAA<br>CGUCUCUUA<br>CCCUAUUC  | GAAUAGGGUAAG<br>AGACGUUUUCUU<br>AUUUUUCACCCUG<br>GUUAUUCACCGU<br>ACAC  | CGUCUCUACCC<br>UAUUCUCUCGAC<br>CGAAGUUUCUUU<br>UUAGGAUUUGAG<br>UAAUUACGGGAA<br>GCCGC   | GCGGCUUCCCGUAA<br>UUACUCAAAUCCUA<br>AAAAGAAACUUCGG<br>UCGAGAGAAUAGG<br>GUAAGAGACG  |
| 5. | UAUCUCUCG<br>ACCGAAGUU<br>UCUUUUUAG<br>GAUUUGACU<br>AAUUACGGG<br>AAGCCACU  | GGUUACUAUAAA<br>AGAAAUUACCACG<br>GUCCGUUUUAGG<br>UCCUUUUGACUCU<br>UGU  | AAUUACGGGAAG<br>CCACUACAAAAA<br>AGACCUCUAAAU<br>ACAAGAUACCUU<br>ACAAAAUAUAA<br>AUCCC   | GCUUCCCGUAAUUA<br>CUCAAUCCUAAAA<br>AGAAACUUCGGUCG<br>AGAGAUAGAGUAA<br>GAGACGUUUU   |
| 6. | UUCAGUGGU<br>UUCGUCAUG<br>UCGGAGAGA<br>AUGACCCUU<br>CUUAGUAUC<br>GAAGGCCU  | CCUGUGACAGGAG<br>UGUUUUUUCUCU<br>UCCGUUUUUCGGAU<br>ACGGAUCUAUUU<br>AGC | CUUAGUAUCGAA<br>GGCCUGGGCCUA<br>UUGUUCUCCUU<br>GCGAGAUAGCGC<br>UAAAUAGAUCCG<br>UAUCC   | GAUUUGUUACAUG<br>UACUUGUAUGGAA<br>AGGUUAAAAGUC<br>UAUCUAACAGUUGU<br>CUUAGUUGUCUU   |
| 7. | UAUCGAAGG<br>AUACUGGGC<br>CUAUUGUUC<br>CUCCUUGCG<br>AGAUAGCGC<br>UAAAUUGA  | UCAAUUUAGCGCU<br>AUCUCGCAAGGAG<br>GAACAAUAGGCC<br>AGUAUCCUUCGAU<br>A   | AGAUAGCGCUAA<br>AUUGAUCCGUAU<br>CCGAAUACGGAA<br>GAGAAUAACAC<br>UCCUGUGACGAG<br>GAUGU   | UUGUCUUCCCUAAA<br>CCAUAUACAGACUG<br>UUAAGGUCCGCGAC<br>AGACAUAGAAAAG<br>GAGUUUUAAC  |
| 8. | GCUAAAUAAG<br>AUCCGUUAC<br>CGAAUACGG<br>AAGAGAAAU<br>AACACUCCU<br>GUCACAGG | AGGCCUUCGAUAC<br>UAAGAAGGGUCA<br>UUCUCUCCGACAU<br>GACGAAACCACUG<br>AA  | AACACUCCUGUC<br>ACAGGAUGUGGG<br>UCGGUAAAACC<br>GGAAGUAGUGUA<br>ACCUUACGUCUA<br>CUCU    | CCGUACGAAACUAC<br>UGCGAAGACAUAGA<br>UAUAAGUAGUAUCC<br>UUUGUGGUUACUA<br>UAAAAGAAA   |
| 9. | ACAAGAGUC<br>AAAAGGACC   | AGUGGCUUCCCGU<br>AAUUAGUCAAAU  | UUUCUUUUUAUAG<br>UAACCACAAAGG  | AGAGUAGACGUAA<br>GGUUACACUACUUC  |

|   |                                      |  |  |
|---|--------------------------------------|--|--|
| UAAUACGGA<br>CCGUGGUA<br>UUUCUUUA<br>UAGUAACC | CCUAAAAAGAAAC<br>UUCGGUCGAGAG<br>AUA | AUACUACUUAUA<br>UCUAUGUCUUCG<br>CAGUAGUUUCGU<br>ACGG | CGGUUUUACCGAC<br>CCACAUCCUGUGAC<br>AGGAGUGUU |
|---|--------------------------------------|--|--|

Ответ: В качестве правильного ответа принималась последовательность РНК, длиной от 18 до 30 нуклеотидов, содержащая часть последовательности, указанной в таблице выше для соответствующего поля. В этом случае система выдавала следующее сообщение «На этапе тестов *in vitro* вы добились стабильного вырезания нужного участка гена CFTR - у вас действительно вырезается участок с мутацией. Вы верно подобрали гидовые РНК»

Неправильные ответы:

1. Введенные ответ не соответствует последовательности для соответствующего поля. Сообщение «На этапе тестов *in vitro* вы обнаружили, что ваша система с Cas9 не вырезает нужный участок, она вырезает фрагменты из других участков генома»

2. Последовательность короче 18 нуклеотидов. Сообщение: «На этапе тестов *in vitro* вы обнаружили высокую неспецифичную активность нуклеазы. Помимо целевого участка ваш Cas9 с вашей гидовой РНК разрезал и много других генов»

3. Последовательность длиннее 30 нуклеотидов. Сообщение: «На этапе тестов *in vitro* вы обнаружили, что гидовая РНК не полностью помещается в специализированный центр белка, остается небольшая лишняя часть. Кажется, длину гидовой РНК можно уменьшить, лишняя длина не играет роли.»

4. В последовательности появляется тимин вместо урацила (буква «Т»). Сообщение: «В РНК тимин заменен на урацил. В вашей же последовательности указан тимин. Поменяйте на урацил и попробуйте еще раз.»

### Задача “Муковисцидоз. Доставка эффектора”

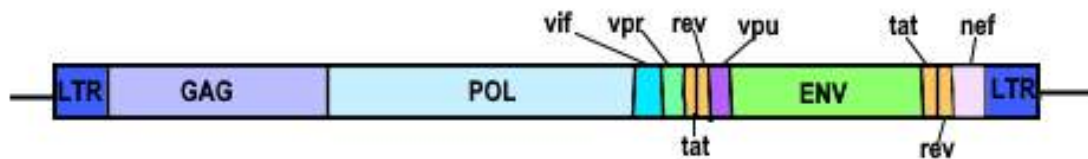
Самое главное в генной терапии - чтобы клетка не считала терапевтические молекулы чужеродными. Для этого она должна синтезировать их самостоятельно. Кроме того, когда речь идет о воздействии на ДНК, эффекторные молекулы, само собой, должны попасть в ядро. Транспорт через ядерную мембрану сложный и адаптировать молекулы лекарства для транспорта в ядро непростая задача. Эта и многие другие проблемы, возникающие при попытке ввести в клетку Cas9, гидовую РНК и ДНК “нормального” гена, решаются с помощью вирусных векторов.

**Вирусные векторы** - это биотехнологически получаемые структуры, имитирующие в организме человека поведение настоящей вирусной частицы, но не вызывающие при этом инфекционный процесс. В их состав входят: белки, формирующие оболочку вирусной частицы, способную к узнаванию клеток-мишеней и к проникновению в цитоплазму; и трансген-экспрессирующая часть, осуществляющая после доставки в клетку длительную экспрессию одного или нескольких генов.

В рамках задачи по доставке эффекторной системы в клетку мы предлагаем вам **сконструировать лентивирусный вектор**. Лентивирусы - разновидность ретровирусов. Их геном представлен одноцепочечной молекулой РНК, в клетке подвергается обратной транскрипции и встраивается в определенные места генома. Лентивирусные вектора способны заражать даже неделящиеся клетки, что для генной терапии такого заболевания как муковисцидоз очень важно.

Геном лентивируса включает в себя два концевых повтора (LTR), гены структурных белков gag, pol и env, и гены шести регуляторных белков, названных tat, rev, vpr, vrn, nef и vif. В геном инфицированной клетки попадает то, что находится между двумя LTR. Гены отдельных белков могут быть убраны из генома вируса без снижения его способности к

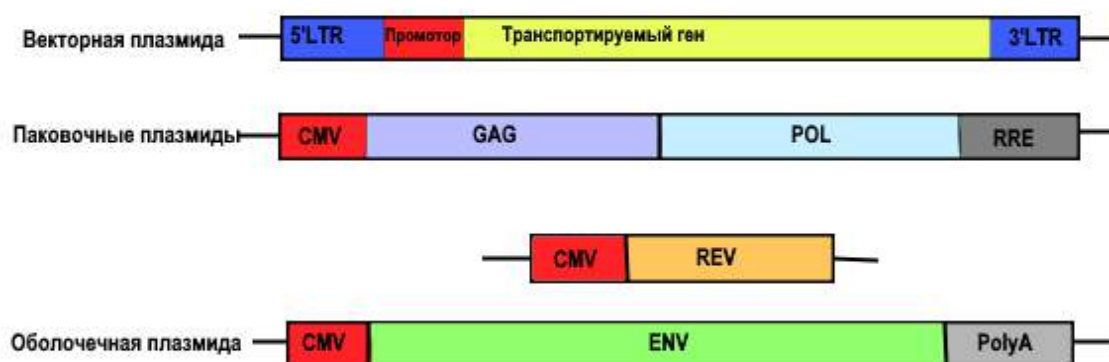
размножению и инфицированию клеток, именно это и делается при создании лентивирусного вектора. Схема строения генома лентивируса представлена на рис.1.



**Рис.1.** Схема строения генома лентивируса. Gag образует корпус (сердцевину вируса), Pol - ферменты вируса, обеспечивающие интеграцию в геном, Env - белки оболочки.

Сборка (упаковка) лентивирусного вектора происходит в так называемых упаковывающих клетках, восприимчивых к трансфекции. Упаковывающая система таких клеток включает, минимум, три типа экспрессируемых кассет (упаковывающая, векторная и оболочечная), ни одна из которых без участия других кассет не может «собрать» вирусную частицу, способную проникать в клетку-мишень. Кассеты вводятся в клетки в виде плазмид. В плазмиды вставляют промоторы для экспрессии генов, часто используется промотор от цитомегалловируса (CMV). Введенная в упаковывающие клетки упаковывающая кассета экспрессирует гены, необходимые для формирования инфицирующей вирусной частицы. Но из кассеты исключен ген env, кодирующий белки-предшественники оболочки (Env), определяющие его способность выходить за пределы клетки. Самые современные упаковывающие системы включают обычно две плазмиды: одна кодирует Gag- и Gag-pol-белки; вторая - Rev-белок (избирательно активирует синтез структурных белков вируса и обеспечивает транспорт из ядра длинных молекул вирусной РНК).

Векторная плазида содержит трансген-экспрессирующую кассету с геном, предназначенным для экспрессии в новом хозяине. Для формирования оболочки векторной вирусной частицы в систему включен оболочечный вектор. Он содержит кассету, определяющую синтез гликопротеинов оболочки вируса. Схема устройства упаковывающей системы показана на рис.2.



**Рис.2.** Схематическое изображение общего плана строения плазмид упаковывающей системы вируса. LTR - длинные концевые повторы, CMV - цитомегалловиральный промотор, RRE (Rev Response Element) - последовательность, с которой связывается белок Rev, PolyA - полиадениновая последовательность

В результате такого разделения на плазмиды получается «одноразовый» вирус. Ген белка оболочки не попадает в РНК вируса и вирус не способен размножаться после инфицирования клеток пациента.

При создании вектора, кроме тех генов, которые мы хотим туда вставить, нам нужна еще система отбора клеток, в которых успешно пошла трансфекция. Чаще всего эту функцию берут на себя встраиваемые в плазмиду гены устойчивости к антибиотикам. Еще одним распространенным, но не универсальным способом является создание химерных белков - к гену белка, который будет экспрессировать в данной системе, добавляется последовательность какого-либо флуоресцентного белка. Получается гибрид, накопление которого в клетке можно легко отследить.

**В рамках задачи о доставке** вашей эффекторной системы вам предстоит корректно спроектировать и получить лентивирусный вектор. Разработанный вектор должен доставлять в клетку всё необходимое и обеспечивать экспрессию доставленных генов.

Вам будет нужно распределить ключевые элементы по плазмидам и показать понимание самого процесса получения плазмид.

Указание участникам: «В предыдущей задаче вы получили последовательности ваших гидовых РНК. Последовательность гена Cas9, оптимизированная под кодоновый состав эукариот есть в открытых международных базах данных, поэтому в рамках данной задачи мы считаем, что у вас она тоже есть. Вам предстоит создать векторную плазмиду для паковочной системы лентивируса и затем указать, что же в итоге окажется в геноме лентивируса, который будет использоваться для инфекции пациента. Лентивирусная векторная система стандартна по некоторым компонентам, в частности паковочные плазмиды и оболочечная плаزمиды одинаковы для любой векторной плазмиды, поэтому в рамках данной задачи мы будем предполагать, что эти плазмиды у вас уже есть в готовом виде. Стремитесь к оптимальности - в плазмидах не должно быть ничего лишнего, так как емкость лентивирусного вектора ограничена»

**Поля задачи, варианты ответов, верные и неверные ответы:**

| Поле   | Варианты ответа | Вариант отмечен как верный   | Вариант не отмечен  | Качество полученной системы, модификатор от 100% |
|--|-----------------|--|---------------------|--|
| 1. В какой системе будет осуществляться сборка частиц вируса | E.coli          | Вы трансфецировали ваши клетки, но сборки вируса не произошло. Лентивирусы предназначенные для млекопитающих не собираются в бактериях | успех               |  |
|  | S.cerevisiae    | Вы трансфецировали ваши клетки, но сборки вируса не произошло. Лентивирусы предназначенные для млекопитающих не собираются в дрожжах   | успех               |  |
|  | Гибридомы       | успех  | Один из 2 вариантов |  |

|  | человеческих клеток   |   | выше  |     |
|--|-----------------------|---|-------|-----|
| 2. Какие функциональные элементы войдут в состав вашей векторной плазмиды (Можно выбрать любое количество ответов) | Ген POL               | Вы внесли в клетки человека POL - элемент для репродукции вирусного генома. Это еще не делает его полноценным вирусом, но уже переводит в разряд потенциально небезопасных  | успех |     |
|  | Ген GAG               | В вашей векторной плазмиде есть все необходимое, но и некоторые лишние элементы, дублирующиеся в паковочных и оболочечной плаزمиде. Такие гены как GAG, REV, ENV, сайт узнавания REV могут быть помещены в векторную плазмиду, если окажутся не между двух LTR, а как бы снаружи. Тем не менее, эти гены в данной плазмиде не нужны, делают её очень большой. | успех | -25 |
|  | Промотор для гена REV | В вашей векторной плазмиде есть все необходимое, но и некоторые лишние элементы, дублирующиеся в паковочных и оболочечной плаزمиде. Такие гены как GAG, REV, ENV, сайт узнавания REV могут быть помещены в векторную плазмиду, если окажутся не между двух LTR, а как бы снаружи. Тем   | успех | -25 |



|  |   |   |   |  |
|--|---|---|---|--|
|  |   | не менее, эти гены в данной плазмиде не нужны, делают её очень большой.   |   |  |
|  | сайт начала репликации (Origin)           | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Ваша плазида не нарабатывается в бактериальных системах. Она не начинает репликацию.  |  |
|  | ген устойчивости к пуромицину             | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Как правило, клетки после трансфекции выращивают на среде с антибиотиком для отбора тех, в ком успешно прошла трансфекция. Все ваши клетки умерли |  |
|  | ген устойчивости к хлорамфениколу         | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Как правило, клетки после трансфекции выращивают на среде с антибиотиком для отбора тех, в ком успешно прошла трансфекция. Все ваши клетки умерли |  |
|  | ген Cas9                                  | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Вы не вставили в вектор для переноса обязательный элемент системы CRISPR/Cas9   |  |
|  | LTR                                       | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Ваши вирусные частицы не собрались  |  |
|  | гены гидовых РНК                          | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Вы не вставили в вектор для переноса обязательный элемент системы CRISPR/Cas9   |  |
|  | промотор общий для Cas9 и для гидовых РНК | Одного промотора на два гена для эукариот мало. Второй ген экспрессироваться не будет, поэтому, если попытаться поставить под один промотор | успех   |  |

|  |   |   |   |    |
|--|---|---|---|----|
|  |   | гены гидовых РНК и Cas9, вся система работать не будет.   |   |    |
|  | промотор для Cas9                                   | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Белок Cas9 не экспрессировался в клетках человека   |    |
|  | промотор для гидовых РНК                            | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | Гидовые РНК не синтезировались в клетках человека   |    |
|  | последовательность участка связывания белка REV     | В вашей векторной плазмиде есть все необходимое, но и некоторые лишние элементы, дублирующиеся в паковочных и оболочечной плаزمиде. Такие гены как GAG, REV, ENV, сайт узнавания REV могут быть помещены в векторную плазмиду, если окажутся не между двух LTR, а как бы снаружи. Тем не менее, эти гены в данной плазмиде не нужны, делают её очень большой. | успех   | -5 |
|  | сайты узнавания эндонуклеаз                         | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка пройдет успешно   | При попытках ввести в плазмиду новый элемент, вы обнаружили, что не знаете, в какое место вектора произойдет вставка. Для правильной вставки плазмиды разрезается по сайту узнавания конкретной нуклеазы. |    |
|  | немутированная последовательность участка гена CFTR | В вашей векторной плазмиде есть всё, что нужно и ничего лишнего. Сборка   | При тестах на культуре клеток человека вы обнаружили, что   |    |

