Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Матвеев Андрей Леонидович

Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеризация

03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., доцент Н. В. Тикунова

Новосибирск – 2019

Оглавление

ОГЛАВЛЕНИЕ 2

ВВЕДЕНИЕ 6

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11

1.1. КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ 11

1.1.1. Вирус клещевого энцефалита: организация вириона и жизненный цикл 11

1.1.2. Переносчики вируса клещевого энцефалита и способ заражения 16

1.1.3. Генетическое разнообразие ВКЭ 16

1.1.4. Патогенез КЭ 18

1.1.5. Методы профилактики и лечения КЭ 21

1.2. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ 25

1.2.1.Основные подходы к конструированию полноразмерных антител 25

1.2.2. Особенности наработки рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих 30

1.2.3. Клетки млекопитающих, используемые для продукции терапевтических белков 31

1.2.4. Векторные плазмиды и их доставка в клетки, используемые селективные маркеры 36

1.2.5. Способы сайт-направленной интеграции целевых генов в геном 41

1.2.6. Способы увеличения скорости пролиферации клеток и продолжительности их жизни 45

1.2.7. Способы воздействия на секрецию и фолдинг рекомбинантных гликопротеинов 47

1.2.8. Оптимизация ростовых сред и способы культивирования штаммов-продуцентов 50

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 55

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....58

2.1. МАТЕРИАЛЫ.....58

2.1.1. Реактивы 58

2.1.2. Эукариотические и бактериальные клетки 59

2.1.3. Вирусы и бактериофаги.....59

2.1.4. Лабораторные животные 59

2.1.5. Комбинаторные фаговые библиотеки.....60

2.1.6. Ферменты.....60

2.1.7. Растворы.....60

2.1.8. Культуральные среды 61

2.1.9. Плазмиды.....61

2.1.10. Праймеры.....62

2.2 МЕТОДЫ.....63

2.2.1. Иммуноферментный анализ.....63

2.2.2. Выделение суммарной РНК из гибридомных клеток.....64

2.2.3. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) 64

2.2.4. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса 64

2.2.5. Определение нуклеотидных последовательностей 65

2.2.6. Электрофоретический анализ белков 65

2.2.7. Вестерн-блот анализ белков 66

2.2.8. Ферментативный гидролиз ДНК.....67

2.2.9. Экстракция фрагментов ДНК из агарозного геля.....67

2.2.10. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду.....67

2.2.11. Трансформация клеток E. coli плазмидной ДНК 67

2.2.12. Электрофоретическое фракционирование ДНК 68

2.2.13. Амплификация фрагментов гена, кодирующего гликопротеин E ВКЭ 68

2.2.14. Выделение плазмидной ДНК, не содержащей эндотоксинов 68

2.2.15. Адаптация клеток CHO K1 к суспензионному росту в бессывороточных средах 69

2.2.16. Трансфекция эукариотических клеток плазмидными ДНК 69

2.2.17. Очистка полноразмерных антител с использованием аффинной хроматографии 70
2.2.18. Получение штаммов-продуцентов полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-S 70
2.2.19. Оценка константы связывания антитела chFVN145 с белком Е ВКЭ 71
2.2.20. Исследование протективных свойств химерного антитела chFVN145 на мышиной модели КЭ 72
2.2.21. Статистический анализ 72
2.2.22. Амплификация пептидных библиотек 73
2.2.23. Аффинное обогащение пептидных библиотек 73
2.2.24. Выделение фаговых частиц, экспонирующих пептиды 74
2.2.25. Выделение ДНК бактериофагов, несущих пептид 75
2.2.26. Полимеразная цепная реакция с бляшек и определение нуклеотидной последовательности 75
2.2.27. 3D-моделирование структуры гликопротеина Е ВКЭ 75

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 76

3.1. СОЗДАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ОСНОВЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК 76
3.1.1. Создание суспензионной линии CHO-S 76
3.1.2. Получение штамма-продуцента химерного антитела против ВКЭ с использованием плазмид pCLm4/hygro-FVN145 и pCHm2 -FVN145 77
3.1.3. Получение штаммов-продуцентов химерного антитела против ВКЭ с использованием бицистронной плазмиды pBudCE4.1 и ее производных 79
3.1.4. Создание суспензионной линии CHO-S/FRT 85
3.1.5. Конструирование кассетной плазмиды, кодирующей константные домены антитела человека, сайт гомологичной рекомбинации FRT и участки для быстрого клонирования генов, кодирующих целевые вариабельные домены антител 86

3.1.6. Конструирование плазмиды, несущей ген, который кодирует химерное антитело chFVN145, и локусы, обеспечивающие сайт-направленную рекомбинацию в геном 90

3.1.7. Создание штамма-продуцента химерного антитела chFVN145 с использованием гомологичной рекомбинации 90

3.1.8. Наработка и очистка химерного антитела против вируса клещевого энцефалита 93

3.2. ОЦЕНКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИТЕЛА chFVN145 ПРОТИВ ВКЭ 95

3.2.1. Подготовка очищенного препарата антитела chFVN145; вестерн-блот анализ 95

3.2.2. Изучение аффинности антитела chFVN145 97

3.2.3. Изучение эпитопной специфичности химерного антитела против вируса клещевого энцефалита с использованием рекомбинантных фрагментов белка E .98

3.2.4. Эпитопное картирование хАТ chFVN145 с использованием комбинаторных пептидных библиотек 100

3.3. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ АНТИТЕЛА chFVN145 103

3.3.1. Исследование способности антитела chFVN145 обеспечивать постконтактную профилактику ВКЭ у зараженных мышей 103

3.3.2. Исследование терапевтической эффективности антитела chFVN145 на мышиной модели 105

3.3.3. Подтверждение отсутствия опосредованного антителом chFVN145 усиления инфекции in vivo ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 112

ВЫВОДЫ 113

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 114

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 117

ВВЕДЕНИЕ

Клещевой вирусный энцефалит (КЭ) – природно-очаговое инфекционное заболевание, способное привести к тяжелейшим неврологическим последствиям и даже смерти больного. Этиологическим агентом является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), представитель семейства *Flaviviridae*. ВКЭ в основном передается при укусах иксодовых клещей, населяющих лесные районы Евразии. Кроме Российской Федерации, заболевания, вызванные ВКЭ, регистрируются в Китае, Монголии, Казахстане и в 27 европейских странах; более половины всех случаев КЭ и всех смертельных исходов этого заболевания регистрируются в РФ [WHO, 2011].

Существует три основных субтипа ВКЭ – Дальневосточный, Европейский и Сибирский [Gritsun et al., 2003b], причем считается, что ВКЭ Европейского субтипа чаще всего вызывает легкие формы КЭ, наиболее тяжелые формы чаще ассоциируются с ВКЭ Дальневосточного субтипа, а ВКЭ Сибирского субтипа вызывает КЭ с промежуточной тяжестью [Gritsun et al., 2003a; 2003b]. В некоторых регионах Евразии встречаются два или даже три основных субтипа ВКЭ; к таким регионам относятся Сибирь, страны Балтии и Украина [WHO, 2011].

Наиболее эффективным способом борьбы с КЭ является вакцинопрофилактика. В настоящее время эффективные вакцины производятся и в РФ, и за рубежом. Однако, в ряде регионов уровень вакцинации недостаточен. В большинстве стран, где встречается ВКЭ, отсутствуют специфические препараты для лечения КЭ. Производство выпускавшегося ранее анти-ВКЭ сывороточного иммуноглобулина FSME-Bulin было приостановлено из-за опасений относительно возможного антитело-зависимого усиления инфекции после его введения пациентам. В РФ, где регистрируется большинство наиболее тяжелых и смертельных случаев КЭ, для его экстренной профилактики и терапии применяют иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита, получаемый из донорской крови. Этот препарат обладает выраженным терапевтическим действием, а также защитным эффектом, при введении не вакцинированным людям в первые дни после укуса зараженного клеща [Лашкевич и Карганова, 2007; Пеньевская и Рудаков, 2010]. Однако, как и другие препараты, получаемые из донорской крови, противоклещевой иммуноглобулин обладает некоторыми недостатками, включая ограниченное количество плазмы от вакцинированных доноров; гетерогенность используемой

донорской крови и, как следствие, недостаточная стандартизация препарата; потенциальный биологический риск, связанный с присутствием в донорской крови не идентифицированных инфекционных агентов, прионов и аллергенов. В связи с этим необходима разработка альтернативных противоклещевых препаратов, в производстве которых не используется донорская кровь.

Перспективным подходом к разработке нового препарата является создание специфических рекомбинантных антител, в частности, химерного антитела против ВКЭ. В химерных антителах к константным доменам иммоноглобулинов человека присоединены вариабельные домены моноклональных антител мыши. Ранее в НИБХ СО АН (ныне ИХБФМ СО РАН) была получена большая панель моноклональных антител мыши против гликопротеина Е ВКЭ. Некоторые из этих антител обладали способностью нейтрализовать инфекционность ВКЭ *in vitro* [Tsekhanovskaya et al., 1993]. На основе вариабельных доменов вируснейтрализующих мышиных антител было создано несколько химерных антител против ВКЭ, два из них были способны нейтрализовать инфекционность ВКЭ *in vitro* [Baykov et al., 2014; Levanov et al., 2010]. Одно химерное антитело защищало мышей, инфицированных ВКЭ Европейского субтипа, однако оно нарабатывалось в транзиентной системе экспрессии [Baykov et al., 2014].

Целью данной работы являлось создание штамма-продуцента химерного антитела, обладающего протективной активностью в отношении трех основных субтипов ВКЭ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Создать штамм эукариотических клеток, стабильно продуцирующих химерное антитело против ВКЭ.

2. Получить препарат очищенного химерного антитела и оценить аффинность этого антитела.

3. Определить эпитопную специфичность химерного антитела против ВКЭ.

4. Исследовать протективные свойства химерного антитела против ВКЭ в отношении Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса в экспериментах *in vivo*.

5. Изучить возможность усиления инфекции при введении суб-протективных доз антитела.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В данной работе впервые был создан стабильный штамм суспензионных клеток, продуцирующих химерное антитело против белка Е ВКЭ и показано, что химерное антитело chFVN145 способно защищать модельных животных от заражения штаммами ВКЭ трех основных субтипов – Европейского, Сибирского и Дальневосточного. Введение антитела chFVN145 через 1, 2 и 3 дня после заражения спасало более 50% модельных животных; введение суб-протективных доз этого широко-протективного химерного антитела зараженным животным не вызывало усиления инфекции. Впервые локализован на петлях в N-концевом участке домена D3 белка Е ВКЭ эпитоп, отвечающий за связывание с широко-протективным антителом chFVN145.

Практическая значимость работы состоит в разработке потенциально терапевтического препарата для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита. Кроме того, создана панель штаммов на основе суспензионных эукариотических клеток для разработки на их основе штаммов-продуцентов эукариотических белков; сконструированы кассетные векторные плазмиды для создания с их помощью штаммов-продуцентов различных полноразмерных антител. С помощью созданных штаммов и плазмид уже были получены полноразмерные антитела человека против ортопоксвирусов. Выявленная последовательность эпитопа, узнаваемого широко-протективным антителом chFVN145, может быть полезна при создании полиэпитопных вакцин и исследовании механизмов антитело-зависимого усиления инфекции и нейтрализации ВКЭ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Созданный оригинальный суспензионный штамм CHO-S/FRT, в геноме которого сайты гомологичной рекомбинации введены в транскрипционно активные участки хроматина, пригоден для создания на его основе штаммов-продуцентов полноразмерных антител.
2. Химерное антитело chFVN145 обладает наномолярной аффинностью.

3. Обнаружен новый эпитоп в составе белка Е ВКЭ, включающий аминокислотные остатки 307-313 и 333–338, расположенные в домене D3.
4. Химерное антитело chFVN145 способно защищать мышей от заражения ВКЭ Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов.
5. Введение суб-протективных доз антитела chFVN145 не вызывало у зараженных мышей уменьшения средней продолжительности жизни по сравнению с контрольными зараженными мышами, которым не вводили антитело.

Апробация работы и публикации

По результатам диссертационной опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Материалы диссертации были представлены на 7 международных конференциях: XII International Jena Symposium on Tickborne Diseases (IJSTD XII) (Веймар, Германия, 2013); 38-th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013); The 17th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (Прага, Чешская Республика, 2014); The 17th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (Прага, Чешская Республика, 2014); 3rd Antivirals Congress (Амстердам, Голландия, 2014); Biologics & Biosimilars Congress (Берлин, Германия, 2016); 43-th FEBS Congress (Прага, Чешская Республика, 2018) и 9 Российских конференциях: Международная научно-практическая конференция "Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами (Иркутск, Листвянка, Россия, 2012); Международная научно-практическая конференция "Клещевой энцефалит и другие инфекции, переносимые клещами (Иркутск, Листвянка, Россия, 2012); Научная конференция «Фундаментальные науки - медицине» (Новосибирск, Россия, 2012); Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни» (Москва, Россия, 2014); Конференция. посвященная 60-летнему юбилею основания Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (Москва, Россия, 2015); Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (Новосибирск, Россия, 2016), IV Национальный конгресс бактериологов и Международный симпозиум Microbios-2018 (Омск, Россия, 2018); OpenBio 2018 (Новосибирск, Россия, 2018); OpenBio 2019 (Новосибирск, Россия, 2019).

Вклад автора

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН. Большинство экспериментов и анализ полученных данных сделаны лично автором, включая конструирование плазмидных ДНК, несущих гены тяжелых и легких цепей антитела, получение полноразмерных антител человека, получение штаммов-продуцентов полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-S, CHO-S/FRT, изучение их свойств, исследование антигенных свойств укороченных вариантов белка E и картирование специфического эпитопа с использованием пептидных библиотек. В планировании некоторых стадий при создании генетических конструкций принимала участие к.б.н. И.Н. Бабкина. Измерение аффиности антител человека проводили совместно с к.б.н. И.К. Байковым. Протективная активность антител была исследована в НПО «Микроген», г. Томск и в ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 20 рисунков и 4 таблицы. Библиография включает 314 литературных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Клещевой вирусный энцефалит

1.1.1. Вирус клещевого энцефалита: организация вириона и жизненный цикл

Клещевой вирусный энцефалит (КЭ) – вирусное заболевание, способное вызывать тяжелое поражение нервной системы человека. Возбудителем КЭ является вирус ВКЭ, который является членом семейства Flaviviridae, рода *Flavivirus*. Этот род содержит три группы вирусов: вирусы, переносимые клещами, вирусы, переносимые комарами, и вирусы, чей переносчик неизвестен. В группу вирусов, переносимых клещами, кроме ВКЭ, входят вирус омской геморрагической лихорадки (Omsk hemorrhagic fever virus, вирус шотландского энцефалита овец (Louping ill virus), вирус Лангат (Langat virus), вирус Повассан (Powassan virus), вирус кьясанурской болезни (Kyasanur Forest disease virus) и др. [Lindenbach et al., 2013].

Вирионы ВКЭ диаметром около 50 нм покрыты липидной оболочкой. Геном ВКЭ – кодирующая одноцепочечная РНК (+оцРНК) длиной более 10,5 тысяч нуклеотидов [Pletnev et al., 1986; Füzik et al., 2018]. Геномная РНК ВКЭ на 5'-конце кэпирована и содержит одну протяженную открытую рамку трансляции (ОРТ), которая фланкирована 5'- и 3'- нетранслируемыми областями (рис. 1). ОРТ ВКЭ кодирует один полипротеин длиной более 3400 аминокислотных остатков (ако), который затем модифицируется и расщепляется вирусными и клеточными протеазами на три структурных (C, prM и E) и семь неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5) (рис. 1) [Lindenbach et al., 2013].

Основным иммуногенным белком ВКЭ, является гликопротеин E (рис. 1, 2) [Lindenbach et al., 2013]. Рентгеноструктурный анализ показал, что гликопротеин E содержит три домена (D1 – D3) и C-концевой гидрофобный участок (с 396 по 496 ако), который включает трансмембранный регион (448–496 ако), в то время как домены D1 – D3 находятся на поверхности вириона [Rey et al., 1995]. Генетические последовательности, кодирующие участки доменов D1 (1–51 ако, 137–189 ако, 295–300 ако) и D2 (52–135, ако 195–284), перемежаются в геномной РНК ВКЭ; домен D3 (301–397 ако) кодируется непрерывной последовательностью (рис. 2). Все три

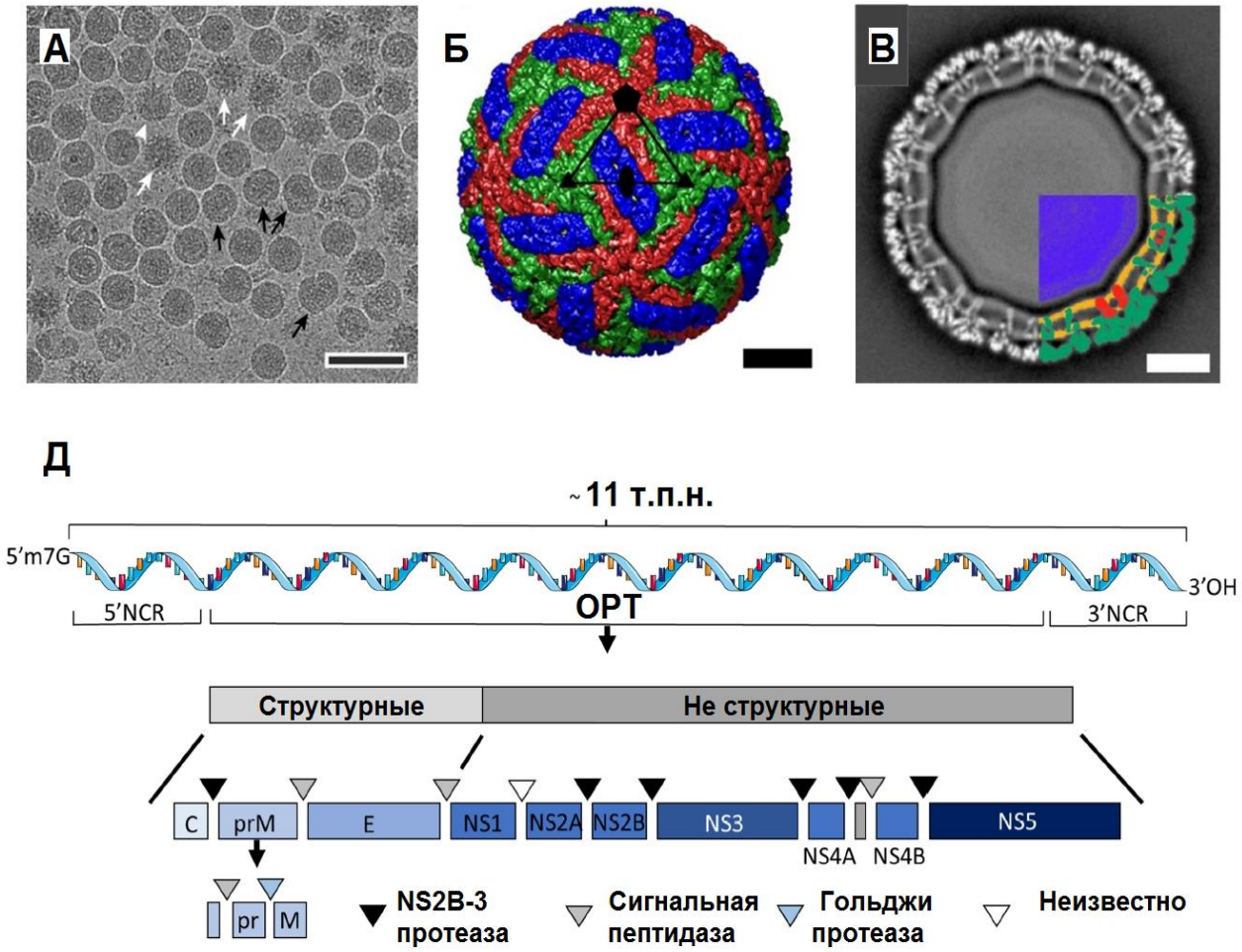


Рисунок 1 – Структура зрелого вириона ВКЭ. (А) Криоэлектронная микрофотография вирионов ВКЭ. Образец содержит зрелые, незрелые и полузрелые (белые стрелки), а так же поврежденные (черные стрелки) частицы. Масштаб 100 нм. (Б) Молекулярная поверхность вириона ВКЭ. Три субъединицы белка Е в каждой икосаэдрической асимметричной единице показаны красным, зеленым и синим цветом. Масштаб 10 нм. (В) Центральный срез карты электронной плотности ВКЭ, перпендикулярный оси пятого порядка вируса. Вирусная мембрана пронизана трансмембранными спиралями белков Е и М. Нижний правый квадрант среза имеет цветовую кодировку следующим образом: нуклеокапсид – синий; листочки внутренней и наружной мембран – оранжевые; белок М – красный; белок Е – зеленый. Масштаб 10 нм. (Г) Схематическое представление организации генома ВКЭ и событий, связанных с созреванием полипротеинов [Füzik et al., 2018]

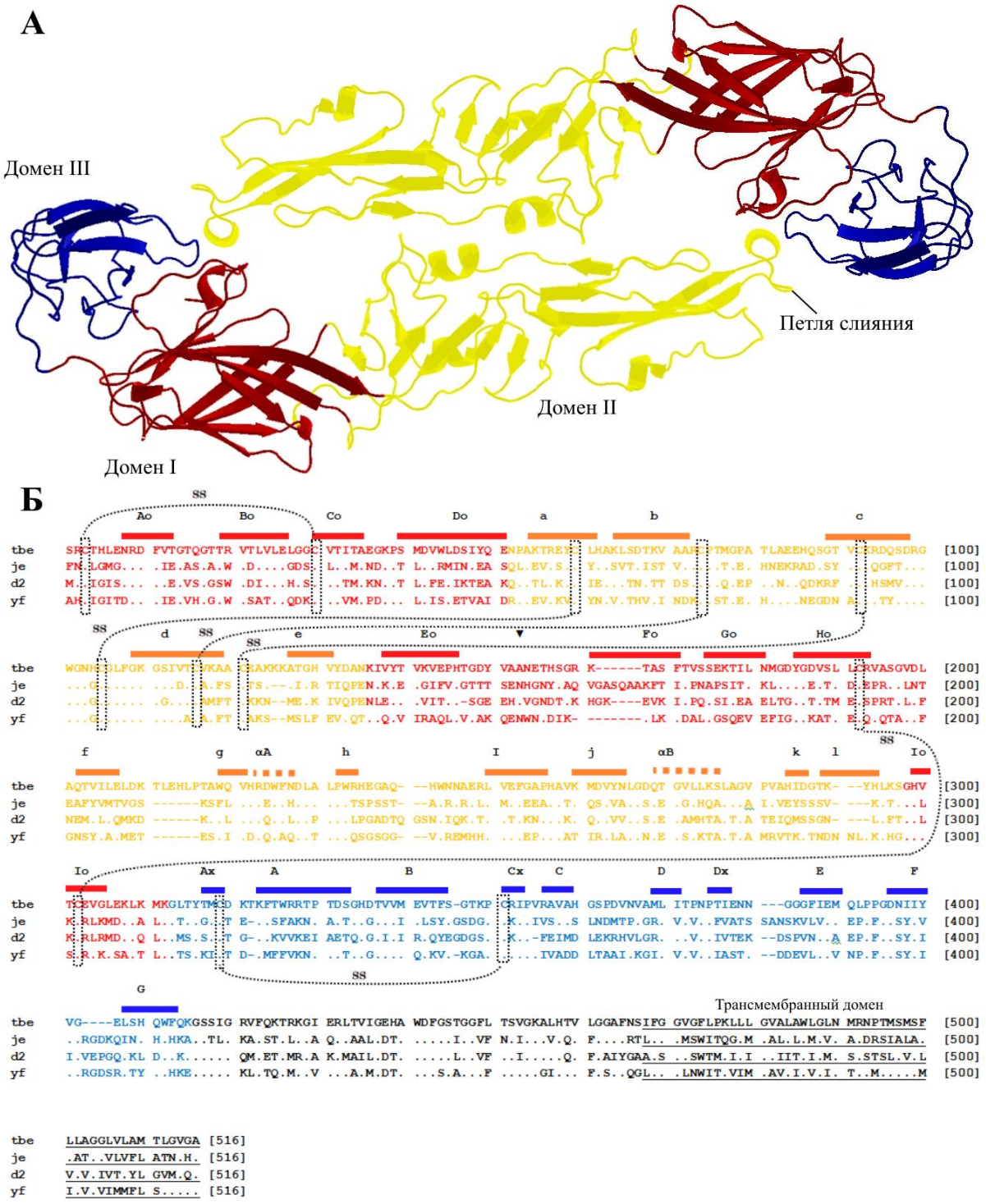


Рисунок 2 – Структурная организация гликопротеина Е ВКЭ. Домен 1 окрашен красным, домен 2 – желтым, домен 3 – синим. А. Ленточная модель димера белка Е ВКЭ. Б. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков оболочки флавивирусов: tbe - ВКЭ Neudörfl, je - вирус японского энцефалита, yf - вирус желтой лихорадки, d2 - вирус денге, серотип 2. Точки показывают идентичные аминокислотные остатки; черные штрихи - делеции. S-S мостики обозначены пунктирными линиями. С-концевая область, которая не входит в растворимый фрагмент белка Е, выделена черным, трансмембранный сегмент подчеркнут. Сайт гликозилирования обозначен треугольником. Элементы вторичной структуры отмечены сплошными линиями (β-тяжи) и пунктирными линиями (альфа-спирали) над последовательностью. Приведено по Rey et al., 1995

домена образованы β-складками. Домен D1, находящийся между доменами D2 и D3, – это центральный домен, β-тяжи которого образуют структуру типа β-бочки. Домен D2, отвечающий за димеризацию гликопротеина E, имеет вытянутую пальцевидную структуру. В домене D2 β-тяжи *c* и *d* объединяет гидрофобная *cd*-петля, называемая также петлей слияния (fusion loop). Петля слияния играет важную роль в проникновении флавивирусов в клетку, и ее последовательность высококонсервативна для флавивирусов. Домен D3, имеющий конформационное сходство с константными доменами иммуноглобулинов, образует сэндвич-структуру из двух β-листов и отвечает за взаимодействие с рецепторами клетки [Füzik et al., 2018]. Белок E гликозилирован, сайт гликозилирования находится в домене D1 в позиции N_{154} [Rey et al., 1995].

Сложное конформационное строение гликопротеина E стабилизировано шестью дисульфидными мостиками, и на поверхности интактного вириона гликопротеин E находится в виде гомодимера по принципу «голова к хвосту» (рис. 2). Гомодимер белка E дополнительно стабилизирован белком M; петли слияния обоих мономеров находятся внутри белка и не экспонированы на поверхности вириона. При уменьшении pH среды ниже 6,5 происходит конформационная перестройка гликопротеина E; из гомодимера он превращается в гомотример (рис. 3). При этом петля слияния сближается с мембраной эндосомы, эндосомальная и вирионная мембраны сливаются, и вирусная частица проникает в клеточную цитоплазму, где происходит высвобождение геномной РНК (рис. 3).

При репликации ВКЭ сначала синтезируется антисмысловая вирусная РНК, которая затем служит матрицей для образования геномной вирусной +оцРНК. Репликативные комплексы локализуются в мембранных структурах клетки внутри эндоплазматического ретикулума (ЭР). Собранные нуклеокапсиды покрываются липидными оболочками в просвете ЭР путем образования «почек». Незрелые вирусные частицы, образованные таким образом, проходят через комплекс Гольджи и подвергаются созреванию. Созревание включает в себя превращение из незрелых, покрытых «шипиками» вирионов в зрелые гладкие вирусные частицы. Этот процесс включает расщепление белка prM и реорганизацию белка E с образованием гомодимеров, способных к слиянию. Затем зрелые вирусные частицы

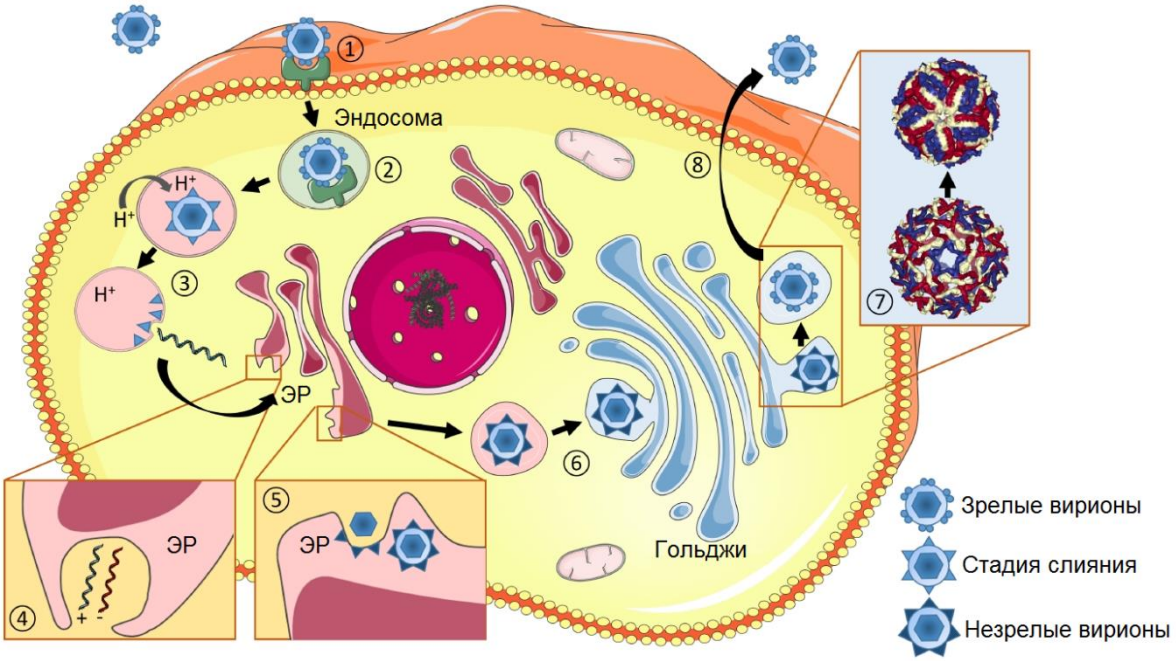


Рисунок 3 – Схематическая иллюстрация жизненного цикла ВКЭ. (1) Инфекция начинается со связывания вирусных частиц со специфическими рецепторами клеточной поверхности. (2) Вирусные частицы попадают в клетки путем эндоцитоза. (3) Низкий pH в зрелой эндосоме вызывает конформационные изменения в белке E, приводящие к перегруппировке димеров в тримерные формы (стадия слияния или фузогенное состояние) и последующему слиянию вирусной оболочки с эндосомальными мембранами, что приводит к раздеванию вириона. (4) Репликация вируса происходит посредством синтеза антисмысловой (-)РНК, которая служит матрицей для продукции геномной РНК. Репликационные комплексы локализуются в мембранных структурах внутри ЭР. (5) Собранные нуклеокапсиды приобретают липидные оболочки путем образования почек в просвете ЭР. (6) Незрелые частицы проходят через комплекс Гольджи. (7) Созревание происходит в комплексе Гольджи и включает расщепление белка prM и реорганизацию белков E в компетентные для слияния гомодимеры, что приводит к переходу от колючих незрелых к гладким зрелым частицам. (8) Зрелые частицы транспортируются в цитоплазматических пузырьках и высвобождаются во внеклеточное пространство путем экзоцитоза

экспортируются из комплекса Гольджи в цитоплазматические везикулы и высвобождаются из клеток-хозяев путем экзоцитоза (рис. 3) [Lindenbach et al., 2013].

1.1.2. Переносчики вируса клещевого энцефалита и способ заражения

Заражение человека ВКЭ происходит при укусе клеща, инфицированного ВКЭ. Чаще всего преносчиками ВКЭ являются клещи рода *Ixodes: I. ricinus* – в Западной и Восточной Европе, и *I. persulcatus* – в Восточной Европе, в азиатской части России, на севере Казахстана, Монголии и Китая [Lindenbach et al., 2013]. Около 1% всех случаев КЭ в Европе вызвано пищевым заражением при употреблении не пастеризованного молока коз, овец или коров, а также молочных субпродуктов, изготовленных из такого молока [Kriz et al., 2009]. Такой способ заражения в основном регистрируется в Восточной Европе и на Балканах; однако небольшие вспышки пищевого КЭ также были зарегистрированы в Центральной и Западной Европе и в РФ [Kohl et al., 1996; Gresikova et al., 1975; Holzmann et al., 2009; Caini et al., 2012; Hudopisk et al., 2013]. Кроме того, недавно в Польше были описаны случаи ВКЭ, связанные с трансплантацией органов [Lipowski et al., 2017].

На сегодняшний день КЭ является эндемичной болезнью в 27 европейских и, по крайней мере, в четырех азиатских странах [Steffen, 2016]. В Европе в последние годы заболеваемость КЭ растет, а в России уровень заболеваемости снизился по сравнению с наблюдавшимся в конце 1990-х годов, и продолжает снижаться, несмотря на регистрируемый рост числа людей, подвергшихся укусам клещей [Suss, 2011; Erber et al., 2018]. Следует отметить, что в европейских странах существует проблема с точной статистикой заболеваемости КЭ; в некоторых странах регистрируются только клинически выраженные случаи, в то время как в других, например, в некоторых странах Балтии, регистрируются и бессимптомные случаи, при которых наблюдается только сероконверсия [Suss, 2011; Erber et al., 2018].

1.1.3. Генетическое разнообразие ВКЭ

Данные филогенического анализа ранее отсеквенированых штаммов ВКЭ, выявленных на эндемичных территориях в Европе и Азии, показали, что ВКЭ можно разделить на три основных субтипа: Европейский (ВКЭ-Ев), Сибирский (ВКЭ-Сиб) и Дальневосточный (ВКЭ-ДВ) [Ecker et al., 1999]. Позднее были выделены еще две дополнительные генетические линии («178–79» и «группа 886–84»), которые также

были предложены в качестве субтипов ВКЭ [Demina et al., 2010]. И если генетическая группа 178–79 до сих пор представлена только одним штаммом, то «группа 886-84» включает несколько десятков штаммов, выделенных от клещей и мелких млекопитающих, отловленных в Восточной Сибири около озера Байкал и в Северной Монголии, а также из тканей больного, погибшего от ВКЭ [Kozlova et al., 2018]. В настоящее время предложено назвать этот генетический вариант ВКЭ Байкальским субтипом с прототипным штаммом «886-84» [Kozlova et al., 2018]. Еще один новый потенциальный субтип ВКЭ - Гималайский, был недавно идентифицирован у диких грызунов *Marmota himalayana* на плато Цинхай-Тибет в Китае [Dai et al., 2018]. О выявлении этого генетического варианта ВКЭ у больных или у клещей не сообщалось.

Ранее полагали, что субтип ВКЭ-Ев распространен по всей Европе, включая европейскую часть России, тогда как субтипы ВКЭ-Сиб и ВКЭ-ДВ встречаются в Азии. В настоящее время показано, что в некоторых регионах сосуществуют два или даже три основных субтипа ВКЭ, например, страны Балтии, Сибирь, Украина.

Инфекция, вызванная субтипом ВКЭ-Ев, обычно приводит к довольно легкой форме с уровнем смертности <2%. Считается, что заболевания, вызванные субтипом ВКЭ-ДВ, протекают чаще в тяжелых формах, с высоким уровнем смертности [Gritsun et al., 2003a]. Субтип ВКЭ-Сиб, как полагают, вызывает заболевания с промежуточной тяжестью и существенно меньшей смертностью; чаще такой ВКЭ протекает в форме непаралитического фебрильной энцефалита [Gritsun et al., 2003b]. Вместе с тем, полагают, что субтип ВКЭ-Сиб чаще вызывает персистирующий КЭ, вызванный хронической вирусной инфекцией [Mandl, 2005]. Кроме того, описаны случаи геморрагического КЭ у пациентов из России; такие формы этого заболевания не встречаются в Европейских странах [Ternovoi et al., 2003]. Также у пациентов из России регистрируются хронические/прогрессирующие формы КЭ, что также редко встречается, если вообще встречается в Европе [Gritsun et al., 2003a, 2003b; Mickienė et al., 2002].

Важно отметить, что, согласно современным данным, вирусный субтип не является единственным определяющим фактором тяжести КЭ; как легкие, так и тяжелые случаи КЭ были связаны с инфекцией любым из субтипов. Таким образом, кроме вирусного субтипа или кажущейся вирулентности определенного субтипа

ВКЭ, другие факторы могут влиять на тяжесть КЭ, включая дозу инфекционного вируса, а также возраст, генотип, состояние иммунитета и общее состояние здоровья инфицированного человека [Mickienė et al., 2014; Barkhash et al., 2010, 2012; 2013, 2016; 2018; Kaiser, 2012; Zajkowska et al., 2011].

1.1.4. Патогенез КЭ

Для того, чтобы ВКЭ вызвал заболевание после укуса клеща, вирус должен преодолеть ряд защитных барьеров в организме (рис. 4). Первым основным барьером является кожа. Поскольку ВКЭ передается клещами, этот барьер легко преодолевается путем инъекции вирусных частиц со слюной во время присасывания клеща. Слюна клеща содержит фармакологически активные молекулы, которые умешьшают защитные механизмы организма, такие как болевые и зудные рефлексы, гемостаз, воспаление, врожденный и адаптивный иммунитет, а также заживление ран [Wikel, 2013]. Соответственно, эти компоненты слюны клещей попадают в кровь одновременно с передачей ВКЭ [Labuda et al., 1996] и, таким образом, усиливают инфекцию и распространение ВКЭ в организме [Labuda et al., 1993]. После такой инокуляции вирус локально размножается в подкожных тканях, включая клетки Лангерганса и нейтрофилы кожи, а затем клетки Лангерганса транспортируют вирусные частицы в дренирующие лимфатические узлы. Мигрирующие моноциты/макрофаги продуцируют инфекционный ВКЭ [Labuda et al., 1996], и эти клетки могут служить векторами для переноса вирусных частиц в дренирующие лимфатические узлы. Вторым основным барьером, с которым сталкивается ВКЭ, является иммунный ответ, вызванный самой вирусной инфекцией. Если вирус преодолеет этот барьер, он может распространиться по организму и вызвать виремию. Репликация вируса в лимфатических узлах приводит к распространению его в кровоток и индукции виремии. Во время первичной виремии вирус поражает различные периферические органы и ткани, но инфекция часто прекращается на этой стадии, и сероконверсия происходит без каких-либо явных клинических признаков [Prokopowicz et al., 1995]. Третий барьер, который ВКЭ должен преодолеть, - это гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), который ограждает центральную нервную систему (ЦНС) от токсичных веществ и патогенов. Если ВКЭ преодолевает ГЭБ, то инициируется инфекция в мозге. Двухфазная природа КЭ

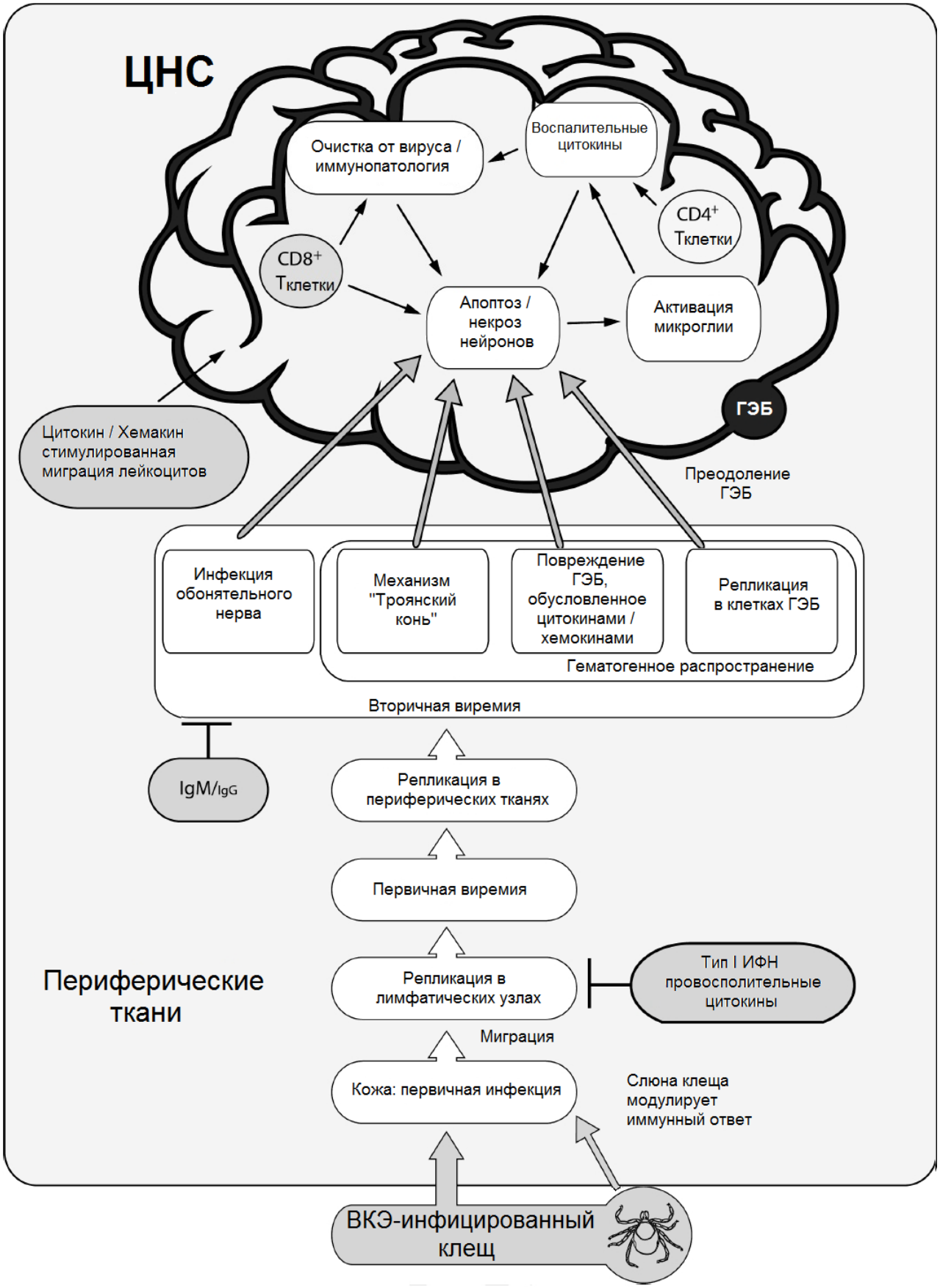


Рисунок 4 – Схема инфицирования ВКЭ млекопитающего хозяина [Ruzek et al., 2013b]

отражает первоначальное распространение вируса в периферических тканях, что вызывает цитокиновый ответ, после чего в некоторых случаях происходит проникновение вируса в ЦНС, и регистрируется вторая неврологическая фаза заболевания. Существует несколько различных способов, которыми вирусные частицы могут пересекать ГЭБ (рис. 4):

• индукция проницаемости ГЭБ напрямую;

• инфекция микрососудистых эндотелиальных клеток из линии фронта ГЭБ;

• прямой аксонный ретроградный транспорт от инфицированных периферических нейронов, распространяющийся через нервно-мышечные соединения из мышц в соматические моторные нейроны спинного мозга;

• инфекция обонятельных нейронов и распространение в обонятельную луковицу.

Существует также так называемый механизм «троянского коня», при котором вирус транспортируется зараженными иммунными клетками, которые поступают в ЦНС [Palus et al., 2017; Ruzek et al., 2013 a, b]. Как именно ВКЭ пересекает ГЭБ, не ясно, и, скорее всего, в этот процесс вовлекаются различные механизмы. Поскольку нарушение проницаемости ГЭБ является следствием выделения цитокинов в ответ на репликацию флавивируса [Roe et al., 2012], ВКЭ, вирус Лангат, вирус Западного Нила (West Nile Virus) и вирус японского энцефалита (Japanese encephalitis virus) попадают в ЦНС [Li et al., 2015; Ruzek et al., 2011; Roe et al., 2012; Weber et al., 2014]. Весьма вероятной представляется нейроинвазия ВКЭ путем прямого заражения микрососудистых эндотелиальных клеток. В модели ГЭБ *in vivo* после добавления ВКЭ менее 5% микрососудистых эндотелиальных клеток были инфицированы ВКЭ, однако, инфекция персистировала и распространилась через ГЭБ [Palus et al., 2017]. Вирус Лангат, вероятно, использует путь заражения через обонятельный нерв. После периферического заражения мышей этот вирус был обнаружен сначала в обонятельной луковице, а затем распространился в другие области мозга [Kurhade et al., 2016]. До сих пор не совсем ясно, поступает ли ВКЭ в мозг через обонятельные нейроны или иным образом. Следует отметить, что большинство исследований по этой теме было выполнено *in vitro* или на животных моделях *in vivo*, однако, такие модели могут не вполне адекватно отражать последовательность событий, происходящих в организме человека при проникновении ВКЭ через ГЭБ.

Как только вирус проникает в мозг человека, он начинает размножаться в крупных нейронах передних рогов спинного мозга, продолговатого мозга, моста, зубчатого ядра, клетках Пуркинье и полосатого тела. Основные гистологические воспалительные реакции, наблюдаемые после инфекция головного мозга ВКЭ, - лимфоцитарно-менингеальные и периваскулярные инфильтраты, а также пролиферация микроглии с образованием глиозных узелков и нейронофагия (рис. 4) [Gelpi et al., 2005, 2006].

1.1.5. Методы профилактики и лечения КЭ

Вакцинопрофилактика

Наиболее эффективным способом борьбы с КЭ является вакцинопрофилактика. Первая в мире вакцина против ВКЭ была разработана в Советском Союзе сразу после открытия ВКЭ, и уже в 1938 году были начаты ее клинические испытания. Вакцина представляла собой инактивированную 1% формальдигидом мозговую суспензию мышей, зараженных интрацеребрально ВКЭ. Модифицированный вариант этой вакцины, при приготовлении которого использовали 2,5% формальдигид для инактивации вируса из мозговой суспензии зараженных мышей, стали применять в СССР с 1958 года. Как и первый, этот вариант вакцины также эффективно защищал от КЭ, и его можно было использовать даже для вакцинации детей. Однако, недостатками вакцины против ВКЭ на основе мозговой суспензии был относительно высокий процент аллергических реакций [Смородинцев и Дубов, 1986].

В настоящее время в Российской Федерации производятся три вакцины. «ВКЭ-вакцина Москва» и «Клещ-Э-ВАК» производятся Научно-исследовательским отделом ИБФ РАН им. Чумакова в Москве. Вакцина «Энцевир®» производится компанией Микроген (филиал ФГУК «НИЦ« Микроген» МЗ России» в НИЦ «Вирион», Томск). В российских вакцинах, как и во всех производимых вакцинах против КЭ, используется инактивированный вирус, наработанный на аттестованных клеточных культурах. При этом вакцины, производимые в Москве, основаны на штамме ВКЭ Софьин [Vorovich et al., 2015] и Энцевир® на штамме ВКЭ 205 [Safronov et al., 1991; Красильников и др., 2004]. Оба используемых в российских вакцинах штамма принадлежат к дальневосточному субтипу. Все российские

вакцины показывают хорошие профилактические показателя при их применении. Все они разрешены к применению у детей, начиная с раннего возраста (вариант томской вакцины для детей называется «Энцевир нео®»).

В Европейских странах вакцины против ВКЭ используются последние 40 лет и обеспечивают эффективную профилактику КЭ [Barrett et al., 2003]. Первая европейская вакцина, FSME-IMMUN® (Pfizer, США), была одобрена для людей, живущих и работающих в высокоэндемичных районах в 1976 году. Вакцина изготовлена на основе ВКЭ штамм Neudoerfl европейского субтипа, выделенного из клещей [Barrett et al., 2003]. Вторая вакцина, Encepur® (GlaxoSmithKline), была зарегистрирована в 1991 году в Германии и основана на штамме Karlsruhe (K23) [Harabacz et al., 1992; Girgsdies and Rosenkranz, 1996], также принадлежащем к европейскому субтипу.

Способы экстренной профилактики и лечения ВКЭ

В настоящее время для экстренной профилактики и лечения ВКЭ в России и Казахстане используется иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита (анти-ВКЭ ИГ), полученный из плазмы доноров [Пеньевская и Рудаков, 2010]. Основное количество препарата производится в НПО «Микроген», но некоторые станции переливания крови также его производят. Этот препарат способен предотвращать ВКЭ или уменьшать тяжесть клинических симптомов [Лашкевич и Карганова, 2007]. Анализ результатов когортных исследований показал, что своевременное введение анти-ВКЭ ИГ обеспечивает защиту в 79% случаев. Для экстренной профилактики необходимо использовать анти-ВКЭ ИГ с титром анти-гемагглютинации не менее 1:80. [Пеньевская и Рудаков, 2010].

В европейских странах применявшийся ранее для экстренной профилактики и лечения КЭ препарат сывороточного анти-ВКЭ иммуноглобулин FSME-Bulin больше не используется. Этот препарат продемонстрировал хороший терапевтический эффект, но опасения, связанные с тем, что введение специфических иммуноглобулинов может спровоцировать антитело-зависимое усиление инфекции (ADE, antibody-dependent enhancement), привели к приостановке его использования [Kluger et al., 1995; Arras et al., 1996; Waldvogel et al., 1996].

Примечательно, что после правильного и своевременного введения иммуноглобулинов против ВКЭ не было описано клинических случаев обострения

заболевания [Bröker и Kollaritsch, 2008]. Важно отметить, что ADE-эффект не наблюдался в экспериментах *in vivo* на мышах после введения специфических антител против ВКЭ до и после заражения [Kreil и Eibl, 1997; Baykov et al., 2014; Huisman et al. 2009]. Тем не менее, некоторые исследователи предполагают, что иммуноглобулиновая терапия может быть причиной относительно высокой распространенности хронических форм КЭ в России по сравнению с европейскими странами; однако в настоящее время нет данных, подтверждающих это предположение. С другой стороны, ADE-эффект наблюдался в исследованиях на мышах с использованием вируса Лангат и вируса шотландского энцефалита овец, которые являются близкими родственниками ВКЭ. Для выяснения этого важного вопроса необходимы дополнительные исследования использования иммунопрепаратов для экстренной профилактики и терапии КЭ.

Экспериментальные способы иммунотерапии

В связи с тем, что на данный момент в европейских странах нет разрешенных специфических противовирусных препаратов для терапии КЭ [Studahl et al., 2013; Taba et al., 2017], для лечения пациентов с КЭ в основном проводят симптоматическую и поддерживающую терапию, включая интенсивную терапию в тяжелых случаях. Однако, несмотря на то, что в этих странах циркулирует в основном ВКЭ-Ев, вызывающий обычно лишь легкие формы КЭ, в последние годы накопились данные о том, что и в европейских странах у пациентов могут развиться тяжелые формы КЭ, которые могут вызвать серьезные неврологические последствия и даже смерть [Elsterova et al., 2017]. Причем такие случаи зарегистрированы и у пациентов, получивших полный курс вакцинации. В связи с этим проводится поиск альтернативных средств лечения пациентов с КЭ.

Неспецифический иммуноглобулин

Одним из возможных способов иммунотерапии КЭ является введение пациентам высоких доз внутривенного иммуноглобулина человека (IVIG). Препарат одобрен для клинического применения при различных заболеваниях [Rhoades et al., 2000], включая флавивирусные энцефалиты [Ruzek et al., 2013a; Elsterova et al., 2017]. Эффективность IVIG обусловлена наличием широкого репертуара нейтрализующих антител против различных патогенов и иммуномодулирующими свойствами этого препарата [Boros et al., 2005].

В литературе описан случай применения IVIG для лечения пациента с тяжелой формой КЭ. В результате проведенного лечения было зарегистрировано улучшение состояния пациента, однако, неврологическая симптоматика не прекратилась [Kleiter et al., 2007]. Следует отметить, что применяемую партию IVIG не тестировали на наличие ВКЭ-специфических антител. Недавно было показано, что только препараты IVIG, содержащие вируснейтрализующие антитела против ВКЭ, предотвращали развитие инфекции в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [Elsterova et al., 2017].

Терапевтическая вакцинация

Инактивированная вакцина применялась для лечения КЭ лишь в нескольких случаях. В одном случае вакцина на основе ВКЭ-ДВ, штамм Софьин вводилась пациенту, который был инфицирован штаммом, принадлежащим к ВКЭ-Сиб, и через 4 года после заражения у него развилась хроническая форма КЭ [Погодина и др., 1986]. Пациент получил полный курс вакцинации в конце четвертого года заболевания, это привело к увеличению титра специфических антител в реакции гемагглютинации. Впоследствии анти-гемагглютинационная активность сыворотки крови пациента уменьшилась, и через год после первой терапевтической вакцинации повторили курс вакцинации [Погодина и др., 1986]. В других случаях терапевтическая вакцинация использовалась в сочетании с глюкокортикоидами для лечения пациентов с хроническим КЭ [Umanskyi et al., 1981]. Наблюдаемые в этом случае улучшения могли быть вызваны как гормонами, так и другими неспецифическими терапевтическими агентами. Важно отметить, что элиминацию ВКЭ у пациентов с хроническим КЭ не регистрировали [Погодина и др., 1986].

Препараты интерферона

Препарат рекомбинантного интерферона в составе липосомного носителя, Реаферон-ЭС-Липинт, изучали в комбинации с препаратом специфического сывороточного иммуноглобулина. Реаферон-ЭС-Липинт вводили перорально; иммуноглобулиновый препарат – интратекально. Результаты исследования продемонстрировали улучшение клинических показателей при различных формах КЭ, однако это исследование спонсировалось производителем, и результаты подвергаются сомнению. Лечение Реафероном-ЭС-Липинт без иммуноглобулинов также улучшало прогноз, но было менее эффективным, чем в комбинации с иммуноглобулиновым препаратом [Salabay et al., 2012; Воробьева и др., 2012].

Таким образом, наиболее эффективным препаратом для экстренной профилактики и терапии КЭ является противоклещевой иммуноглобулин, получаемый из донорской крови. Однако, как и другие препараты, в производстве которых используется донорская кровь, препарат противоклещевого иммуноглобулина обладает рядом недостатков. К основным недостаткам можно отнести ограниченность такого ресурса как донорская кровь, наличие определенного биологического риска при введении такого препарата, связанного с возможностью наличия в препарате неидентифицированных инфекционных агентов или аллергенов, а также значительные различия концентрации анти-ВКЭ антител в крови разных доноров, что не дает возможность стандартизации разных партий препарата по соотношению «белок–противовирусная активность».

Наиболее перспективным направлением для создания препаратов для специфической терапии КЭ является их разработка на основе рекомбинантных антител. Важнейшими этапами в разработке препаратов терапевтических антител являются: 1) выбор из имеющихся в природе молекул целевых антител и конструирование на их основе рекомбинантного антитела, которое обладает требуемыми свойствами – высокой специфичностью, аффинностью и, в случае ВКЭ, противовирусной активностью; 2) наработка отобранных или сконструированных молекул в количествах, достаточных для эффективного биотехнологического производства; 3) адекватная характеризация разработанного препарата согласно современным требованиям; 4) тщательная оценка возможной токсичности препарата; 5) проведение клинических испытаний по общепринятым схемам.

1.2. Получение рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих

1.2.1.Основные подходы к конструированию полноразмерных антител

С начала XIX века возник интерес к терапевтическому применению антител. Первоначально препараты на основе антител ограничивались поликлональными сыворотками, для получения которых требовалось большое количество животных и антигена, пригодного для их иммунизации. С развитием технологий появились

разнообразные молекулярно-генетические подходы для создания высокоспецифических антител.

К настоящему времени разработаны и используются для создания фармацевтических препаратов несколько подходов к конструированию целевой молекулы терапевтического антитела:

- конструирование химерных и гуманизированных антител на основе вариабельных доменов моноклональных антител (мкАТ) мыши и константных доменов иммуноглобулинов человека;
- получение полноразмерных антител человека с помощью трансгенных животных;
- конструирование полноразмерных антител человека из константных доменов иммуноглобулинов человека и вариабельных доменов антител человека, отобранных из комбинаторных библиотек фаговых антител с помощью технологии фагового дисплея и обладающих целевыми свойствами;
- прямой отбор полноразмерных антител человека с нужными свойствами с применением технологии “single-cell”.

Все перечисленные подходы имеют свои преимущества и ограничения, и выбор оптимальной технологии осуществляется в каждом конкретном случае.

Гибридомная технология

В 1975 году Milstein и Köhler [Köhler и Milstein, 1975] разработали гибридомную технологию для производства моноклональных антител (мкАТ). Этот метод основан на слиянии В-клеток из селезенки иммунизированного животного (чаще всего используют мышей) с клетками миеломы мыши; такое слияние приводит к образованию гибридных клеток (гибридом), которые можно культивировать длительное время. Если В-клетка, участвовавшая в слиянии, секретировала целевое антитело, то полученная гибридома также будет обладать способностью секреции этого мкАТ. Эта технология дала старт разработке нового класса лекарственных средств, основанных на терапевтических антителах с заданной специфичностью, и в 1985 году FDA (Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) одобрило первое терапевтическое мкАТ, Muromonab-anti-CD3. Однако иммуногенность полученных из мышей мкАТ сильно ограничивает спектр заболевания человека, при которых эти мкАТ можно применять, и исключает их применение при хронических или рецидивирующих

заболеваниях человека, таких как воспаление, рак и аутоиммунные расстройства. Мышиные мкАТ распознаются организмом пациента как чужеродные, что приводит к развитию ответов человеческого антитела против антитела мыши (HAMA) [Tjandra et al., 1990].

Для преодоления этого ограничения разработали химерные антитела, в которых к константным доменам антител человека присоединены вариабельные домены моноклональных антител мыши. Следующим шагом для уменьшения доли «мышиных» последовательностей в рекомбинантных антителах стала разработка гуманизированных антител. Для гуманизации используют разные подходы, один их которых состоит в том, что гипервариабельные участки из вариабельных доменов мышиного антитела, пересаживают в каркасные участки соответствующих вариабельных доменов антител человека (CDR grafting) [He et al., 1998]. После такой гуманизации, только небольшой процент антител сохраняет свою первоначальную специфичность, поэтому критически важным является выбор правильного вариабельного домена человека [He et al., 1998]. Другой подход к гуманизации заключается в поиске и замене аминокислотных остатков иммуногенных для человека в донорских вариабельных доменах антитела мыши на аминокислотные остатки типичные для человеческих антител (resurfacing) [Chapman и McNaughton, 2017]. При использовании такого метода гуманизации, чаще сохраняются физико-химические свойства родительского антитела, но полностью избежать HAMA не удается. Затем полученные гуманизированные вариабельные домены присоединяют к константным доменам иммуноглобулина человека. Полученные рекомбинантные антитела производят в культуре клеток млекопитающих с использованием разных биотехнологических подходов.