|  |                  |   |   |  |
|--|------------------|---|---|--|
|  |                  | пройдет успешно   | происходят частые сбои в репации гена           |  |
| 3. Что в итоге окажется в геноме лентивирусной частицы, применяемой для пациента? (Можно выбрать любое количество ответов) | Ген GAG          | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего   | Не произошло интеграции в генов клетки человека |  |
|  | Ген POL          | Чем меньше в геноме вируса осталось от того, чтобы он мог размножаться в клетке, тем лучше. Вставкой таких генов, как pol, env, rev, вы делаете систему менее безопасной (задача считается не решенной) | успех   |  |
|  | Ген ENV          | Чем меньше в геноме вируса осталось от того, чтобы он мог размножаться в клетке, тем лучше. Вставкой таких генов, как pol, env, rev, вы делаете систему менее безопасной (задача считается не решенной) | успех   |  |
|  | Ген REV          | Чем меньше в геноме вируса осталось от того, чтобы он мог размножаться в клетке, тем лучше. Вставкой таких генов, как pol, env, rev, вы делаете систему менее безопасной (задача считается не решенной) | успех   |  |
|  | LTR              | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего   | Не произошло интеграции в генов клетки человека |  |
|  | гены гидовых РНК | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для   | У вас неполный набор обязательных для системы   |  |

|  |                                 |  |   |    |
|--|---------------------------------|--|---|----|
|  |                                 | терапевтического эффекта и нет ничего лишнего  | CRISPR/Cas9 элементов. Ваш препарат не оказывает терапевтического эффекта   |    |
|  | ген Cas9                        | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего  | У вас неполный набор обязательных для системы CRISPR/Cas9 элементов. Ваш препарат не оказывает терапевтического эффекта         |    |
|  | промоторы для гидовых РНК       | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего  | У вас неполный набор обязательных для системы CRISPR/Cas9 элементов. Ваш препарат не оказывает терапевтического эффекта         |    |
|  | промотор для Cas9               | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего  | У вас неполный набор обязательных для системы CRISPR/Cas9 элементов. Ваш препарат не оказывает терапевтического эффекта         |    |
|  | сайты узнавания эндонуклеаз     | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего  | Вы специально не вводили сайты узнавания рестриктаз в геном вируса, однако, так как они были в плаزمиде, они не могли исчезнуть |    |
|  | сайт начала репликации (Origin) | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта, но есть и лишние элементы, ненужные для терапевтического эффекта. Постарайтесь | успех   | -5 |

|  |                                   |  |       |     |
|--|-----------------------------------|--|-------|-----|
|  |                                   | избавиться от всего, что нужно для репродукции плазмиды в бактериях, отбора бактерий с плазмидами, отбора линии пакующих человеческих клеток, в которых успешно прошла трансфекция (задача считается решенной, снижается качество продукта)  |       |     |
|  | ген устойчивости к пуромицину     | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта, но есть и лишние элементы, ненужные для терапевтического эффекта. Постарайтесь избавиться от всего, что нужно для репродукции плазмиды в бактериях, отбора бактерий с плазмидами, отбора линии пакующих человеческих клеток, в которых успешно прошла трансфекция (задача считается решенной, снижается качество продукта) | успех | -10 |
|  | ген устойчивости к хлорамфениколу | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта, но есть и лишние элементы, ненужные для терапевтического эффекта. Постарайтесь избавиться от всего, что нужно для репродукции  | успех | -10 |

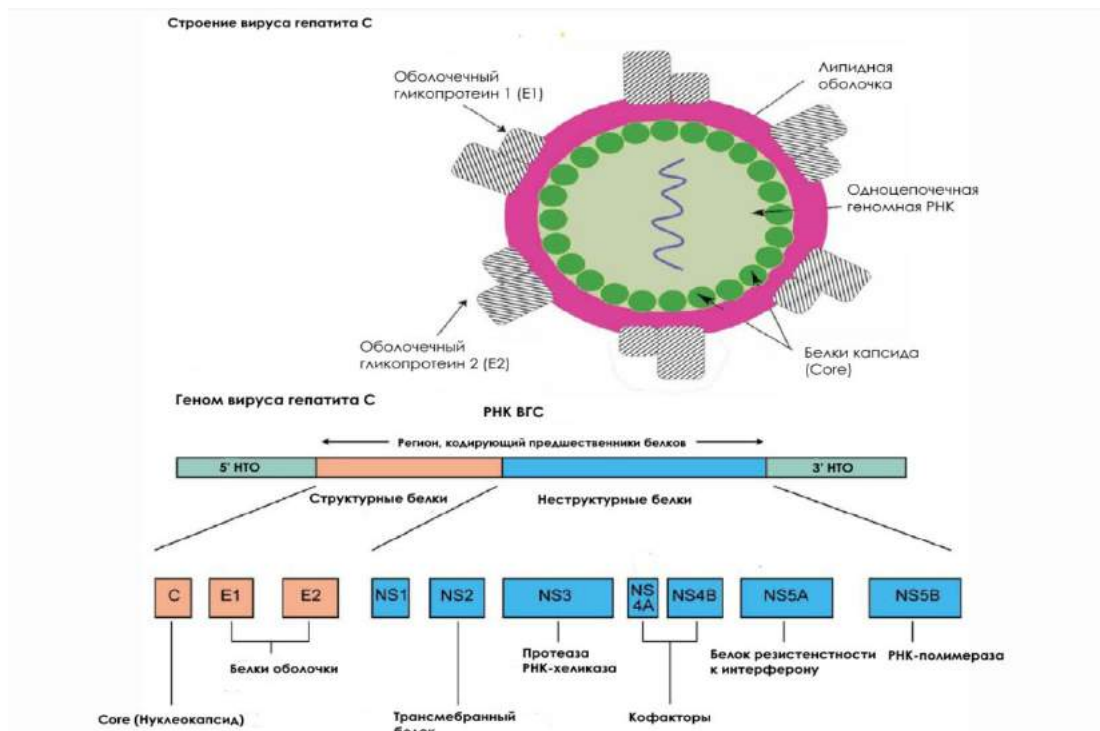
|  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
|  |  | плазмиды в бактериях, отбора бактерий с плазмидами, отбора линии пакующих человеческих клеток, в которых успешно прошла трансфекция (задача считается решенной, снижается качество продукта) |   |  |
|  | немутированная последовательно сть участка гена CFTR | В геноме ваших вирусных частиц есть все необходимое для терапевтического эффекта и нет ничего лишнего  | При тестах на культуре клеток человека вы обнаружили, что происходят частые сбои в репарации гена |  |

### Линейка задач «Гепатит С».

Для решения данной задачи вам понадобится знание некоторой теории о вирусе, иммунном ответе на вирусную инфекцию и современных методах работы с нуклеиновыми кислотами и белками. При внимательном прочтении теории вы сможете сделать верные выводы и, соответственно, правильный выбор при решении задачи. Тем не менее, нужно понимать, что в данном пособии написано лишь минимально необходимое для решения, более полно поднятые здесь темы вы можете изучить самостоятельно.

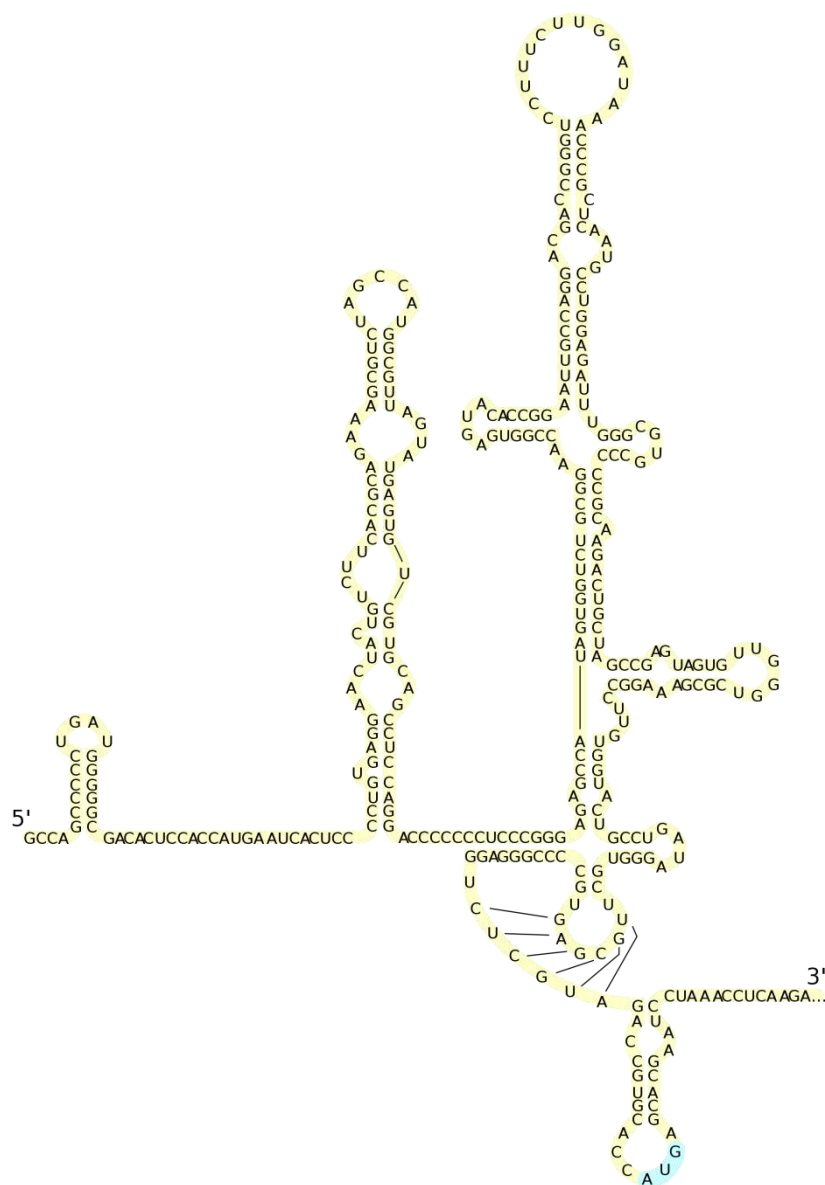
#### Вирус гепатита С.

Вирус гепатита С (ВГС) является членом семейства Flaviviridae. Это небольшой, состоящий из оболочки, нуклеокапсида и одноцепочечной РНК вирус. Оболочка состоит из липидов мембраны хозяина и белков оболочки: E1 и E2. Нуклеокапсид образован белком Core. РНК кодирует один полипротеин, превращающийся с помощью протеаз в функциональные белки. В геноме ВГС выделяют 3 зоны: 5'-нетранслируемую область; регион, кодирующий белки, которые в свою очередь делят на структурные и неструктурные; 3'-нетранслируемую область. К структурным белкам относятся белки Core, E1, E2. Неструктурные белки это белки, которые обеспечивают репликацию (размножение) вируса в клетке. К ним относятся белки NS1, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Строение вируса гепатита С и его генома схематично представлено на рис. 1.



**Рис.1.** Схема строения вириона ВГС и его генома. Подписаны основные (но не все) функции неструктурных белков. Взято из [1] с изменениями.

5'-концевой участок генома ВГС содержит IRES — Internal Ribosome Entry Site (участок внутренней посадки рибосомы). IRES — элемент, обеспечивающий связывание рибосомы хозяина с вирусной РНК для начала трансляции. Структура IRES ВГС представлена на рисунке 2. IRES представляет собой особым образом уложенную РНК. РНК в такой структуре образует структуры, которые называют шпильками (две «цепочки-ножки» комплементарно связанные друг с другом и головка).



**Рис.2.** Структура IRES вируса гепатита С.

Для IRES-элементов важно, прежде всего, сохранение пространственной структуры. Если данный участок РНК изменит свою структуру (например, потеряет одну из шпилек), то уже не сможет выполнять свою функцию и синтез вирусных белков с данной РНК остановится. 5'-нетранслируемая область одна из наиболее консервативных (наименее подверженных эволюционным изменениям и наиболее одинаковых у разных штаммов) областей генома ВГС.

IRES, таким образом, можно использовать в качестве мишени для ингибирования синтеза вирусных белков. Комплементарные участкам IRES короткие РНК, называемые короткими интерферирующими РНК, связываясь с ним, останавливают трансляцию генома вируса. Способность IRES ВГС связываться с рибосомой могут также ингибировать некоторые клеточные белки, пептиды и витамин В12.

Заключительный элемент генома – 3'-концевая НТО – участвует в инициации репликации, в регуляции трансляции и стабилизации геномной РНК.

Оболочечные гликопротеины и их функции.

Белки Е1 и Е2 попадают в оболочку вируса на той стадии, когда в клетке-хозяине формируется мембрана вирусных частиц. Эти белки пронизывают мембрану насквозь и содержат углеводные остатки (почему их и называют гликопротеинами). Основные функции этих белков – взаимодействие с рецепторами и обеспечение проникновения вирусного генома в цитоплазму клетки.



В белке E2 найдено три участка с очень высокой частотой аминокислотных замен, это гипервариабельные регионы (ГВР). Благодаря аминокислотной изменчивости всех трех гипервариабельных регионов гликопротеина E2 формируются так называемые ускользающие варианты вируса, т.е. такие, на которые в данный момент нет иммунного ответа.

Еще одна особенность оболочечного белка E2 – наличие участков полипептидной цепи, имеющих сходство с другими белками. Это явление называют молекулярной мимикрией. Благодаря этому сходству ВГС может останавливать противовирусное действие интерферона-альфа.

Белок нуклеокапсида и его функции.

Нуклеокапсидный протеин (сердцевинный белок, core) образуется первым среди всех вирусных белков в процессе биосинтеза, он отщепляется от полипротеина с помощью сигнальных пептидаз клетки.

Этот белок формирует вирусный нуклеокапсид, инициирует упаковку РНК ВГС и сборку оболочки вируса. Среди всех белков ВГС Core отличается самым высоким содержанием консервативных зон в первичной структуре. Сердцевинный белок является одним из наиболее иммуногенных антигенов ВГС.

Неструктурные белки и их функции.

Основная биологическая функция белка NS2 – выщепление протеазы ВГС (NS3). Для ее выполнения белок NS2 формирует комплекс с участком полипротеина, соответствующим белку NS3.

NS3 обладает двумя важными ферментативными активностями: протеазной и хеликазной/нуклеотидтрифосфатазной. Благодаря протеазной активности от полипротеина ВГС отщепляются все неструктурные белки кроме протеина NS2. Хеликазная/нуклеотидтрифосфатазная активность необходима для АТФ-зависимого раскручивания высокоупорядоченных участков и разъединения комплексов РНК. Кроме этих функций белок NS3 вместе с полипептидом NS4A участвует в блокировке клеточной противовирусной защиты. Для появления протеазной активности белку NS3 необходим кофактор, в роли которого выступает полипептид NS4A ВГС.

Белок NS4B имеет трансмембранное расположение, зоны с консервативной первичной структурой, а также формирует специальную мембранно-ассоциированную платформу для репликативного комплекса ВГС, что и является главной функцией этого белка.

Белок NS5A играет роль ключевого регулятора репликации. Этот протеин ассоциирован с мембранами клетки-хозяина. Кроме того, для него есть данные об участии в подавлении клеточного противовирусного ответа. Белок NS5A существует в виде двух форм с гипо- и гиперфосфорилированием, гиперфосфорилированный белок NS5A снижает репликацию РНК ВГС. Баланс двух форм белка, таким образом, контролирует репликацию ВГС.

Белок NS5B обладает активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы, способной инициировать синтез РНК как с использованием праймера, так и без него. Белок NS5B связан с мембранами ЭПР через С-концевой трансмембранный домен. Белок NS5B один из наиболее консервативных белков ВГС.

Репликации РНК ВГС предшествует образование репликативного комплекса. Считается, что сначала с помощью белка NS4b формируется платформа, на которой начинает собираться репликативный комплекс. В состав этого комплекса входят вирусные белки NS5A, NS3–NS4A, NS5B.

Вирус гепатита С и иммунная реакция человека

Вирус гепатита С инфицирует человека, если попадает в кровь, на поврежденные кожные или слизистые покровы. Он может передаваться при половых контактах, от матери к ребенку при родах и очень редко при беременности, если происходит повреждение

околоплодных оболочек. Исход острого гепатита С определяется реакцией иммунной системы организма-хозяина и тактикой размножения ВГС. Традиционно ключевая роль в борьбе вирус – хозяин отводилась скорости размножения патогена. Но ВГС, как и некоторые другие вирусы, продемонстрировал еще одну возможность – представление иммунной системе набора неоднородных по антигенной структуре вариантов вируса, которые еще и постоянно обновляются в каждом последующем вирусном потомстве. Такая тактика называется ускользанием от иммунного ответа. У ВГС эта вариабельность реализуется в основном за счет белков E1 и E2.

Инкубационный период вирусного гепатита С варьирует от 2 до 26 недель, в среднем составляя 6-12 недель. РНК ВГС определяется в крови на 1-3-й неделе заболевания. При симптомной острой ВГС-инфекции анти-ВГС антитела определяются только у 50-70% пациентов, у остальных анти-ВГС антитела появляются через 3-6 нед после инфицирования. В ряде случаев при патологиях иммунитета (например, связанными с ВИЧ) антитела могут не вырабатываться. После пройденного успешного курса лечения у пациентов еще несколько недель или месяцев сохраняются в крови анти-ВГС антитела.

#### Противовирусный иммунитет человека

У человека нет видового иммунитета к ВГС. Важную роль в защите от вирусов играет воспалительная реакция, направленная на ограничение распространения вирусов в организме. При этом помимо клеток крови (макрофагов, естественных киллеров) противовирусный эффект оказывают такие универсальные реакции на внедрение вирусов, как общее или локальное повышение температуры и увеличение кислотности среды.