Использование генномодифицированных животных

Одним из способов создания человеческих терапевтических антител является использование трансгенных животных, в организме которых вырабатываются полностью человеческие антитела. Проблема технологии трансгенных антител заключалась в большой протяженности генных локусов иммуноглобулинов человека [Matsuda et al., 1993; Weichhold et al., 1993; Cook и Tomlinson 1995; Frippiat et al., 1995; Pallares et al., 1999]. Для получения максимального репертуара антител, был сделан акцент на включение как можно большего и разнообразного количества

человеческих V-генов, но не всех D-сегментов или C-генов для тяжелой цепи [Bruggemann et al. 2007]. Было предложено несколько стратегий получения таких животных, экспрессирующих широкие репертуары антител человека. Для получения трансгенных животных из отряда грызунов в их организмы были введены генные локусы иммуноглобулинов человека, интегрированные в бактериальные или дрожжевые искусственные хромосомы, путем микроинъекции в ооциты или трансфекции эмбриональных стволовых клеток. Для получения трансгенных животных подотряда жвачных в их организм были введены фибробласты с интегрированными фрагментами хромосом человека или искусственными хромосомами человека.

При получении трансгенных животных эндогенные локусы иммуноглобулинов обычно выключаются с помощью технологии цинковых пальцев или методом генного таргетинга. Однако исследования показали, что при иммунизации целевым антигеном человеческие антитела в организме животного не вырабатывались так же эффективно, как эндогенные иммуноглобулины, и зачастую полученные человеческие антитела обладали низкой аффинностью [Brüggemann et. al., 2014]. Это объясняется несовершенным взаимодействием константной области иммуноглобулина человека человека с эндогенными сигнальными компонентами, такими как Igα/β, существующими в организме мыши, крысы или крупного рогатого скота. Кроме, того после получения целевого антитела в трансгенных животных, для их биофармацевтического производства необходимо все-таки получать штамм-продуцент.

Применение фагового дисплея

Комбинаторные технологи является мощным инструментам для отбора и создания терапевтических антител, поскольку они основаны на наличии физической связи между генотипом и фенотипом в формате фаговой частицы, пригодной для обогащения и скрининга комбинаторных библиотек. Для конструирования терапевтических препаратов используются комбинаторные фаговые библиотеки фрагментов антител, в которых каждый бактериофаг экспонирует на своей поверхности уникальное сочетание вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей, а геном, содержащийся в этой фаговой частице, включает последовательности, кодирующие эти вариабельные домены. Чаще всего применяют сконструированные

на основе нитчатых бактериофагов M13 и fd библиотеки Fab-фрагментов или библиотеки одноцепочечных антител (single-chain variable fragments, scFvs). Одноцепочечные антитела представляют собой вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, соединенные между собой гибким пептидным линкером [Тикунова и Морозова, 2009].Такой подход позволяет расширить репертуар антител, поскольку объединение вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей происходит случайным образом, и могут встречаться сочетания вариабельных доменов, которые не встречаются в природе [Тикунова и Морозова, 2009].

Дисплейные технологии позволяют получать высоко аффинные антитела сравнительно быстро, но при переводе одноцепочечных антител в полноразмерный формат, не всегда удается сохранить их аффинность и специфичность. К этому приводят ряд факторов, таких как структурные различия между одноцепочечными и полноразмерными антителами, различающиеся механизмы фолдинга у бактерий и клеток млекопитающих и отсутствие гликозилирования белка у бактерий [Ni и Lee 2007; Wildl и Gerngross, 2005].

Применение single-cell technology

Еще одним возможным подходом для получения человеческих антител является применение так называемой «single-cell technology», которая основана на сочетании нескольких технологий. На первом этапе из крови доноров выделяют популяцию В-лимфоцитов, которую затем обогащают с использованием технологии клеточного сортинга по способности связывать флуоресцентно меченный целевой антиген. Из обогащенной популяции с использованием технологии одноклеточной ПЦР выделяют гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антитела человека. Затем полученные последовательности встраивают в экспрессионные плазмиды, нарабатывают антитела и исследуют их свойства. Однако эта технология не позволяет получать антитела против опасных антигенов, и, кроме того, при некоторых заболеваниях в организме человека вырабатываются только низкоаффинные антитела [Seah et al., 2018; Ouisse et al., 2017].

1.2.2. Особенности наработки рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих

За последнее десятилетие более ста новых биофармацевтических продуктов на основе антител были одобрены и продаются в США и Европейском союзе (ЕС). Рыночная стоимость этих биологических препаратов оценивается в 140 миллиардов долларов США [Walsh, 2014]. Количество рекомбинантных белков получаемых в эукариотических системах экспрессии с каждым годом увеличивается [Walsh, 2014].

Поскольку при экспрессии белка в клетках млекопитающих происходит его правильный фолдинг, корректные пост-трансляционные модификации и сборка субъединиц, именно клетки млекопитающих наиболее часто используют для наработки терапевтических рекомбинантных белков. Кроме того, качество и эффекторные свойства белка могут быть выше при экспрессии в клетках млекопитающих по сравнению с другими системами экспрессии: такими как бактерии, растительные и дрожжевые клетки.

Исследования роли гликозилирования в обеспечении биологической активности терапевтических белков показали, что надлежащие профили гликозилирования рекомбинантных белков могут улучшать их свойства – повысить стабильность препарата, увеличить время полужизни белка в кровотоке и уменьшить его иммуногенность [Ashwell и Harford, 1982; Runkel et al., 1998; Ghaderi et al., 2010; Ghaderi et al., 2012; Jefferis, 2016a; Jefferis, 2016b; Kuriakose et al., 2016].

На сегодняшний день продуктивность клеток млекопитающих, которые культивируют в биореакторах, может достигать нескольких граммов целевого белка с одного литра культуральной среды. Это увеличение продукции, достигнуто, в основном, в результате улучшения состава питательных сред, управления технологическими процессами и модернизации экспрессионных систем. Процесс создания высокопродуктивного штамма-продуцента на основе клеток млекопитающих можно разбить на три взаимосвязанные задачи:

1) выбор системы экспрессии для продукции рекомбинантного антитела;
2) создание экспрессионного вектора оптимизированного для выбранной системы экспрессии (подходящие регуляторные генетические элементы, оптимизация кодонов генов тяжелых и легких цепей рекомбинантного антитела);
3) выбор типа культивирования штамм продуцента – перфузия, fed-batch и пр.

1.2.3. Клетки млекопитающих, используемые для продукции терапевтических белков

Существует множество систем экспрессии, основанных на клетках млекопитающих. В настоящее время используют несколько типов клеточных культур, при этом наиболее часто используется линия клеток рака яичника китайского хомячка (CHO). Также разрешены и одобрены для получения терапевтических рекомбинантных белков другие клеточные линии, такие, как NS0 (линия клеток миеломы мыши), BHK (иммортализованная линия клеток почки детеныша хомячка), HEK-293 (иммортализованная линия клеток почки эмбриона человека), Per.C6 (иммортализованная линия клеток сетчатки глаза человека) и HT-1080 (линия клеток фибросаркомы человека).

Клетки яичника китайского хомяка (CHO)

В 1986 году был разработан препарат тканевого активатора плазминогена человека (tPA, Activase, Genentech, Сан-Франциско, Калифорния, США), который стал первым рекомбинантным терапевтическим белком, наработанным в клетках млекопитающих (CHO), который получил одобрение FDA. По некоторым оценкам несколько сотен белков-кандидатов, перспективных для клинического применения, сейчас находятся на поздних стадиях внедрения в промышленное производство, и многие из этих белков, нарабатываются в клеточной линии CHO. Ее используют при производстве более 70% находящихся на биофармацевтическом рынке белковых препаратов, большинство из которых являются рекомбинантными антителами [Durocher и Butler, 2009; Kim et al., 2012; Butler и Spearman, 2014].

Клетки CHO являются наиболее часто используемыми клетками для производства гликопротеинов из-за их многочисленных преимуществ. Клетки CHO могут достигать существенной скорости роста, что важно для коммерческого производства. Эти клетки могут быть адаптированы к росту в виде суспензионной культуры, а именно такой формат культивирования наиболее предпочтителен для крупномасштабного промышленного производства [Kim et al., 2012; Lai et al., 2013]. Клетки CHO можно культивировать в специально подобранных бессывороточных и синтетических питательных средах, что исключает использование компонентов крови животных или человека, и уменьшает биологический риск при применении наработанных в этих клетках терапевтических препаратов. Более того, клетки CHO

почти невосприимчивы к заражению вирусами человека, что сводит к минимуму биологические риски при производстве (и применении) препаратов [Boeger et al., 2005]. Устойчивость к вирусам человека может быть связана с тем, что многие рецепторы необходимые для проникновения вируса в клетку не экспрессируются в клетках CHO [Xu et al., 2011]. Гликозилирование в клетках CHO сходно с гликозилированием в клетках человека, поэтому полученные таким образом рекомбинантные белки будут в большинстве случаев совместимыми и биологически активными в организме человека [Kim et al., 2012; Lai et al., 2013]. Кроме того были разработаны различные системы амплификации генов, используемые в клетках CHO и обеспечивающие высокий уровень синтеза рекомбинантных белков и хорошую удельную производительность клеток продуцентов [Durocher and Butler, 2009; Kim et al., 2012; Lai et al., 2013]. Большинство биотерапевтических гликопротеинов, которые в настоящее время производятся в этих клетках, одобрено FDA и Европейским агентством по лекарствам (EMA, European Medicines Agency). Ранее были одобрены для терапевтического применения несколько моноклональных антител, таких как Силтуксимаб (SYLVANT®), Пертузумаб (PERJETA®) и Ритуксимаб (RITUXAN®), а также другие белки, например, активатор тканевого плазминогена (tPa, ACTILYSE®, ACTIVASE®), и ДНКаза человека (PULMOZYME®). Перечисленные препараты - это лишь малый процент одобренных для терапевтического применения гликопротеинов, полученных с использованием клеток CHO [Dumont et al., 2015]. В 2017 году более половины новых одобренных биопрепаратов на основе рекомбинантных гликопротеинов были получены с использованием клеток CHO [Sellick et al., 2011]. [FDA, 2016].

Хотя клетки CHO обладают многими преимуществами для производства гликопротеинов, они не способны продуцировать некоторые типы человеческого гликозилирования, такие как α-2,6-сиалирование и α-1,3/4-фукозилирование [Patnaik и Stanley, 2006]. Кроме того, клетки CHO продуцируют гликаны, которые не встречаются в клетках человека, а именно N-гликолилнейраминовую кислоту (Neu5Gc) и галактоза-α1,3-галактозу (α-гал), хотя такие гликаны присутствуют в очень небольшой доле синтезированных молекул, <2% и <0,2%, соответственно [Bosques et al., 2010; Ghaderi et al., 2010; Dietmair et al., 2012b; Ghaderi et al., 2012]. Иммунная система человека может продуцировать антитела против этих N-гликанов,

что повышает иммуногенность рекомбинантного гликопротеина в организме человека и может способствовать продукции антител, нейтрализующих соответствующие биотерапевтические свойства целевых белковых молекул [Galili et al., 1984, Noguchi et al., 1995, Tangvoranuntakul et al., 2003, Chung et al., 2008, Macher и Galili, 2008, Padler-Karavani et al., 2008, Ghaderi et al., 2010, Padler-Karavani и Varki, 2011]. Клетки CHO также имеют ограниченную способность к производству гамма-карбоксилатных рекомбинантных белков, таких как факторы свертывания крови [Kumar 2015], хотя некоторые улучшения в этом направлении были достигнуты с использованием метаболической инженерии [Rehemtulla et al., 1993; Liu et al., 2014]. Еще одно ограничение для использования клеток CHO – это производство белков, которым для «созревания» необходима протеолитическая обработка; известно, что часть произведенных белков в клетках CHO остаются не полностью протеолизированными, и по этой причине могут быть не активными. Например, было показано, что для производства зрелой и активной формы фактора Виллебранда и B-домена VIII фактора коагуляции необходима ко-экспрессия фурина и этих белков [Fischer et al., 1995; Demasi et al., 2016]. Точно так же, ко-экспрессия пропротеина конвертазы обеспечивает эффективное «созревание» морфогенетического белка-7 костного мозга человека [Sathyamurthy et al., 2015].

Линии на основе клеток человека

Один из способов получения человеческого типа гликозилирования у рекомбинантных гликопротеинов – использование человеческих линий клеток для их продукции. Такая стратегия гарантирует, что белки будут содержать, если не идеальный паттерн гликозилирования, то, по крайней мере, неиммуногенные гликаны [Swiech et al., 2012]. Чаще всего для производства терапевтических средств на основе гликопротеинов используют клеточную линию HEK293, полученную из эмбриональных почек человека, или клеточную линию HT-1080, полученную из фибросаркомы человека [Rasheed et al., 1974; Graham et al, 1977].

Первым терапевтическим гликопротеином, продуцируемым в клетках человека HEK293 был дротрекогин альфа (Xigris®), одобренный FDA и EMA в 2001 и 2002 годах, соответственно. Тем не менее, в 2011 году этот препарат был снят с производства, так как не смог показать значительные положительные эффекты. На сегодняшний день, только четыре препарата рекомбинантных гликопротеинов,

полученных с помощью клеток человека, были разрешены FDA и/или EMA - альфа агалзидаза, эпоэтин дельта (DYNEPO®), идурсульфаза (ELAPRASE®) и альфа-велаглюцераза (VPRIV®). Эти препараты производятся с использованием технологии активации генов в клетках HT-1080 [Moran, 2010]. Для эпоэтина дельта, произведенного в клетках HT-1080, показано, что его тетра-антеннальные гликаны имеют лучшую однородность, в них выше содержание сиаловой кислоты и отсутствует N-гликолилнейраминовая кислота по сравнению с эритропоэтином, произведённым в клетках CHO [Llop et al., 2008]. В настоящее время этот препарат был добровольно изъят с рынка по коммерческим причинам фирмой производителем [Dumont et al., 2015]. Профиль гликозилирования альфа-велаглюцеразы, произведенной с использованием клеток HT-1080, также сравнивали с профилями гликозилирования аналогичных препаратов (другие β-глюкоцереброзидазы), продуцируемых в клетках CHO и клетках моркови (имиглюцераза (CEREZYME®) и альфа-талиглюцераза (ELELYSO). Эти три препарата имеют отличающиеся гликановые профили, но при этом они показывают сходную ферментативную и биологическую активность *in vitro*, стабильность и эффективность [Ben Turkia et al., 2013; Tekoah et al., 2013]. При использовании всех трех препаратов β-глюкоцереброзидаз нейтрализующие антитела, влияющие на активность белка, выявлялись у более, чем 20% пациентов, [Ben Turkia et al., 2013].

В 2014 году были получены разрешения FDA/EMA для клинического применения четырех терапевтических гликопротеинов, произведенных с использованием человеческих клеточных линий на основе клеток HEK293. Два из них - FVIIIFc (ALPROLIX®) и rFIXFc (ELOCTATE®), - это белки, используемые для профилактики кровотечения у людей с гемофилией типа A и B. Они состоят из доменов факторов свертывания крови FVIII и FIX слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека (IgG1) [Powell et al., 2012, Peters et al., 2013]. rFVIIIFc имеет шесть сайтов сульфатирования тирозина, которые необходимы для его функциональности. Кроме того, rFIXFc необходимо γ-карбоксилирование первых двенадцати остатков глутаминовой кислоты, которые влияют на его биологическую активность. Использование клеток HEK293 для продукции этих гликопротеинов привело к увеличению сульфатирование тирозина и γ-карбоксилирование глутаминовой кислоты по сравнению с гликопротеинами, полученными с

использованием клеток CHO [Berkner, 1993; Kannicht et al., 2013; Peters et al., 2013; McCue et al., 2014, 2015]. Дулаглутид (TRULICITY®), еще один Fc-слитый белок, используемый для лечения сахарного диабета 2 типа и производимый в клетках HEK293-EBNA1, был одобрен в 2014 году. Наконец, симоктоког альфа (NUWIQ®), замещающий фактор свертывания при гемофилии A, был одобрен EMA с 2014 года и FDA с 2015 года [Dumont et al., 2015]. Он производится в клеточной линии HEK293-F и имеет профиль гликозилирования, сходный с фактором VIII, полученным из плазмы [Casademunt et al., 2012; Kannicht et al., 2013].

Для производства гликопротеинов также используется клеточная линия PER.C6, полученная на основе эмбриональных клеток ретинобласты человека, трансформированных аденовирусом типа 5, кодирующим последовательности E1A и E1B [Havenga et al., 2008; Swiech et al., 2012]. Особенность этих клеток - способность продуцировать иммуноглобулины в высоких титрах без необходимости амплификации целевых генов [Jones et al., 2003]. В настоящее время проходят 2 фазу клинических испытаний два препарата, продуцируемых клетками PER.C6 [Dumont et al., 2015]. Первый - MOR103, - это мкАТ, против гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора, пригодное для лечения пациентов с ревматоидным артритом и рассеянным склерозом [Behrens et al., 2015; Dumont et al., 2015]. Второй - CL184, препарат, который является коктейлем их двух мкАТ, которые могут использоваться для лечения бешенства [Marissen et al., 2005; Bakker et al., 2008].

Еще одна человеческая клеточная линия, HKB-11, представляет собой гибридную линию клеток, полученную при слиянии клеток HEK293S и B-клеток человека [Cho et al., 2003]. Эта клеточная линия показывает высокий уровень продукции белка, причем профиль гликозилирования произведенного белка содержит большое количество связи α(2,3) и α(2,6)-сиаловой кислоты, что обеспечивает сохранение биологической активности целевого белка [Picanco-Castro et al., 2013].

1.2.4. Векторные плазмиды и их доставка в клетки, используемые селективные маркеры

Процесс производства рекомбинантного белка в клетках млекопитающих обычно происходит по хорошо известной схеме (рис. 5). На первой стадии, клеточная линия трансформируется плазмидой, содержащей ген, который кодирует целевой рекомбинантный белок, селективные элементы и необходимые регуляторные и транскрипционные элементы. Если целевой белок состоит из нескольких субъединиц, как в случае иммуноглобулинов, то клеточную линию необходимо трансформировать несколькими плазмидами или вводить в одну плазмиду последовательности нескольких оперонов, кодирующих субъединицы рекомбинантного белка. При этом необходимо, чтобы в результате трансформации целевые генетические последовательности были интегрированы в геном клетки-хозяина.

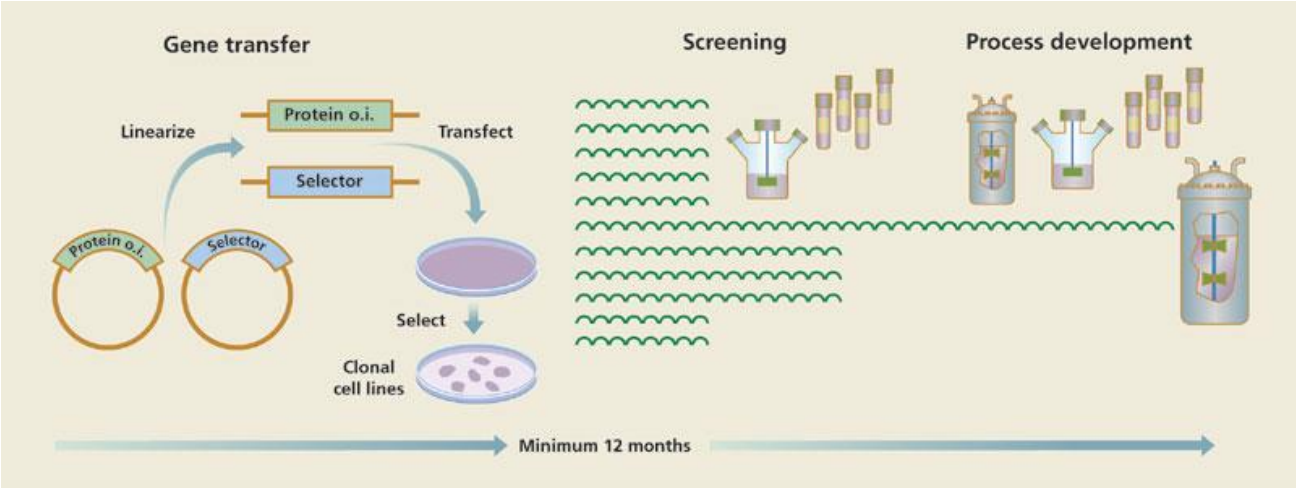


Рисунок 5 – Схема биотехнологического процесса получения штамма продуцента, рекомбинантного белка. Волнистые линии обозначают предварительное культивирование отдельных клеточных линий, скрининг которых необходим для отбора промежуточных штаммов; флаконы - криоконсервацию отобранных промежуточных первичных штаммов-продуцентов; роллерные колбы - процесс масштабирования и оптимизации; биореакторы показывают крупные производственные процессы [Wurm, 2004]

Селективный ген необходим для селективного отбора трансформированных клеток с интегрированной в геном плазмидой из пула всех клеток исходной популяции [Rita Costa et al., 2010]. Через несколько дней после трансформации, при наличии в ростовой питательной среде селективного агента, выживают только

клетки, экспрессирующие селективный маркер, т.е. несущие в своем геноме рекомбинантную плазмиду. Наиболее часто используют следующие селективные маркеры: дигидрофолатредуктазу (DHFR), фермент, участвующий в метаболизме нуклеотидов; глутаминсинтетазу (GS), фермент, участвующий в синтезе глутамина (незаменимая аминокислота); антибиотики, ингибирующие трансляцию белка, такие как генетицин G-418, гигромицин B, пуромицин и зеоцин. В первых двух случаях отбор происходит в отсутствии соответствующего метаболита (гипоксантин и тимидин, в случае DHFR; глутамин, в случае GS). В третьем случае отбор происходит благодаря полному ингибированию трансляции белка (ингибирование присоединения малой или большой субъединицы рибосомы при инициации трансляции), что полностью блокирует рост и деление нетрансформированных клеток [Lalonde и Durocher, 2012].

Большинство экспрессионных векторов в настоящее время содержат, по крайней мере, одну последовательность интрона, которая обычно расположена между промотором и геном, кодирующим рекомбинантный белок. Оптимизация кодонов в генах, кодирующих целевой белок, также может повышать уровень продукции белка. Например, при использовании гена млекопитающего, содержащего редко используемые кодоны, не может транслироваться белок с высокой эффективностью, но такой ген может быть преобразован путем изменения кодонов на наиболее часто используемые [Makrides, 1999].

В 1973 году Грэм и Ван дер Эб показали, что обработки клеток наночастицами ДНК и фосфата кальция делает возможным транспорт ДНК в культуры клеток млекопитающих [Graham и van der Eb, 1973]. Невирусный способ переноса рекомбинантных генов в клетку остается основным подходом для получения стабильных клеточных линий в производственных целях. Обычно используется достаточно эффективные и надежные методы трансфекции, такие как: использование фосфата кальция, электропорация, липофекция, баллистический и полимер-опосредованный переноса генов [Norton и Pachuk, 2003]. Невозможно оценить, является ли какой-нибудь из этих методов более эффективным, чем остальные, потому что комплексные исследования эффективности трансфекции этими методами отсутствуют.

Ген, кодирующий рекомбинантный белок, и ген, кодирующий селективный маркер, могут содержаться как в одной, так и в разных векторных плазмидах. Когда эти гены содержаться в одном и том же векторе, они экспрессируются в виде полицистронной мРНК [Balland, A. et al., 1988]. Для увеличения вероятности получения высокопродуктивной линии клеток, экспрессия гена, кодирующего селективный маркер, может управляться слабым промотором. Несмотря на то, что такой подход обычно приводит к уменьшению эффективности стабильной трансфекции клеток, выжившие клетки, прошедшие селективный отбор, имеют значительно более высокий уровень продукции рекомбинантного белка.

Линеаризации плазмиды перед трансфекцией повышает эффективность стабильной трансфекции, хотя суперскрученная плазмидная ДНК также будет преобразованы в линейную форму внутри ядра через 1-2 часа после трансфекции из-за активности эндо- и экзонуклеаз [Finn, 1989]. Ядерные лигазы обеспечивают ковалентное присоединение отдельных молекул плазмидной ДНК [Perucho, 1980], а рекомбиназы катализируют случайную интеграцию этих конкатемеров так же, как и одиночных молекул плазмидной ДНК, в геном хозяина с помощью негомологичной рекомбинации [Finn, 1989]. Лигирование плазмидной ДНК до интеграции часто обеспечивает ко-интеграцию нескольких копий плазмидной ДНК по одному сайту. Большинство штаммов-продуцентов рекомбинантных белков, основаны на клеточных линий, в хромосомы, которых интегрированы экспрессионные вектора.

Локализация в хромосоме, гена, кодирующего целевой белок, имеет большое влияние на уровень транскрипции рекомбинантного гена (явление, известное как эффект положения). Интеграция в район неактивного гетерохроматина приводит к незначительной или к полному отсутствию экспрессии данного гена, тогда как интеграция в район эухроматина значительно увеличивает уровень экспрессии. Тем не менее, интеграция в эухроматин не является гарантией обеспечения долгосрочной эффективной экспрессии целевого гена. Во многих случаях целевые гены в клетках млекопитающих быстро инактивируется (замолкают), возможно, под влиянием расположенного рядом конденсированного хроматина. «Замолкание» генов ассоциировано с гипоацитилированием гистонов, метилированием лизина-9 гистона H3, и увеличением CpG-метилирования в промоторной области этого гена [Richards и Elgin, 2002; Mutskov и Felsenfeld, 2004].

Количество копий интегрированной плазмиды, а также участки интеграции в геноме клетки продуцента являются одними из ключевых факторов для обеспечения стабильной экспрессии генов. Поскольку интеграция целевой последовательности в геном – это процесс, протекающий с низкой вероятностью, особую роль в этом процесс играют селективные маркеры, позволяющие отобрать из больших популяций клоны, со встройкой в геном. При создании выскопродуктивных штаммов чаще всего используют два селективных маркера, а именно GS и DHFR.

При использовании в качестве селективного маркера GS происходит замещение ауксотрофии по глютамину рекомбинантным геном GS [Fan et al., 2013]. Глутамин синтетаза катализирует синтез глутамина из глутамата и аммиака, причем аммиак является активатором апоптоза. Таким образом, система GS обеспечивает двойное преимущество: снижение уровня аммиака в среде для культивирования клеток и обеспечение клеток неустойчивой аминокислотой (глутамином). Метионинсульфоксимин (MSX) обеспечивает специфичное и необратимое ингибирование GS. При концентрации 10-100 мкМ MSX, можно отобрать устойчивые клоны отдельных популяциях клеточных линий, которые, содержат увеличенное число копий интегрированной плазмиды, содержащей гены, которые кодируют GS и целевой белок [Bebbington et al., 1992; Barnes et al., 2000]. Клеточные линии NS0 и Sp2/0 экспрессируют недостаточные эндогенные уровни GS для поддержания роста, поэтому для отбора достаточно простого удаления глютамина из культуральной среды. Однако для клеток CHO необходимо добавление метионинсульфоксимина MSX (аналог глутамата) в сочетании с удалением глютамина из среды, чтобы помочь ингибировать активность эндогенной глутамин синтетазы и иметь достаточное селективное давление. Кроме того, недавно были разработаны клеточные линии CHO, нокаутные по гену глутамин синтетазы, что повысило эффективность этой системы отбора [Fan et al., 2013].

При селекции с использованием DHFR в качестве селективного маркера также использует мутантные клетки CHO, у которых нокаутирован один ген, кодирующий дегидрофолат редуктазу CHO DXB-11, или клетки DG-44, полностью нокаутные по этому гену [Urlaub и Chasin, 1980]. Используя рекомбинантный ген DHFR в интегрированной плазмиде, клетки подвергают селекционному давлению и амплификации гена с увеличением концентрации метотрексата для ингибирования

активности фермента DHFR в сочетании с отсутствием нуклеотидных предшественников в среде. При использовании в качестве селективного маркера DHFR, экспрессия рекомбинантного белка может быть усилена путем добавления к ростовой среде метотрексата (MTX) - препарата, который блокирует активность DHFR [Pallavicini et al., 1990; Gandor et al., 1995]. Через 2-3 недели после добавления метотрексата большинство клеток погибают, выживает лишь часть клеток, имеющих избыточный уровень экспрессии DHFR. Обычно выжившие клетки, обработанные MTX, содержат несколько сотен копий плазмид, которые несут ген, кодирующий DHFR случайным образом интегрированных в геном, [Pallavicini et al., 1990; Wurm et al., 1986]. Большинство, таких клеток имеют удельную продуктивность выше, чем клетки, не проходившие отбор, но только некоторые отдельные клоны имеют значительно увеличенную в 10-20 раз продуктивность [Zettlmeissl et al., 1988].

Недавно были разработаны другие системы отбора, такие как система OSCAR™, в которой используются минигенные векторы, кодирующие гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), которые необходимы для синтеза пурина [Melton et al., 2001; Costa et al., 2012]. Тем не менее, до сих пор золотым стандартом в биофармацевтической промышленности для создания высокопродуктивных штаммов-продуцентов остаются использование систем селекции GS и DHFR.

Наиболее высокая удельная продуктивность, как правило, наблюдается в медленно растущих клеточных линиях, однако, такие линии не обеспечивают высокую суммарную продуктивность. Именно оптимальное сочетание скорости роста и высокой удельной продуктивность делает отобранный кандидатный штамм-продуцент пригодным для производства. В нескольких работах исследовалось влияние друг на друга характеристик роста и продуктивности в иммортализованных линиях клеток [Mazuret al., 1998; Gorman et al., 1983].

Стабильность моноклональных клеточных линий в течение длительного периода времени также является важным фактором. Из-за врожденной тенденции к физиологической гетерогенности и возможной генетической гетерогенности необходимо тщательно анализировать отобранные клоны и проверять их стабильность, по крайней мере, на протяжении 50-60 пассажей. Исследование стабильности клеточной линии обычно занимает несколько месяцев [Barnes et al.,

2001]. Добавление МТХ в качестве селективного агента в ростовую среду поддерживает производительность на стабильном, однородном уровне в некоторых клеточных линиях, однако, генетические исследования показали, что добавление МТХ также способствует появлению цитологической неоднородности, которая, в свою очередь, является крайне нежелательной для промышленных штаммов-продуцентов [Wurm et al., 1992; Kim и Lee, 1999].

1.2.5. Способы сайт-направленной интеграции целевых генов в геном

Несмотря на успешное применение описанных выше систем отбора и амплификации с целью получения высоко продуктивных штаммов, при использовании этих методов сохраняется основная проблема, заключающаяся в том, что все они основаны на случайной интеграции плазмиды в геноме клетки. В результате случайной интеграции образуется высокогетерогенная клеточная популяция, в которой разные клеточные клоны имеют сильно различающиеся уровни продукции целевого белка. Различия в уровне экспрессии белка могут составлять 1-2 порядка [Barnes et al., 2004; Jones. et al., 2003]. Также интеграция плазмиды в геном может произойти в области гетерохроматина, что приведет к низкому уровню экспрессии генов. Использование такого типа векторных систем подразумевает скрининг очень большого количества клонов (обычно от нескольких тысяч до нескольких сотен тысяч, в зависимости от используемого метода клонирования), чтобы найти те редкие клоны со стабильно интегрированной плазмидой в высоко транскрипционно активных областях хроматина («горячих точках»).

Недавно было разработано несколько инструментов молекулярной и клеточной биологии для целенаправленной интеграции генов в определенные локусы генома. Поскольку гены, кодирующие целевой гликопротеин и селективный маркер, находятся на одной и той же плазмиде, их совместная интеграция в одну и ту же области хроматина увеличивает вероятность того, что высокий уровень экспрессия селективного маркера также приведет к хорошему уровню экспрессии целевого белка.

В качестве инструментов для направленного интегрирования в геном первого поколения в основном использовались рекомбиназы Cre/Lox и FLP/FRT [Kito et al.,

2002; Huang et al., 2007; Kim et al., 2012]. В технологии обмена генетических кассет, опосредованного рекомбиназой (RMCE), используют сайт-специфическую рекомбиназу для встройки фланкированной гетероспецифическими последовательностями экпрессионной плазмиды (донорной), в транскрипционно активный участок хроматина, фланкированный идентичными последовательностями в геноме хозяина (акцепторный). Это технология позволяет ускорить время получения выскоподуктивных клеточных линий, в основном CHO, стабильно экспрессирующих моноклональные антитела [Kito et al., 2002; Huang et al., 2007; Zhang et al., 2015], при наличии ранее созданных клеток, содержащих в своем транскрипционно активном участке генома сайты для направленной рекомбинации. Такие клетки предварительно получают с помощью не специфической интеграции в геном, и в результате скрининга десятков тысяч клонов отбирают клоны, несущие сайт интеграции в транскрипционно активных участках генома.

При использовании RMCE идентификация высоко активного сайта генной транскрипции является критичной. Если активный сайт не определен, рецепторный сайт для рекомбинации интегрируется случайно, и приходится отбирать и тестировать тысячи клонов для определения, в котором из них ген интегрировался в так называемый правильный сайт

В качестве молекулярных инструментов второго поколения были использованы разные системы эндонуклеаз для геномного редактирования. К этой категории относятся нуклеазы с белковым доменом типа «цинковые пальцы» (ZFN), мегануклеазы, нуклеазы TALEN и система CRISPR/Cas9 [Durai et al., 2005; Porteus и Carroll, 2005; Cabaniols et al., 2010;, Silva et al., 2011; Kim et al., 2012; Sanjana et al. 2012; Cho et al., 2013; Sun и Zhao, 2013]. Эти нуклеазы индуцируют разрывы двухцепочечной ДНК в определенных местах клеточного генома, облегчая интеграцию плазмиды путем негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологично направленной репарации (HDR) [Gaj et al., 2013]. Обе технологии ZFN и TALEN основаны на способности ДНК-связывающего домена направлять на конкретную последовательность нуклеазу, которая и способствует 2-цепоченому разрыву ДНК. Эффективность использования этих нуклеазы зависят от способности выбрать хороший мотив распознавания ДНК, обладающий высокой специфичностью и сродством к выбранному участку генома. Так как в геноме млекопитающих

содержатся многочисленные повторы последовательностей, или имеются высокогомологичные последовательности ДНК, в последние годы разрабатывают новые системы типа ZFN и TALEN с улучшенной специфичностью этих ферментов [Miller et al., 2007; Szczepek et al., 2007; Guo et al., 2010; Doyon et al., 2011].

В качестве эффективной альтернативы этим нуклеазам для редактирования генома на основе эндонуклеаз недавно появилась технология CRISPR/Cas9. Эта технология состоит из двух компонентов CRISPR-РНК, которая обеспечивает комплементарное взаимодействие с выбранной последовательностью ДНК и эндонуклазой Cas9, которая производит двуцепочечный разрыв по выбранному сайту. При редактировании генома в клетках млекопитающих результатом работы системы CRISPR-Cas9 является репарация двуцепочечного разрыва как путем негомологичного соединения концов, так и путём гомологичной рекомбинации [Wiedenheft et al., 2012; Cho et al., 2013; Gaj et al., 2013]. В результате репарации, сопровождающейся негомологичным соединением концов, часто возникают небольшие вставки или делеции, способные разрушить рамку считывания целевых генов, что приводит нокауту этих генов. Этот метод уже был апробирован в клетках CHO и показал снижение вариабельности уровня продукции между отдельными клонами в трансформированном пуле клеток [Lee et al., 2015]. Однако технологии ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 в основном используют для ген-специфического нокаута. Особенно успешны был нокаут генов GS и DHFR в клетках CHO с использование нуклеаз типа ZFN, что позволило получить полностью нокакутные клетки по этим генам [Liu et al., 2010]. Эти инструменты могут оказаться очень полезными для интеграции в «горячие точки» хроматина, но одной из ключевых проблем по-прежнему остается определение точек интеграции в геноме хозяина, которые позволят добиться хороших уровней экспрессии целевых генов и стабильности продукции белка [Zhang et al., 2015]. Следует также отметить, что такая специфическая интеграция не может быть универсальным подходом, поскольку некоторые терапевтические белки могут требовать определенной скорости экспрессии для корректного свертывания или для приобретения адекватных качественных признаков (например, гликозилирование, протеолитическая обработка и т.д.).

Еще одним относительно часто используемым инструментом является технология экспрессии искусственных хромосом (ACE) млекопитающих. Такой минигеном служит автономным генетическим элементом, который реплицируется клетками, и его ДНК-последовательность настраивается с помощью различных регулирующих элементов, которые могут способствовать эффективной экспрессии целевых генов [Lai et al., 2013; Estes и Melville, 2014]. Применение этого подхода обеспечило создание клеточных линий CHO, продуцирующих высокие титры моноклональных антител [Lindenbaum et al., 2004; Kennard et al., 2009; Kennard, 2011]. При сравнении культивирования fed-batch клоны клеток CHO, полученные с помощью ACE, и клоны, полученные случайной интеграцией в геном, показывали сопоставимые уровни экспрессию IgG1 и одинаковую стабильность экспрессии [Combs et al., 2011].

Для повышения уровня продукции и стабильности линий продуцирующих клеток могут быть использованы некоторые цис-регуляторные элементы. Эти элементы помогают ремоделировать среду хроматина для поддержания активного состояния транскрипции вокруг трансгена. Одним из наиболее часто используемых цис-регуляторных элементов являются S/MAR-элементы. Ранее было показано, что включение S/MAR-элементов в экспрессионные векторы, используемые для продукции рекомбинантных белков, может значительно увеличить уровень экспрессии трансгенов в поликлональной популяции трансформированных клеток [Harraghy et al., 2015]. К сожалению, во многих публикациях было показано, что активность MAR-элементов чувствительна к нуклеотидной последовательности трансгенов и зависит от конкретной конфигурации векторной плазмиды [Harraghy et al., 2015]. Из-за этого были разработаны биоинформационные инструменты, способные выявлять новые улучшенные MAR-подобные последовательности в геноме млекопитающих [Girod et al., 2007; Harraghy et al.; 2012; Harraghy et al., 2015].

Другим классом эпигенетических регуляторных элементов являются повсеместно действующие элементы открытого хроматина (UCOE). Эти последовательности содержат CpG-богатые островки, обнаруженные в промоторных областях генов домашнего хозяйства, которые обеспечивают открытое состояние хроматина для экспрессии трансгена. Также было установлено, что UCOE помогают повысить продуктивность линий клеток-продуцентов гликопротеинов [Benton et al.,

2002; She et al., 2009]. Третий класс эпигенетических элементов - это стабилизирующий и антирепрессорный элементы (STAR). Они были обнаружены с помощью геномного скрининга элементов, которые увеличивали экспрессию трансгена [Kwaks et al., 2003; Sautter and Enenkel, 2005; Hoeksema et al., 2011; Van Blokland et al., 2011; Harraghy et al., 2015].

Включение различных эпигенетических элементов не только может помочь повысить уровень экспрессии целевого рекомбинатного белка, но также может увеличить количество клонов, в которые интегрирован трансген, с большим количеством копий трансгена на клетку, что ускоряет процесс отбора высокопродуктивного штамм [Grandjean et al., 2011; Harraghy et al., 2015]. Также было продемонстрировано, что MAR и UCOE помогли уменьшить вариабельность экспрессии между различными клонами и способствовали поддержанию активного состояния транскрипции при экспрессии трансгена [Williams et al., 2005; Galbete et al., 2009; Harraghy et al., 2011]. UCOE-элементы также могут препятствовать метилированию ДНК в промоторной области встроенной экспрессионной плазмиды, предотвращая тем самым подавление экспрессии генов [Lindahl Allen и Antoniou, 2007: Zhang et al., 2010]. Большинство этих регуляторных элементов состоят из участков свободных от нуклеосом, что также может способствовать ингибированию перехода участка хроматина, куда встроился трансген в транскрипционно неактивное состояние [Arope et al., 2013; Harraghy et al., 2015].

1.2.6. Способы увеличения скорости пролиферации клеток и продолжительности их жизни

Производство большего количества белков с меньшими ресурсами и за меньшее время остается серьезной проблемой при работе с системами экспрессии клеток млекопитающих. В связи с этим, были задействованы различные инструменты и методы, направленные на увеличение скорости роста, пролиферации и продолжительности жизни клеток. Ключевыми аспектами оптимизации скорости роста и продуктивности клеток, безусловно, являются параметры процесса культивирования (pH, температура, скорость перемешивания и т.д.), а также тип среды и состав ростовых добавок. Питательные и ростовые среды должны поддерживать доступность ключевых питательных веществ и способствовать

минимизации накопления метаболитов, оказывающих негативное влияние на производительность культуры клеток [Andersen et al., 2009]. Тем не менее, состав большинства коммерческих сред и ростовых добавок является закрытым, что делает их оптимизацию ресурсоемкой. Помимо питательных сред и ростовых добавок, из библиотеки химически синтезированных молекул было идентифицировано множество небольших молекул, которые способствуют повышению продуктивности штаммов-продуцентов [Allen et al., 2008]. Так, в культуральных средах часто используют бутират натрия и вальпроевую кислоту. Эти ингибиторы гистондеацетилазы, сохраняя ацетилирование гистонов, уменьшают их взаимодействие с ДНК и помогают поддерживать хроматин в активном состоянии, что приводит к увеличению уровня и/или продолжительности транскрипции трансгена. Добавление этих химических веществ привело к увеличению производительности в клетках CHO, что было подтверждено в ряде исследований [Durocher и Butler, 2009; Yang et al., 2014]. Однако, использование этих низкомолекулярных ингибиторов может также иметь нежелательные вторичные эффекты, такие как блокирование клеточного цикла или индукция апоптоза [Sung et al., 2004; Jiang and Sharfstein, 2008; Sunley и Butler, 2010], поэтому были проведены исследования для оптимизации условий применения этих ингибиторов [Rodriguez et al., 2005]. Более того, сочетание этих ингибиторов с легкой гипотермией (30–32°C) или с антиапоптозными клетками в продуктивном культивировании также способствовало повышению продуктивности [Kim и Lee, 2000; Kim и Lee, 2002; Sung et al., 2007; Kim et al., 2009a; Chen et al., 2011].

Стратегии гипотермии и антиапоптоза были независимо использованы для увеличения выживаемости клеток клеток CHO и, таким образом, для максимизации продуктивности. Простое использование пониженной температуры во время фазы продуцирования белка в клетках CHO значительно улучшило выход многочисленных модельных белков, таких как щелочная фосфатаза, эритропоэтин, интерферон-гамма и бета-интерферон, поскольку при этом замедлялся клеточный цикл, что обеспечивало более длительное нахождение клеток не в пролиферативном, а в продуктивном режиме [Kaufmann et al., 1998; Yoon et al., 2003; Fox et al., 2004; Ahn et al., 2008; Sunley et al., 2008]. Этот сдвиг в сторону производства белка способствовал повышению доступности питательных веществ и снижению

накопления вторичных метаболитов. Что касается антиапоптозной инженерии, гены семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1) были сверхэкспрессированы в различных клеточных линиях CHO [Kim и Lee, 2000; Tey et al., 2000; Meents et al., 2002; Chiang и Sisk, 2005; Kim et al., 2009b; Majors et al., 2009]. Также была протестирована стратегия подавления регуляции проапоптотических генов, таких как Bax, Bak, микроРНК mir-mmu-miR-466h-5p и каспазы-3, -7, -8 и -9 [Kim и Lee, 2002; Sung et al. al., 2007; Yun et al., 2007; Cost et al., 2010; Druz et al., 2013]. Применение обеих стратегий обеспечило увеличение продукции белка. Успешное ингибирование апоптоза было достигнуто также за счет избыточной экспрессии других родственных антиапоптотических белков [Durocher и Butler, 2009; Bandaranayake и Almo, 2014]. Несмотря на то, что в этих исследованиях влияние на долговечность клеток было очевидным, сообщалось о противоречивых результатах по изменению других параметров, влияющих на продуктивность клеток [Kim et al., 2012].

Некоторые инженерные стратегии основаны на контроле клеточной пролиферации. Например, избыточная экспрессия транскрипционного фактора клеточного цикла E2F-1 способствует увеличению плотности жизнеспособных клеток в периодических культурах CHO [Majors et al., 2008]. Инсерция гена CDKL3 также ускоряет пролиферацию клеток HEK293 и CHO [Jaluria et al., 2007]. Прогрессирование клеточного цикла также происходило быстрее при использовании онкогена c-myc в клетках CHO [Kuystermans и Al-Rubeai, 2009]. Введение гена mTOR, продукт которого участвует в пролиферации, клеток, в клетки CHO привело к увеличению пролиферации клеток и повышению производительности терапевтического IgG, щелочной фосфатазы и α-амилазы [Dreesen и Fussenegger, 2011]. Кроме того, было показано, что сверхэкспрессия микроРНК mir-17 в CHO привела к увеличению скорости пролиферации клеток, что привело к более высокому выходу Epo-Fc [Jadhav et al., 2012].

1.2.7. Способы воздействия на секрецию и фолдинг рекомбинантных гликопротеинов

Наиболее важным аспектом при производстве гликопротеинов является правильное созревание рекомбинантных белков. По мере того как эти белки транслируются, они проходят через ЭР и аппарат Гольджи, что обеспечивает

правильное гликозилирование и фолдинг перед секрецией белка. Поскольку отсутствует корреляции между количеством копий гена и количеством секретируемых молекул белка, были выдвинуты предположения о том, что трансляционные и/или посттрансляционные процессы также могут ограничивать скорость продукции белка [Wilson et al., 1990; Mohan et al., 2008]. Однако изменения уровня белков ЭР, участвующих в секреторном пути, показал неоднозначные результаты, которые зависели от системы экспрессии и/или типа продуцированного белка. В некоторых исследованиях были выявлены положительные эффекты избыточной экспрессии белка XBP-1 (белка, связывающего X-box 1), транскрипционного фактора, регулирующего развернутый белковый ответ (UPR) во время стресса ЭР [Iwakoshi et al., 2003; Tigges and Fussenegger, 2006; Becker et al. al., 2008; Ku et al., 2008]. Однако в другой работе применение не показало очевидного преимущества при использовании этого подхода в стабильных клетках CHO-K1, экспрессирующих интерферон-гамма, эритропоэтин или мкАТ человека. Кроме того, в ответ на стресс в ЭР клетки обычно происходит замедление механизмов [Ku et al., 2008]. ATF4, другой критический фактор транскрипции в системе UPR, был сверхэкспрессирован для восстановления трансляции и повышения уровня антитромбина III, продуцируемого в клетках CHO [Ohya et al., 2008]. Эта активация осуществлялась с помощью белка GADD34, который связывался с фосфатазой PP1, ответственной за дефосфорилирование и активацию фактора инициации трансляции eIF-2A. Аналогично, GADD34 также может быть сверхэкспрессирован для увеличения продуктивности клеток CHO [Omasa et al., 2008]. Кроме того, секреторные ограничения клеток CHO могут быть устранены путем сверхэкспрессии растворимых рецепторов белка, чувствительных к N-этилмалеимиду (SNARE). Например, контролируя стыковку и слияние пузырьков, было показано, что экспрессия SNAP-23 и VAMP8 улучшает продукцию секретируемой щелочной фосфотазы и моноклональных антител в клетках CHO-K1 [Peng et al., 2011]. Сходным образом, избыточная экспрессия мутанта S132A белка-переносчика церамида, который отвечает за передачу церамида из ЭР в Гольджи и за синтез сфингомиелина, также улучшала продукцию тканевого активатора плазминогена, человеческого сывороточного альбумина и мкАТ в промышленных клеточных линиях [Florin et al., 2009; Rahimpour et al., 2013]. Аналогично, частица 14 для

распознавания сигнала (SRP14), которая направляет секретируемые белки на мембрану ЭР, повышает продуктивность рекомбинантного IgG в клетках CHO при избыточной экспрессии [Lakkaraju et al., 2008; Le Fourn et al., 2014].

Известно, что в процессинге синтезирующих белков ключевую роль играют шапероны. Они использовались многими группами в качестве инструментов клеточной инженерии, но результаты их использования были противоречивыми [Mohan et al., 2008]. Самым популярным шапероном для клеточной инженерии CHO является белок дисульфидизомераза (PDI), которая катализирует образование дисульфидных связей в белках. Его сверхэкспрессия показала положительные результаты при увеличении продукции мкАТ как в клетках CHO, так и в клетках NS0 [Smales et al., 2004; Mohan et al., 2007]. Тем не менее, в других исследованиях наблюдалось либо отрицательное влияние такого подхода, либо отсутствие его влияния на продуктивность штаммов-продуцентов [Mohan et al., 2008]. Аналогично, сверхэкспрессия в клетках продуцентах шаперона BiP, связывающего тяжелые цепи, давала противоречивые результаты (и повышенная, и пониженная продуктивность) [Mohan et al., 2008]. Кроме того, сверхэкспрессия белка ERp57 эндоплазматического ретикулума, изоформы PDI, вместе с калнексином/кальретикулином привела к увеличению продукции тромбопоэтина в клетках CHO [Mohan et al., 2008]. Сверхэкспрессия шаперонов Hsp27 и Hsp70 в клетках CHO также обеспечила повышение продукцию рекомбинантного интерферона-гамма [Lee et al., 2009]. Для объяснения таких расхождений в результатах было проведено специальное исследование, показавшее, что это может быть связано с особенностями различных линий CHO. Так, клетки CHO-K1 имеют больший объем ЭР и более высокую митохондриальную массу по сравнению с клетками CHO, происходящими из другой сублинии клеток - DUXB11 [Hu et al., 2013]. Таким образом, эти различные и иногда противоречивые результаты могут быть частично объяснены использованием различных штаммов CHO. Однако использование представленных подходов пока не дает гарантированного увеличения продуктивности клеток.

1.2.8. Оптимизация ростовых сред и способы культивирования штаммов-продуцентов

Высококачественные коммерческие питательные среды для культивирования клеточных культур млекопитающих в настоящие время легко доступны. Тем не менее, ведущие компании-производители терапевтических рекомбинантных белков, чаще всего, проводят значительную работу по оптимизации состава питательных средств собственного производства. Как правило, на различных фазах производства для разных производственных процессов необходимы питательные среды разного состава. Питательная среда для быстрого роста, во время которого культуру пересевают каждые 3-5 дней, имеет состав, отличающийся от поддерживающей питательной среды, которая используется во время продукции целевого белка. Этап производственного процесса при культивировании периодической клеточной культуры в замкнутом объеме (культура одного производственного цикла длительностью 6-8 дней) или расширенный вариант этого процесса (длительность 10-21 дней) является более продолжительным, чем этап пассирования клеток. Разработка и подбор питательных сред для каждого этапа культивирования клеток является первостепенным, и такая оптимизация должна быть проведена для каждого конкретного производственного процесса и клеточной линии.

Ранее, эмбриональная бычья сыворотка в концентрации 1-20% была необходимым компонентом ростовых питательных сред для культивирования клеток млекопитающих. В наши дни, почти во всех производственных процессах используют бессывороточные среды. Состав современных бессывороточных питательных сред обеспечивает прекрасные условия роста клеточных культур, поскольку включает факторы роста, незаменимые аминокислоты, необходимый набор белков, липидов, углеводов и малых молекул. Важными причинами отказа от использования сред с добавлением сыворотки, является варьирование состава сыворотки от партии к партии, риск передачи посторонних агентов (например, бычьих вирусов и прионов) и ее высокая стоимость.

Форматы клеточных культур по типу роста

Для производства рекомбинантных белков в настоящие время используют клеточные культуры с двумя разными типами роста: прикрепленный к поверхности

(адгезивный тип) и не прикрепленный (суспезионный тип); последний является предпочтительным.

Адгезивные культуры клеток. Эритропоэтин (Epogen; Amgen, Thousand Oaks, Калифорния, США) был первым рекомбинантным белок, производимым в культуре клеток млекопитающих, который стал блокбастером на фармацевтическом рынке с объемом продаж более 1 млрд долларов в год. Этот эритропоэтин изготавливается с использованием простой технологии. Для прикрепления клеток CHO, их высевают в роллерные флаконы, заполненные на 10-30% от максимального объема, и культивируют при среднем или медленном вращении. Вращение обеспечивает регулярное смачивание клеток и доступ питательный веществ, аэрация происходит за счет растворения кислорода, находящегося в "пустом пространстве" флакона. После периода роста и периода наработки целевого белка в культуре в течение нескольких дней собирают клеточную жидкость, затем осветляют супернатант. Этот процесс может быть легко масштабирован, за счет увеличения количества роллерных флаконов, используемых параллельно. Концентрация продукта колеблется в пределах 50-200 мг/л, и в год нарабатывается около 1 кг эритропоэтина. Сегодня весь процесс наработки Epogen, полностью роботизирован, проходит в специальных, полностью стерильных помещениях, абсолютно без участия человека [Wurm, 2004].

Такого типа наработка целевого белка, имеет ограниченную удельную продуктивность, менее грамма целевого белка на 1 литр, поскольку максимальное отношение количества клеток на единицу объема намного ниже, чем при оптимизированном культивировании в механическом биореакторе.

Адгезивные клеточные культуры также выращивают на полимерных микроносителях, которые позволяют перевести адгезивные клеточные культуры в «псевдо суспензионный» формат, и выращивать клетки в механических биореакторах. Эти микроносители чаще всего представляют себой шарики полимера диаметром 0,1-1 мкм), с «шершавой» поверхностью (например, коллагенизированые микроносители), которая обеспечивает адгезию клеток. Микроносители позволяют легко масштабировать рост клеток в разных типах биореакторов. Использование микроносителей также увеличивает удельную производительность адгезивных штаммов-продуцентов за счет, в том числе, увеличения количества клеток в единице

объема. Известно несколько примеров использование системы экспрессии с микроносителями на основе клеток CHO, например, для производства фолликулостимулирующего гормона [Loumaye et al., 1998] и вируса осповакцины [Spier и Kadouri, 1997].

Суспензионные клеточные культуры. Суспензионные клетки CHO в настоящее время преобладают в фармацевтическом производстве рекомбинантных белков из-за способности одиночной клетки к росту и делению в неприкрепленном состоянии. Другие клеточные культуры также были получены в формате суспензионной культуры клеточные: NS0 [Barnes et al., 2000], BHK [Bödecker et al., 1994], HEK-293 [Wurm и Bernard, 1999] и PER-C6 [Jones et al., 2003]. За исключением клеток NS0, всем остальным клеточным линиям необходимы специальные добавки к ростовой среде для поддержания суспензионного формата. В настоящее время перевод клеточных культур в суспезионный формат является рутинной процедурой, поскольку разработаны и коммерчески доступны специальные питательные среды [Wurm, 2004].

Для масштабирования (scale-up) до очень больших объемов при "простом" или удлиненном типе культивирования циклической клеточной культуры в замкнутом объеме (культура одного производственного цикла), штамм-продуцент предварительно выращивается в биореакторах небольшого объема, затем наработанную клеточную массу разбавляют 5-20 объемами свежей ростовой питательной среды, нагретой в биоректоре большого объема. Весь процесс от разморозки клеточной культуры до наработки белка в большом биореакторе состоит из трех отдельных фаз: этап посева клеток, этап инокуляции и этап производства. Этап посева обычно проводят в небольших объемах, чтобы наработать свежие клетки для процесса масштабирования клеток на первых этапах производства. Этап инокуляции начинается с небольшого количества клеточной суспензии наработанной на этапе посева, к концу этапа нарастает достаточное количество биомассы для начала стадии производства. Оптимизированные условия производства конкретной клеточной линии редко являются универсальными, потому что разные клеточные линии млекопитающих имеют сугубо индивидуальный тип метаболизма, скорость потребления глюкозы, разные скорости выработки лактата,

чувствительности к стрессовым сигналов, и оптимальные условия роста могут отличаться даже для клонов, полученных из одной материнской линии [Wurm, 2004].

Время культивирования штамма-продуцента определяется в основном ростовой способностью и кинетикой продуктивности, еще одним важным фактором является качество произведенного продукта. Целевой белок, синтезированный на начальных этапах стадии производства, может быть подвержен деградации, опосредованной появлением в культуральной среде внутриклеточных ферментов (в т.ч. протеаз) вследствие разрушения клеток. Кроме того, из-за уменьшения содержания в культуральной среде питательных веществ и необходимых структурных компонентов для синтеза белка может изменяться молекулярный состав целевого белка. Тем не менее, даже при культивировании в одинаковых воспроизводимых условиях, целевой белок синтезируется в определенном диапазоне молекулярных вариаций [Wurm, 2004].

Оптимизация процессов культивирования происходит в системе обратного масштабирования (scale-down), т.е. пропорционального уменьшения компонентов. Наиболее популярные и широко используемые реакторы обратного масштабирования имеют объем 1-2 литра. Такие реакторы могут быть заменены системами, не оснащенными измерительными приборами, например качалочными колбами объемом от 0,2 до 5 л с заполнением 30-50% от объема. Клеточные культуры в качалочных колбах часто проявляют признаки кислородного голодания, особенно при высокой клеточной плотности. Ранее в системах обратного масштабирования также использовались культуральные планшеты, однако, они имеют один существенный недостаток: культуральная среда в лунках быстро испаряется и, следовательно, их нельзя использовать при длительном культивировании. Недавно была разработаны качалочные 50-мл конические пробирки с вентилируемым крышками, которые показали себя как потенциальная модель обратного масштабирования, поскольку обладают сходными характеристиками продуктивности и скорости роста с биореакторами [Wurm, 2004]. Такие колбы широко используются для оптимизации условий культивирования.

Удлиненный тип культивирования циклической клеточной культуры в замкнутом объеме и перфузионные процессы (Fed-batch)

В настоящие время большинство используемых способов культивирования, обеспечивающих высокий уровень продукции, основаны на культивировании клеточных линий по так называемому «удлиненному типу культивирования циклической клеточной культуры в замкнутом объеме», при котором свежие компоненты среды добавляют небольшими партиями или полунепрерывно. Подбор условий для такого типа культивирования трудозатратен и требует хорошего понимания особенностей клеточной линии и целевого продукта, и такой тип культивирования, как правило, применяется только при производстве целевого продукта для 3 фазы клинических испытаний или для фармацевтического рынка [Wurm, 2004].

Совсем другой подход используется при непрерывном перфузионном процессе культивирования. При таком типе культивирования можно достичь еще более высокой плотности клеток, чем при удлиненном типе культивирования циклической клеточной культуры в замкнутом объеме, и такая плотность клеток может сохраняться в течение многих недель и месяцев, причем отбор целевого продукта, можно осуществлять неоднократно в течение периода культивирования. При непрерывном перфузионном культивировании через биореактор в течение одного дня может прокачиваться несколько объемов свежей среды. Такой тип культивирования может обеспечить максимальную продуктивность, достигнутую к настоящему времени. Так, с использованием перфузионной технологии в суспензионных клетках ВНК нарабатывается препарат фактора свертывания крови VIII (Kogenate, Bayer, Беркли, Калифорния, США), ежегодная рыночная потребность которого составляет 150 граммов. Фактор VIII (2332 а.к.о.) является, вероятно, самым крупным белком, когда-либо произведенным в биореакторе. Культуральная жидкость, содержащая этот белок, непрерывно выкачивается из биореактора, в котором постоянно культивируется штамм-продуцент. Хотя такой тип культивирования очень сложен, требует тщательного контроля и длится до 6 месяцев, он гарантирует воспроизводимо высокое качество такого «сложного» для биотехнологического производства белка [Bödecker et al., 1994].