Приобретенный противовирусный иммунитет определяется сочетанием специфических факторов (иммуноглобулинов, В- и Т-лимфоцитов) и факторов неспецифической (естественной) устойчивости (воспалительной реакции, интерферонов, противовирусных ингибиторов, естественных киллеров, макрофагов и др.).

Интерфероны — важнейшие факторы неспецифической резистентности. Практически все вирусы обуславливают выработку интерферонов, их образование является одной из первых защитных реакций организма на внедрение вирусов. Интерфероны в отличие от антител подавляют внутриклеточные этапы репродукции вирусов в зараженных клетках и обеспечивают невосприимчивость к вирусам окружающих здоровых клеток.

Факторы неспецифической резистентности в сочетании с медиаторами воспаления способны разрушать инфицированные вирусами клетки. Если этого не происходит и вирусы размножаются, наступает вторая (специфическая) стадия противовирусного иммунитета, связанная с продукцией вируснейтрализующих антител В-лимфоцитами и активацией регуляторных Т-лимфоцитов (Т-хелперов, Т-супрессоров, цитотоксических лимфоцитов).

#### Подавление иммунного ответа вирусом гепатита С

ВГС может активно подавлять интерферон-опосредованный антивирусный клеточный ответ на различных этапах, начиная с рецепторов клетки, распознающих вирусную РНК, и закачивая ингибированием рецепторов интерферона, опосредующих антивирусный клеточный ответ. Вирусные белки E2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и Core на разных этапах блокируют интерферон-опосредованный ответ клетки.

При хронической инфекции РНК ВГС в течение длительного времени циркулирует в крови у многих пациентов с хроническим заболеванием, несмотря на наличие у них специфических антител. Это связано, в том числе, и с тем, что антитела, в связи с изменчивостью вируса могут оказаться недостаточно эффективными.

Интерфероны – важные молекулы противовирусного ответа

Интерфероны – это группа белков, которую объединяют по признаку антивирусной активности по отношению к разным вирусам, опосредованной метаболическими процессами клетки на уровне экспрессии генов. Интерфероны, вырабатываемые клетками человека, классифицируют по типу клеток, которые их выделяют:

Интерферон (ИТФ) альфа (вырабатывается лейкоцитами);

Интерферон (ИТФ) бета (вырабатывается клетками соединительной ткани – фибробластами);

Интерферон (ИТФ) гамма (вырабатывается лимфоцитами, макрофагами и природными киллерами).

Интерфероны не могут напрямую уничтожать вирусы, они лишь воздействуют на экспрессию интерферон-зависимых генов. В их число входят и белки, препятствующие репликации вируса, и белки, вызывающие гибель зараженной клетки.

## **Методическое пособие по решению линейки задач «Лекарство от гепатита С»**

### **Задача “Диагностика гепатита С”**

Вам предоставлены пробы крови нескольких человек. Необходимо определить, заражены ли эти люди гепатитом С.

Помните, что ошибка диагностики может стоить упущенного времени для лечения, а, возможно, и жизни. Тем не менее высокая стоимость продукта может оттолкнуть потенциального покупателя (учреждения здравоохранения). Вашу систему диагностики проверят на 100 пробах. Кроме того, для этих проб мы ввели некие параметры, которые отражают реальные факторы, которые могут помешать точности вашей диагностики. В природе выделяют порядка десятка различных генотипов вируса гепатита С, которые в большей или меньшей степени отвечают на те или иные виды терапии. Кроме того, генотипы вируса как правило специфичны для различных географических районов. В рамках этой задачи мы не вводим различий между генотипами.

При попадании в организм вирус вызывает иммунную реакцию. Иммунная реакция развивается не мгновенно, а в течение нескольких недель. Наиболее явным её признаком является наличие антител к белкам вируса в крови человека. Антитела вырабатываются к определенным характерным участкам белков вируса - эпитопам. К одному и тому же белку могут вырабатываться антитела специфичные к разным его участкам. Вирус гепатита С стремится стать невидимым для нашей иммунной системы, для этого некоторые его белки содержат постоянно изменяющиеся области, в результате чего, антитела их не узнают. Существует ряд состояний, когда антитела не вырабатываются, и вариант, когда антитела есть, а пациент уже не болен.

РНК вируса появляется в крови больного намного раньше, чем антитела. Диагностика на основе РНК вируса сложнее и требует большей квалификации. Кроме того, она, как и диагностика основывающаяся на антителах, имеет свой предел точности, зависящий от того, какую именно методику работы с РНК вируса вы выберете.

Для разработки метода диагностики вам необходимо решить, к чему будет чувствителен ваш тест - к антителам к вирусу или непосредственно к РНК самого вируса. Оба эти варианта имеют свои плюсы и минусы.

Далее нужно определиться с тем, каким методом в каком его варианте вы работаете с выбранными агентом.

Для разработки метода, основанного на детекции антител, вам необходимо иметь представления о том, что такое **иммуноферментный анализ**. Для работы с РНК потребуется знать о **полимеразной цепной реакции** и ее модификациях для работы с РНК. После подбора метода, вам понадобится указать, откуда вы собираетесь получать некоторые необходимые для его реализации компоненты. Для этого нужно иметь представление о **химических и бактериальных системах синтеза белка**.

Ознакомительные материалы по всем перечисленным выше методам собраны в тексте **“Общие сведения о методах молекулярной биологии.”**

В случае успешного прохождения вашей методикой лабораторных и клинических испытаний, вам будет предложено зарегистрировать разработку. После этого вы получите оценку качества вашего метода диагностики и сможете использовать его в дальнейшем для создания лекарственного комплекса.

### Задача “Диагностика гепатита С” в симуляторе

Поля задачи и варианты ответов

| Поле 1го порядка                                 | Значение   | Поле 3го порядка   | Значение   | Поле 5го порядка                  | Значение   | Поле 7го порядка                    | Значение |
|--|--|--|--|-----------------------------------|--|-------------------------------------|----------|
| На чем будет основана диагностика?               | Антитела к вирусу                                      | К продукту какого/каких генов антитела (множественный выбор) | Core (C)   |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | NS3  |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | NS4A,  |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | NS4B   |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | NS5  |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | E1   |                                   |  |                                     |          |
|  |  | E2   |  |                                   |  |                                     |          |
|  | Какой метод работы с антителами и будете использовать? | Гетерогенный иммуноферментный анализ                         | Что будет иммобилизовано на твердой подложке?    | Способ получения антигенов вируса | Антигены вируса                                  | Прямое выделение из вирусных частиц |          |
|  |  |  |  |                                   | Антитела к вирусу из крови                       |                                     |          |
|  |  |  |  |                                   | Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях |                                     |          |
|  |  |  |  |                                   | Прямой химический синтез пептидов                |                                     |          |
|  |  |  |  |                                   | Прямое выделение из вирусных частиц              |                                     |          |
| Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях |  |  |  |                                   |  |                                     |          |
| Хемилюминисцентный иммуноанализ                  |  | Способ получения антигенов вируса                            | Прямое выделение из вирусных частиц              |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях |                                   |  |                                     |          |
|  |  |  | Прямой химический синтез пептидов                |                                   |  |                                     |          |
|  | Рекомбинантн   |  |  |                                   |  |                                     |          |

|                   |  |   |   |                                 |                                 |      |    |    |     |      |      |     |                              |                   |                         |                       |   |   |   |   |                                    |                                    |      |  |   |                   |      |
|-------------------|--|---|---|---------------------------------|---------------------------------|------|----|----|-----|------|------|-----|------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|---|---|---|---|------------------------------------|------------------------------------|------|--|---|-------------------|------|
|                   |  |   | ый<br>иммуноблот-<br>анализ (RIBA)  |                                 |                                 |      |    |    |     |      |      |     |                              |                   |                         |                       |   |   |   |   |                                    |                                    |      |  |   |                   |      |
| РНК<br>вирус<br>а | Определе<br>ние РНК<br>вируса в<br>крови<br>основано<br>на | Гибридизации<br>без<br>амплификаци<br>и выбранного<br>участка | Каким<br>участкам<br>РНК<br>вируса<br>будут<br>комплеме<br>нтарны<br>зонды?<br>(множеств<br>енный<br>выбор) | 3'-<br>нетранслиру<br>емая зона | 5'-<br>нетранслиру<br>емая зона | Core | E1 | E2 | NS3 | NS4A | NS4B | NS5 | Метод<br>детекции<br>сигнала | Флюоресцен<br>ция | Радиоактивн<br>ая метка | Хемилюмин<br>исценция |   |   |   |   |                                    |                                    |      |  |   |                   |      |
|                   |  |   |   |                                 |                                 |      |    |    |     |      |      |     |                              |                   |                         |                       | Амплификаци<br>и выбранного<br>участка и<br>последующей<br>гибридизации | Ваша<br>система<br>диагности<br>ки будет<br>позволять | Качественно<br>е<br>определение<br>РНК вируса | Какая часть<br>РНК вируса<br>будет<br>амплифицир<br>оваться?<br>(множествен<br>ный выбор) | 3'-<br>нетрансли<br>руемая<br>зона | 5'-<br>нетрансли<br>руемая<br>зона | Core | Гены<br>структурн<br>ых белков<br>(E1, E2) | Один из<br>генов<br>неструктур<br>ных<br>белков<br>(NS) | Какой<br>основной | кДНК |

|  |  |  |  |  |   |   |
|--|--|--|--|--|---|---|
|  |  |  |  |  | конечный продукт амплификации вы хотите получить?   | РНК   |
|  |  |  |  |  | Амплификация в случае РНК всегда начинается одинаково. Образуется гибрид РНК и кДНК. Что будет в вашей методике происходить дальше? | Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК<br>Невысокие температуры и ферментативное расщепление РНК |
|  |  |  |  |  | В нескольких полях ниже выберите из списка нужные вам ферменты (полес множественным выбором)  | ДНК-зависимая-ДНК-полимераза  |
|  |  |  |  |  |   | Обратная транскриптаза  |
|  |  |  |  |  |   | РНК-полимераза  |
|  |  |  |  |  |   | Лигаза  |
|  |  |  |  |  |   | Эндонуклеаза  |
|  |  |  |  |  |   | Экзонуклеаза  |
|  |  |  |  |  |   | РНКаза Н  |
|  |  |  |  |  | Термостабильная протеаза  |   |
|  |  |  |  |  | Сколько различных праймеров вам понадобится?  | Один  |
|  |  |  |  |  |   | Два   |
|  |  |  |  |  |   | Три   |
|  |  |  |  |  |   | Четыре  |
|  |  |  |  |  | Праймеры какой примерно   | 5-10 нуклеотидов  |

|  |  |  |  |  |   |   |  |
|--|--|--|--|--|---|---|--|
|  |  |  |  |  |   | длина вы будете использовать?   | 10-15 нуклеотидов  |
|  |  |  |  |  |   |   | 15-25 нуклеотидов  |
|  |  |  |  |  |   |   | 25-35 нуклеотидов  |
|  |  |  |  |  |   |   | 35-50 нуклеотидов  |
|  |  |  |  |  |   |   | более 50 нуклеотидов   |
|  |  |  |  |  | .Количественное и качественное определение РНК вируса | Какая часть РНК вируса будет амплифицироваться? (множественный выбор) | Весь геном вируса  |
|  |  |  |  |  |   |   | 3'-нетранслируемая зона  |
|  |  |  |  |  |   |   | 5'-нетранслируемая зона  |
|  |  |  |  |  |   |   | Core   |
|  |  |  |  |  |   |   | Гены структурных белков (E1, E2)                               |
|  |  |  |  |  |   |   | Один из генов неструктурных белков (NS)                        |
|  |  |  |  |  |   |   | В нескольких полях ниже выберите из списка нужные вам ферменты |
|  |  |  |  |  | ДНК-зависимая-ДНК-полимераза                          |   |  |
|  |  |  |  |  | Обратная транскриптаза                                |   |  |
|  |  |  |  |  | РНК-полимераза  |   |  |
|  |  |  |  |  | Лигаза  |   |  |

|  |  |  |  |  |   |                                   |   |
|--|--|--|--|--|---|-----------------------------------|---|
|  |  |  |  |  |   | Эндонуклеаза                      |   |
|  |  |  |  |  |   | Экзонуклеаза                      |   |
|  |  |  |  |  |   | РНКаза Н                          |   |
|  |  |  |  |  |   | Термостабильная протеаза          |   |
|  |  |  |  |  | Сколько различных праймеров вам понадобится?          | Один                              |   |
|  |  |  |  |  |   | Два                               |   |
|  |  |  |  |  |   | Три                               |   |
|  |  |  |  |  |   | Четыре                            |   |
|  |  |  |  |  | Праймеры какой примерно длины вы будете использовать? | 5-10 нуклеотидов                  |   |
|  |  |  |  |  |   | 10-15 нуклеотидов                 |   |
|  |  |  |  |  |   | 15-25 нуклеотидов                 |   |
|  |  |  |  |  |   | 25-35 нуклеотидов                 |   |
|  |  |  |  |  |   | 35-50 нуклеотидов                 |   |
|  |  |  |  |  |   | более 50 нуклеотидов              |   |
|  |  |  |  |  |   | Способ определения количества РНК | Измерить концентрацию молекул РНК в растворе после окончания амплификации |
|  |  |  |  |  |   |                                   | Меченные радиоизотопами зонды г   |
|  |  |  |  |  | Меченные флуоресцентными                              |                                   |   |



|  |  |  |  |  |  |  |   |
|--|--|--|--|--|--|--|---|
|  |  |  |  |  |  |  | метками зонды   |
|  |  |  |  |  |  |  | Определение интенсивности полос на геле-электрофорезе |

Ответ:

Данная задача допускала множество вариантов ответа, приводящих к получению продукта более или менее высокого качества. Ниже представлены последовательности выбора вариантов, которые приводили к успеху в лабораторных испытаниях

1. Антитела к вирусу; Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 60%)

2. Антитела к вирусу; Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Прямой химический синтез пептидов (Качество 62%)

3. Антитела к вирусу; Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 60%)

4. Антитела к вирусу; Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Прямой химический синтез пептидов (Качество 62%)

5. Антитела к вирусу; Неструктурные белки; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 55%)

6. Антитела к вирусу; Неструктурные белки; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Прямой химический синтез пептидов (Качество 57%)

7. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 50%)

8. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Прямой химический синтез пептидов (Качество 52%)

9. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 50%)

10. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Прямой химический синтез пептидов (Качество 52%)

11. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 45%)

12. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Прямой химический синтез пептидов (Качество 47%)

13. Антитела к вирусу; Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 80%)

14. Антитела к вирусу; Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Прямой химический синтез пептидов (Качество 82%)
15. Антитела к вирусу; Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 80%)
16. Антитела к вирусу; Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Прямой химический синтез пептидов (Качество 82%)
17. Антитела к вирусу; Неструктурные белки, Core; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 75%)
18. Антитела к вирусу; Неструктурные белки, Core; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Прямой химический синтез пептидов (Качество 77%)
19. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 70%)
20. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антигены вируса; Прямой химический синтез пептидов (Качество 72%)
21. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 70%)
22. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки, Core; Гетерогенный иммуноферментный анализ; Антитела к вирусу из крови; Прямой химический синтез пептидов (Качество 72%)
23. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки, Core; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Рекомбинантные белки, нарабатываемые в бактериях (Качество 65%)
24. Антитела к вирусу; Структурные белки, Неструктурные белки, Core; Хемилюминисцентный иммуноанализ; Прямой химический синтез пептидов (Качество 67%)
25. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)
26. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов (Качество 94 %)
27. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); РНК; Невысокие температуры и ферментативное расщепление РНК; Обратная транскриптаза, РНК-полимераза, РНКазы; Два; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)
28. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; РНК; Невысокие температуры и ферментативное расщепление РНК; Обратная транскриптаза, РНК-полимераза, РНКазы; Два; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)

29. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)

30. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)

31. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); РНК; Невысокие температуры и ферментативное расщепление РНК; Обратная транскриптаза, РНК-полимераза, РНКазы H; Четыре; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)

32. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; РНК; Невысокие температуры и ферментативное расщепление РНК; Обратная транскриптаза, РНК-полимераза, РНКазы H; Четыре; 15-25 нуклеотидов (Качество 94%)

33. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов; Измерить концентрацию молекул РНК в растворе после окончания амплификации (Качество 97%)

34. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов; Меченные радиоизотопами зонды (Качество 87%)

35. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов; Меченные флуоресцентными метками зонды (Качество 100%)

36. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов; Измерить концентрацию молекул РНК в растворе после окончания амплификации (Качество 97%)

37. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); кДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от кДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов; Меченные радиоизотопами зонды (Качество 87%)

38. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS); κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов; Меченные флуоресцентными метками зонды (Качество 100%)

39. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов; Измерить концентрацию молекул РНК в растворе после окончания амплификации (Качество 97%)

40. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов; Меченные радиоизотопами зонды (Качество 87%)

41. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Четыре; 15-25 нуклеотидов; Меченные флуоресцентными метками зонды (Качество 100%)

42. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов; Измерить концентрацию молекул РНК в растворе после окончания амплификации (Качество 97%)

43. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов; Меченные радиоизотопами зонды (Качество 97%)

44. РНК вируса; Амплификации выбранного участка и последующей гибридизации; Количественное и качественное определение РНК вируса; 5'-нетранслируемая зона, Один из генов неструктурных белков (NS), Core; κДНК; Воздействие высоких температур и отсоединение РНК от κДНК; ДНК-зависимая-ДНК-полимераза, Обратная транскриптаза; Два; 15-25 нуклеотидов; Меченные флуоресцентными метками зонды (Качество 100%)

### **Задача “Терапия гепатита С”**

Основные современные подходы к лечению гепатита С

В данной части методического пособия мы кратко описываем основные существующие или находящиеся на стадии разработки и клинических исследований препараты для лечения гепатита С и стратегии их применения. Гепатит С долгое время считался неизлечимым, но на текущий момент признан полностью излечимым. Чтобы это случилось разрабатывались самые разные стратегии лечения. Основой успешного лечения

гепатита С является комбинирование двух или более препаратов с разными мишенями для воздействия. В рамках данной задачи мы предлагаем вам разработать один препарат и принимаем для упрощения модели, что этого будет достаточно для лечения.

#### Интерфероновая терапия

Лечить гепатит С с помощью интерферонов ученые попробовали раньше всех иных способов. Сегодня, несмотря на все недостатки и побочные эффекты, этот вид терапии всё еще применяется врачами. Интерферон - белок, вырабатываемый лейкоцитами человека. Лечение гепатита С проводится с помощью альфа-интерферона, который получают с помощью методов генной инженерии: внедрение в бактерий гена белка, создание гибридом на основе лейкоцитов человека.

Интерферон взаимодействует с клеткой через находящийся на её поверхности рецептор, это запускает синтез интерферон-зависимых белков, которые и обуславливают противовирусный эффект интерферона. Белки вируса гепатита С активно препятствуют работе интерферона на разных этапах, поэтому его вводят искусственно в больших количествах, чем вирус может заблокировать.

Для лечения интерфероном характерен ряд побочных эффектов, из-за которых пациенты иногда прерывают лечение, а врачи стремятся найти замену этой терапии. Наблюдались следующие побочные эффекты с различной частотой (от 1-2% до 20%) среди испытуемых в ходе клинических исследований: лихорадка, озноб, слабость, очень часто - головная боль, миалгия, снижение аппетита, тошнота, снижение АД; менее часто - астения, сонливость, головокружение, раздражительность, бессонница, депрессия, суицидальные мысли и попытки, рвота, диарея, сухость во рту, изменение вкуса, тахикардия; редко - нервозность, тревожность, боли в животе, кожная сыпь или зуд и пр.

Эффективность интерферонового лечения не превышала 70%. Сегодня для увеличения периода жизни белка к крови его модифицируют полиэтиленгликолем (ПЭГ), который делает его более устойчивым к протеазам.

#### Нуклеозидные ингибиторы

Следующим успехом ученых в лечении гепатита стало применение рибавирина. Рибавирин (рис.1) - вещество, которое после модификации в печени становится аналогом пуриновых нуклеотидов.

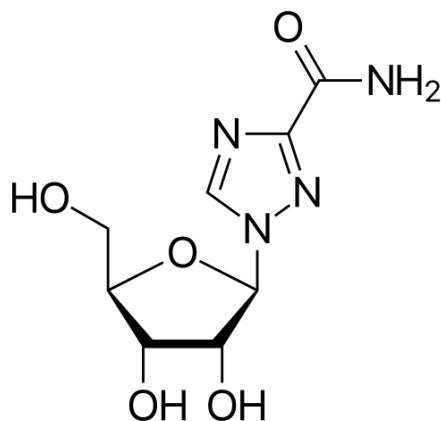


Рис.1. Формула рибавирина

Рибавирин включается в РНК вместо аденина или гуанина и образует комплементарные пары с урацилом и цитозином, что вызывает мутации в РНК-зависимой репликации вирусов.

Нуклеозидные ингибиторы это группа препаратов, которые по своей структуре похожи на нуклеозиды. Иногда вещество больше похоже на нуклеотид, но условно его всё равно относят к этой группе. После модификации в печени, если они ей подвержены, часто фосфорилируются. Принцип действия таких препаратов основывается на том, что вирусные полимеразы воспринимают их как субстраты для реакции. В дальнейшем такой ингибитор

может вызвать или остановку репликации, или мутации в геноме вируса, или каким-либо иным способом нарушить синтез РНК вируса, ингибируя полимеразу вируса NS5В.

Примерами таких препаратов являются: софосбувир, дасабувир

Ненуклеозидные ингибиторы

В эту группу мы отнесли всё разнообразие препаратов, которые не маскируются под субстрат вирусной полимеразы. У вируса гепатита С есть несколько потенциальных белковых мишеней для ингибиторов. Важнейшими из них являются протеаза вируса NS3, а также белки NS4А, NS4В, NS5А. Затрагивается как репликативная система вируса, так и полимеразная.

Примерами ингибиторов протеазы являются следующие препараты: фалдапревир, боцепревир, теллапревир, паритапревир. См. рис.2

Препараты-ингибиторы NS5А: даклатасвир, омбитасвир, ледипасвир. См. рис.3.

Ингибиторы могут действовать по разным принципам. Часто в роли механизма встречается аллостерическая регуляция (регуляция через аллостерические центры белка - участки, не являющиеся активным центром, но связывание с которыми влияет на структуру белка). В случае ингибиторов полимеразы мы встречаем аналоги пептидов, которые занимают активный центр протеазы и блокируют её работу.

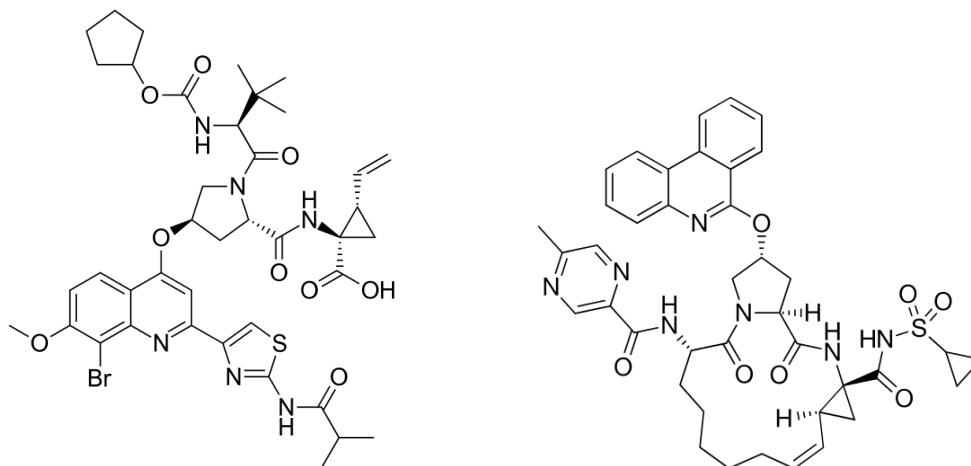


Рис.2. Формулы фалдапревира (слева) и паритапревира (справа)

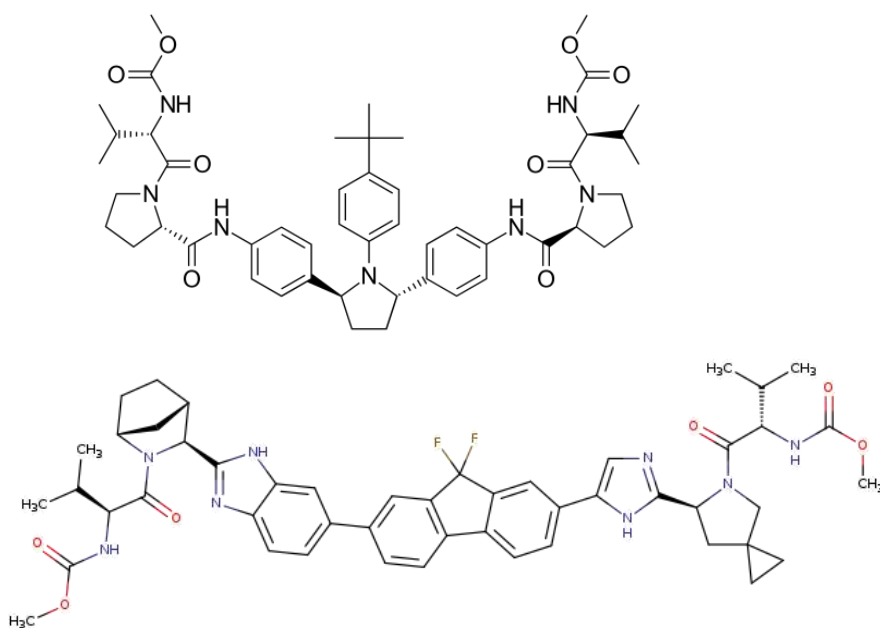


Рис.3. Формулы омбитасвира (вверху) и ледипасвира (внизу)

#### Антисмысловые олигонуклеотиды

Антисмысловые олигонуклеотиды - одна из новых, еще не применяющихся широко методик борьбы с вирусом.

Антисмысловые олигонуклеотиды - это олигонуклеотиды, связывающиеся с РНК по принципу комплементарности и, таким образом, изменяющие функцию РНК-мишени. Такое определение позволяет объединить множество типов олигонуклеотидов и различные механизмы их воздействия на РНК после связывания. Вкратце, механизмы действия антисмысловых нуклеотидов можно разделить на две группы: 1) связывание с РНК и нарушение их функции, без содействия её разрушению, например, остановка трансляции и 2) ускорение разрушения РНК при помощи внутренних ферментов клетки, таких как РНКазы Н или Argonaute-2 ( РНК-интерференция).

В основе РНК-интерференции двуцепочечные короткие (21-25 нуклеотидов) молекулы РНК (малые интерферирующие РНК). С помощью особых ферментов цепочки разделяются, и одна из них служит матрицей для узнавания комплементарной ей последовательности в РНК клетки или вируса, в зависимости от того, как подобрали последовательность интерферирующей РНК. По факту связывания “образцовой” РНК с РНК-мишенью происходит разрушение мишени нуклеазами.

Антисмысловые РНК действуют по тому же принципу, только опираются не на отдельную систему белков, как в случае РНК-интерференции, а на иные белки клетки, например, РНКазу Н. РНКазы Н разрушают молекулы двуцепочечной РНК. Когда антисмысловая РНК связывается с мишенью, мишень расщепляется РНКазой Н. Диапазон возможной длины таких олигонуклеотидов чуть выше, чем в случае РНК-интерференции - от примерно 15-16 до 35-40 нуклеотидов.

#### Решение задачи:

На первом этапе необходимо определиться с тем, что будет **мишенью воздействия препарата**. Здесь вам предлагается выбор из 3 вариантов: это могут быть **вирусные протеазы, иммунная система человека либо репликативная система** выбора. Далее необходимо определиться с тем, как именно вы работаете с выбранным вариантом и на основе этих данных разрабатывать дальнейшие параметры терапии. Если ваш препарат успешно пройдет испытания - вы можете зарегистрировать разработку и затем привлечь инвестиции и использовать терапию для создания комплексного лекарства.

1. Задача «Терапия Гепатита С» в симуляторе. Эта задача является наиболее вариативной из предложенных участникам и имеет большое количество полей со множеством вариантов выбора. Поэтому мы представили ее здесь в виде иерархически нумерованного списка, где поля более низкого порядка появляются при выборе соответствующего поля более высокого порядка

Мишень действия препарата

1.1. Иммунная система человека

1.1.1. «Как работаем с иммунной системой человека?»

1.1.1. Искусственно вводимые интерфероны (выбор этого поля отсылает нас к доставке типа «белок»)

1.1.1.1. Существуют разные виды интерферонов. Выберите тот, какой будете использовать

1.1.1.1.1. Интерфероны-альфа

1.1.1.1.2. Интерфероны-бета

1.1.1.1.3. Интерфероны-гамма

1.1.1.2. Интерфероны - белки. Какой источник их получения будете использовать?

1.1.1.2.1. Выработка клетками человека-донора: лейкоцитами, фибробластами, лимфоцитами и др.

1.1.1.2.1.1. Стимуляция выработки интерферона будет осуществляться

1.1.1.2.1.1.1. Неактивным вирусом гепатита С

(тут еще должен быть блок про то, что там надо инактивировать, как получить такую штуку, что там должно непременно остаться, а что нет, как вообще и из чего собрать систему для получения такого вируса. так как это потенциальное адидце, если я не успею, я вообще удалю это поле)

1.1.1.2.1.1.2. Другим вирусом подходящим для индукции

1.1.1.2.1.1.3. Двухцепочечной РНК

1.1.1.2.1.1.4. УФ-облучением

1.1.1.2.1.1.5. Дихлоро-1-бета-D-рибафуранозилбензимидазолом

1.1.1.2.1.1.6. Хлороквином

1.1.1.2.1.1.7. Стафилококковым энтеротоксином

1.1.1.2.2. Рекомбинантный белок из бактерий

1.1.1.2.2.1. Как получить ген интерферона для вставки в бактерию? Первый этап это:

1.1.1.2.2.1.1. Найти ДНК гена в нашем геноме и использовать её (ответ приводит к неверному решению)

Как будете выделять нужный ген из генома?

● Эндонуклеазами рестрикции

● Микрохирургически выделить хромосому с геном, а дальше как-нибудь разберемся

● ПЦР со специфическими праймерами

Как будете избавляться от интронов в гене?

● На каждый экзон отдельные праймеры для ПЦР, потом соединять лигазой

● Вырезать интроны рестриктазами, оставшиеся экзоны сшивать лигазой

● Никак. Интроны никак не мешают.

У вас в пробирке есть ДНК, по вашему мнению кодирующая интерферон. Что дальше?



- Эту ДНК из пробирки добавить в среду, в которой живут бактерии (нежизнеспособный вариант - его выбор сразу делает решение задачи невозможным)
- Эту ДНК из пробирки механически проколов клеточную стенку и мембрану ввести внутрь бактерии
- Поместить эту ДНК внутрь везикулы из фосфолипидной мембраны и добавить в среду, где живут бактерии
- Встроить ДНК в подходящий вектор для переноса
  - Как целевая ДНК встраивается в вектор?
    - Вектор разрезается где-нибудь в случайном месте любой эндонуклеазой рестрикции, а потом лигазой туда вшивается ДНК
    - Целевая ДНК отдельно подготавливается так, чтобы по концам были сайты для конкретных эндонуклеаз рестрикции. В векторе сайты для этих же рестриктаз находятся в конкретном месте. Далее лигирование.
    - Целевая ДНК отдельно подготавливается так, чтобы по концам были сайты для конкретных эндонуклеаз рестрикции. В векторе нет специального участка для вставки. (
      - Откуда будете брать вектор?
        - Синтезируете сами. Последовательности векторов известны
        - Закажете у специализирующейся на этой компании
    - Как вектор попадет в клетку бактерии?
      - Электропорация
      - Тепловой шок
      - Добавить в среду с бактериями и инкубировать при 37 градусах сутки
    - Как будете выделять наработанный белок, чтобы использовать?
      - В векторе была для этого специальная последовательность с шестью гистидинами. Можно очистить на колонке, задерживая белок за эти гистидины.
        - Антителами к белку, которые привязаны к твердому носителю. Всё остальное смывается, интерферон останется
        - Разогнать лизат клеток в гель-электрофорезе. В полосе, соответствующей массе интерферона, он и будет.

#### 1.1.1.2.2.1.2. Выделить мРНК интерферона и использовать её

Как будете находить мРНК интерферона после выделения всей РНК из клетки?

- Центрифугировать и искать по массе
- Гель-электрофорез и искать по массе (длине)
- ПЦР со специфическими для гена интерферона праймерами
- Комплементарные меченные зонды, за которые вытаскивать из смеси нужные

РНК

#### 1.1.1.2.2.1.3. Заказать химический синтез у специализированных компаний

#### 1.1.1.2.2.2. У вас в пробирке есть ДНК, кодирующая интерферон. Что дальше?

##### 1.1.1.2.2.2.1. Эту ДНК из пробирки добавить в среду, в которой живут бактерии

1.1.1.2.2.2.2. Механически проколоть клеточную стенку и мембрану ввести внутрь бактерии эту ДНК

1.1.1.2.2.2.3. Поместить эту ДНК внутрь липосомы из фосфолипидной мембраны и добавить в среду, где живут бактерии

1.1.1.2.2.2.4. Встроить ДНК в подходящий вектор для переноса

1.1.1.2.2.2.4.1. Как целевая ДНК встраивается в вектор?

- Вектор разрезается где-нибудь в случайном месте любой эндонуклеазой рестрикции, а потом лигазой туда вшивается ДНК
- Целевая ДНК отдельно подготавливается так, чтобы по концам были сайты для конкретных эндонуклеаз рестрикции. В векторе сайты для этих же рестриктаз находятся в конкретном месте. Далее лигирование.
- Целевая ДНК отдельно подготавливается так, чтобы по концам были сайты для конкретных эндонуклеаз рестрикции. В векторе нет специального участка для вставки.

1.1.1.2.2.2.4.2. Откуда будете брать вектор?

- Синтезируете сами. Последовательности векторов известны
- закажете у специализирующейся на этом компании

1.1.1.2.2.2.4.3. Как вектор попадет в клетку бактерии?

- Электропорация
- Тепловой шок
- Добавить в среду с бактериями и инкубировать при 37 градусах сутки

1.1.1.2.2.2.4.4. Как будете выделять наработанный белок, чтобы использовать?

- В векторе была для этого специальная последовательность с шестью гистидинами. Можно очистить на колонке, задерживая белок за эти гистидины.
- Антителами к белку, которые привязаны к твердому носителю. Всё остальное смывается, интерферон останется
- Разогнать лизат клеток в гель-электрофорезе. В полосе, соответствующей массе интерферона, он и будет.

1.1.3. Антитела к вирусу

1.1.3.1. Антитела к чему именно вы будете получать?

- Белок Core
- Структурные белки E1 и E2
- Неструктурные белки NS 2-5

1.1.3.2. Как будете получать антитела?

1.1.3.2.1. Прямой химический синтез (неверные ответы)

Как получите необходимую последовательность аминокислот?