Помимо получения стабильных клеточных линий, в настоящие время все чаще применяется транзиентная трансфекция клеточных линий для получения рекомбинантных белков в исследовательских целях, а также на этапе проведения доклинических исследований. Короткий промежуток времени, всего в несколько дней между трансфекцией клеток плазмидной ДНК и отбором куьтуральной жидкости с целевым продуктом, делает этот подход очень привлекательным, несмотря на низкую продуктивность, колеблющуюся в диапазоне десятков миллиграмм на литр. Ряд компаний, включая Genentech (Сан-Франциско, Калифорния, США), Roche (Базель, Швейцария), Novartis (Базель, Швейцария) и Bayer (Беркли, Калифорния, США), используют масштабированный вариант транзиентной наработки белка при культивировании трасфицированных клеток в биореакторах, чтобы в течение нескольких дней произвести от сотни миллиграммов до нескольких граммов рекомбинантного белка [Wurm и Bernard, 1999]. В настоящее время транзиентная экспрессия рекомбинантных белков находится на пути превращения из лабораторной технологии в новый тип производственного процесса.

Заключение

Таким образом, анализ имеющейся научной литературы показал, что разработка терапевтических препаратов на основе молекул иммуноглобулинов является активно развивающейся областью биотехнологии. Учитывая, что наиболее эффективным препаратом для специфической терапии клещевого энцефалита и для экстренной профилактики этого заболевания у невакцинированных является противоклещевой иммуноглобулин, получаемый из донорской крови и в силу этого имеющий ряд недостатков, наиболее перспективным на наш взгляд является разработка терапевтического препарата на основе полноразмерных рекомбинантных антител, обладающих противовирусными свойствами в отношении ВКЭ. Поскольку ранее в Новосибирском институте биоорганической химии СО АН (ныне ИХБФМ СО РАН) были получены мкАТ мыши против гликопротеина Е ВКЭ, обладающие способностью нейтрализовать инфекционность этого вируса, оптимальным способом разработки являлось создание препарата на основе химерных антител – молекул, в которых вариабельные домены тяжелых и легких цепей из мкАТ мыши

объединены с константными доменами тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека нужного изотипа. Такие антитела имеют ряд преимуществ перед препаратами сывороточных иммуноглобулинов, включая их производство в биотехнологических условиях без использования компонентов крови человека или животных и возможность стандартизации соотношения концентрации белка к нейтрализующей активности в разных партиях препарата.

Возможность создания вируснейтрализующего химерного антитела, способного защищать мышей от введения летальной дозы ВКЭ, была продемонстрирована ранее (Baykov et al., 2014), причем было показано, что созданное химерное антитело значительно более эффективно нейтрализовало ВКЭ, чем коммерческий сывороточный иммуноглобулин. Однако, это антитело нарабатывалось в транзиентной системе экспрессии, и стабильный штамм-продуцент отсутствовал. В связи с этим необходимо создание стабильного штамма-продуцента на основе эукариотических клеток для наработки достаточных количеств потенциально терапевтического антитела.

При создании стабильного штамма-продуцента необходимо выбрать базовую клеточную линию, ввести в нее целевую генетическую последовательность, отобрать клоны, в которых целевая последовательность встроилась в геном клетки-хозяина, провести амплификацию целевой ДНК в геноме хозяина, отобрать более продуктивные клоны (процедура амплификации-селекции может быть повторена несколько раз), выбрать клоны, стабильно продуцирующие целевой белок, отобрать из них те, у которых соотношение скорости роста и продуктивности будет оптимальным, подобрать условия культивирования и, наконец, масштабировать процесс культивирования. Поскольку молекулы иммуноглобулинов содержат различные полипептидные цепочки, значительную роль играет выбор стратегии создания векторных конструкций для введения не одного, а двух целевых генов.

Разработка терапевтических противовирусных препаратов на основе антител включает еще один необходимый этап – доказательство наличия противовирусной активности антитела. При наличии животной модели, необходимо исследовать противовирусные свойства не только *in vitro*, но и в системе *in vivo*. Поскольку на территории Российской Федерации встречаются три основных субтипа ВКЭ (дальневосточный, сибирский и европейский), необходимо оценить протективные

свойства разрабатываемого антитела на модельных животных в отношении всех трех субтипов ВКЭ.

Таким образом, для выполнения поставленной цели – создания потенциального препарата для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита, – необходимо было решить задачи по конструированию стабильного штамма-продуцента химерного антитела против вируса клещевого энцефалита и исследованию его противовирусных свойств.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

В работе использовали реактивы следующих фирм:

Агароза-GTG (Lonza, Швейцария); бактоагар (Difco, США); бактотриптон (BD, США); азид натрия; бычий сывороточный альбумин (БСА); глицерин; глицин; диметилсульфоксид (DMSO); дитиотреитол – DTT; ксиленцианол; нитро-тетразолиевый голубой (NBT); пунцовый С; Твин-20 – Tween-20; трис(гидроксиметил)аминометан - трис; (Amresco, США); бромистый этидий; бромфеноловый синий; Кумасси R-250; этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Serva, Германия); Sephadex G50 SuperFine (GE Healthcare, Великобритания); акриламид; N,N-метиленбисакриламид; 2-меркаптоэтанол; нитроцеллюлоза (Bio-Rad, США); 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат (BCIP); кристаллический фиолетовый (Roche, Франция); агароза; додецилсульфат натрия – SDS; 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS); персульфат аммония; триэтиламин; глютамин (Биолот, Россия); дрожжевой экстракт; паранитрофенилфосфат – pNPP; N,N,N`,N`-тетраметилэтиленамид - TEMED (Fluka, Швеция); дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты - dNTP (Биосан, Россия); "BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit" (Applied Biosystems, США); GlutaMAX (Life Technologies, США); Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США); X-gal (Carl Roth, Германия); белок А-сефароза CL-4B (Life Technologies, США), Декстран сульфат 5-15 кДА (Sigma Aldrich, США).

Наборы «PureYield(TM) Plasmid Midiprep System» (Promega, США); «GeneJET Gel Extraction Kit» (Thermo Scientific™, США). Колонка Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания)

ДНК-маркеры 100bp и 1kB (СибЭнзим, Россия). Маркеры молекулярной массы белков (Fermentas, Литва).

Моноклональные антитела мыши против Fc-фрагмента IgG человека, поликлональные антитела козы против Fc-фрагмента IgG человека, поликлональные антитела козы против цельной молекулы (H+L) IgG человека, конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma Aldrich, США).

Антибиотики и селективные маркеры: ампициллина натриевая соль, канамицина сульфат, тетрациклина гидрохлорид (Gerbu, Германия); гигромицин Б, зеоцин (Life Technologies, США), метотрексат (TEVA, Израиль), генетицин G418 (Life Technologies, США).

Рекомбинантный белок Е был предоставлен сотрудником Лимнологического института СО РАН И. Г. Кондратовым.

Все остальные использованные реактивы отечественного производства имели квалификацию не ниже «ОСЧ» и «ХЧ».

2.1.2. Эукариотические и бактериальные клетки

Штаммы *Escherichia coli*:

- XL1Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB lacI*q*ZΔM15* Tn*10* (Tetr) «Stratagen»).
- HB2151 (*araD (lac pro AB), lacIq* Δ*(lacZ)M15, thi/F' proA+B+/fhua2*Δ*(thi*Δ *(hsdMSmerB) (−rk−mk− McrBC-)K12*) («Stratagen»).
- ER2738 (F′*proA*$^{+}$*B*$^{+}$ *lacI*^{q} *Δ(lacZ)M15 zzf::Tn*10(Tet^{R})*/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*) (New England Biolabs, США).
- INV 110 (F′ [*tra*D36 *pro*AB *lac*I^{q} *lac*ZΔM15] *rps*L (Str^{R}) *thr leu end*A *thi*-1 *lac*Y *gal*K *gal*T *ara ton*A *tsx dam dcm sup*E44 Δ(*lac-pro*AB) Δ(*mcr*C-*mrr*)102:*Tn*10(Tet^{R}) (Invitrogen, США).

Эукариотические клетки CHO-K1 из «Российской коллекции клеточных культур млекопитающих» ИЦ РАН (Санкт-Петербург, Россия).

2.1.3. Вирусы и бактериофаги

Для исследования использовали ВКЭ, штамм Абсеттаров из коллекции НПО «Вирион» (Томск), штамм Софьин, штамм Васильченко из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск).

2.1.4. Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей BALB/c из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Россия), питомника ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Иркутск, Россия) и питомника НПО «Микроген» Вирион (Томск, Россия). Животных содержали в

пластиковых клетках при нормальном цикле день/ночь. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*. Все работы с животными проводили в соответствии с рекомендациями по защите животных, используемых в научных целях (Директива EU2010/63/EU). Все эксперименты на животных были одобрены комитетами по биоэтике ИХБФМ СО РАН, Новосибирск и ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, Иркутск, Россия.

2.1.5. Комбинаторные фаговые библиотеки

Пептидные фаговые библиотеки: Ph.D-12, Ph.D-C7C (New England Biolabs, США).

2.1.6. Ферменты

*Apa*I, *Avr*II, *Bam*HI, *Bgl*II, *Bss*HI, *Eco*RV, *Hin*dIII, *Hpa*I, *Kpn*I, *Ksp*22I, *Msc*II, *Nco*I, *Nhe*I, *Not*I, *Pst*I, *Xho*I (Fermentas, Литва) и *Afl*II (New England Biolabs, США).

ДНК-лигаза фага T4 (Fermentas, Литва). DreemTaq Green ДНК-полимераза (Life Technologies, США), низкоошибочная ДНК-полимераза Phusion (Fermentas, Литва).

2.1.7. Растворы

AP-буфер: 100 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$, 100 мМ Tris-HCl, pH 9.5.

Буфер для белкового электрофореза разделяющий 12,5%: 0,375 М трис-HCl, pH8.8, 0,1% SDS, 12,5% акриламид, 1% N',N-метиленбисакриламид.

Буфер для белкового электрофореза концентрирующий 5%: 0,125 М трис-HCl, pH6.8, 0,1% SDS, 5% акриламид, 0.5% N',N-метиленбисакриламид.

Буфер для нанесения белковых проб на полиакриламидный гель: 100 мМ Tris-HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 0,2 % бромфеноловый синий, 20 %-ный глицерин.

Буфер (×6) для нанесения проб ДНК на полиакриламидный или агарозный гель: 0,25 % бромфеноловый синий, 0,25 % ксиленцианол, 30 % глицерин.

Буфер для переноса белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану: 39 мМ глицин, 48 мМ Трис-HCl**,** 0,037 % SDS, 20 % метанол.

Буфер для ПЦР (x10): 200 мМ Трис-HCl (pH 8,8), 100 мМ KCl, 100 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 20 мМ $MgCl_2$, 1 % Triton-X100. DreemTaq Green Buffer (Life Technologies, США). HF buffer (Fermentas, Литва).

Буфер для реакции лигирования 10x T4 ligase buffer” (Fermentas, Литва).

Буфер для трансформации *E. coli* №1*:* 10 мМ MOPS, 10 мМ RbCl, pH 7.0.

Буфер для трансформации *E. coli* №2: 100 мМ MOPS, 10 мМ RbCl, 50 мМ $CaCl_2$, pH 6.5

Буфер иодидный: 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 1 мМ EDTA, 4 М NaI.

Буфер карбонат-бикарбонатный: 50мМ $NaHCO_3$, 50мМ Na_2CO_3, pH 9.5.

Буфер трис-ацетатный (TAE): 20 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, 40 мМ трис, pH 8.0.

Буфер трис-глициновый: 25 мМ Трис-HCl, pH 8.3, 192 мМ глицин, 0,1 % SDS.

Буфер трисовый (ТБР): 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7.5.

Буфер цитратный: 50 мМ цитрат натрия, 50 мМ лимонная кислота, pH 3.1.

Лизирующий раствор для выделения ДНК: 50мМ глюкоза, 25 мМ трис-HCl, pH 8.0, 10мМ ЭДТА.

Раствор Трипсин-Версен: 3 мг трипсина (Sigma Aldrich), 500 мл раствора Версена (Билот, Россия).

Фосфатно-солевой буфер (ФСБР): 100 мМ NaCl, 33 мМ Na_2HPO_4, 17мМ $NaH_2PO_4 \times 12H_2O$, pH 7.2.

2.1.8. Культуральные среды

Для культивирования клеток *E. coli* готовили:

- Среда LB. На 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl. pH 7.2.
- Нижний агар, на 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 15 г бактоагара. pH 7.2.
- Верхний агар, на 1 л: 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl, 7 г бактоагара. pH 7.2.б

Питательные среды для культивирования эукариотических клеток: среда Opti-MEM и Ham's F-12 (Life Technologies, США). Эмбриональная телячья сыворотка Sus-biol (Биолот, Россия). Синтетические питательные среды: CD OptiCHO, CD FortiCHO, (Life Technologies, США); proCHO-4, proCHO-AT (Lonza, Швейцария). Ростовая добавка PowerFeed C (Life Technologies, США).

2.1.9. Плазмиды

pCHm2, pCLm4/hygro, pBudCE4.1/full_Ab, pBudCE4.1 (Life Technologies, США), pOptiVec-TO (Life Technologies, США); pEGFP-N1 (Clontech, США), pCDNA5/FRT, pOG44 (Life Technologies)

2.1.10. Праймеры

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе.

1	rED3_301_NcoI_dir	5′-GCGCCATGGCCGGCGGTGGCTCGGGTCTTA CATACACAATGTGCG-3′;
2	rED3_his_NotI_rev	5′-TTAGCGGCCGCTTAGTGATGGTGATGATG ATGACTCCCTTTTTGGAACCATTG-3′;
3	rED3_359 _NotI_rev	5′-TTAGCGGCCGCTGTTATCAACATGGCCAC GTTCACATCCG-3′
4	rED3_356_NcoI_dir	5′-GCGCCATGGCCGGCGGTGGCTCGATGTTG ATAACACCCAACCCC-3′
5	GFP-Zeo-HindIII GFP-Zeo-BssHII_L	5′-GGGTTAAGCTTGGCACTGGTGAGCAAGGGCGAGG-3′ 5′-CCCAATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCACCAA GTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGC-3′
6	DHFR_MscII_U DHFR_PstI_L	5′-GGCTGGCCAATGGTTCGACCATTGAACTG-3′ 5′-CGACCTGCAGGTCGACATCGATCTTAAGC-3′
7	pGK_NheI_U pGK_AvrII_L	5′-GGAGCTAGCAATTCTACCGGGTAGG-3′ 5′-CCGGCCTAGGTGCAGGTCGAAAGGCC-3′
8	Ef1α_U17 Ef1α_L22	5′-AATGGTACCCGTGAGGCTCCGGTGCC-3′ 5′-TGGGGATCCTCACGACACCTGAAATGGAAGA-3′
9	CH_U22 BGH_polyA_L18	5′-AATCTCGAGTCATCTGCCAGTACCAAAGGCC-3′ 5′-AATCTCGAGCCATAGAGCCCACCGCAT-3′
10	CL_U21 SV40_polyA_L30	5′-GCAAAGCTTCAAGAGGACTGTAGCAGCTCC-3′ 5′-GCAAAGCTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT TAC-3′
11	pGK_U20 и pGK_L17	5′-GGGTTGTTAACGAATTCTACCGGGTAGGGGA-3 5′-CCCAAAGATCTGCAGGTCGAAAGGCCC-3′
12	pGK_APA_U20 и DHFR_L21	5′-ATTGGGCCCAATTCTACCGGGTAGGGGA-3 5′-GCCTGATCATAGCTAGAGGTCGACGGTAAT-3′
13	M13_pIII_F	5′-CTCTGTAGCCGTTGCTAC-3′
14	M13_PIII_96	5′-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3′

Сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции подчеркнуты. Олигонуклеотиды синтезированы стандартным фосфоамидным методом с очисткой с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН.

2.2 Методы

2.2.1. Иммуноферментный анализ

Скрининг культуральной жидкости эукариотических клеточных линий

Антитела козы против Fab_2-фрагмента иммуноглобулина человека разводили в карбонат-бикарбонатном буфере до концентрации 1 мкг/мл, затем переносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов (Greiner, Германия) и инкубировали ночь при +4° С. Затем лунки планшетов промывали буфером ФСБР трижды. Участки неспецифического связывания блокировали 5% раствором обезжиренного молока в ФСБР в течение 1 часа при 37°С, после чего, повторяли промывание лунок. После этого в лунки вносили серию 10-кратных разведений культуральной жидкости в ФСБР с 0.1% Твин 20 и инкубировали в течение 1 часа при 37°С с постоянным перемешиванием. Лунки планшетов промывали три раза буфером ФСБР с 0.1% Твин-20, и трижды ФСБР. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли конъюгатом щелочной фосфатазы с антителами козы против Fc-фрагмента IgG человека. Затем лунки трижды промывали ФСБР с 0,2% Твин-20 и трижды АР-буфером; иммунные комплексы окрашивали пара-нитрофенилфосфатом в АР-буфере. Для определения продуктивности штамма использовали калибровочную кривую, для этого вместо культуральных жидкостей после блокировки в лунки 96-луночного планшета добавляли 5-ти кратные разведения очищенного химерного антитела, начиная с концентрации 1 мкг/мл.

Исследование специфической активности культуральной жидкости штамм продуцентов chFVN145

В случае проведения ИФА с использованием рекомбинантного белка Е антиген разводили в ФСБР до концентрации 2 мг/мл и сорбировали в течение ночи при +4°С. Дальнейшие действия проводили, как описано выше.

2.2.2. Выделение суммарной РНК из гибридомных клеток

Выделение РНК проводили с помощью набора реагентов “RNeasy Mini Kit” (QIAGEN) согласно инструкции производителя. Суммарную РНК выделяли из 10^6 клеток гибридомы FVN-145. Выделенную РНК смывали с колонки 50 мкл очищенной воды, не содержащей нуклеаз. После измерения концентрации полученный раствор РНК хранили при -70 ºС.

2.2.3. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) была проведена с использованием набора “Titan One Tube RT-PCR kit” (Roche) согласно инструкции производителя. При синтезе фрагментов тяжелых цепей использовали олигонуклеотиды VH_dir и VH_rev, а для синтеза VL-фрагментов – олигонуклеотиды VL_dir и VL_rev. Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Участки геля, содержащие необходимые фрагменты ДНК, (размером ~ 350 п.н. для VH-фрагметов и ~ 325 п.н. а в случае VL-фрагментов) вырезали из геля; ДНК из вырезанных кусочков геля выделяли с использованием набора GeneJET gel extraction kit, согласно инструкции производителя.

2.2.4. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

Выделение плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса [Birnboim и Doly, 1979] с модификациями. Бактериальные клетки, трансформированные необходимой плазмидой, выращивали в течение ночи в 3-5 мл среды LB с селективным антибиотиком при 37°C. После осаждения клеток центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин клеточный осадок растворяли 100 мкл лизирующего раствора и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Вносили 200 мкл раствора 0,2M NaOH с 1% SDS, аккуратно перемешивали и оставляли смесь до осветления. Затем вносили 150 мкл 3 М ацетата Na pH 4,8, резко перемешивали и инкубировали на льду в течение 15 мин. Образцы центрифугировали при 15000 g в течение 10 мин, отбирали супернатант, смешивали его с двумя объемами 96% этанола и инкубировали при -20°C в течение 20 мин. ДНК осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий ДНК,

растворяли в 100 мкл воды и смешивали со 100 мкл 5 М LiCl, после чего инкубировали при 70°С в течение 10 мин и центрифугировали при 15000g 10 мин. Переносили супернатант в чистые пробирки, добавляли 5 объемов 96% этанола, инкубировали при -20°С в течение 10-20 мин и центрифугировали при 15000 g 10 мин. Супернатант удаляли, осадок сушили и растворяли в 100 мкл воды. Для переосаждения добавляли 20 мкл 5М NaCl и 250 мкл 96% этанола и инкубировали при -20°С в течение 20 мин, затем центрифугировали при 15000 g 10 мин. Осадок, высушенный от остатков спирта, растворяли в 20 мкл воды. Плазмидные ДНК хранили при -20°С.

2.2.5. Определение нуклеотидных последовательностей

Для проведения реакции Сэнгера анализируемую ДНК предварительно очищали при помощи GTG-агарозного геля. Секвенирующие реакции проводили в объеме 30 мкл с использованием необходимых праймеров и BigDye® Terminator v3.1 Cycling Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Продукты реакции Сэнгера чистили методом гельфильтрации через колонки с сорбентом Sephadex G-50 Superfine (GE HealthCare). Электрофоретическое разделение образцов любезно проводил к.б.н. А.Ю. Тикунов, лаборатория молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН с использованием капиллярного электрофореза в Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis 3500 (Applied Biosystems, США). Последовательности анализировали с использованием программ FinchTV, Vector NTI Suite 8 и MEGA 7.0.18.

2.2.6. Электрофоретический анализ белков

Электрофоретическое разделение белков проводили по Лэммли [Laemmli, 1970] в прерывистой буферной системе в присутствии 0,1% SDS в трис-глициновом буфере. Использовали 12,5% разделяющий и 5% концентрирующий гели. Образцы смешивали с буфером для нанесения в соотношении 1:1 для денатурации белка, прогревали в течение 5 мин при 95°С, затем наносили на ПААГ. Буфер, содержащий 0,1 М дитиотреитол, использовали при проведении электрофореза в редуцирующих условиях. Электрофорез вели в режиме 8 В / см. Гели окрашивали с использованием раствора красителя Coomassi Brilliant Blue R-250 в 20% этаноле, 10% уксусной

кислоте, отмывали кипячением в дистиллированной воде. Результаты сканировали или фотографировали.

2.2.7. Вестерн-блот анализ белков

Рекомбинантные варианты гликопротеина Е ВКЭ

Лизаты клеток *E. coli,* продуцирующие укороченные варианты гликопротеина Е ВКЭ разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле (ПААГ) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи электропереноса [Towbin et al., 1984] в буфере для переноса в течение 4 часов при силе тока 0.65мА на 1 $см^2$ геля. Дополнительно стабилизировали перенесенные белки на нитроцеллюлозной мембране 0,5% раствором парафармальдегидом (Биовитрум, Россия). После блокировки мест неспецифического связывания 5% раствором молока в ФСБР в течение 1 часа при 37°С, нитроцеллюлозные полоски инкубировали с химерным антителом chFVN145 в концентрации 50 мкг/мл в течение 60 минут при 37°С. Образовавшиеся иммунные комплексы выявляли конъюгатом щелочной фосфатазы с антителами козы против Fc-фрагмента IgG человека. После инкубирования с конъюгатом и промывки раствором 0,1% Tween-20-ФСБР нитроцеллюлозные полоски дополнительно промывали АР-буфером. В качестве хромогена использовали смесь 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфата (BCIP) и нитро-тетразолиевого голубого (NBT).

Химерное антитело chFVN145

Препараты антитела chFVN145 разделяли электрофоретически и переносили на нитроцеллюлозную мембрану аналогично описанному выше. После блокировки мест неспецифического связывания 5% раствором молока в ФСБР в течение 1 часа при 37°С, нитроцеллюлозные полоски инкубировали с конъюгатом щелочной фосфатазы с моноклональными антителами мыши против Fc-фрагмента IgG человека или с конъюгатом щелочной фосфатазы с антителами козы против цельной молекулы IgG человека в течение часа при 37°С. После инкубирования с конъюгатом и промывки раствором 0,1% Tween-20-ФСБР нитроцеллюлозные полоски дополнительно промывали АР-буфером. Визуализацию комплекса проводили, как описано выше.

2.2.8. Ферментативный гидролиз ДНК

Для ферментативного гидролиза 0,2-10 мкг ДНК смешивали с 1-2 ед. активности эндонуклеазы рестрикции на 1 мкг ДНК в соответствующем буфере. Гидролиз проводили при 37°С (если иное не указано в инструкции) в течение 60 мин. Результаты гидролиза анализировали в 1-1,5% агарозном геле.

2.2.9. Экстракция фрагментов ДНК из агарозного геля

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с использованием «QIAquick Gel Extraction Kit» (“QIAGEN”, США) согласно инструкции производителя.

2.2.10. Встраивание фрагментов ДНК в векторную плазмиду

Для встраивания фрагментов ДНК в векторную плазмиду в лигазную смесь вносили 0,5 пкМ ДНК векторной плазмиды, расщепленной эндонуклеазами рестрикции, 20-кратно превышающее количество фрагмента, обработанного теми же рестриктазами, и ДНК-лигазу фага Т4. Лигирование вели в течение 2-4 часов при 11°С в буфере, содержащем 66мМ трис-HCl, pH 7.6, 8 мМ $MgCl_2$, 5 мМ ДТТ и 1 мМ АТФ. На 1мкг ДНК использовали 1-2 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4.

2.2.11. Трансформация клеток E. coli плазмидной ДНК

Клетки *E. coli* трансформировали по ранее описанному методу [Маниатис и др., 1984] с модификациями. Из 1 мл клеточной культуры, выращенной до плотности OD_{600}=0,4-0,6, осаждали клетки центрифугированием при 3000g 1 мин. Осадок растворяли на льду в 1 мл буфера для трансформации №1, и повторно центрифугировали при 3000g в течение 1 мин, после чего осадок ресуспендировали в 1 мл буфера для трансформации №2 и инкубировали во льду 15 мин. Клетки повторно центрифугировали и осадок растворяли в 200 мкл буфера для трансформации №2. В полученную клеточную суспензию вносили 3 мкл DMSO и плазмидную ДНК (не более 10 мкл раствора) и оставляли во льду в течение 30 мин. Клетки прогревали при 42°С в течение 2 мин, смешивали с 1 мл среды 2×YT и инкубировали 1 час при 37°С, а затем высевали на агаризованную среду с

соответствующим антибиотиком. Эффективность трансформации составляла 10^7 – 10^8 колоний на 1 мкг ДНК.

2.2.12. Электрофоретическое фракционирование ДНК

Электрофоретическое фракционирование фрагментов ДНК делали как описано ранее [Остерман, 1981], с использованием 6% ПААГ с соотношением акриламид: бисакриламид 30:1, либо в 0,8% или 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере в режиме 10 В/см. Образцы вносили в лунки геля в буфере для нанесения образцов ДНК. Для визуализации ДНК гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл).

2.2.13. Амплификация фрагментов гена, кодирующего гликопротеин Е ВКЭ

В качестве матрицы для ОТ-ПЦР использовали РНК гена Е ВКЭ, штамм Софьин (GenBank: AEP20480.1). Для получения фрагмента, кодирующего белок rED3delA* (301 – 359 ако) использовали праймеры rED3_301_NcoI_dir и rED3_359 _NotI_rev. Фрагмента, кодирующего белок rED3delD* (356 – 397 ако), – праймеры rED3_356_NcoI_dir и rED3_his_NotI_rev.

Продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле.

ПЦР-продукты встраивали в плазмидную ДНК pHEN2 по сайтам узнавания эндонуклеазами рестрикции, в результате были получены плазмиды pHEN-rED3delA* и pHEN-rED3delD*. Правильность встройки подтверждали секвенированием.

2.2.14. Выделение плазмидной ДНК, не содержащей эндотоксинов

Для трансфекции эукариотических клеток плазмидные ДНК выделяли с использованием набора “PureYield plasmid midiprep system” (Promega) согласно инструкции производителя с использованием вакуумного насоса (Millipore) из культуры клеток *E.coli* XL1-blue, трансформированных необходимой плазмидой и выращенных в 100 мл среды LB при непрерывном качании в течение ночи при 37 °C. После элюции с колонок растворы плазмид переосаждали 3-5 объмами 96 % этанола, центрифугировали при 14000 g 5 мин, промывали осадок 70% этиловым спиртом и растворяли в не содержащей нуклеаз воде. Концентрацию и чистоту ДНК определяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра “SmartSpec

Plus" (Bio-Rad) при длине волн 260 нм и 280 нм. В расчетах полагали, что оптическая плотность равна 1,0 для раствора ДНК с концентрацией 50 мкг/мл [Sambrook J. et al., 2001], а чистота 95% достигается при соотношении $ОП_{260}$/ $ОП_{280}$ > 1,8. Растворы ДНК хранили при -20 °С. Качество выделенной плазмидной ДНК проверяли электрофоретически, основной формой плазмидной ДНК при электрофорезе должна быть суперскрученная ДНК.

2.2.15. Адаптация клеток CHO K1 к суспензионному росту в бессывороточных средах

Клетки CHO K1 культивировали при 37˚С в атмосфере 5% CO_2 в среде Ham's F-12 (LifeTechnologies, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 4 мМ глутамина (Биолот, Россия) в 75 мл культуральных флаконах. При достижении монослоя, клетки снимали с поверхности культурального флакона с использованием раствора Трипсин-Версена и разводили в 5 раз. Каждые 3-4 пассажа содержание ЭТС уменьшали на 2%, затем клетки переводили в синтетическую питательную среду ProCHO-AT (Lonza, Швейцария), содержащую 4 мМ глутамина (Биолот, Россия). Клетки пассировали в среде ProCHO-AT 8-10 пассажей, пока не восстанавливалась их скорость деления. Для адаптации к суспензионному типу роста клетки высевали в 50 мл мини биореакторы (TPP, Швейцария) в 4 мл среды ProCHO-4 (Lonza, Швейцария), содержащей 6 мМ глутамина и 0,2% не ионного сурфактанта pluronic F68 (Thermofischer scientific, США). Клетки культивировали при 37˚С в атмосфере 5% CO_2 на шейкере для CO_2-инкубатора Celltron (Infors, Швейцария) при 150 об/мин. Клетки пассировали в 8-10 пассажей в виде суспензии, пока не восстанавливалась их скорость деления.