- Белковое секвенирование выделенных из крови антител
- Секвенирование мРНК антител

1.1.3.2.2. Поликлональные антитела с использованием животных

1.1.3.2.2.1. Чем индуцируется выработка антител?

- Активным вирусом, способным к инфицированию
- Белками, к которым нужны антитела
- Отдельными фрагментами белков, к которым нарабатываются антитела

1.1.3.2.3. Моноклональные антитела в культуре клеток

Какие клетки будут культивироваться?

- В-лимфоциты человека
- Т-лимфоциты мышей
- Гибридомы на основе опухолевых и иммунных клеток человека

Чем индуцируется выработка антител? (Копия поля 1.1.3.2.2.1)

- Активным вирусом, способным к инфицированию
- Белками, к которым нужны антитела
- Отдельными фрагментами белков, к которым нарабатываются антитела

#### 1.1.3.2.4. Рекомбинантный белок из бактерий

1.1.3.2.4.1. Как получите необходимую последовательность аминокислот?

1.1.3.2.4.1.1. Белковое секвенирование выделенных из крови антител

1.1.3.2.4.1.2. Получение мРНК цепей иммуноглобулинов

1.1.3.2.4.1.2.1. Из каких клеток выделять РНК?

- Плазмоциты, выделенные из крови
- Т-клетки, выделенные из крови
- Макрофаги, выделенные из крови
- Вся клеточная фракция крови, а потом уже находить там нужную мРНК

1.1.3.2.4.1.2.2. Как выделить РНК нужного нам антитела?

- ПЦР со специфическими праймерами
- По длине на гель-электрофорезе

1.1.3.2.4.1.2.3. У вас в пробирке есть кДНК, кодирующая одну из цепей иммуноглобулинов. Что дальше? (Копия аналогичных полей выше (1.1.1.2.2.2..))

1.1.3.2.4.1.2.3.4.4. Как будете выделять наработанный белок, чтобы использовать? (Копия аналогичных полей выше (1.1.1.2.2.2.4.4..))

## 1.2. Репликативная система вируса

Как работаем с репликативной системой вируса?

1.2.1. РНК-зависимая-РНК-полимераза (NS5B)

1.2.1.1. Принцип действия препарата

1.2.1.1.1. Аналоги нуклеозидов/нуклеотидов (этот пункт предопределяет класс доставки как доставку аналога нуклеозидов/тидов)

Какой сахар или его производное будет содержаться в молекуле, если будет там содержаться

- Рибоза
- Дезоксирибоза

Механизм действия

- Встраивается в РНК вируса при синтезе, провоцируя в дальнейшем неправильное узнавание и мутации
- Встраивается в цепь при синтезе и служит сигналом окончания синтеза, тем самым образуя РНК неполной длины
- Оказываясь в активном центре полимеразы полностью блокирует её работу

Способ разработки

- Эмпирический отбор нескольких кандидатов, заказ синтеза, экспериментальная проверка;
- Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Тестирование различных веществ, отобранных случайным образом

Предполагаемый диапазон молекулярной массы действующего вещества

- меньше 50 Да
- 50-200 Да
- 200-600 Да (для этого варианта препарата только этот вариант является подходящим)
- 600-1000 Да
- 1-5 кДа
- 6-50 кДа

- 50-200 кДа
- Больше 200 кДа

Вы получили вещество с доказанным *in vitro* ингибирующим эффектом. Что дальше?

- Можно запускать тестирование *in vivo*;
- Еще несколько итераций, чтобы поискать схожие вещества с некоторыми модификациями. Вдруг найдется более эффективное и достаточно устойчивое?

- Проверить на цитотоксичность на культуре клеток

Что активно? (этот пункт повлияет на доставку)

- Само вещество, формула которого является формулой вашего лекарства
- Метаболит вещества, образующийся после прохождения через печень

#### 1.2.1.1.2. Ненуклеозидные ингибиторы

Принцип действия препарата (NS5B)

- Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование;
- Белок-белковое взаимодействие с ингибирующим эффектом;
- Связывание с фермент-субстратным комплексом и ингибирование реакции;
- Конкурирование с нуклеотидами за активный центр фермента (этот вариант запарывает всю дальнейшую цепочку)

Предполагаемый диапазон молекулярной массы действующего вещества

- меньше 50 Да
- 50-200 Да
- 200-600 Да
- 600-1000 Да
- 1-5 кДа
- 6-50 кДа
- 50-200 кДа
- Больше 200 кДа

Способ разработки

- Эмпирический отбор нескольких кандидатов, заказ синтеза, экспериментальная проверка
- Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Использование большой библиотеки случайных пептидов для поиска связывающихся с РНК-полимеразой, затем проверка на ингибирующий эффект

Вы получили вещество с доказанным *in vitro* ингибирующим эффектом. Что дальше?

- Можно запускать тестирование *in vivo*
- Еще несколько итераций, чтобы поискать схожие вещества с некоторыми модификациями. Вдруг найдется более эффективное и достаточно устойчивое?

- Проверить на цитотоксичность на культуре клеток

Что активно? (этот пункт потом повлияет на доставку)

- Само вещество, формула которого является формулой вашего лекарства
- Метаболит вещества, образующийся после прохождения через печень

#### 1.2.1.1.3. РНК-интерференция гена NS5B (выбор этого поля определяет тип доставки “короткие нуклеиновые кислоты”)

Для синтеза рибонуклеинового компонента системы РНК-интерференции вам надо знать точную последовательность гена. Как будете её получать?

- В международных открытых базах данных для ученых уже давно есть.

Возьмем оттуда

- Весь цикл подготовки и секвенирования гена проведете самостоятельно

Какой структуры будет ваша малая интерферирующая РНК?

- Двухцепочечная (правильный ответ)
- Одноцепочечная (неправильный ответ)

Длина вашей малой интерферирующей РНК

- 5-10 нуклеотидов
- 11-20 нуклеотидов
- 21-25 нуклеотидов (единственно верный тут вариант ответа, все остальные делают препарат просто неактивным)
- 26-30 нуклеотидов

Чем руководствоваться при выборе участка гена, который послужит мишенью? (оба варианта имеют право на жизнь, но второй дает чуть больше очков качества)

- Не слишком важно, РНК интерференция достаточно надежная система
- Поискать наиболее консервативные области и делать мишенью их

Как получить малые интерферирующие РНК для препарата?

- Амплифицировать с помощью ПЦР
- Химический синтез олигонуклеотидов

#### 1.2.1.1.4. Антисмысловая РНК к гену NS5B

Для синтеза антисмысловой РНК вам надо знать точную последовательность гена. Как будете её получать?

- В международных открытых базах данных для ученых уже давно есть.

Возьмем оттуда

- Весь цикл подготовки и секвенирования гена проведете самостоятельно

Какой структуры будет ваша антисмысловая РНК?

- Двухцепочечная (неправильный вариант ответа)
- Одноцепочечная (правильный вариант ответа)

Длина вашей антисмысловой РНК

- 5-15 нуклеотидов
- 16-40 нуклеотидов (верный вариант ответа)
- 41-80 нуклеотидов
- 81-120 нуклеотидов

Чем руководствоваться при выборе участка гена, который послужит мишенью?

- Не слишком важно, антисмысловые РНК достаточно надежная система
- Поискать наиболее консервативные области и делать мишенью их

Как получить РНК для препарата? (оба варианта имеют право на жизнь, если речь идет о достаточно длинных фрагментах)

- Амплифицировать с помощью ПЦР в несколько стадий
- Химический синтез олигонуклеотидов

#### 1.2.2. IRES-элемент

##### 1.2.2.1. Принцип действия препарата

##### 1.2.2.1.1. Изменение пространственной структуры РНК в одном из участков IRES

##### 1.2.2.1.1.1. Способ воздействия на структуру IRES

- Разрушение эндонуклеазами (даже не смешно, оно сразу запарывает всё решение)
- Перестройка укладки молекулы (разрушение одних шпилек и образование других, например)

- Образование двуцепочечных участков РНК там, где их быть не должно

#### 1.2.2.1.1.2. Способ нарушить укладку молекулы

1.2.2.1.1.2.1. Образование более энергетически выгодного и стабильного комплекса с коротким аналогом нуклеиновой кислоты, который приводит к разрушению имеющихся водородных связей и перестройке укладки (определяет тип доставки “олигонуклеотид”)

Вам нужно вещество, способное комплементарно связываться с РНК, при этом вытесняя цепь РНК из двойной цепи РНК. Какую часть структуры будет отличаться по химической структуре от природной РНК?

- Азотистые основания
- Сахаро-фосфатный остов (это правильный ответ)

Для таких целей можно использовать, например

- Пептидо-нуклеиновые кислоты (этот и вариант ниже имеют право на жизнь в равной степени)
- Морфолиновые олигонуклеотиды
- Дезоксирибонуклеиновую кислоту (это кардинально неверный ответ в данном конкретном случае)

1.2.2.1.1.2.2. Антисмысловые РНК, которые свяжутся с одноцепочечными участками IRES, тем самым меняя структуру IRES

#### 1.2.2.1.2. Блокирование связывания рибосомы с IRES

Принцип блокировки связывания

- Закрытие молекулой препарата участка связывания IRES с рибосомой
- Закрытие молекулой препарата всего IRES

Какой природы будет ваше вещество, связывающиеся с IRES?

- Пептид/белок (определяет способ доставки “пептид/небольшой белок”)
- Нуклеиновая кислота (определяет способ доставки “олигонуклеотид”)

В поисках подходящего вещества вы использовали большой случайный набор того, что может связываться с IRES. Вы нашли 3 вещества в некоторой степени подходящие вам. Ваши дальнейшие действия?

- Будем использовать эти вещества
- Проведем тесты на дальнейшее усовершенствование на основе этих веществ. Для всех трех вариантов
- Выберем одно и будем совершенствовать его

### 1.2.3. NS4B

target\_replsystem\_how\_ns4b

1.2.3.1. Принцип действия препарата (Ярик, тут на самом деле \_\_почти\_\_ (но не совсем) всё то же самое, что и для NS5B)

replsystem\_how\_ns4b\_princip

#### 1.2.3.1.1. Прямые специфические ингибиторы

Принцип работы ингибиторов

- Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование
- Белок-белковое взаимодействие с ингибирующим эффектом
- Связывание с фермент-субстратным комплексом и ингибирование реакции (в данном случае этот вариант неверен, NS4B вообще-то нифига не фермент)
- Нарушение полимеризации белка NS4B

Предполагаемый диапазон молекулярной массы действующего вещества (Копия аналогичного поля выше)

Способ разработки (Копия аналогичного поля выше)

- Эмпирический отбор нескольких кандидатов, заказ синтеза, экспериментальная проверка

- Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом

● Использование большой библиотеки случайных пептидов для поиска связывающихся с NS4B, затем проверка на ингибирующий эффект

Вы получили вещество с доказанным *in vitro* ингибирующим эффектом. Что дальше? (Копия аналогичного поля выше)

Что активно? (этот пункт повлияет на доставку)

- Само вещество, формула которого является формулой вашего лекарства
- Метаболит вещества, образующийся после прохождения через печень

1.2.3.1.2. РНК-интерференция гена NS4B (выбор этого поля определяет тип доставки “короткие нуклеиновые кислоты”)

Для синтеза рибонуклеинового компонента системы РНК-интерференции вам надо знать точную последовательность гена. Как будете её получать?

- В международных открытых базах данных для ученых уже давно есть.

Возьмем оттуда

- Весь цикл подготовки и секвенирования гена проведете самостоятельно

Какой структуры будет ваша малая интерферирующая РНК?

- Двухцепочечная (правильный ответ)
- Одноцепочечная (неправильный ответ)

Длина вашей малой интерферирующей РНК

- 5-10 нуклеотидов
- 11-20 нуклеотидов
- 21-25 нуклеотидов (единственно верный тут вариант ответа, все остальные делают препарат просто неактивным)
- 26-30 нуклеотидов

Чем руководствоваться при выборе участка гена, который послужит мишенью? (оба варианта имеют право на жизнь. но второй дает чуть больше очков качества)

- Не слишком важно, РНК интерференция достаточно надежная система
- Поискать наиболее консервативные области и делать мишенью их

Как получить малые интерферирующие РНК для препарата?

- Амплифицировать с помощью ПЦР
- Химический синтез олигонуклеотидов

1.2.3.1.3. Антисмысловая РНК к гену NS4B

Для синтеза антисмысловой РНК вам надо знать точную последовательность гена. Как будете её получать? (Копия аналогичного поля выше)

Какой структуры будет ваша антисмысловая РНК? (Копия аналогичного поля выше)

Длина вашей антисмысловой РНК (Копия аналогичного поля выше)

Чем руководствоваться при выборе участка гена, который послужит мишенью? (Копия аналогичного поля выше)

Как получить РНК для препарата?

- Амплифицировать с помощью ПЦР в несколько стадий
- Химический синтез олигонуклеотидов

1.2.4. NS5A

1.2.4.1. Принцип действия препарата (NS5A)

1.2.1.1.2. Прямые специфические ингибиторы

Принцип работы ингибиторов

- Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование

- Белок-белковое взаимодействие с ингибирующим эффектом
  - Связывание с фермент-субстратным комплексом и ингибирование реакции (в данном случае этот вариант неверен, NS5A вообще-то нифига не фермент)
- Предполагаемый диапазон молекулярной массы действующего вещества
- меньше 50 Да (слишком мало)
  - 50-200 Да (имеет право на жизнь при выборе поля про аллостерическое ингибирование. проходит как доставка небольшой непонятной хрени)
  - 200-600 Да (имеет право на жизнь. проходит как доставка небольшой непонятной хрени)
  - 600-1000 Да (имеет право на жизнь, но осложняет доставку. здесь оно будет проходить как доставка крупной непонятной хрени)
  - 1-5 кДа (ни о чем вариант, означает непонимание происходящего)
  - 6-50 кДа (вот это нормальное значение, если они выберут белок-белковое. означает доставку белка)
  - 50-200 кДа (вот это для белок-белковых тоже имеет место быть, но это уже многовато. означает доставку белка)
  - Больше 200 кДа (слишком много)

Способ разработки

- Эмпирический отбор нескольких кандидатов, заказ синтеза, экспериментальная проверка
- Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Использование большой библиотеки случайных пептидов для поиска связывающихся с NS5A, затем проверка на ингибирующий эффект

Вы получили вещество с доказанным *in vitro* ингибирующим эффектом. Что дальше?

- Можно запускать тестирование *in vivo*
- Еще несколько итераций, чтобы поискать схожие вещества с некоторыми модификациями. Вдруг найдется более эффективное и достаточно устойчивое?
- Проверить на цитотоксичность на культуре клеток

Что активно? (этот пункт потом повлияет на доставку)

- Само вещество, формула которого является формулой вашего лекарства
- Метаболит вещества, образующийся после прохождения через печень

#### 1.2.1.1.3. РНК-интерференция гена NS5A (выбор этого поля определяет тип доставки “короткие нуклеиновые кислоты”)

Для синтеза рибонуклеинового компонента системы РНК-интерференции вам надо знать точную последовательность гена. Как будете её получать?

- В международных открытых базах данных для ученых уже давно есть. Возьмем оттуда

- Весь цикл подготовки и секвенирования гена проведете самостоятельно

Какой структуры будет ваша малая интерферирующая РНК?

- Двучепочечная (правильный ответ)
- Одноцепочечная (неправильный ответ)

Длина вашей малой интерферирующей РНК

- 5-10 нуклеотидов
- 11-20 нуклеотидов
- 21-25 нуклеотидов (единственно верный тут вариант ответа, все остальные делают препарат просто неактивным)
- 26-30 нуклеотидов



Чем руководствоваться при выборе участка гена, который послужит мишенью? (оба варианта имеют право на жизнь, но второй дает чуть больше очков качества)

- Не слишком важно, РНК интерференция достаточно надежная система
- Поискать наиболее консервативные области и делать мишенью их (в данном случае, этот вариант сильно увеличивает очки качества, у этого белка есть сильно варьируемые участки, интерференция по которым может выйти неудачной)

Как получить малые интерферирующие РНК для препарата?

- Амплифицировать с помощью ПЦР
- Химический синтез олигонуклеотидов

#### 1.2.1.1.4. Антисмысловая РНК к гену NS5A

Для синтеза антисмысловой РНК вам надо знать точную последовательность гена. Как будете её получать?

- В международных открытых базах данных для ученых уже давно есть.

Возьмем оттуда

- Весь цикл подготовки и секвенирования гена проведете самостоятельно

Какой структуры будет ваша антисмысловая РНК?

- Двухцепочечная (неправильный вариант ответа)
- Одноцепочечная (правильный вариант ответа)

Длина вашей антисмысловой РНК

- 5-15 нуклеотидов
- 16-40 нуклеотидов (верный вариант ответа)
- 41-80 нуклеотидов
- 81-120 нуклеотидов

Чем руководствоваться при выборе участка гена, который послужит мишенью? (оба варианта имеют право на жизнь, но второй дает чуть больше очков качества)

- Не слишком важно, антисмысловые РНК достаточно надежная система
- Поискать наиболее консервативные области и делать мишенью их (в данном случае, этот вариант сильно увеличивает очки качества, у этого белка есть сильно варьируемые участки, интерференция по которым может выйти неудачной)

Как получить РНК для препарата?

- Амплифицировать с помощью ПЦР в несколько стадий
- Химический синтез олигонуклеотидов

### 1.3. Вирусные протеазы. Комплекс NS4A/NS3

#### 1.3.1. Принцип действия (NS4A/NS3)

1.3.1.1. Имитация пептида в активном центре, блокирующая работу NS3 (это поле определяет способ доставки “белок”)

Способ разработки (NS4A/NS3)

- Эмпирический отбор нескольких кандидатов, заказ синтеза, экспериментальная проверка
- Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом (в данном случае не самый удачный вариант)
- Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом
- Использование большой библиотеки случайных пептидов для поиска связывающихся с NS3, затем проверка на ингибирующий эффект

Вы получили вещество с доказанным *in vitro* ингибирующим эффектом. Что дальше?

- Можно запускать тестирование *in vivo*

- Еще несколько итераций, чтобы поискать схожие вещества с некоторыми модификациями. Вдруг найдется более эффективное и достаточно устойчивое?

- Проверить на цитотоксичность на культуре клеток

Примерный диапазон молекулярной массы вашего препарата

- 5-400 Да
- 400-1000 Да (верный вариант)
- 1-3 кДа
- 3-10 кДа

1.3.1.2. Связывание в аллостерическом центре с ингибиторным эффектом, направленным на препятствование образованию комплекса NS4A/NS3 (а тут ровно та же самая фигня, что и про специфические ингибиторы для других белков-мишеней, мне надоело переписывать каждый раз)

1.3.1.3. РНК-интерференция генов NS4A или NS3 (Те же поля, что и в пункте 1.2.1.1.3.)

1.3.1.4. Антисмысловая РНК к NS4A или NS3 (Те же поля, что и в пункте 1.2.1.1.4.)

### **Ответ:**

Для данной задачи существует более 250 цепочек выборов, которые приводят к успеху в лабораторных испытаниях лекарства. Поэтому мы привели по одному примеру правильного ответа для каждого типа терапии.  
Тип лекарства:

Белок. (Пептид)

Вирусные протеазы. Комплекс NS4A/NS3; Имитация пептида в активном центре, блокирующая работу NS3; 400-1000 Да; Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом; Проверить на цитотоксичность на культуре клеток (Качество 91%)

Белок (Полноразмерный белок)

Репликативная система вируса; NS4B; Прямые специфические ингибиторы; Белок-белковое взаимодействие с ингибирующим эффектом; 6-50 кДа; Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом; Еще несколько итераций, чтобы поискать схожие вещества с некоторыми модификациями. Вдруг найдется более эффективное и достаточно устойчивое? (Качество 86%)

Олигонуклеотид или аналог

Репликативная система вируса; NS5A; РНК-интерференция гена NS5A; В международных открытых базах данных для ученых уже давно есть. Возьмем отсюда; Двухцепочечная; 21-25 нуклеотидов; Поискать наиболее консервативные области и делать мишенью их; Химический синтез олигонуклеотидов (Качество 95%)

Аналог нуклеозидов

Репликативная система вируса; РНК-зависимая-РНК-полимераза (NS5B); Аналоги нуклеозидов/нуклеотидов; Рибоза; Оказываясь в активном центре полимеразы полностью блокирует её работу; Молекулярный докинг, заказ синтеза, проверка экспериментом; 200-600 Да; Можно запускать тестирование in vivo (Качество 93%)

Молекула иного типа массой до 600 Да

Репликативная система вируса; NS4B; Прямые специфические ингибиторы; Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование; 50-200 Да; Эмпирический отбор нескольких кандидатов, заказ синтеза, экспериментальная проверка; Проверить на цитотоксичность на культуре клеток (Качество 85%)

Молекула иного типа массой свыше 600 Да

Репликативная система вируса; NS4B; Нарушение полимеризации белка NS4B; 50-200 Да или 200-600 Да или 600-1000 Да; Разные варианты модификаций уже существующих препаратов, заказ синтеза, проверка экспериментом; Еще несколько итераций, чтобы поискать схожие вещества с некоторыми модификациями. Вдруг найдется более эффективное и достаточно устойчивое? (Качество 93%)

### **Способы введения и адресной доставки лекарственных препаратов**

В рамках данного методического пособия мы приводим основные теоретические аспекты необходимые для решения задач “Гепатит С. Доставка” и “Муковисцидоз. Доставка эффектора”. Тем не менее, мы рекомендуем использовать дополнительную литературу для более полного понимания темы.

Пути введения лекарственных средств

Выделяют два принципиально различных способа попадания лекарства в организм: через желудочно-кишечный тракт (энтерально) и минуя желудочно-кишечный тракт (парентерально).

Энтеральные пути введения: через рот (перорально), под язык (сублингвально) и через прямую кишку (ректально).

Парентеральные пути введения: на кожу и слизистые оболочки, инъекции, ингаляции. Наиболее удобный и естественный для пациента путь введения - пероральный. Он же одновременно и самый сложный для создателей лекарства, которое должно преодолеть два наиболее активных внутренних барьера - кишечник и печень, где большинство веществ подвергается превращениям. Кроме того, чтобы добраться даже до кишечника препарат должен пройти через желудок. Кислая среда и протеазы практически полностью исключают пероральное введение белковых препаратов без какой-либо защиты от этого. На настоящий момент уже созданы материалы, из которых делают капсулы нерастворимые в желудке и растворимые в кишечнике.

С помощью иглы лекарство можно доставить в любую точку тела, при этом обеспечены и точность дозирования, и быстрота наступления эффекта. Но это более трудоемкий способ, требующий соблюдения стерильности и присутствия медицинского персонала. Как правило, лекарство в этом случае вводят внутривенно, внутримышечно или подкожно, реже внутриартериально. Однако уколы болезненны и неудобны для пациента, а в некоторых случаях могут быть противопоказаны.

Ректальный путь введения используют, например, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта или если больной находится в бессознательном состоянии. Главное преимущество этого способа в том, что около трети лекарства поступает в общий кровоток, минуя печень.

Ингаляции применяют для прямого воздействия на бронхи или получения быстрого и сильного эффекта, так как всасывание лекарств в легких происходит очень интенсивно.

Как видно, способов введения лекарств много, но выделить один оптимальный не удается, выбор способа всегда зависит от конкретного препарата и конкретного случая. Одним из главных определяющих факторов адекватности способа доставки лекарства является способность препарата попадать в кровь.

Движение лекарственных препаратов по организму

Все этапы движения лекарства по организму и процессы, происходящие с лекарством в организме, являются предметом изучения фармакокинетики. 4 основных этапа фармакокинетики лекарственных препаратов:

1. Всасывание. Поступление лекарства в кровеносное русло. Всасывание может происходить со всех поверхностей организма — кожи, слизистых оболочек, с поверхности легких; при приеме внутрь поступление лекарств из желудочно-кишечного тракта в кровь идёт с использованием механизмов всасывания питательных веществ. Лучше всего в желудочно-кишечном тракте всасываются липофильные препараты, имеющие небольшую

молекулярную массу. Высокомолекулярные средства и вещества, нерастворимые в жирах, практически не всасываются в желудочно-кишечном тракте, и поэтому их следует вводить другими путями, например непосредственно в кровь.

2. Распределение. Процесс проникновения лекарственного средства из крови в органы и ткани. Распределение вещества происходит тем быстрее и легче, чем больше оно гидрофобно, и чем меньше его молекулярная масса.

3. Метаболизм. Видоизменение химической структуры лекарства. Метаболизм лекарств происходит преимущественно в печени. В большинстве случаев вещество превращается из биологически активного в биологически неактивное соединение. Печень обладает антиоксидантными свойствами в отношении всех чужеродных веществ, в том числе и лекарств. Однако в некоторых случаях лекарственное вещество из неактивного «пролекарства» превращается в биологически активное лекарственное средство. Некоторые лекарственные средства вообще не подвергаются метаболизму в организме и покидают его в неизменном виде, если ферменты организма не могут с ними взаимодействовать.

4. Выведение. Лекарственное средство и продукты его метаболизма могут выводиться различными путями, однако основной путь выведения подавляющего большинства лекарств — через почки с мочой.

При попадании в кровь лекарство, как правило, уже становится доступно для поглощения клеткой. Некоторые вещества имеют свойство связываться с белками плазмы крови.

Когда речь идет о механизме действия лекарства, важным аспектом является также то, снаружи или изнутри клетки действует вещество. Так, например, интерфероны оказывают своё действие посредством связи с интерфероновым рецептором на плазматической мембране клетки, им не нужно проникать внутрь клетки. В таком случае для терапевтического эффекта достаточно продумать способ обеспечения сохранности препарата в крови. Если же лекарство является ингибитором какого-либо фермента, ему необходимо попасть в клетку.

Проникновение лекарственного препарата внутрь клетки

Механизмы всасывания внутрь клетки можно разделить на четыре основных вида: диффузия (проникновение молекул за счет теплового движения), фильтрация (прохождение молекул через поры под действием давления), активный транспорт (перенос с затратами энергии) и эндоцитоз (захват клеткой макромолекулярных соединений посредством везикул - небольших мембранных пузырьков, содержащих белки в своей мембране). Фильтрация и активный транспорт редки в случае лекарств, чаще встречаются диффузия и эндоцитоз.

Эндоцитоз - основной путь попадания в клетку веществ из плазмы крови. Существует два основных пути такого транспорта. Жидкофазный эндоцитоз — это неизбежный процесс, при котором концентрация веществ, поглощаемых в составе везикул, соответствует концентрации веществ во внеклеточной жидкости. Такие везикулы образуются постоянно и необычайно активно. Опосредуемый рецепторами эндоцитоз представляет собой избирательный механизм, позволяющий клеткам захватывать большие количества специфических лигандов без поглощения внеклеточной среды. Лиганд в этом случае связывается с рецептором, который затягивается затем внутрь клетки.

Помимо вариантов, когда клетка самостоятельно принимает в себя лекарственный препарат (эндоцитоз, активный транспорт), или происходит диффузия, учеными разработаны способы направленного транспорта веществ в конкретные типы клеток. Основными применяемыми подходами являются: доставка препарата с каким-либо вектором, обеспечивающим направленное попадание в нужные клетки; искусственные различного состава, внутрь которых помещается лекарственный препарат.

В качестве векторов для доставки лекарственных препаратов рассматриваются гормоны, ферменты, пептиды, антитела, гликопротеиды, гликолипиды, вирусы.

Использование в качестве векторов вирусных частиц является одной из основ генной терапии – лечения наследственных, мультифакторных и инфекционных заболеваний путем введения экзогенного генетического материала в клетки пациентов с целью направленного изменения генетических дефектов. Вирусы обеспечивают избирательность доставки генетического материала в строго определенные ткани и клетки, так как каждый вирус способен репродуцироваться только в клетках определенного типа. Однако вирусные векторы имеют и ряд существенных недостатков. Ретровирусные системы способны активировать опухолевую трансформацию клеток, аденовирусные системы способны продуцировать токсичные вирусные белки и вызывать сильный иммунный ответ.

Некоторые виды лекарственных препаратов более эффективно изолировать от окружающей среды. Для этого используют различные искусственно созданные контейнеры. Самым распространенным способом является использование липосом. Липосомы представляют собой сферические частицы диаметром от 20 нм до 50 мкм, образованные из одного или нескольких бимолекулярных слоев фосфолипидов и содержащие внутри воду или раствор.

Липосомы как носители лекарственных средств характеризуются следующими преимуществами: полученные из природных фосфолипидов они биodeградируемы и биосовместимы, мембрана липосом может сливаться с клеточной и обеспечивать доставку содержимого в клетку. Для повышения тропности липосом к определенным органам и тканям их изготавливают из фосфолипидов и гликолипидов, изолированных из этих органов.

#### Особенности распространенных видов лекарственных препаратов

##### Олигонуклеотиды

В биологических системах немодифицированные ДНК и РНК по своей природе нестабильны, так как повсеместно подвергаются воздействию нуклеаз. Для применения олигонуклеотидов в качестве лекарственных препаратов, необходимо их модифицировать таким образом, чтобы сохранить или улучшить их способность комплементарно связываться с РНК, повысить устойчивость к расщеплению нуклеазами, обеспечить распределение в тканях и доставить в то же место клетки, где находятся РНК-мишени. Для этих целей используется несколько различных химических методов.

##### 1. Модификация цепи

Так как нуклеазы расщепляют фосфодиэфирную связь, очевидно, что первоочередной мишенью химической модификации олигонуклеотидов оказывается непосредственно их сахарофосфатный остов. Чаще всего для получения антисмысловых препаратов проводят фосфоротиоатную (PS) модификацию сахарофосфатного остова, при которой один из атомов кислорода в фосфатной группе (не вовлеченный непосредственно в межнуклеотидную связь) заменяется на атом серы. PS-связь значительно повышает устойчивость к расщеплению нуклеазами. Такие олигонуклеотиды сохраняют способность стимулировать расщепление РНК-мишени РНКазой Н.

Другой пример это замена кислорода в 3'-положении дезоксирибозы на аминогруппу. Для них проявляется высокое сродство к комплементарной РНК и высокая устойчивость к нуклеазам, однако в их действии не участвует РНКазы Н.

Помимо модификаций фосфодиэфирной связи олигонуклеотидной цепи, разрабатываются вещества с заменой сахарофосфатного остова на другую группу атомов, сохраняющую биологическую активность исходного соединения. Одна из таких замен привела к созданию фосфородиамидатных олигонуклеотидов с морфолиновой группой. Благодаря фосфородиамидатным связям морфолиновые олигонуклеотиды биохимически нейтральны. Молекулы с подобными заменами по свойствам близки к ДНК и устойчивы к действию нуклеаз. В механизме их действия не участвует РНКазы Н – он преимущественно заключается в остановке трансляции или других способах пространственной блокировки синтеза белков.

##### 2. Модификация гетероциклов

Модификация гетероциклов (оснований) направлена преимущественно на повышение сродства и усиление связывания с комплементарными нуклеиновыми кислотами. Такая модификация поддерживает механизм действия РНКазы Н.

### 3. Модификация сахаров

На данный момент, для улучшения терапевтических свойств олигонуклеотидов наиболее эффективны модификации остатков сахаров в 2'-положении.

Группировка таких сахаров в РНК-подобную структуру повышает их связывающую способность. Практически все соединения с модификацией в 2'-положении значительно ослабляют или полностью подавляют способность РНКазы Н расщеплять цепь РНК противоположного участка модификации. Подобное ограничение можно минимизировать с помощью смешанной стратегии, отграничивающей 2'-модифицированными остатками центральный участок олигонуклеотида. Кроме того, есть некоторые ограничения в применении 2'-модифицированных нуклеозидов для получения дуплексов коротких интерферирующих РНК (киРНК), вовлечённых в механизм РНК-интерференции.

При подкожном введении олигонуклеотиды быстро поступают от места инъекции в кровотоки, а пиковая концентрация в плазме достигается через 3-4 часа или более. При внутривенном или подкожном введении после достижения пиковой концентрации в плазме концентрация препарата быстро снижается по мультиэкспоненте, т.е. первоначальная фаза быстрого распределения препарата в тканях, занимающая от нескольких минут до часов, сменяется более медленной фазой окончательного выведения препарата из тканей.

При пероральном введении, степень проникновения в кровь крайне низка и составляет менее 1% введённой дозы.

#### Нуклеозидные ингибиторы

Большинство нуклеозидных ингибиторов хорошо всасываются в желудке, с достижением максимальной концентрации в крови в течение часа, хорошо распределяются в тканях и жидкостях организма. В организме все нуклеозидные ингибиторы фосфорилируются к активным производным. Метаболизируются большинство препаратов группы в печени.

#### Белковые и пептидные препараты

Пептидные препараты в организме подвергаются быстрой биотрансформации под действием различных протеаз. Образующиеся из них пептидные фрагменты обладают собственной активностью и могут вносить существенный вклад или даже изменять фармакологическое действие основного препарата.

Важными факторами, осложняющими использование препаратов этой группы является необходимость защищать лекарство от действия желудочного сока, потеря активности при

небольшом изменении структуры, короткий период жизни в организме, высокая иммуногенность (вызывает иммунную реакцию на введение).

Одним из путей повышения эффективности лекарственных препаратов белковой структуры является химическая модификация их молекулы, состоящая не в собственно изменении их структуры, а в физико-химической трансформации, достигаемой соединением нативной молекулы с полиэтиленгликолем (ПЭГ).

Подобная химическая модификация фармакологических препаратов пептидной структуры адресно направлена на улучшение их переносимости, снижение иммуногенности, увеличение продолжительности нахождения в организме пациента.

#### Решение задачи

Эту задачу вам необходимо решать с учетом того, что представляет из себя разработанное вами в предыдущей задаче терапевтическое вещество, так как для создания лекарственного комплекса метод доставки должен быть адекватен доставляемому веществу.

Тип доставляемого вещества и способ введения - 2 параметра с которыми необходимо определиться на начальной стадии разработки лекарства. От них зависят возникающие перед

вами в дальнейшем вопросы, например, способы “защиты” действующего вещества, механизм его доставки в нужный орган (печень в случае гепатита С) и т.д.

**Задача «Доставка лекарства от гепатита С» в симуляторе.**  
 При разработке способов доставки участникам предлагалось выбрать подходящий для их лекарства вариант из раскрывающегося списка. По мере выбора варианта открывались поля последующих порядков, позволявшие уточнить способ доставки. При выборе верных вариантов в каждом поле задача считалась решенной и система выводила сообщение об успешном решении.