2.2.16. Трансфекция эукариотических клеток плазмидными ДНК

Клетки культивировали при 37˚С в атмосфере 8% CO_2 в среде CD OptiCHO (LifeTechnologies, США), содержащей 6 мМ глутамин (Биолот, Россия) в 125 мл колбах эрленмейера на шейкере для CO_2 инкубаторов Celltron (Infors, Швейцария) при 160 об/мин. Перед трансфекцией клетки пассировали 3-4 раза и высевали в шестилуночные планшеты (Nunc, Дания) в плотности $0.5\text{-}0.7\times10^6$ кл/мл. Трансфекцию осуществляли с использованием Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции. Смешивали 30 мкл Lipofectamin 2000 с 600 мкл Opti-MEM и

инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Параллельно 12 мкг плазмидной ДНК разводили в 600 мкл среды Opti-MEM. Оба раствора объединяли, аккуратно перемешивали и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Затем 200 мкл полученной суспензии добавляли в каждую лунку с клетками CHO-S или CHO-S/FRT. Через 24 или 48 часов оценивали продукцию белка, гены которого содержались в плазмидах при трансфекции.

2.2.17. Очистка полноразмерных антител с использованием аффинной хроматографии

Химерные антитела выделяли аффинной хроматографией с использованием сорбента “Protein A sepharose CL-4B” (GE Healthcare). Перед хроматографией культуральную жидкость центрифугировали 10 мин при 15000 g и фильтровали через 0,22 мкм шприцевый фильтр. Осветленную культуральную жидкость наносили на колонку с сорбентом “Protein A sepharose CL-4B” со скоростью, обеспечивающей время контакта с сорбентом не менее 4 минут, на хроматографе “BioLogic LP System” (Bio-Rad). Колонку промывали 10 объемами ТБР с pH 7.5, содержащего 0,05% азида натрия в качестве консерванта. Рекомбинантные антитела элюировали с колонки 0,1 М цитратным буфером с pH 3.1. После элюции pH доводили до значения 6.2-6.4, добавляя 1,0 М трис-HCl pH 7.5. После этого элюат диализовали против ТБР с pH 7.5 в диализной кассете (Thermficher Scientific, США) с размером пор 10 кДа, в течении ночи при +4°C.

Раствор антитела концентрировали ультрафильтрацией с использованием фильтров “Amicon ultra-4” (Millipore) с порогом отсечения 50 кДа. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре “SmartSpec Plus” (Bio-Rad), учитывая, что оптическая плотность раствора иммуноглобулина IgG с концентрацией 1 мг/мл составляет около 1,41, согласно [Hale et al., 2000]. Раствор антитела фильтровали через 0,22 мкм фильтр и хранили при 4 С в концентрации не менее 1 мг/мл.

2.2.18. Получение штаммов-продуцентов полноразмерных антител в эукариотических клетках линии CHO-S

Клетки трансфицированные как описано в п. 2.2.16 высевали в концентрации $0{,}5\times10^6$ в селективную среду CD OptiCHO, 6 мМ глутамина и селективный маркер.

Селективную среду меняли каждые 3-4 дня. После достижения 90% жизнеспособности в поликлональных популяциях клеток, проводили их клонирование методом придельных разведений, для этого в 1 лунку 96-ти луночного планшета высевале не более 1 клетки в селективной среде.

Для амплификации генов к селективной среде добавляли метотрексат (TEVA, Израиль) в концентрациях 400 нМ или 1,2 μМ. Каждые 3-4 дня меняли селективную среду с метатрексатом. Отдельные клоны получали методом предельных разведений, после достижения 90% жизнеспособности в поликлональных популяциях клеток.

Для наработки химерного антитела использовали среду CD FortiCHO (LifeTechnologies, США), 40% раствор глюкозы (Синтез, Россия) и питательную добавку CD Efficient Feed C (LifeTechnologies, США).

Очистку антител проводили, как описано в п. 2.2.17.

2.2.19. Оценка константы связывания антитела chFVN145 с белком Е ВКЭ

Кинетику связывания химерного антитела chFVN145 с рекомбинантным гликопротеином rE ВКЭ определяли методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием оптического биосенсора ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Поверхность сенсорного чипа GLC (Bio-Rad) активировали смесью 125 мкл 40 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (EDAC) и 125 мкл 10 мМ N-гидроксисульфосукцинимида (Sulfo-NHS) в течение 1 мин со скоростью 150 мкл/мин. Рекомбинантный белок Е ВКЭ, разведённый в 10 мМ растворе ацетата натрия с pH 4,5 до концентрации 15 мкг/мл, иммобилизовали на активированную поверхность со скоростью 25 мкл/мин на вертикальном канале L1 сенсорного чипа GLC на уровне 70 единиц ответа (RU). Серийные разведения chFVN145 анализировали, начиная с самой низкой концентрации (1 нМ, 3 нМ, 9 нМ, 27 нМ и 81 нМ) при скорости потока 25 мкл / мин. Вертикальный канал L2, был использован в качестве опорного канала. Связывание длилось 10 мин, диссоциация комплексов – 30 мин. Эксперименты по связыванию проводили в трех повторах; поверхность чипа была регенерирована 100 мМ лимонной кислотой. Глобальный анализ экспериментальных данных, основанных на модели односайтового связывания или гетерогенных аналитов, был выполнен с использованием программного обеспечения ProteOn Manager v. 3.1.0. Константа аффинности была рассчитана как $KD = k_{off} / k_{on}$.

2.2.20. *Исследование протективных свойств химерного антитела chFVN145 на мышиной модели КЭ*

Трехнедельных мышей (по 10 в каждой группе) инфицировали внутрибрюшинно серийными десятикратными разведениями ВКЭ в 0,9% NaCl, и рассчитывали LD_{50} по методу Рида-Менча [Reed и Muench, 1938]. Партии вирусных суспензий разделяли на аликвоты и хранили при -80° С.

Чтобы исследовать протективную активность препаратов антител, мышей линии BALB/c (10-11 г) инфицировали интраперитонеально (и/п) 0,2 мл ВКЭ в соответствующем разведении. Используемые иммунологические препараты – антитело chFVN145 и коммерческий противоклещевой иммуноглобулин, полученный из донорской крови (НПО «Микроген», Россия) разводили в 0,9% растворе NaCl и в объеме 100 мкл вводили однократно внутримышечно (в/м) мышам. Каждая экспериментальная группа мышей состояла из 8–10 животных. Мышей контролировали, не менее двух раз в день на наличие клинических признаков заболевания (пареза и / или паралича). В случае проявления клинических признаков мышей подвергали эвтаназии с использованием изофлурана. Животных наблюдали в течение 21 дня после заражения, регистрируя их выживаемость. И средний период жизни (СПЖ), который определяли как период между заражением и гибелью животных; СПЖ мышей, выживших до конца эксперимента, составил 21 день. Чтобы учесть влияние хранения и замораживания-оттаивания на партии вирусных суспензий, реальную летальную дозу (в LD_{50}) дополнительно определяли в каждом эксперименте как описано ранее [Reed и Muench, 1938] с использованием четырех групп мышей, по шесть животных в каждой группе.

2.2.21. Статистический анализ

Все эксперименты *in vitro* проводили в трех или более повторах. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения MS Excel и приведены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (SEM, standart error of the mean). Сравнение выживаемости животных проводили с использованием логрангового теста. Данные были проанализированы с использованием онлайн-сервиса (https://www.evanmiller.org/abtesting/survival-curves.html). Значение $p \leq 0,05$ являлось статистически достоверным.

2.2.22. Амплификация пептидных библиотек

Культуру клеток *E. coli* ER2738 растили в течение ночи при 37°C, брали аликвоту и инкубировали при 37°C в 50 мл LB среды с тетрациклином (50 мг/мл) до оптической плотности OD_{600} = 0.01-0.05. После чего инфицировали фаговой библиотекой Ph.D-12 либо Ph.D-C7C с множественностью инфицирования 1:20 (20 фаговых частиц на 1 бактерию) и инкубировали при 37°C при качании 4,5-5 часов. Осаждали зараженные клетки центрифугированием при 12000 g 10 минут при температуре +4°C. Отбирали супернатант, содержащий бактериофаги, добавляли к нему 1/6 объема ПЭГ/2,5мМ NaCl и выдерживали во льду в течение 2 часов. Преципитат ПЭГ-фаговые частицы осаждали центрифугированием при 12000g при температуре +4°C в течение 15 мин, затем удаляли супернатант и повторно центрифугировали. Полученный осадок растворяли в 1 мл буфера, содержащего 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5) и 150 мМ NaCl, и, после добавления 180 мкл ПЭГ/2,5мМ NaCl, инкубировали во льду 20 - 60 мин. Фаговый преципитат осаждали центрифугированием при 5000g при температуре +4°C в течение 10 мин, и после тщательного удаления супернатанта вместе с остатками ПЭГ ресуспендировали осадок в 50 мкл ФСБР. Сток хранили при -20°C.

Оценка выхода фаговых частиц. Культуру клеток *E. coli* ER2738 культивировали в среде LB с тетрациклином (50 мг/мл) при 37°C в течение ночи, отбирали аликвоту и инкубировали при 37°C в LB среде с тетрациклином (50 мг/мл) до экспоненциальной стадии роста (оптическая плотность OD_{600} = 0.01-0.05). Из исходного стока фаговые частицы титровали в ФСБР до разведения 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} и смешивали 10 мкл с 200 мкл экспоненциальной культуры клеток *E. coli* ER2738. Инкубировали около 5-ти минут и смешивали с 4 мл верхнего агара, затем разливали по чашкам Петри с предварительно залитым нижним агаром, содержащим 50 мкг/мл X-Gal, 40 мкг/мл IPTG, чашки растили в течение ночи при 37°C. Титр фагов определяли по формуле: $C_{БОЕ/мл} = N \times 10^2 \times 10^{разв}$, где разв – степень разведения, а N-количество бляшек на чашке Петри.

2.2.23. Аффинное обогащение пептидных библиотек

Биопэннинг пептидных фаговых библиотек Ph.D-12 и Ph.D-C7C проводили как описано в инструкции производителя «Ph.D.™ Phage Display Libraries» с нашими

модификациями. Антитело chFVN145 и контрольное рекомбинантное антитело fh1A, специфичное к белку p35 ортопоксвирусов [Khlusevich, 2018], растворяли в 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8.6 в концентрации от 100 до 10 мкг/л и сорбировали на поверхность полистироловых планшетов (Greiner, Германия) при комнатной температуре в течение ночи. Для блокировки мест неспецифического связывания использовали 3% раствор сухого молока в ТБР (в первом и втором раундах) и 3% раствор БСА в ТБР (в третьем раунде), инкубировали в течение часа. После удаления блокирующего раствора и 6-ти кратной отмывки раствором ТБР с 0,1% Tween-20, в лунки с контрольным антителом fh1A вносили около 10^{11} БОЕ пептидной фаговой библиотеки и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем не связавшиеся бактериофаги переносили в лунки с антителом chFVN145 и инкубировали 1 ч при 37°C. Удаляли не связавшиеся бактериофаги и промывали лунки планшета 10 раз ТБР с 0,1% Tween-20, после чего связавшиеся фаговые частицы элюировали раствором антитела в концентрации 100 мкг/мл при комнатной температуре в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Небольшую аликвоту полученного элюата отбирали для титрования; оставшимся элюатом инфицировали клетки *E. coli* ER2738 в объеме 20 мл, находящиеся в экспоненциальной фазе роста. Инфицированные клетки инкубировали при 37°C в течение 4,5 часов, затем выделяли фаговые частицы.

2.2.24. *Выделение фаговых частиц, экспонирующих пептиды*

Бактериофагами инфицировали находящуюся в экспоненциальной фазе роста культуру клеток *E.coli* ER2738, культуру инкубировали в течение 4,5-5 часов при 37 °C при постоянном перемешивании, и осаждали клетки центрифугированием при 12000 g 10 мин при 4°C. Супернатант с бактериофагами осторожно переносили в чистые пробирки, смешивали с 1/6 объёма PEG/NaCl и выдерживали в течение 2 часов при 4°C. Бактериофаги осаждали центрифугированием при 12000 g при 4 °C в течение 15 минут, удаляли супернатант, и растворяли осадок в 1 мл ТБР. Для удаления оставшихся клеток повторяли центрифугирование при 14000 g при 4 °C в течение 5 мин. Супернатант переносили в другие пробирки, смешивали с 1/6 объёма PEG/NaCl и инкубировали во льду в течение часа. Бактериофаги осаждали центрифугированием при 14000 g при 4 °C в течение 10 мин, удаляли супернатант, и растворяли осадок, содержащий фаговые частицы, в 50 мкл TBS.

2.2.25. Выделение ДНК бактериофагов, несущих пептид

Культуру клеток *E. coli* ER2738, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, инфицировали фагами и инкубировали при 37°С с качанием в течение 4,5-5 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 12000 g при 4°С в течение 10 мин. Осторожно переносили супернатант с бактериофагами в другие пробирки, смешивали с 2/5 объема 20% PEG/2.5 мМ NaCl и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 мин. Бактериофаги осаждали центрифугированием при 12000 g при 4 °С в течение 10 минут. Осадок растворяли в 200 мкл йодидного буфера, добавляли 500 мкл 96 % этанола и инкубировали при комнатной температуре10-20 минут. Полученную суспензию центрифугировали при 12000 g при 4°С в течение 10 мин, удаляли супернатант, а осадок промывали 70 % этанолом. После удаления спирта, осадок высушивали на воздухе и растворяли в 30 мкл бидистилированной воды.

2.2.26. Полимеразная цепная реакция с бляшек и определение нуклеотидной последовательности

Для использования фаговой ДНК в качестве матрицы выросшие за ночь на верхнем агаре бляшки переносили микробиологической петлей в лунки ПЦР-планшета (Applied Biosystems) с 20 мкл ФСБР, прогревали при 96°С в течение 5 мин. Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала по 10 пкм праймеров M13_pIII_F и M13_PIII_96, смесь dNTP (по 0,25 мМ каждого), 3 мкл 10×Dream Taq Green буфера, 5 мкл раствора ДНК, 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Проводили 30 циклов ПЦР: денатурация матрицы - 94ºС, 1 мин; отжиг праймеров на матрице - 56ºС, 30 сек; реакция полимеризации - 72ºС, 1 мин. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле. Реакцию Сэнгера для определения нуклеотидной последовательности ДНК проводили с использованием праймера M13_PIII_96 как описано в п. 2.2.6.

2.2.27. 3D-моделирование структуры гликопротеина Е ВКЭ

Молекулярные координаты ако гликопротеина Е ВКЭ (PDB 1svb), используемого в структурном анализе, были получены из базы данных белков (PDB NCBI), а затем визуализированы с использованием пакета программ PyMol software (version 1.7.6.0).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Создание штамма-продуцента химерного антитела против вируса клещевого энцефалита на основе эукариотических клеток

3.1.1. Создание суспензионной линии CHO-S

При создании промышленных клеточных линий чаще всего используют суспензионный тип культивирования штаммов-продуцентов в бессывороточных синтетических средах, поскольку такой тип культивирования обладает рядом преимуществ, таких как: способность клеточной культуры достигать плотности большей, чем 10^7 клеток/мл; отсутствие контаминации микроорганизмами из сывороток животных в стандартизованных синтетических средах; возможность культивирования в любом типе промышленных биореакторов, в том числе в перфузионном типе культивирования.

Для привыкания адгезивных клеток CHO-K1 к суспензионному росту на первом этапе их адаптировали к росту в бессывороточной среде. При адаптации клеток CHO-K1 к бессывороточной среде их культивировали в среде Ham F-12, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) и 4 мМ глутамин, при этом постепенно уменьшали содержание ЭТС с 10% до 0%. При полном исключении сыворотки клетки CHO-K1 высевали в синтетическую среду ProCHO-AT, содержащую 6 мМ глутамин, и пассировали до тех пор, пока клетки не восстановили скорость пролиферации.

После адаптации к росту в бессыворотчной среде ProCHO-AT, полученные клетки адаптировали к суспензионному росту в среде, содержащей не ионный сурфактант pluronic F-68 (Thermofischer Scientific, США), который препятствует прикреплению клеток к поверхности и их слипанию между собой. Клетки высевали в 50 мл мини-биореакторы (TPP, Швейцария) в среде для адаптации к суспензионному росту ProCHO-4, содержащей 6 мМ глутамин. Клетки инкубировали при 37˚C в атмосфере 5% CO_2 на шейкере для CO_2-инкубатора Celltron (Infors, Швейцария) при 150 об/мин и пассировали в виде суспензии, пока не восстановилась их скорость деления. В результате были получены клетки адаптированные к суспензионному росту в бессывороточных средах CHO-S.

3.1.2. Получение штамма-продуцента химерного антитела против ВКЭ с использованием плазмид pCLm4/hygro-FVN145 и pCHm2 -FVN145

Ранее были сконструированы кассетные плазмиды pCHm2 и pCLm4/hygro [Байков и др., 2012], кодирующие константные домены тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов человека, несущие последовательности для быстрой встройки генов, кодирующих вариабельные домены, и содержащие гены устойчивости к различным селективным маркерам, а именно к генетицину G418 (pCHm2) и к гигромицину Б (pCLm4/hygro). Эти две плазмиды создавали для получения на их основе штаммов-продуцентов.

Плазмиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи химерного антитела против гликопротеина Е ВКЭ, получали следующим образом. Из гибридомных клеток, продуцирующих мкАТ FVN-145 (предоставлена Матвеевым Л.Э., ИХБФМ СО РАН) была выделена суммарная мРНК, затем с помощью ОТ-ПЦР и праймеров VH_dir и VH_rev был получен ПЦР-продукт гена, кодирующего вариабельный домен тяжелой цепи антитела chFVN145. Для получения ПЦР-продукта кодирующего вариабельный домен легкой цепи мкАТ FVN-145 использовали праймеры VL_dir и VL_rev и выделенную суммарную РНК в качестве матрицы. Полученные ПЦР-продукты, кодирующие вариабельные домены антитела, были обработаны соответствующими эндонуклеазами рестрикции, сайты для которых были введены в последовательности праймеров (табл. 1), и объединены в реакции лигирования с плазмидами pCHm2 и pCLm4/hygro, также обработанными соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Правильность встройки ДНК-фрагментов подтверждали секвенированием.

Полученные плазмиды pCHm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145 (рис. 6) нарабатывали в клетках *E. coli* XL1blue и выделяли их из лизатов с использованием набора “PureYield plasmid midiprep system” (Promega, США), позволяющего избавиться от эндотоксинов. Для получения химерного антитела производили одновременную трансфекцию клеток CHO-S смесью, содержащей эквимолярные количества обеих плазмид. Трансфекцию проводили с помощью Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Независимо эти же клетки трансфицировали плазмидой pEGFP-N1, содержащей ген GFP, для контроля эффективности трансфекции. Уровень трансфекции в контрольных клетках

оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии через 24 часа после трансфекции, обычно он составлял не менее 70% клеток, экспрессирующих GFP.

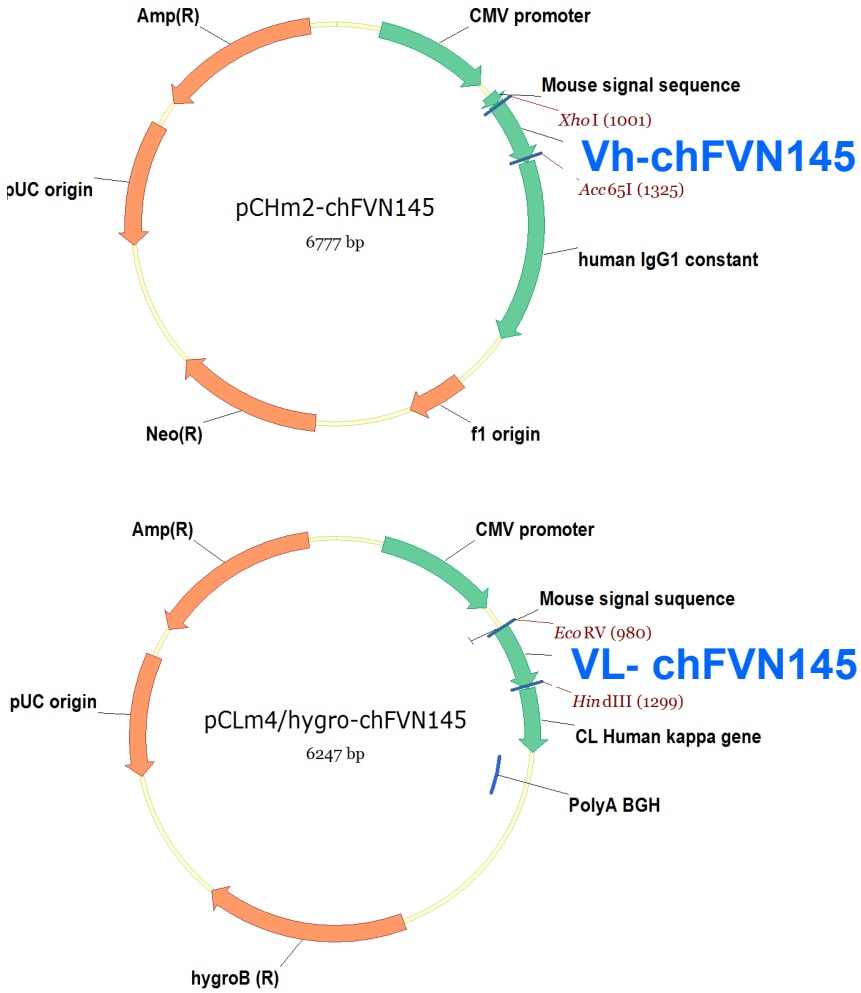


Рисунок 6 – Карты плазмид pCHm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145. Использованные обозначения: CMV promoter – цитомегаловирусный промотор; VH -– участок гена, кодирующий вариабельный домен тяжёлой цепи антитела chFVN145; human IgG1 constant – участок, кодирующий константные домены тяжёлых цепей антител человека изотипа IgG1; VL –участок гена, кодирующий вариабельный домен лёгкой цепи антитела chFVN145; human kappa constant -- участок, кодирующий константный домен каппа-цепей антител человека; PolyA BGH – сайт полиаденилирования бычьего гормона роста; pUC – прокариотический ori репликации; Neo(R), Amp(R) и HygroB(R) – гены, обусловливающие устойчивость к неомицину, ампициллину, и гигромицину Б, соответственно; mouse signal sequence – участок, кодирующий сигнальный пептид цепей иммуноглобулинов. Курсивом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции

Культуральную жидкость, содержащую химерное антитело, отбирали через 48 часов после трансфекции и методом ИФА определяли в ней наличие антитела. После подтверждения экспрессии целевого антитела трансфицированными клетками их пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 6мМ глутамина, 200 мкг/мл гигромицина Б и 400 мкг/мл генетицина G418. Селективную среду меняли каждые 3-4 дня на новую. После достижения клетками 90% жизнеспособности из полученной поликлональной популяции отбирали отдельные клоны методом предельных разведений, для чего в каждую лунку 96-ти луночного планшета высевали не более 1 клетки в селективной среде.

Всего было проанализировано более 700 отдельных клонов, и было показано, что максимальная продуктивность полученных таким способом клонов не превышала 5 мг/л. Кроме того, продуктивность всех отобранных клонов была нестабильной и снизилась на 50% через 30 пассажей.

Достигнутый низкий уровень продукции можно объяснить тем, что при такой схеме клонирования интеграция в геном проходила случайным образом, и вероятность того, что одна из плазмид могла встроиться в неактивный участок хроматина была высока. В связи с этим было принято решение получить штамм-продуцент с использованием бицистронной плазмиды, которая одновременно содержала гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи химерного антитела против ВКЭ.

3.1.3. Получение штаммов-продуцентов химерного антитела против ВКЭ с использованием бицистронной плазмиды pBudCE4.1 и ее производных

В работе использовали коммерческую бицестронную плазмиду pBudCE4.1, которая содержит два эукариотических промотора – цитомегаловирусный промотор (pCMV) и промотор гена, кодирующего фактор элонгации EF-1α, – для одновременной и независимой экспрессии двух разных целевых белков или двух субъединиц одного белка, например антитела. После последовательностей промоторов в этой плазмиде содержатся несколько сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции для клонирования целевых генов, а так же сайты полиаденилирования. Кроме того, эта плазмида содержит под контролем промотора вируса SV40 ген

устойчивости к зеоцину, который можно использовать в качестве селективного маркера (рис. 7).

Получение клонов, продуцирующих химерное антитело против ВКЭ с использованием бицистронной плазмиды pBudCE4.1

ПЦР-фрагменты, кодирующие тяжелую и легкую цепи химерного антитела chFVN145, получали в ПЦР с использованием в качестве матриц соответственно плазмиды pCHm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145 и соответствующие праймеры, содержащие сайты для клонирования (табл. 1). Сначала в плазмиду pBudCE4.1 был встроен под контроль pCMV ген, кодирующий легкую цепь антитела chFVN145; затем в полученную промежуточную плазмиду встроили ген, кодирующий тяжелую цепь chFVN145 под контроль промотора pEF-1α. Правильность последовательных этапов клонирования подтверждали секвенированием.

Для получения штамма-продуцента антитела chFVN145 проводили трансфекцию клеток CHO-S с помощью Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя, с параллельной независимой трансфекцией плазмидой pEGFP-N1. Уровень трансфекции в контрольных клетках с GFP, оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии.

Концентрацию антитела chFVN145 в культуральной жидкости определяли через 48 часов после трансфекции методом ИФА. Затем трансфицированные клетки, пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 6мМ глутамина, 200 мкг/мл зеоцина, замену селективной среды на новую проводили каждые 3-4 дня. После достижения клетками 90% жизнеспособности из полученной поликлональной популяции получали отдельные клоны методом предельных разведений, как описано выше.

Всего было проанализировано около 1000 отдельных клонов, максимальная продуктивность у проанализированных клонов была не более 10 мг/л. Кроме того отобранные клоны так же были нестабильны, их продуктивность снижалась на 50-60% через 30 пассажей.

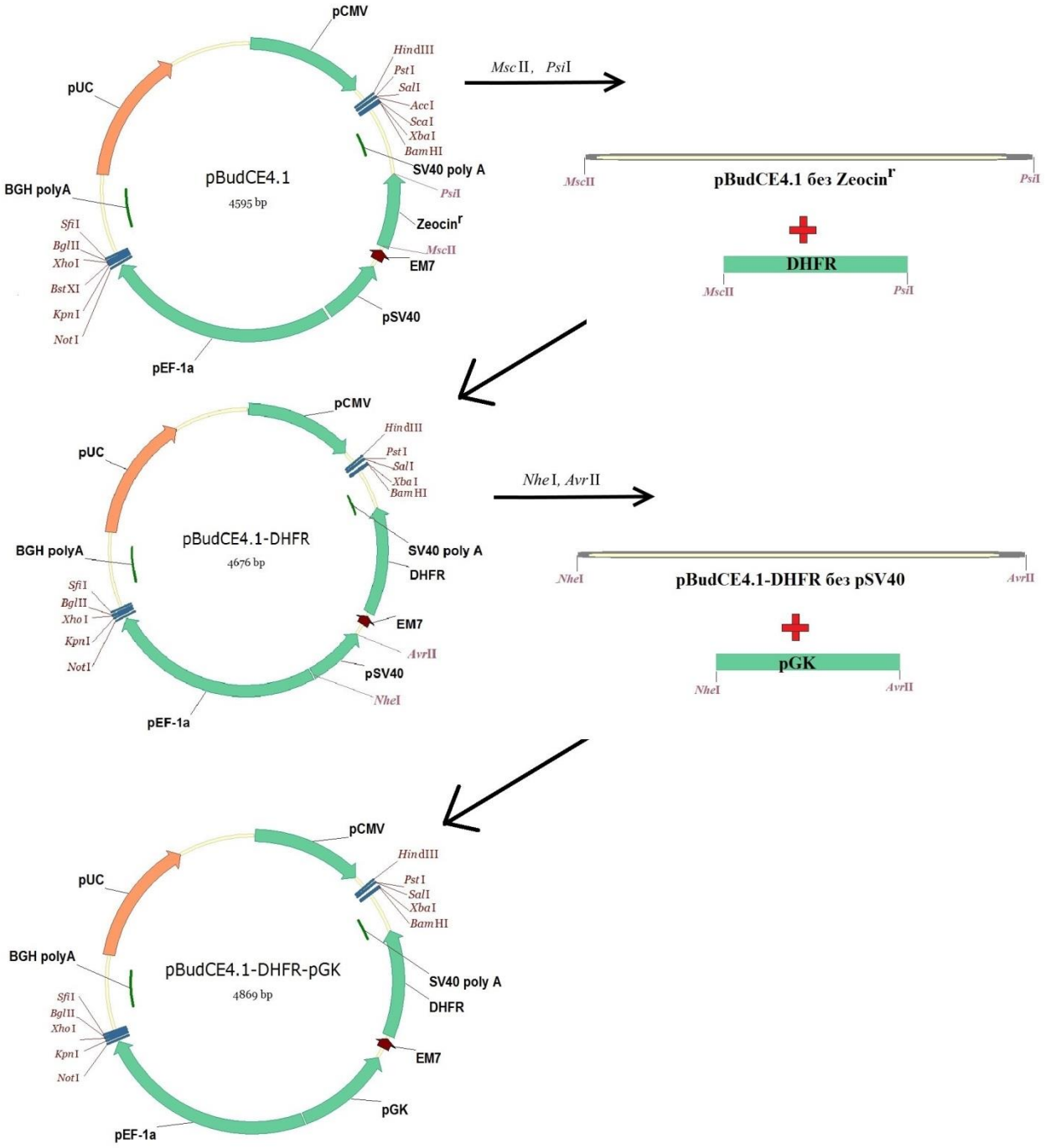


Рисунок 7 – Схема конструирования плазмид pBudCE4.1-DHFR и pBudCE4.1-DHFR-pGK. Использованные обозначения: pCMV – цитомегаловирусный промотор; pSV40 – эукариотический промотор вируса SV40; Zeocin^r– ген, обусловливающий устойчивость к зеоцину; EM7 – прокариотический промотор; pEF-1 α – эукариотический промотор гена фактора элонгации EF-1α; SV40 poly A – сайт полиаденилирования вируса SV40; BGH poly A – сайт полиаденилирования гена бычьего гормона роста; pUC – прокариотический ori репликации; DHFR – ген дегидрофолат редуктазы; pGK – промотор фосфоглицерат киназы 1 мыши. Курсивом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции

Конструирование плазмиды pBudCE4.1-DHFR и получение клонов, продуцирующих химерное антитело против ВКЭ

Известно, что амплификация целевых генов в геноме клеток-продуцентов может существенно повысить продуктивность штамма. Амплификацию целевых генов, позволяющую увеличить их копийность в геноме клеток-хозяев, можно проводить с использованием дигидрофолатредуктазы (DHFR), которую также можно использовать как селективный маркер. В связи с этим, в плазмиде pBudCE4.1-chFVN145 заменили ген устойчивости к зеоцину на ген *dhfr*.

На первом этапе получили ПЦР-продукт, содержащий ген *dhfr,* с использованием праймеров DHFR_MscII_U и DHFR_PstI_L (табл. 1) и ДНК плазмиду pSEL1 [Massey-Gendel et al, 2009] в качестве матрицы. Затем полученный ПЦР-продукт и плазмиду pBudCE4.1 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Msc*II и *Pst*I и объединяли в реакции лигирования (рис. 7). После лигирования корректность клонирования проверяли секвенированием. Затем в плазмиду pBudCE4.1-DHFR были встроены гены, кодирующие тяжелую и легкую цепь химерного антитела chFVN145, как описано выше, и в результате была получена плазмида pBudCE4.1-DHFR-chFVN145.

Трансфекцию клеток CHO-S плазмидой pBudCE4.1-DHFR-chFVN145 проводили с помощью Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Концентрацию антитела chFVN145 в культуральной жидкости определяли через 48 часов после трансфекции методом ИФА. Затем трансфицированные клетки пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 6мМ глутамина, и 400 нМ метотрексата. Селективную среду меняли каждые 3-4 дня на новую. После достижения клетками 90% жизнеспособности, из полученной поликлональной популяции получали отдельные клоны методом предельных разведений, как описано выше.

Было проанализировано около 500 отдельных клонов, максимальная продуктивность у полученных клонов достигала 20 мг/л. Затем для повышения продуктивности была проведена амплификация целевых генов в 10 отобранных линиях с максимальной продуктивностью. Для этого в селективной среде была увеличена концентрация метотрексата до 1,2 мкМ. После амплификации и клонирования максимальная продуктивность у новых клонов составляла 40 мг/л.

Однако, отобранные клоны так же были нестабильны, их продуктивность снижалась на 40-70% через 30 пассажей.

Еще одним возможным способом повышения продуктивности могло быть снижений транскрипционной активности гена *dhfr* с тем, чтобы при добавлении метотрексата в культуральную среду выжили только те клоны, в которых амплификация в геноме целевой плазмиды прошла наиболее эффективно. В связи с этим, в плазмиде pBudCE4.1-DHFR в генной кассете, содержащей ген *dhfr,* был заменен эффективный эукариотический промотор pSV40 на слабый промотор pGK - промотор гена фосфоглицерат киназы 1 мыши (рис. 7).

Конструирование плазмиды pBudCE4.1-DHFR-pGK и получение клонов, продуцирующих химерное антитело против ВКЭ

Для создания этого варианта плазмиды на первом этапе получили ПЦР-продукт, содержащий промотор pGK, с использованием праймеров pGK_NheI_U и pGK_AvrII_L (табл. 1) и плазмиды pExT [Tasic et al., 2012] в качестве матрицы. На втором этапе полученный ПЦР-продукт и плазмиду pBudCE4.1-DHFR обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Nhe*I и *Avr*II (рис. 7) и объединяли в реакции лигирования. Корректность конструирования промежуточной плазмиды pBudCE4.1-DHFR-pGK проверяли секвенированием. Затем в плазмиду pBudCE4.1-DHFR-pGK встраивали гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела chFVN145, как описано выше, и в результате была получена плазмида pBudCE4.1-DHFR-pGK-chFVN145.

Клетки CHO-S трансфицировали плазмидой pBudCE4.1-DHFR-pGK-chFVN145 с использованием Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Трансфицированные клетки через 48 часов после трансфекции пересевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 6мМ глутамина, и 400 нМ метотрексата. Селективную среду меняли каждые 3-4 дня на новую. После достижения клетками 90% жизнеспособности, из полученной поликлональной популяции получали отдельные клоны методом предельных разведений, как описано выше.

Было проанализировано около 500 отдельных клонов, максимальная продуктивность у полученных клонов достигала 20 мг/л. Для повышения продуктивности проводили амплификацию генов в 10 отобранных линиях с

максимальной продуктивностью. Для этого в селективной среде увеличивали концентрацию метотрексата до 1,2 мкМ. После амплификации и клонирования максимальная продуктивность у ряда новых клонов достигла 100 мг/л. Однако, проверка стабильности продуктивности отобранных линий показала, что через 30 пассажей продуктивность снижалась на 50-80%.

Чаще всего на уровень экспрессии трансгенов влияет локация в геноме, в которую встраивается целевой ген, и причиной снижения продуктивности штаммов-продуцентов может быть метилирование или ацетилирование целевых генов, в нашем случае, генов, кодирующих тяжелую или легкую цепи антитела chFVN145. Все предыдущие схемы клонирования, включая те, которые использовали для оптимизации продуктивности, предполагали случайную встройку целевых генов в геном, поэтому важно нацелить интеграцию плазмиды в транскрипционно активные участки генома CHO-S. На следующем этапе для повышения стабильности уровня продукции штаммов-продуцентов была использована сайт специфическая интеграция в геном. Для создания такой системы необходимо было сконструировать штамм клеток-хозяев, несущих в транскрипционно активном локусе генома сайт для направленной интеграции целевой ДНК, и сконструировать векторные плазмиды, содержащие участки ДНК, обеспечивающие интеграцию в геном клетки-хозяина.

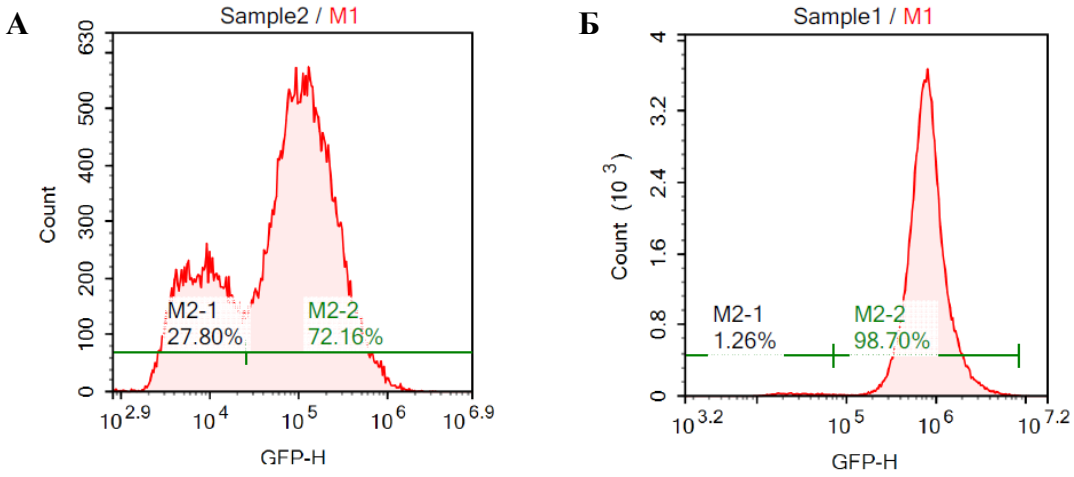
Таблица 2. Максимальная продуктивность клонов, полученных с использованием разных подходов и стабильность продукции химерного антитела chFVN145.

	pCHm2-FVN145 и pCLm4/hygro-FVN145	pBudCE4.1-chFVN145	pBudCE4.1-DHFR-chFVN145	pBudCE4.1-DHFR-pGK-chFVN145
Проанализировано отдельных клонов	> 700	≈ 1000	≈ 500	≈ 500
Продуктивность	≤ 5 мг/л	≤ 10 мг/л	≤ 40 мг/л	≤ 100 мг
Продуктивность через 30 пассажей	снизилась на 50%	снизилась на 50-60%	снизилась на 40-70%	снизилась на 50-80%

3.1.4. Создание суспензионной линии CHO-S/FRT

Для оптимизации последующего процесса отбора клонов в коммерческой плазмиде pFRT/LacZeo (Life technologies, США) заменили ген, кодирующий слитый белок *LacZeo* (ß-лактомаза, соединенная с продуктом гена *Sh ble*, обеспечивающим устойчивость к зеоцину) на ген слитого белка GFPZeo (*gfp*, соединенный с зеоцином). Для этого был получен ПЦР продукт с использованием праймеров GFP-Zeo-*Hin*dIII и GFP-Zeo-*B*ssHII_L, содержащий ген GFP, в котором на 5'- и 3'-концах находятся сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Hin*dIII и *B*ssHII, соответственно. Далее плазмидную ДНК pFRT/LacZeo и ПЦР-фрагмент с геном, кодирующим GFP, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Hin*dIII и *B*ssHII. Полученные фрагменты нужной длины (4914 п.о. и 780 п.о.) очищали и объединяли в реакции лигирования. Корректность встройки в результирующую плазмиду подтверждали секвенированием.

Затем клетки линии CHO-S, полученные нами как описано в п. 3.1.1., трансфицировали плазмидой pFRT/GFPZeo с использованием Lipofectamine 2000. Через 24 часа после трансфекции количество трансфектантов оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра Novocyte (ACEA, США). Было показано, что не менее 50% клеток экспрессировали белок GFP (рис. 8А). Через 48 часов после трансфекции полученный пул клеток высевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 6 мМ глутамина, 200 мкг/мл зеоцина. Селективную среду полностью заменяли каждые 3-4 дня. Методом предельных разведений получали отдельные клоны, для этого в лунки 96-луноного планшета высевали не более 1 клетки на 1 лунку планшета в селективной среде. Полученные клоны анализировали по уровню экспрессии белка GFP методом проточной цитофлуориметрии. Клоны с наибольшим уровнем продукции белка GFP проверяли на стабильность. Для этого их пассировали 30-35 пассажей в ростовой среде без селективного антибиотика зеоцина, после чего определяли уровень продукции GFP. В результате был отобран стабильный клон, названный CHO-S/FRT, с максимальным уровнем продукции GFP (рис. 8Б).



Gate	Count	% M1	Mean X
M1	41,728	100.00 %	127,527
M2-1	11,601	27.80 %	9,815
M2-2	30,109	72.16 %	172,957

Gate	Count	% M1	Mean X
M1	98,977	100.00 %	945,544
M2-1	1,246	1.26 %	32,386
M2-2	97,693	98.70 %	953,278

Рисунок 8 – Анализ изменения флуоресценции трансфицированных клеток CHO-S по уровню GFP, выполненный методом проточной цитофлуориметрии: *а* – пул трансфецированных клеток CHO-S через 24 после трансфекции; *б* – пул полученных клеток CHO-S/FRT после селекции

3.1.5. Конструирование кассетной плазмиды, кодирующей константные домены антитела человека, сайт гомологичной рекомбинации FRT и участки для быстрого клонирования генов, кодирующих целевые вариабельные домены антител

Использование бицистронной плазмиды для создания штамма-продуцента рекомбинантного антитела показало хорошие результаты по продуктивности, но полученные штаммы не были стабильными и существенно снижали уровень своей продуктивности после десятков пассажей, поскольку встройка плазмиды происходила в случайный участок генома и, вероятно, была сильно подвержена клеточным механизмам инактивации генов. Для увеличения стабильности продукции в дальнейших исследованиях использовали бицистронную плазмиду, содержащую сайт гомологичной рекомбинации. Схема клонирования кассетной векторной плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL, содержащей сайт гомологичной рекомбинации и гены, кодирующие константные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека, представлена на рисунке 9.

Сначала в коммерческую плазмиду pCDNA5/FRT (Life Technologies), содержащую FRT-сайт для гомологичной рекомбинации, клонировали промотор гена, кодирующего фактор элонгации трансляции *Ef-1α*. ПЦР-фрагмент содержащий в своем составе промотор pEf1α получали с использованием праймеров *Ef1α_U17* и *Ef1α_L22* и плазмиды pBudCE4.1 (Life Technologies) в качестве матрицы. Затем полученный фрагмент и плазмиду pCDNA5/FRT обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Kpn*I и *Bam*HI. Полученные очищенные фрагменты объединяли в реакции лигирования. Корректность лигирования подтверждали секвенированием. Таким образом была получена промежуточная плазмида pCDNA5/FRT-pEf1α.

На втором этапе в плазмиду pCDNA5/FRT-pEf1α встраивали последовательность, кодирующую константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека и сайт полиаденилирования. Для этого с помощью праймеров CH_U22 и BGH_polyA_L18 (табл. 1) получали ПЦР-фрагмент, содержащий ген, кодирующий константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека и сайт полиаденилирования бычьего гормона роста; в качестве матрицы использовали созданную ранее в нашей лаборатории плазмиду pBudCE4.1/full_Ab, содержащую гены, кодирующие константные домены тяжелой и легкой цепей антитела человека. На 5’- и 3’-концах этого ПЦР-фрагмента содержались сайты узнавания эндонуклеазой рестрикции *Xho*I. Далее полученный ПЦР фрагмент и плазмидную ДНК pCDNA5/FRT-pEf1α обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Xho*I. Полученные фрагменты объединяли в реакции лигирования. Корректность клонирования подтверждали секвенированием. В результате была получена плазмида pCDNA5/FRT-CH.

На третьем этапе в плазмиду pCDNA5/FRT-CH необходимо было встроить ген, кодирующий константный домен легкой цепи с сайтом полиаденилирования вируса SV40. Для этого с использованием праймеров CL_U21 и SV40_polyA_L30 (табл. 1) получали ПЦР-фрагмент с геном, кодирующим константный домен легкой цепи, и сайтом полиаденилирования вируса SV40. В качестве матрицы использовали плазмиду pBudCE4.1/full_Ab. В последовательности праймеров вводили сайты узнавания эндонуклеазой рестрикции *Hin*dIII. Затем плазмидную ДНК pCDNA5/FRT-CH и полученный ПЦР фрагмент обрабатывали эндонуклеазой

рестрикции *Hin*dIII. Полученные очищенные фрагменты объединяли в реакции лигирования. Корректность подтверждали секвенированием.

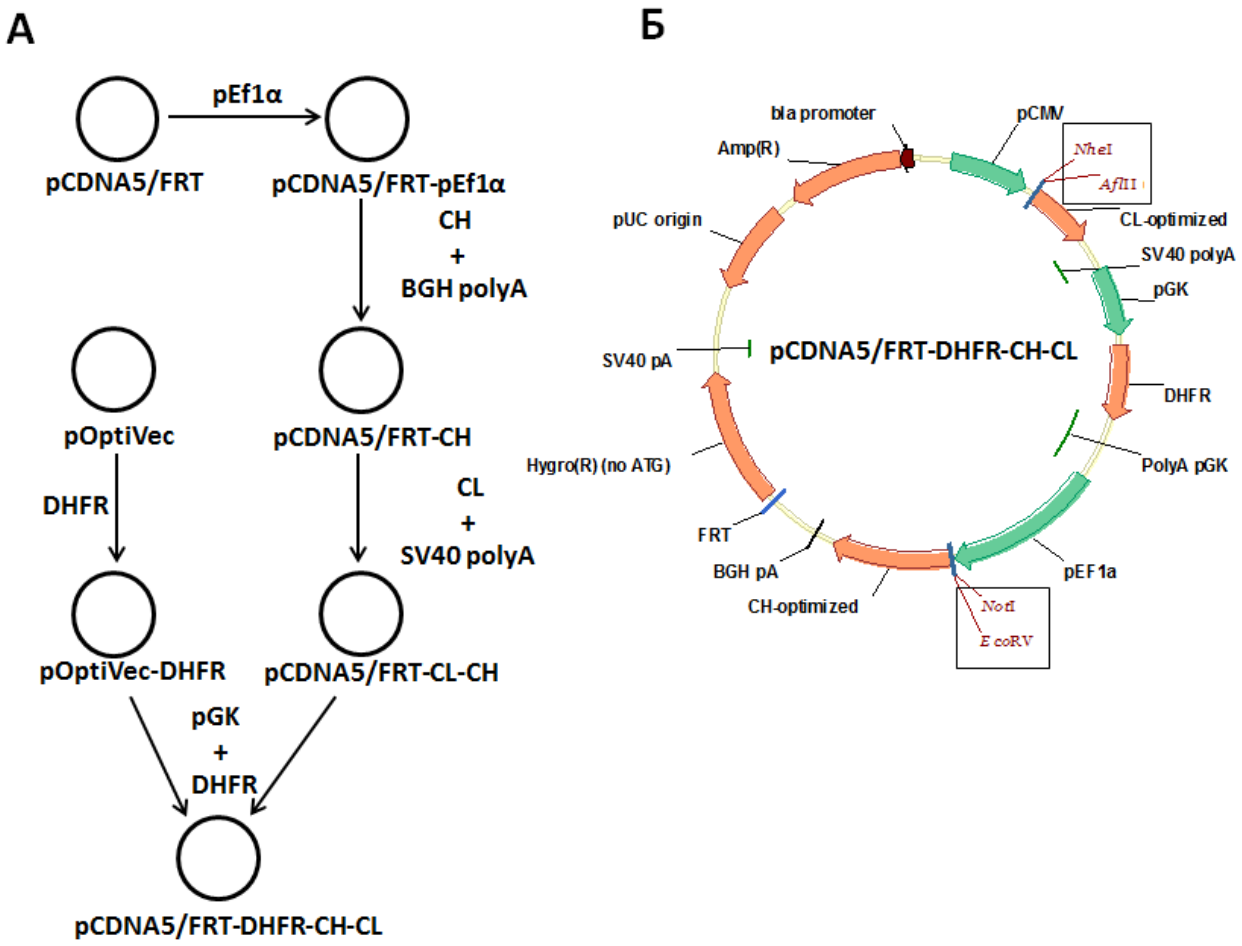


Рисунок 9 – Схема конструирования кассетной векторной плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL (А) и генетическая схема организации плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL (Б). Использованные обозначения: pCMV – цитомегаловирусный промотор; pSV40 – эукариотический промотор вируса SV40; CH– участок, кодирующий константные домены тяжёлых цепей антител человека изотипа IgG1; CL – участок, кодирующий константный домен каппа-цепей антител человека; PolyA pGK – сайт полиаденилирования фосфоглицерат киназы 1 мыши; SV40 polyA – сайт полиаденилирования вируса SV40; BGH pA – сайт полиаденилирования гена бычьего гормона роста; Amp(R) и Hygro(R) – гены, обусловливающие устойчивость к ампициллину и гигромицину Б, соответственно; bla promoter – прокариотический промотор; pEF-1a – эукариотический промотор гена фактора элонгации EF-1α; pUC – прокариотический ori репликации; DHFR – ген дегидрофолат редуктазы; pGK – промотор фосфоглицерат киназы 1 мыши; FRT – сайт гомологичной рекомбинации. Курсивом указаны сайты эндонуклеаз рестрикции

В ходе четвертого этапа получали промежуточную плазмиду, в которой ген *dhfr* контролировался слабым эукариотическим промотором. Для этого в плазмиде pOptiVec-TOPO (Life Technologies), содержащей ген *dhfr*, заменили IRES-элемент вируса энцефаломиокардита на слабый эукариотический промотор фосфоглицераткиназы pGK. Для этого с использованием праймеров pGK_U20 и pGK_L17 (табл. 1) был получен ПЦР-фрагмент длиной 408 п.н., содержащий pGK, причем на 5’- и 3’-концах ПЦР-фрагмента находились сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Hpa*I и *Bgl*II; в качестве матрицы использовали плазмиду pExT [Tasic et al., 2012]. Плазмидную ДНК pOptiVec-TOPO и полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрицииа *Hpa*I и *Bgl*II и объединяли в реакции лигирования. Корректность встройки подтверждали секвенированием. В результате была получена промежуточная плазмида pOptiVec-DHFR.

На последнем этапе в плазмиду pCDNA5/FRT-CH-CL встраивали ген *dhfr* под контролем промотора pGK. Для этого получали ПЦР-фрагмент длиной 1120 п.н., содержащий промотор pGK, ген *dhfr* и сайт полиаденилирования тимидинкиназы с использованием праймеров pGK_APA_U20 и DHFR_L21 (табл. 1), причем на 5’- и 3’-концах ПЦР-фрагмента находились сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Apa*I и *Ksp*22I. В качестве матрицы для получения этого ПЦР-продукта использовали плазмиду pOptiVec-DHFR. Плазмидную ДНК pCDNA5/FRT-CH-CL и полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами *ApaI* и *Ksp*22*I* и объединяли в реакции лигирования. Полученная в результате кассетная плазмида pCDNA5/FRT-DHFR-CL-CH, содержащая ген *dhfr*, организована таким образом, что перед генами, кодирующими константные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека, находились сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Eco*RV и *Not*I, а также *Nhe*I и *Afl*II, соответственно. Это обеспечивало удобного клонирование фрагментов ДНК, кодирующих вариабельные домены тяжелых и легких цепей антител человека. Кроме того, у гена, кодирующего гигромицин Б фосфотрансферазу отсутствовал стартовый кодон ATG, а FRT-сайт был расположен на 5’-конце этого гена.

3.1.6. Конструирование плазмиды с геном, кодирующим химерное антитело chFVN145, и локусами, обеспечивающими сайт-направленную рекомбинацию в геном

Для получения плазмиды pCDNA5/FRT-DHFR-chFVN145 были наработаны ПЦР-продукты, содержащие гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела chFVN145. В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиду pCHm2-FVN145 и плазмиду pCLm4/hygro-FVN145. ПЦР-продукт, содержащий ген тяжелой цепи был получен с помощью праймеров VH_dir_NotI и VH_rev_EcoRV, в которые были введены сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Not*I и *Eco*RV. ПЦР-продукт, содержащий ген легкой цепи был получен с использованием праймеров VL_dir_NheI и VL_rev_AflII, которые содержали сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Nhe*I и *Afl*II, соответственно.

Сконструированную кассетную плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL и ПЦР-продукт, содержащий ген тяжелой цепи антитела chFVN145, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Not*I и *Eco*RV, чистили и объединяли в реакции лигирования. Затем полученную промежуточную плазмиду и фрагмент, кодирующий вариабельный домен гена легкой цепи антитела chFVN145, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *Nhe*I и *Afl*II, и после объединения в реакции лигирования корректность встроенной нуклеотидной последовательности проверяли секвенированием. В результате была сконструирована плазмида pCDNA5/FRT-DHFR-chFVN145.

3.1.7. Создание штамма-продуцента химерного антитела chFVN145 с использованием гомологичной рекомбинации

Для получения линии клеток, продуцирующих химерное антитело человека против гликопротеина E, chFVN145, суспензионные линии сконструированных нами клеток CHO-S/FRT были трансфицированы с помощью Lipofectamine 2000 (Gibco) двумя плазмидами: вспомогательной плазмидой pOG44 с геном, кодирующим флиппазу, и плазмидой pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 с геном *dhfr* и геном, кодирующим антитело chFVN145. Плазмиды вводили в соотношениях 19/1, 14/1, 9/1 и 4/1 по молекулярным массам плазмид, соответственно.

Через 48 часов после трансфекции определяли жизнеспособность клеток методом окрашивания трипановым синим; количество клеток подсчитывали, используя счетчик клеток TC20 (BioRad, США). Жизнеспособность клеток была более 90%. Эффективность трансфекции оценивали методом проточной цитофлуориметрии, для этого оценивали процент трансфицированных клеток, содержащих GFP. Количество неокрашенных GFP клеток колебалось от 19 до 46% при разных условиях трансфекции (рис. 10). Лучшая эффективность наблюдалась при ко-трансфекции плазмидами pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 и pOG44 в соотношении 9/1 по их молекулярным массам (таблица 3).

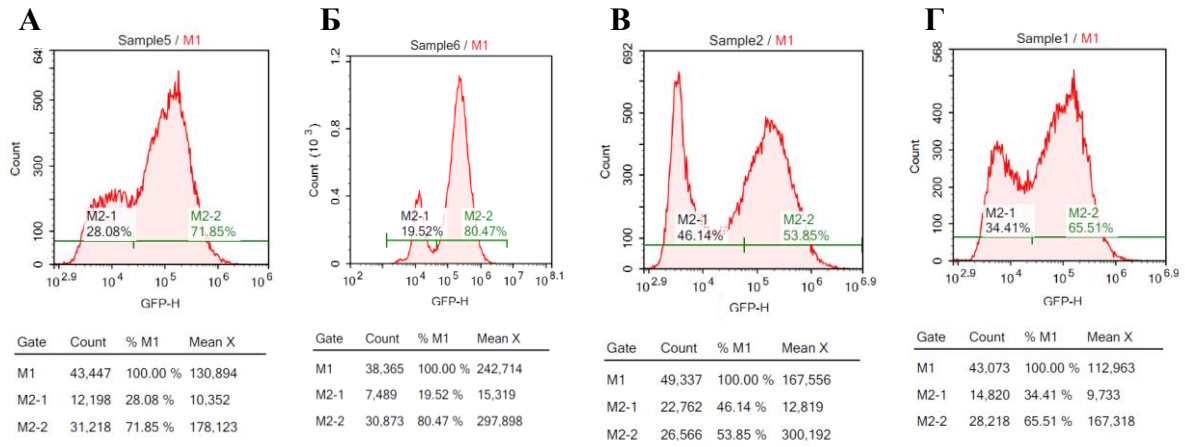


Рисунок 10 – Анализ изменения флуоресценции клеток CHO-S/FRT по уровню GFP, выполненный методом проточной цитофлуориметрии, клетки были трансфицированны плазмидами pOG44 и pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 в разных соотношениях по массам плазмид: А – 19/1; Б – 14/1; В – 9/1; Г – 4/1

Таблица 3. Эффективность ко-трансфекции клеток CHO-S/FRT плазмидами pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 и pOG44 при разном соотношении.

	Соотношение плазмид pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 и pOG44			
	19/1	14/1	9/1	4/1
Количество клеток, не экспрессирующих GFP	28,08 %	19,52 %	46,14 %	34,41 %

Поскольку FRT-сайт во вспомогательной плазмиде pFRT/GFP-Zeo, использовавшейся для создания штамма клеток CHO-S/FRT, расположен между стартовый кодоном ATG и слитым белком GFP-Zeo, встраивание плазмиды, содержащей FRT сайт в геном, активировало ген устойчивости к гигромицину, и инактивировало слитый белок GFP-Zeo. Таким образом, стабильные клеточные линии, в которых произошла гомологичная рекомбинация по FRT-сайту, могли быть отобраны по устойчивости к гигромицину и чувствительности к зеоцину, а также по отсутствию экспрессии белка GFP. Пулы клеток с наименьшим числом клеток, экспрессирующих белок GFP, были выбраны для дальнейших экспериментов.

После оценки эффективности трансфекции и гомологичной рекомбинации, полученные пулы клеток в концентрации $0,5\times10^6$ клеток/мл засевали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 80 мкг/мл селективного антибиотика гигромицина B и 6 мМ глутамина. Селективную среду меняли каждые 3 дня на новую, при достижении плотности клеток 2×10^6 клеток/мл их разводили в 5 раз, пока доля живых клеток не достигла 90%.

С использованием метода предельных разведений были получены отдельные клоны. Интенсивность флуоресценции GFP отдельных клеточных колоний оценивали при достижении ими плотности более $0,5\times10^6$ клеток/мл, уровень продукции химерного антитела chFVN145 оценивали в ИФА. Для дальнейшей работы отобрали 10 клонов из каждого пула клеток без экспрессии GFP и с максимальной продуктивностью.

Аликвоту клеток отобранных клонов замораживали, а часть культивировали в течение 21 дня в селективной среде с 100 мкг/мл селективного антибиотика зеоцин. При обнаружении клонов, чувствительных к зеоцину, клетки из соответствующих пробирок размораживали и подвергали амплификации генов.

Для амплификации генов, клоны с интегрированной в геном плазмидой pCDNA5/FRT-DHFR-full_FVN145 высевали в концентрации $0,5\times10^6$ клеток/мл в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 80 мкг/мл селективного антибиотика гигромицин B и метотриксат 400 нМ. Селективную среду меняли каждые 3 дня на новую; при достижении плотности 2×10^6 клеток/мл клетки разводили в 5 раз, пока процент живых клеток не достигал 90%. Отдельные клоны получали методом предельных разведений как описано выше. Было проанализировано около 800

клонов, и в результате были отобраны 4 линии клеток с продуктивностью большей, чем 100 мг/л.

После этого клетки высевали в концентрации $0,5\times10^6$ клеток/мл в селективную среду и в течение 5 дней отбирали аликвоты через равные промежутки времени для оценки удельной продуктивности отобранных клонов. Концентрацию химерного антитела в отобранных аликвотах определяли с помощью ИФА. Удельную продуктивность оценивали по формуле:

$$qP = ((P_{t1}-P_{t0})/(X_1-X_0))\times\mu,$$

где P_1-концентрация антитела chFVN145 в момент времени t1, P_{t0}-концентрация антитела chFVN145 в момент времени t0, X_1-концентрация клеток в момент времени t1, X_0-концентрация клеток в момент времени t0, а $\mu = \ln(X_1/X_0)\times1/(t1-t0)$. Удельная продуктивность указана в таблице 4. Кроме того, отобранные клоны проверяли на стабильность, для этого их культивировали 30 пассажей в среде без метотрексата и гигромицина Б, после чего продуктивность клонов повторно оценивали с помощью ИФА. Все клоны показали высокую стабильность, уровень продукции химерного антитела chFVN145 снижался не более, чем на 10-15 %. Для наработки химерного антитела в последующих экспериментах использовали клон клеток FRT-3E4-9.