**Поля задачи и варианты выбора.**

| Поле 1го порядка   | Значение для поля 1го порядка и поле 2го порядка | Поле 3го порядка                                      | Значение для поля 3го порядка и поле 4го порядка                                 | Поле 5го порядка |  |
|--|--|---|--|------------------|--|
| К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Белок  | Какого размера ваше белковое лекарство?               | Пептид   |                  |  |
|  |  |   | Полноразмерный белок до 50 кДа   |                  |  |
|  |  |   | Полноразмерный белок массой свыше 50кДа  |                  |  |
|  |  | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки? | Нет  |                  |  |
|  |  |   | Да   |                  |  |
|  |  | Меры для защиты от протеаз                            | Нет  |                  |  |
|  |  |   | Химические модификации для увеличения гидрофобности и защиты от протеаз          |                  |  |
|  |  |   | Поместить препарат в нерастворимую в желудке капсулу                             |                  |  |
|  |  |   | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы. |                  |  |
|  |  | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?      | Эндоцитоз  |                  |  |
|  |  | Слияние конструкции                                   |  |                  |  |

|                           |  |  |  |   |
|---------------------------|--|--|--|---|
|                           |  | доставки с мембраной клеток печени   |  |   |
|                           |  | Сшивка с молекулой, направленно поглощаемой целевой клеткой.   |  |   |
| Олигонуклеотид или аналог | Модификации молекулы для устойчивости в клетке | Нет, РНК - естественное для клетки вещество. В модификациях сверх того, что нужно для эффективности, нет необходимости |  |   |
|                           |  | Да, надо защитить от нуклеаз клетки.   | Как будет осуществляться защита от нуклеаз клетки? | Химическая модификация сахаро-фосфатного остова |
|                           |  |  |  | Модификация концов для защиты от экзонуклеаз    |
|                           |  |  |  | Модификация азотистых оснований                 |
|                           | Как ваш препарат попадает в печень?            | В крови связывается с белками плазмы и с током крови попадает в печень. Используется в чистом виде без модификаций.    |  |   |
|                           |  | Химически соединяется с холестерином или подобным гидрофобным веществом, чтобы лучше накапливаться в печени с током    |  |   |



|                                      |  |  |  |  |
|--------------------------------------|--|--|--|--|
|                                      |  | крови  |  |  |
|                                      |  | Химически соединяется с гидрофильным лигандом, направленно идущим в печень с током крови   |  |  |
|                                      |  | Олигонуклеотид помещается в липосому со специфическим для печени набором липидов мембраны  |  |  |
|                                      | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки? | Простая диффузия   |  |  |
|                                      |  | Эндоцитоз  |  |  |
|                                      |  | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                     |  |  |
| Аналог нуклеозидов                   | Как ваш препарат попадает в печень?            | С током крови, направленно   |  |  |
|                                      |  | Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень |  |  |
|                                      |  | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.           |  |  |
|                                      | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки? | Проходит простой диффузией   |  |  |
|                                      |  | Эндоцитоз  |  |  |
|                                      |  | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                     |  |  |
| Молекула иного типа массой до 600 Да | Как ваш препарат попадает в печень?            | С током крови, направленно   |  |  |
|                                      |  | Химически  |  |  |

|                                  |  |  |                                       |   |
|----------------------------------|--|--|---------------------------------------|---|
|                                  |  | ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень |                                       |   |
|                                  |  | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы. |                                       |   |
|                                  | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?   | Сшивается с лигандом, проходящим через мембрану клеток печени                    |                                       |   |
|                                  |  | Эндоцитоз  |                                       |   |
|                                  |  | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                           |                                       |   |
|                                  | Устойчив ли ваш препарат к кислой среде желудка? | Да   |                                       |   |
|                                  |  | Нет  | Способ защиты от кислой среды желудка | Не нужен, вводить в кровь                                   |
|                                  |  |  |                                       | Кислотоустойчивая капсула для перорального приема лекарства |
|                                  |  |  |                                       | Не нужна защита, какой-то процент всё равно попадет в кровь |
| Молекула иного типа массой свыше | Как ваш препарат попадает в печень?              | С током крови, направленно   |                                       |   |

|                          |  |  |                                       |   |
|--------------------------|--|--|---------------------------------------|---|
| 600                      | Да   |  |                                       |   |
| transport_what_more600da |  |  |                                       |   |
|                          |  | Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень |                                       |   |
|                          |  | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.           |                                       |   |
|                          | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?   | Сшивается с лигандом, проходящим через мембрану клеток печени                              |                                       |   |
|                          |  | Эндоцитоз  |                                       |   |
|                          |  | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                     |                                       |   |
|                          | Устойчив ли ваш препарат к кислой среде желудка? |  |                                       |   |
|                          |  | Да   |                                       |   |
|                          |  | Нет  | Способ защиты от кислой среды желудка | Не нужен, вводить в кровь                                   |
|                          |  |  |                                       | Кислотоустойчивая капсула для перорального приема лекарства |
|                          |  |  |                                       | Не нужна защита, какой-то процент всё равно попадет в       |

|                                       |  |  |  |       |
|---------------------------------------|--|--|--|-------|
|                                       |  |  |  | кровь |
| Способ попадания препарата в организм | Парентерально (в кровь)                          |  |  |       |
|                                       | Перорально (в виде таблеток)                     |  |  |       |
|                                       | Местное применение (нанести на поверхность кожи) |  |  |       |

**Ответ:**

**Варианты правильных решений**

| № | Вид терапии, для которого разрабатывается способ доставки | Поле   | Значение  | Качество | Комментарий   |
|---|---|--|---|----------|---|
| 1 | Искусственно вводимые интерфероны                         | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Белок   | 100      | Вы создали подходящую систему доставки препарата, учитывая особенности белков которым не нужно проникать в клетку и механизмы их действия. Ваш белок модифицирован для защиты от протеаз крови и циркулирует в кровяном русле, заходя в клетки лишь в ходе постоянного эндоцитоза, который не зависит от наличия или отсутствия в крови препарата. Это случайный процесс, на который вы не можете повлиять, но это не уменьшает эффективности вашей доставки. |
|   |   | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Полноразмерный белок до 50 кДа  |          |   |
|   |   | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки?                        | Нет   |          |   |
|   |   | Меры для защиты от протеаз   | Химические модификации для увеличения гидрофобности и защиты от протеаз |          |   |
|   |   | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                             | Эндоцитоз   |          |   |
| 2 | Антитела к вирусу   | К какому условному типу можно отнести действующее                            | Белок   | 100      | Вы создали подходящую систему доставки препарата белковой природы, который не нуждается в   |

|   |   |   |  |     |   |
|---|---|---|--|-----|---|
|   |   | вещество<br>вашего<br>лекарства?  |  |     | защите от протеаз, и действует вне клетки. Ваш белок имеет большую массу и циркулирует в кровяном русле, заходя в клетки лишь в ходе постоянного эндоцитоза, который не зависит от наличия или отсутствия в крови препарата. Это случайный процесс, на который вы не можете повлиять, но это не уменьшает эффективности вашей доставки. |
|   |   | Какого размера<br>ваше белковое<br>лекарство?   | Полноразмерны<br>й белок массой<br>свыше 50кДа |     |   |
|   |   | Необходимо ли<br>вашему<br>препарату<br>попасть внутрь<br>клетки?                                   | Нет  |     |   |
|   |   | Меры для<br>защиты от<br>протеаз  | Нет  |     |   |
|   |   | Как ваш<br>препарат<br>проходит через<br>мембрану<br>клетки?  | Эндоцитоз                                      |     |   |
|   |   | Способ<br>попадания<br>препарата в<br>организм  | Парентерально<br>(в кровь)                     |     |   |
| 3 | Белок-белковое взаимодействие ингибирующим эффектом<br><br>6-50 кДа<br><br>50-200 кДа<br><br>Закрытие молекулой препарата IRES<br>всего<br><br>Закрытие молекулой препарата участка связывания IRES с рибосомой | К какому<br>условному<br>типу можно<br>отнести<br>действующее<br>с вещество<br>вашего<br>лекарства? | Белок  | 90  | Вы создали подходящую систему доставки для белковых лекарственных препаратов, которые должны действовать внутри клетки. Не весь ваш препарат доходит до клеток-мишеней и частично разрушается в крови, тем не менее, препарат доходит и борется с вирусом.  |
|   |   | Какого размера<br>ваше белковое<br>лекарство?   | Полноразмерны<br>й белок до 50<br>кДа          |     |   |
|   |   | или   | Полноразмерны<br>й белок массой<br>свыше 50кДа | -10 |   |
|   |   | Необходимо ли<br>вашему<br>препарату<br>попасть внутрь<br>клетки?                                   | Да   |     |   |
|   |   | Меры для<br>защиты от<br>протеаз  | Нет  |     |   |
|   |   | Как ваш<br>препарат   | Эндоцитоз                                      | -15 |   |

|     |  |  |   |     |   |
|-----|--|--|---|-----|---|
|     | Пептид/белок   | проходит через мембрану клетки?  |   |     |   |
|     |  |  | <b>Сшивка молекулой, направленно поглощаемой целевой клеткой.</b>                       | с   |   |
|     |  | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)   |     |   |
|     | Белок-белковое взаимодействие ингибирующим эффектом              | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Белок   | 100 |   |
|     | 6-50 кДа   | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Полноразмерный белок до 50 кДа  |     |   |
|     | 50-200 кДа   |  | Полноразмерный белок массой свыше 50кДа   | -10 |   |
|     | Закрытие молекулой препарата IRES                                | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки?                        | Да  |     | Вы создали подходящую систему доставки для белковых лекарственных препаратов, которые должны действовать внутри клетки. Липосомальная система доставки показала себя с наилучшей стороны, до целевых клеток доходит значительная часть введенного препарата, что позволяет при оптимизации состава липосомальной мембраны для таргетирования мембран печени снизить концентрацию вводимого препарата. |
|     | Закрытие молекулой препарата участка связывания IRES с рибосомой | Меры для защиты от протеаз   | <b>Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.</b> |     |   |
|     |  | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                             | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                  | с   |   |
|     |  | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)   |     |   |
| 3.1 | Пептид/белок   |  |   |     |   |
| 4   | Имитация пептида в   | К какому   | Белок   | 100 | Вы создали  |

|     |  |  |   |     |  |
|-----|--|--|---|-----|--|
|     | активном центре, блокирующая работу NS3                    | условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства?          |   |     | подходящую систему доставки для пептидных лекарственных препаратов, которые должны действовать внутри клетки. Не весь ваш препарат доходит до клеток-мишеней и частично разрушается в крови, тем не менее, препарат доходит и борется с вирусом.   |
|     |  | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Пептид  |     |  |
|     |  | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки?                        | Да  |     |  |
|     |  | Меры для защиты от протеаз   | Нет   |     |  |
|     |  | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                             | Эндоцитоз   | -10 |  |
|     |  |  | <b>Сшивка молекулой, направленно поглощаемой целевой клеткой.</b> |     |  |
|     |  | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)   |     |  |
|     |  |  | Перорально (в виде таблеток)                                      | -20 |  |
| 4.1 | Имитация пептида в активном центре, блокирующая работу NS3 | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Белок   | 100 | Вы создали подходящую систему доставки для пептидных лекарственных препаратов, которые должны действовать внутри клетки. Липосомальная система доставки показала себя с наилучшей стороны, до целевых клеток доходит значительная часть введенного |
|     |  | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Пептид  |     |  |
|     |  | Необходимо ли вашему препарату   | Да  |     |  |

|     |  |  |   |     |   |
|-----|--|--|---|-----|---|
|     |  | попасть внутрь клетки?   |   |     | препарата, что позволяет при оптимизации состава липосомальной мембраны для таргетирования мембран печени снизить концентрацию вводимого препарата.   |
|     |  | Меры для защиты от протеаз   | <b>Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.</b> |     |   |
|     |  | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                             | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                  |     |   |
|     |  | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)   |     |   |
|     |  | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Белок   | 100 |   |
|     |  | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Пептид  |     |   |
|     |  | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки?                        | Да  |     | Вы создали подходящую систему доставки для пептидных лекарственных препаратов, которые должны действовать внутри клетки. Не весь ваш препарат доходит до клеток-мишеней и частично разрушается в крови, тем не менее, препарат доходит и борется с вирусом. Важнейшим плюсом вашей доставки лекарства является пероральное введение. Это упрощает применение и не требует медицинского работника для терапии. |
|     |  | Меры для защиты от протеаз   | <b>Поместить препарат в нерастворимую в желудке капсулу</b>                             |     |   |
|     |  | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                             | Эндоцитоз   | -10 |   |
| 4.2 | Имитация пептида в активном центре, блокирующая работу NS3 |  | Сшивку молекулой, направленно поглощаемой целевой клеткой.                              |     |   |



|   |  |  |  |     |  |
|---|--|--|--|-----|--|
|   |  | Способ попадания препарата в организм  | Перорально (в виде таблеток)   |     |  |
|   | РНК-интерференция гена NS5B  | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Олигонуклеотид или аналог  | 100 |  |
|   | Антисмысловая РНК к гену NS5B  | Модификации молекулы для устойчивости в клетке                               | Да, надо защитить от нуклеаз клетки.   |     |  |
|   | или  | Как будет осуществляться защита от нуклеаз клетки?                           | Химическая модификация сахаро-фосфатного остова  |     |  |
|   | Образование более энергетически выгодного и стабильного комплекса с коротким аналогом нуклеиновой кислоты, который приводит к разрушению имеющихся водородных связей и перестройке укладки | Как ваш препарат попадает в печень?  | <b>В крови связывается с белками плазмы и с током крови попадает в печень. Используется в чистом виде без модификаций.</b>       | -5  | Вы создали подходящую систему для доставки олигонуклеотидов.   |
|   | Антисмысловые РНК, которые свяжутся с одноцепочечными участками IRES, тем самым меняя структуру IRES   |  | <b>Химически соединяется с холестерином или подобным гидрофобным веществом, чтобы лучше накапливаться в печени с током крови</b> | -5  | Некоторую проблему для вас представляло попадание в клетку олигонуклеотидов без остатков лигандов или без связи с другими белками, но вы успешно с ней справились. |
| 5 | или  |  | <b>Химически соединяется с гидрофильным лигандом, направленно</b>  | -5  | Кроме того, вы успешно защитили ваш препарат от действия нуклеаз клетки.   |

|     |  |  |   |     |   |
|-----|--|--|---|-----|---|
|     |  |  | <b>идушим в печень с током крови</b>            |     |   |
|     | Нуклеиновая кислота                      | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Эндоцитоз                                       | -5  |   |
|     | РНК-интерференция гена NS4B              | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)                         |     |   |
|     | Антисмысловая РНК к гену NS4B            |  |   |     |   |
|     | или РНК-интерференция гена NS5A          |  |   |     |   |
|     | Антисмысловая РНК к гену NS5A            |  |   |     |   |
|     | или РНК-интерференция генов NS4A или NS3 |  |   |     |   |
|     | Антисмысловая РНК к NS4A или NS3         |  |   |     |   |
| 5.1 | Те же варианты, что и п.5                | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Олигонуклеотид или аналог                       | 100 | Вы создали подходящую систему доставки для олигонуклеотидного лекарства. Липосомальная система доставки показала себя с наилучшей стороны, до целевых клеток доходит значительная часть введенного препарата, что позволяет при оптимизации состава липосомальной мембраны для таргетирования |
|     |  | Модификации молекулы для устойчивости в клетке                               | Да, надо защитить от нуклеаз клетки.            |     |   |
|     |  | Как будет осуществляться защита от нуклеаз клетки?                           | Химическая модификация сахаро-фосфатного остова |     |   |

|   |                                 |  |  |     |   |
|---|---------------------------------|--|--|-----|---|
|   |                                 | Как ваш препарат попадает в печень?  | Олигонуклеотид помещается в липосому со специфическим для печени набором липидов мембраны  |     | мембран печени снизить концентрацию вводимого препарата. Кроме того, вы успешно защитили ваш препарат от действия нуклеаз клетки.   |
|   |                                 | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                     |     |   |
|   |                                 | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)  |     |   |
|   |                                 | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Аналог нуклеозидов   | 100 |   |
|   |                                 | Как ваш препарат попадает в печень?  | С током крови, направленно   | -5  | Вы создали подходящую систему доставки для нуклеозидных ингибиторов. Нуклеозидные ингибиторы - небольшие молекулы, которые просты и удобны в доставке практически в любом виде. |
|   |                                 | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень |     | Ваши испытания прошли успешно. Но вы предполагали неверный механизм попадания препарата в клетку.   |
|   |                                 |  | Эндоцитоз  |     |   |
| 6 | Аналоги нуклеозидов/нуклеотидов | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)  | -5  | Введение препарата через кровь позволяет использовать более низкие концентрации, чем при преоральном применении. Это удобный и действенный                                      |

|     |   |  |  |     |  |
|-----|---|--|--|-----|--|
|     |   |  |  |     | способ для врача, но, к сожалению, не слишком приятный для пациента.   |
|     |   |  | Перорально (в виде таблеток)   |     | Вы в полной мере распорядились преимуществами нуклеозидных ингибиторов - хорошим всасыванием в желудке и устойчивостью к среде в желудке. Принять таблетку - самый удобный способ для пациента   |
| 6.1 | Аналоги нуклеозидов/нуклеотидов   | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Аналог нуклеозидов   | 100 | Вы создали подходящую систему доставки для нуклеозидных ингибиторов. Липосомальная система доставки показала себя с наилучшей стороны, до целевых клеток доходит значительная часть введенного препарата, что позволяет при оптимизации состава липосомальной мембраны для таргетирования мембран печени снизить концентрацию вводимого препарата. |
|     |   | Как ваш препарат попадает в печень?  | <b>Олигонуклеотид помещается в липосому со специфическим для печени набором липидов мембраны</b> |     |  |
|     |   | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени   |     |  |
|     |   | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)  |     |  |
| 7   | Ненуклеозидные ингибиторы<br>Связывание с одним из аллостерических сайтов и | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Молкула иного типа массой до 600 Да  | 100 | Вы создали подходящую систему доставки для лекарственных препаратов массой до 600 Да. Не весь ваш препарат доходит до клеток-мишеней и частично разрушается в крови, тем не менее, препарат доходит и  |
|     |   | Как ваш препарат попадает в  | С током крови, направленно   | -15 |  |

|               |   |     |  |  |   |  |     |
|---------------|---|-----|--|--|---|--|-----|
| ингибирование | Связывание фермент-субстратным комплексом ингибирование реакции | с и | печень?  |  |   | борется с вирусом. Важнейшим плюсом вашей доставки лекарства является пероральное введение. Это упрощает применение и не требует медицинского работника для терапии. |     |
|               |   |     |  | Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень |   |  |     |
|               |   |     | 50-200 Да  | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?   | Сшивается с лигандом, проходящим через мембрану клеток печени       |  |     |
|               |   |     | 200-600 Да   |  | Эндоцитоз   |  | -5  |
|               |   |     | или  | Способ защиты от кислой среды желудка  | <b>Кислото-устойчивая капсула для перорального приема лекарства</b> |  | 70  |
|               |   |     | Прямые специфические ингибиторы                            |  |   |  |     |
|               |   |     | Связывание с одним из аллостерических сайтов ингибирование | Устойчив ли ваш препарат к кислой среде желудка?   | Нет   |  | -70 |
|               |   |     | Нарушение полимеризации белка NS4B                         |  | Да  |  |     |
|               |   |     | 50-200 Да  | Способ попадания препарата в организм  | Перорально (в виде таблеток)  |  |     |
|               |   |     | 200-600 Да   |  |   |  |     |
|               |   |     | или  |  |   |  |     |
|               |   |     | Прямые специфические ингибиторы                            |  |   |  |     |
|               |   |     | Связывание с одним из аллостерических сайтов ингибирование |  |   |  |     |
| 50-200 Да     |   |     |  |  |   |  |     |
| 200-600 Да    |   |     |  |  |   |  |     |
| или           |   |     |  |  |   |  |     |

|     |   |   |  |                                 |   |
|-----|---|---|--|---------------------------------|---|
|     | <p>Связывание в аллостерическом центре ингибиторным эффектом, направленным на препятствование образованию комплекса NS4A/NS3</p> <p>Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование</p> <p>50-200 Да</p> <p>200-600 Да</p> |   |  |                                 |   |
| 7.1 | <p>Те же варианты, что и в пункте 7.</p>  | <p>К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства?</p> <p>Как ваш препарат попадает в печень?</p> <p>Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?</p> <p>Способ попадания препарата в организм</p> | <p>Молкула иного типа массой до 600 Да</p> <p>С током крови, направленно</p> <p>Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень</p> <p>Сшивается с лигандом, проходящим через мембрану клеток печени</p> <p>Эндоцитоз</p> <p><b>Парентерально (в кровь)</b></p> | <p>100</p> <p>-15</p> <p>-5</p> | <p>Вы создали подходящую систему для доставки ингибиторов. Некоторую проблему для вас представляло попадание в клетку лекарственного препарата без остатков лигандов или без связи с другими белками, но вы успешно с ней справились. В ходе экспериментов вы пришли к выводу, что тяжелым молекулам сложно перемещаться по крови направленно и еще сложнее самостоятельно проникнуть в клетку.</p> |
| 7.2 | <p>Те же варианты, что и в пункте 7.</p>  | <p>К какому условному типу можно</p>  | <p>Молкула иного типа массой до 600 Да</p>   | <p>100</p>                      | <p>Вы создали подходящую систему для доставки</p>   |

|   |   |  |   |     |  |
|---|---|--|---|-----|--|
|   |   | отнести действующее вещество вашего лекарства?                               |   |     | специфических ингибиторов. Липосомальная система доставки показала себя с наилучшей стороны, до целевых клеток доходит значительная часть введенного препарата, что позволяет при оптимизации состава липосомальной мембраны для таргетирования мембран печени снизить концентрацию вводимого препарата. |
|   |   | Как ваш препарат попадает в печень?  | <b>Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.</b>           |     |  |
|   |   | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                             | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени  |     |  |
|   |   | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)   |     |  |
| 8 | Ненуклеозидные ингибиторы   | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Молекула иного типа массой свыше 600 Да   | 100 |  |
|   | Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование      | Как ваш препарат попадает в печень?  | <b>С током крови, направленно</b>   | -15 |  |
|   | Связывание фермент-субстратным комплексом и ингибирование реакции |  | <b>Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень</b> |     | Вы создали подходящую систему доставки для специфических ингибиторов. Тяжелым молекулам сложнее попасть в клетку без дополнительной помощи, но тем или иным способом вы решили эту проблему.   |
|   | 600-1000 Да или   | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Сшивается с лигандом, проходящим через мембрану клеток печени                                     |     |  |
|   | Прямые специфические ингибиторы                                   | Способ попадания препарата в организм  | Эндоцитоз   | -5  |  |
|   |   | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)   | -5  | Введение препарата через кровь позволяет использовать более  |

|     |   |          |                                     |                |  |            |
|-----|---|----------|-------------------------------------|----------------|--|------------|
|     |   | организм |                                     |                | низкие концентрации, чем при преоральном применении. Это удобный и действенный способ для врача, но, к сожалению, не слишком приятный для пациента.  |            |
|     |   |          |                                     |                | Вы в полной мере распорядились преимуществами нуклеозидных ингибиторов - хорошим всасыванием в желудке и устойчивостью к среде в желудке. Принять таблетку - самый удобный способ для пациента |            |
|     | Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование  |          | <b>Перорально (в виде таблеток)</b> |                |  |            |
|     | Нарушение полимеризации белка NS4B  |          |                                     |                |  |            |
|     | 600-1000 Да   |          |                                     |                |  |            |
|     | или   |          |                                     |                |  |            |
|     | Прямые специфические ингибиторы   |          |                                     |                |  |            |
|     | Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование  |          |                                     |                |  |            |
|     | 600-1000 Да   |          |                                     |                |  |            |
|     | или   |          |                                     |                |  |            |
|     | Связывание аллостерическом центре ингибиторным эффектом, направленным на препятствование образованию комплекса NS4A/NS3 |          |                                     |                |  |            |
|     | Связывание с одним из аллостерических сайтов и ингибирование  |          |                                     |                |  |            |
|     | 600-1000 Да   |          |                                     |                |  |            |
| 8.1 | Те же варианты, что   | К        | какому                              | Молекула иного | 100  | Вы создали |



|       |   |   |  |   |
|-------|---|---|--|---|
| и п.8 | условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | типа массой свыше 600 Да  |  | подходящую систему доставки для специфических ингибиторов. Липосомальная система доставки показала себя с наилучшей стороны, до целевых клеток доходит значительная часть введенного препарата, что позволяет при оптимизации состава липосомальной мембраны для таргетирования мембран печени снизить концентрацию вводимого препарата. Для тяжелых молекул липосомы едва ли не самый подходящий вариант доставки, судя по вашим предварительным экспериментам |
|       | Как ваш препарат попадает в печень?                                 | <b>Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.</b> |  |   |
|       | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки?                    | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                                  |  |   |
|       | Способ попадания препарата в организм                               | <b>Парентерально (в кровь)</b>  |  |   |

**Варианты ответов (сочетаний полей) при выборе которых задача считалась не решенной**

| №                                     | Поле   | Значение   | Комментарий   |
|---------------------------------------|--|--|---|
| 1                                     | Способ попадания препарата в организм  | Местное применение (нанести на поверхность кожи)   | На стадии исследований на животных вы измеряли концентрацию препарата в плазме крови и обнаружили, что препарат не проникает через кожу в достаточных количествах.  |
| Действующее вещество - олигонуклеотид |  |  |   |
| 2                                     | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Олигонуклеотид или аналог  | На стадии исследований на животных вы измеряли концентрацию препарата в плазме крови и поняли, что она слишком мала для эффективного действия. Попадая в желудочно-кишечный тракт препарат теряет эффективность |
|                                       | Способ попадания препарата в организм  | Перорально (в виде таблеток)   |   |
| 3                                     | Модификации молекулы для устойчивости в клетке                               | Нет, РНК - естественное для клетки вещество. В модификациях сверх того, что нужно для эффективности, нет необходимости | На стадии исследований на культуре клеток вы обнаружили, что препарат очень быстро разрушается в клетках. Из-за быстрого разрушения эффективность препарата была очень низкой.                                  |

|                              |  |   |  |
|------------------------------|--|---|--|
| 4                            | Как будет осуществляться защита от нуклеаз клетки?                                       | Модификация концов для защиты от экзонуклеаз  | На стадии исследований на культуре клеток вы обнаружили, что препарат очень быстро разрушается в клетках. Из-за быстрого разрушения эффективность препарата была очень низкой.   |
|                              |  | Модификация азотистых оснований   | На стадии исследований на культуре клеток вы обнаружили, что препарат очень быстро разрушается в клетках. Из-за быстрого разрушения эффективность препарата была очень низкой.   |
| 5                            | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?   | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени  | Вы противоречите сами себе. Вы не создали конструкцию доставки, а выбрали другие способы доставки, но предполагаете попадание в клетку с помощью конструкции. Это ваша логическая ошибка.  |
|                              | Как ваш препарат попадает в печень?  | В крови связывается с белками плазмы и с током крови попадает в печень. Используется в чистом виде без модификаций.       |  |
|                              |  | Химически соединяется с холестерином или подобным гидрофобным веществом, чтобы лучше накапливаться в печени с током крови |  |
|                              | Химически соединяется с гидрофильным лигандом, направленно идущим в печень с током крови |   |  |
| 6                            | Другое сочетание ответов отличное от верных  |   | На этапе тестов на животных вы обнаружили, что ваш препарат не действует или действует очень слабо. In vitro ваш препарат работал. Для этого может быть несколько причин: 1) Ваш препарат не попал в кровь; 2) Ваш препарат разрушился в крови; 3) Ваш препарат разрушился в клетке. Главная опасность для олигонуклеотидов - нуклеазы крови и нуклеазы клетки. Кроме того, помните, что не все средства доставки подходят для определенных способов введения. |
| Действующее вещество - белок |  |   |  |
| 7                            | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства?             | Белок   | На стадии исследований на животных вы измеряли концентрацию препарата в плазме крови и поняли, что она слишком мала для эффективного действия. Попадая в желудочно-  |

|     |  |  |   |
|-----|--|--|---|
|     | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Полноразмерный белок до 50 кДа   | кишечный тракт препарат не всасывается.   |
|     |  | Полноразмерный белок массой свыше 50кДа  |   |
|     | Меры для защиты от протеаз   | Нет  |   |
|     |  | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы. |   |
|     | Способ попадания препарата в организм  | Перорально (в виде таблеток)   |   |
| 7.1 | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Белок  | При введении вашего белкового препарата в кровь уже через короткое время он переставал действовать. Вы взяли на анализ кровь испытуемых с разными временными интервалами после введения и поняли, что ваш препарат быстро разрушается на отдельные пептиды. |
|     | Какого размера ваше белковое лекарство?                                      | Полноразмерный белок до 50 кДа   |   |
|     | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки?                        | Нет  |   |
|     | Меры для защиты от протеаз   | Нет  |   |
|     | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)  |   |
| 8   | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь клетки?                        | Нет  | При проведении испытаний вы обнаружили, что белок попадает в клетки. Но ваш белок действует снаружи клетки, ему не надо попадать внутрь. Внутри он не оказывает нужного действия.   |
|     | Меры для защиты от протеаз   | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы. |   |
|     | Способ попадания препарата в организм  | Парентерально (в кровь)  |   |
| 9   | Необходимо ли вашему препарату попасть внутрь                                | Нет  | При проведении испытаний вы обнаружили, что белок попадает в клетки. Но ваш белок действует   |

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
|   | клетки?  |  | снаружи клетки, ему не надо попадать внутрь. Внутри он не оказывает нужного действия.  |
|   | Способ попадания препарата в организм            | Парентерально (в кровь)  |  |
|   | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки? | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени<br>Сшивка с молекулой, направленно поглощаемой целевой клеткой. |  |
| 10  | Как ваш препарат проходит через мембрану клетки? | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени   | Вы противоречите сами себе. Вы не создали конструкцию доставки, а выбрали другие способы доставки, но предполагаете попадание в клетку с помощью конструкции. Ваши испытания будут успешными, но это ваша логическая ошибка.   |
|   | Способ попадания препарата в организм            | Парентерально (в кровь)  |  |
|   | Меры для защиты от протеаз                       | Химические модификации для увеличения гидрофобности и защиты от протеаз<br>Нет   |  |
| 11  | Меры для защиты от протеаз                       | Нет  | На стадии исследований на животных ваш препарат перестал действовать. В плазме крови он не накапливался. В кишечнике обнаружен не был. Вам кажется, что он разрушается в желудке под действием протеаз.  |
|   | Какого размера ваше белковое лекарство?          | Пептид   |  |
|   | Способ попадания препарата в организм            | Перорально (в виде таблеток)   |  |
| 12  | Другое сочетание ответов отличное от верных      |  | На этапе тестов на животных вы обнаружили, что ваш препарат не действует или действует очень слабо. In vitro ваш препарат работал. Для этого может быть несколько причин: 1) Ваш препарат не попал в кровь; 2) Ваш препарат разрушился в крови; 3) Ваш препарат разрушился в клетке. Главная опасность для белков - протеазы. Белки разрушаются в желудке. Полноразмерные белки плохо всасываются в кишечнике. В крови тоже есть протеазы, они могут разрушать белки. Кроме того, помните, что не все средства доставки подходят для определенных способов введения. |
| Действующее вещество - "Молекула иного типа массой до 600 Да" или "Молекула иного типа массой свыше 600 Да" |  |  |  |
| 13  | Устойчив ли ваш                                  | Нет  | На стадии исследований на животных   |

|                                  |  |  |  |
|----------------------------------|--|--|--|
|                                  | препарат к кислой среде желудка?   |  | вы измеряли концентрацию препарата в плазме крови и поняли, что она слишком мала для эффективного действия. Попадая в желудочно-кишечный тракт препарат разрушается  |
|                                  | Способ защиты от кислой среды желудка  | Не нужна защита, какой-то процент всё равно попадет в кровь  |  |
|                                  | Способ попадания препарата в организм  | Перорально (в виде таблеток)   |  |
|                                  | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Молекула иного типа массой до 600 Да<br>Молекула иного типа массой свыше 600 Да  |  |
| 14                               | Как ваш препарат попадает в печень?  | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы.   | Вы предполагали неверный механизм попадания препарата в клетку. Здесь есть логическая ошибка.  |
|                                  | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Сшивается с лигандом, проходящим через мембрану клеток печени<br>Эндоцитоз   |  |
| 15                               | Как ваш препарат попадает в печень?  | С током крови, направленно<br>Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень | Вы противоречите сами себе. Вы не создали конструкцию доставки, а выбрали другие способы доставки, но предполагаете попадание в клетку с помощью конструкции. Это ваша логическая ошибка.  |
|                                  | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени   |  |
| 16                               | Другое сочетание ответов отличное от верных                                  |  | На этапе тестов на животных вы обнаружили, что ваш препарат не действует или действует очень слабо. In vitro ваш препарат работал. Для этого может быть несколько причин: 1) Ваш препарат не попал в кровь; 2) Ваш препарат разрушился в желудке. Кроме того, помните, что не все средства доставки подходят для определенных способов введения. |
| Действующее вещество - нуклеозид |  |  |  |
| 17                               | Как ваш препарат попадает в печень?  | Химически ковалентно связывается с лигандом, идущим с током крови преимущественно в печень                               | На стадии исследований на животных вы обнаружили, что ваш препарат накапливается в печени, но не оказывает терапевтического эффекта. Когда вы посмотрели в какой форме препарат содержится в ткани печени,   |

|   |  |  |  |    |
|---|--|--|--|----|
|   |  |  | вы обнаружили, что он отделился от лиганда таким образом, что получил некоторые модификации, которые снизили его активность. Для веществ, входящих в активный центр фермента, очень важна их 3D структура, даже небольшая "лишняя" химическая группа может оказаться критичной.  |    |
| 18  | Как ваш препарат преодолевает мембрану клетки?                               | Слияние конструкции доставки с мембраной клеток печени                           | Вы противоречите сами себе. Вы не создали конструкцию доставки, а выбрали другие способы доставки, но предполагаете попадание в клетку с помощью конструкции. Ваши испытания будут успешными, но это ваша логическая ошибка.   |    |
|   | Как ваш препарат попадает в печень?  | С током крови, направленно   |  |    |
|   | Другое сочетание ответов отличное от верных                                  |  | На этапе тестов на животных вы обнаружили, что ваш препарат не действует или действует очень слабо. In vitro ваш препарат работал. Для этого может быть несколько причин: 1) Ваш препарат не попал в кровь; 2) Ваш препарат разрушился в желудке. Кроме того, помните, что не все средства доставки подходят для определенных способов введения. |    |
| Ошибки в способе попадания препарата в организм |  |  |  |    |
| 19  | Способ попадания препарата в организм  | Перорально (в виде таблеток)   | Биодоступность ваших созданных конструкций оказалась не слишком высокой. Эффективнее вводить липосомы в кровь, потому что у них не получается преодолеть кишечник в неизменном виде.   |    |
|   | Как ваш препарат попадает в печень?  | Использовать специальные наноразмерные конструкции доставки, например, липосомы. |  |    |
|   | К какому условному типу можно отнести действующее вещество вашего лекарства? | Молекула иного типа массой до 600 Да   |  | Да |
|   |  | Молекула иного типа массой свыше 600 Да  |  | Да |
|   |  | Белок  |  |    |
| Олигонуклеотид или аналог                       |  |  |  |    |
|   | Аналог нуклеозидов   |  |  |    |