Таблица 4. Удельная продуктивность отобранных клонов, продуцирующих химерное антитело chFVN145.

№	Название клона	Удельная продуктивность, пг/кл/день
1	FRT-3E4-4	2,5
2	FRT-3E4-9	4,0
3	FRT-6D1-31	2,1
4	FRT-5H3-104	3,2

3.1.8. Наработка и очистка химерного антитела против вируса клещевого энцефалита

Для наработки химерного антитела клетки FRT-3E4-9 растили в синтетической питательной среде CD FortiCHO, содержащей 6 мМ глутамина и 0,1%

декстран сульфата, который предотвращает образования клеточных сгустков. Клетки культивировали в CO_2-инкубаторе при 37°C, 8% CO_2 и постоянном перемешивании, 150 об/мин. При достижении плотности клеток около 3×10^6 кл/мл измеряли уровень потребления глюкозы с помощью портативного глюкометра One Touch Select Plus Flex (LifeScan Inc. США). Если концентрация глюкозы падала ниже 22,2 мМ, ее доводили до 4 гр/л. В течение всего культивирования ежедневно отбирали аликвоты клеточной суспензии для определения уровня потребления глюкозы и продуктивности клеток. Для увеличения продолжительности культивирования при достижении плотности клеток 6×10^6 кл/мл использовали питательную добавку CD Efficient Feed C (Thermofischer Scientific, США) в 3 концентрациях 1%, 2% и 3%, которую добавляли ежедневно в течение всего времени культивирования. Если клетки потребляли более 0,5 гр/л глюкозы в сутки, температуру снижали до 32°C и увеличивали перемешивание до 180 об/мин. Результаты сравнения культивирования клона FRT-3E4-9 с использованием разных режимов введения питательной добавки представлены на рисунке 11. Культивирование останавливали при падении жизнеспособности до 85%, через 10-14 суток.

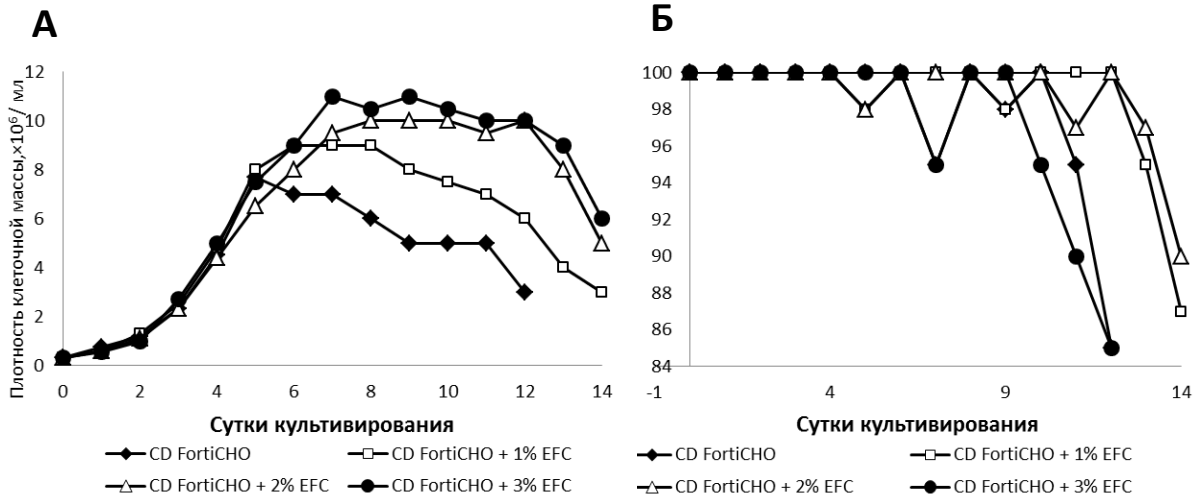


Рисунок 11 – Параметры культивирования клона FRT-3E4-9 при разных режимах введения питательной добавки EFC (Efficient feed C) (А) – график плотности клеток при культивировании; (Б) - график жизнеспособности клеток при культивировании

Таким образом, были оптимизированы условия культивирования клона клеток FRT-3E4-9. По результатам ИФА максимальная продуктивность созданного штамма CHO-S/ FRT-3E4-9 составила 320 мг антитела с 1 л питательной среды при ежедневной добавлении питательной добавки 2% Efficient Feed C.

3.2. Оценка иммунохимических свойств антитела chFVN145 против ВКЭ

3.2.1. Подготовка очищенного препарата антитела chFVN145; вестерн-блот анализ

Одно из главных требований при создании штамма-продуцента – это сохранение иммунохимических свойств целевого белка. Для противовирусных антител важно сохранить аффинность и наличие вируснейтрализующих свойств. Для оценки иммунохимических свойств антитела chFVN145 получали препарат очищенного из культуральной среды, содержащие антитело, проводя очистку от сопутствующих белков на сорбенте с ковалентно иммобилизованным белком А (protein A sepharose CL-4B, GE healthcare, США).

Электрофоретический анализ препарата очищенного антитела chFVN145, обработанного дитиотреитолом, выявил высокую степень чистоты (~95%) и гомогенности препарата, а анализ антитела с неповреждёнными дисульфидными связями подтвердил, что легкие и тяжёлые цепи должным образом объединены в молекулу иммуноглобулина, а отдельные цепи отсутствуют, следовательно после очистки не произошел гидролиз молекулы антитела на Fab и Fc - фрагменты (рис. 12).

Кроме того, методом вестерн-блот анализа подтверждали принадлежность константных доменов очищенного антитела chFVN145 к константным доменам иммуноглобулина человека. Результаты показали, что мкАТ против Fc-фрагмента IgG человека выявляли тяжелую цепь chFVN145, а поликлональные антитела козы против цельной молекулы IgG человека выявляли как тяжелые, так и легкие цепи антитела chFVN145. Полученные результаты подтвердили принадлежность константных доменов очищенного антитела chFVN145 к константным доменам иммуноглобулина человека (рис. 13)

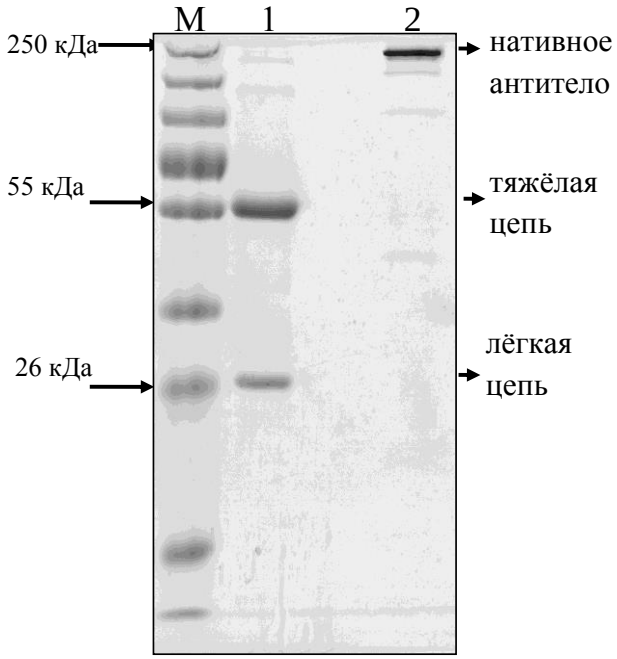


Рисунок 12 – Электрофоретический анализ химерного антитела chFVN145 против ВКЭ в 12,5% ПААГ с додецилсульфатом натрия в денатурирующих (1) и неденатурирующих (2) условиях. М – белковый маркер молекулярных масс

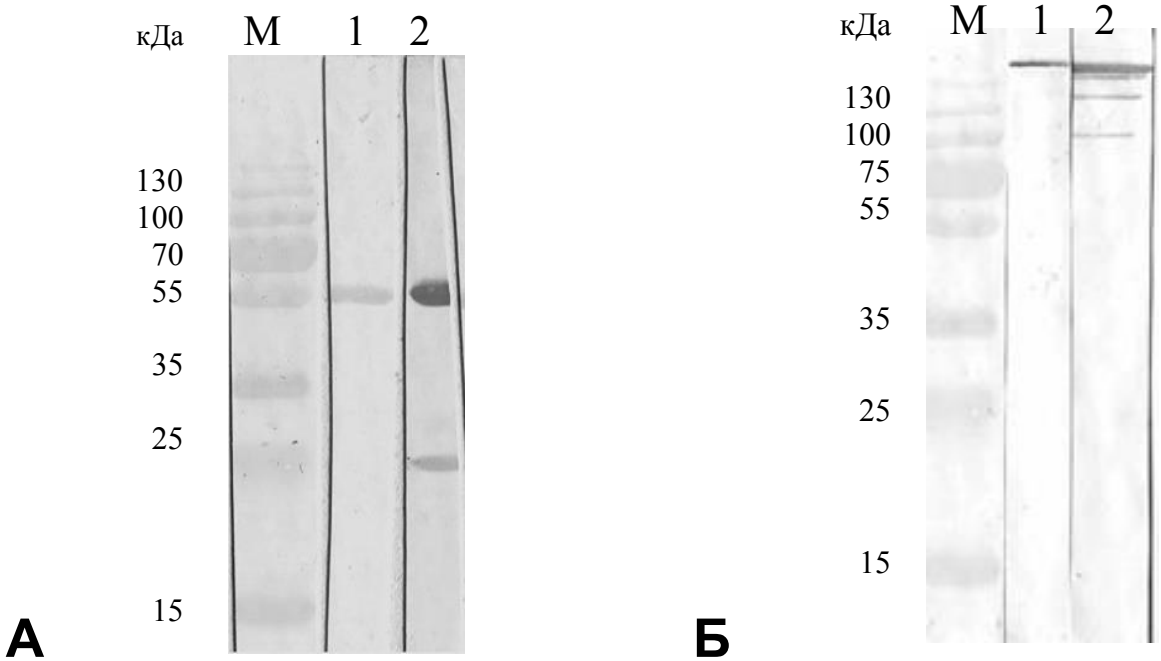


Рисунок 13 – Вестерн-блот анализ образцов химерного антитела chFVN145, проявленных моноклональным антителом против Fc-фрагмента IgG человека (1), поликлональными антителами козы против целой молекулы IgG человека (2). Электрофорез проводили в нередуцирующих (А) и редуцирующих (Б) условиях. М - маркер молекулярных масс.

3.2.2. Изучение аффинности антитела chFVN145

На следующем этапе тестировали способность антитела chFVN145 выявлять гликопротеин Е ВКЭ с помощью твердофазного ИФА (рис. 14). На иммунологическую подложку сорбировали рекомбинантный белок Е (предоставлен Кондратовым И.Г. из ЛИН СО РАН) в концентрации 100 нг и анализировали его связывание с последовательными разведениями антитела chFVN145, начиная с 8,25 нМ (шаг разведения - 2).

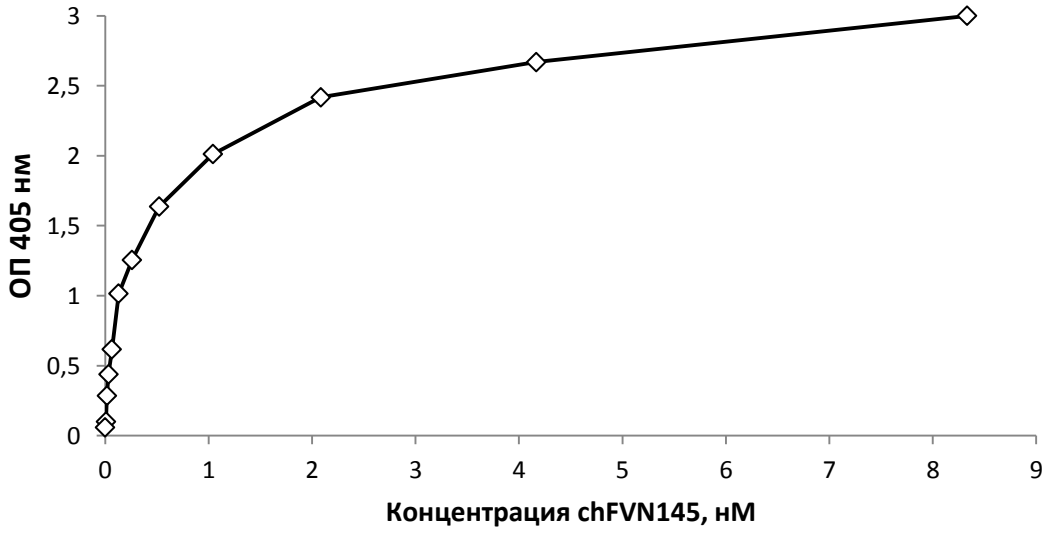


Рисунок 14 – Иммуноферментный анализ взаимодействия антитела chFVN145 с рекомбинантным белком rE

Измерение константы связывания антитела chFVN145 с рекомбинантным белком Е проводили методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Антитело chFVN145 иммобилизовали на поверхность GLC чипа, а рекомбинантный белок Е (предоставлен Кондратовым И.Г.) использовали в качестве аналита. Результаты эксперимента показали (рис 15), что константа диссоциации комплекса «chFVN145-белок Е», рассчитанная как $K_D = k_{off} / k_{on}$, составила $(1,5 \pm 0.2) \times 10^{-9}$ М. Таким образом, антитело chFVN145 продемонстрировало наномолярную аффинность, которая соизмерима со сродством полученного ранее протективного антитела ch14D5a, с тем же антигеном [Байков и соав., 2018].

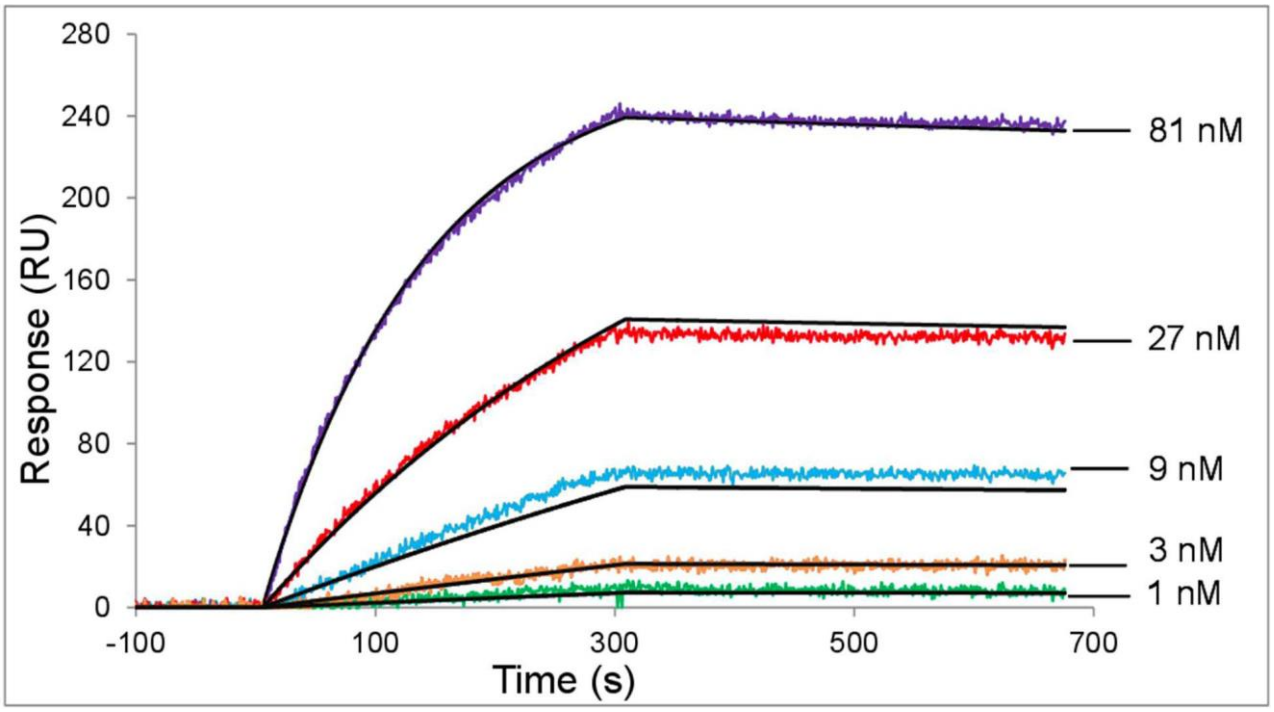


Рисунок 15 – Измерение константы аффинности антитела chFVN145 к рекомбинантному белку rE ВКЭ. Рекомбинантный белок rE иммобилизовали на поверхность GLC чипа. Последовательные трехкратные разведения chFVN145, начиная с 81 нМ, использовали в качестве аналита. Расчетные кривые обозначены черными линиями

3.2.3. Изучение эпитопной специфичности химерного антитела против вируса клещевого энцефалита с использованием рекомбинантных фрагментов белка Е

Эпитопное картирование является важным этапом характеризации антитела. С одной стороны, данные о вируснейтрализующем эпитопе, то есть эпитопе, отвечающем за взаимодействие с вируснейтрализующим антителом или антителами, - это важная информация для изучения молекулярных механизмов патогенеза вируса. С другой стороны, определение такого эпитопа является необходимым этапом при разработке терапевтических препаратов. В данной работе эпитопное картирование антитела chFVN145 проводили двумя независимыми методами – анализом взаимодействия антитела chFVN145 с укороченными рекомбинантными фрагментами белка Е ВКЭ и пептидным картированием с использованием комбинаторных фаговых библиотек случайных пептидов.

Для определения эпитопной специфичности антитела chFVN145 были сконструированы два рекомбинантных белка, содержащих N- и С-концевые части

домена D3, rED3delA* (301 – 359 ако) и rED3delD* (356 – 397 ако). Фрагменты ДНК, кодирующие рекомбинантные фрагменты белка Е rED3delA* (301 – 359 ако) и rED3delD* (356 – 397 ако), получали в ОТ-ПЦР с использованием в качестве матрицы РНК ВКЭ штамм Софьин (GenBank: AEP20480.1) согласно протоколу, описанному в Главе 2. Полученные ПЦР-фрагменты содержали на 5’- и 3’-концах сайты для эндонуклеаз рестрикции *Nco*I и *Not*I, введенные в последовательности соответствующих праймеров. ПЦР-фрагменты обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Nco*I и *Not*I и объединяли в реакции лигирования с ДНК плазмиды pHEN2, обработанной соответствующей теми же рестриктазами. Гены, кодирующие рекомбинантные белки, содержали на N-конце глицин-сериновую последовательность для повышения растворимости, кроме того на С-конце – гексагистидиновую последовательность для очистки белков на Ni-NTA сорбенте.

Полученными результирующими плазмидами pHEN- rED3delA* и pHEN-rED3delD* независимо трансформировали клетки *E .coli* HB2151, находящиеся в стадии экспоненциального роста. Трансформанты высевали на селективную агаризованную среду, и индивидуальные клона анализировали методом ПЦР на наличие фрагментов ДНК, кодирующих соответствующие рекомбинантные белки. Отобранные клоны культивировали, а лизаты клеток анализировали электрофоретически в 12,5% ПААГ с SDS. Результаты электрофоретического разделения клеточных лизатов подтвердили присутствие белковых бэндов с расчетными молекулярными весами. Таким образом, были получены клетки *E. coli*, продуцирующие рекомбинантные белки rED3delA* и rED3delD*.

Лизаты клеток *E. coli*, продуцирующих укороченные рекомбинантные фрагменты белка Е ВКЭ, rED3delA* и rED3delD*, а также рекомбинантные белки rED1+2 и rED3, полученные ранее аналогично и содержащие соответственно аминокислотные последовательности доменов D1 и D2 (1 – 302 ако) и домена D3 (301 – 397 ако), разделяли электрофоретически и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Связывание этих белков с антителом chFVN145 оценивали методом вестерн-блот анализа. В результате было показано, что антитело chFVN145 выявляло рекомбинантный белок rED3 и не взаимодействовало с белком rED1+2 (рис. 16А), следовательно, оно было направлено к домену D3 белка Е ВКЭ. Кроме того антитело chFVN145 образовывало комплекс с рекомбинантным белком rED3delA* (301-359

ако), содержащим N-концевую часть белка Е ВКЭ и не выявляло с белком rED3delD* (356-397), содержащим С-концевую часть домена D3 (рис. 16).

Таким образом, по результатам связывания антитела chFVN145 с рекомбинантными фрагментами белка Е ВКЭ с достаточной надежностью можно сделать заключение о том, что эпитоп, узнаваемый антителом chFVN145, локализуется в N-концевой части домена D3 белка Е ВКЭ, и в связывании с антителом chFVN145 принимают участие ако белка Е ВКЭ, находящиеся между 301 и 359 положением.

3.2.4. Эпитопное картирование хАТ chFVN145 с использованием комбинаторных пептидных библиотек

С целью более точного картирования эпитопа, узнаваемого антителом chFVN145, и подтверждения результатов, полученных традиционным методом, был использован другой способ картирования, основанный на методологии фагового дисплея. Эта методология позволяет в ходе процедуры аффинной селекции отобрать целевые аминокислотные последовательности пептидов и белков из огромных репертуаров однотипных, но различающихся последовательностей. В нашем случае необходимо было из комбинаторных фаговых библиотек случайных пептидов отобрать с помощью аффинной селекции пептиды, специфически связываемые антителом chFVN145, и сравнить их последовательность с последовательностью белка Е ВКЭ.

В работе использовали комбинаторные библиотеки Ph.D.-12 (New England Biolabs, США) и Ph.D.-C7C (New England Biolabs, США). Первая комбинаторная библиотека представляет собой популяцию нитчатых бактериофагов, каждый из которых экспонирует на поверхности пептид из 12 случайных ако в составе минорного фагового белка p3; вторая библиотека - популяцию фагов, содержащих на N-конце белка p3 7-членные случайные пептиды, фланкированные остатками цистеина, что приводит к формированию петли, экспонированной на поверхности бактериофага.

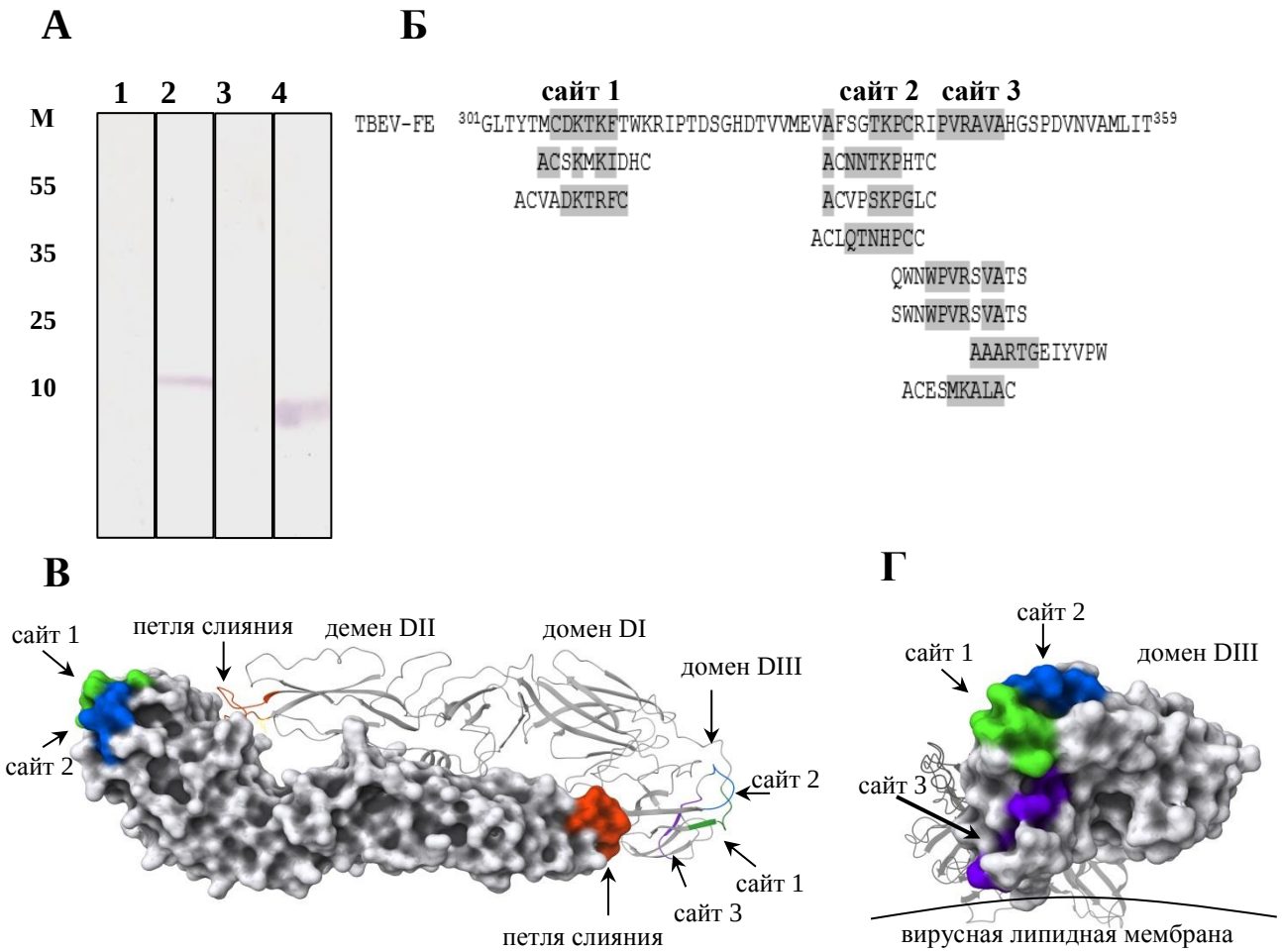


Рисунок 16 – А. Вестерн-блот анализ лизатов клеток *E. coli*, экспрессирующих белки rED1-2 (1), rED3 (2), rED3delD + (3) и rED3delA + (4), фракционированные электрофоретически в 12,5% ПААГ и проявлены антителом chFVN141. Маркер молекулярных масс белков в килодальтонах указан с левой стороны геля. Б. Результаты скрининга фаговой библиотеки пептидов, взаимодействующих с антителом chFVN141. Выравнивание гомологичных фрагментов гликопротеина Е ВКЭ и пептидов, отобранных из библиотеки Ph.D.-12 и библиотеки Ph.D.-C7C. Подобные гликопротеину Е ВКЭ ако отмечены серым цветом. В. Ленточное и поверхностное представление структуры димера гликопротеина Е ВКЭ (PDB 1svb) с указанными предполагаемыми эпитопными сайтами. Вид с внешней поверхности вириона. Г. Ленточное и поверхностное представление предполагаемых эпитопных сайтов, вид со стороны домена D3 гликопротеина Е. Молекулярные координаты для гликопротеина Е ВКЭ (PDB 1svb), используемой в структурном анализе, были получены из банка данных белков, а затем визуализированы с использованием программного обеспечения PyMol (версия 1.7.6.0).

Обе библиотеки независимо обогащали фагами, связываемыми антителом chFVN145, в ходе двух раундов биопэннинга согласно методике, описанной в Главе 2. Соответствующие разведения обогащенных библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C, полученных после второго раунда биопэннинга, использовали для независимой трансфекции клеток *E. coli* ER2738, которые высевали для образования индивидуальных колоний. Фаги, экспонирующие пептиды, которые были отобраны по связыванию с антителом chFVN145, выделяли из индивидуальных колоний, нарабатывали и проверяли специфичность их связывания с антителом chFVN145 методом твердофазного ИФА. Всего таким образом было проанализировано по 285 бактериофагов из каждой библиотеки. Из них 89 фагов из библиотеки Ph.D.-12 и 97 фагов из библиотеки Ph.D.-C7C подтвердили в ИФА способность узнаваться антителом chFVN145.

Для фагов, продемонстрировавших хорошее связывание с антителом chFVN145, секвенировали участок фагового генома, кодирующий экспонированный случайный пептид. Среди выведенных аминокислотных последовательностей только три различных пептида, отобранных из библиотеки Ph.D.-12, имели мотивы, сходные с доменом D3; из пептидов, отобранных из библиотеки Ph.D.-C7C, только шесть имели D3-подобные мотивы (рис. 16). Все эти пептиды локализовались внутри последовательности рекомбинантного белка rED3delA* на участке, находящемся между 307 и 348 ако белка E ВКЭ (рис. 16), что хорошо согласуется с результатами, полученными с помощью рекомбинантных фрагментов белка E ВКЭ.

Согласно полученным результатам, в домене D3 белка E можно выделить три потенциальных сайта, ответственных за взаимодействие с антителом chFVN145: сайт 1 (307-313 ако); сайт 2 (333-338 ако); сайт 3 (341-348 ако). Следует отметить, что согласно классификации вторичных структур белка E, сделанной по результатам рентгеноструктурного анализа белка E ВКЭ [Rey et al., 1995], сайт 1 локализован на петле A, сайт 2 – на петле BC, а сайт 3 – на β-тяже C. При этом, только сайты 1 и 2 находятся на поверхности белка E и доступны для антител; сайт 3 спрятан внутри белка рядом с липидной оболочкой вириона и, вероятно, не доступен для взаимодействия с антителами (рис. 16).

Таким образом, с помощью двух разных методов впервые локализован эпитоп протективного антитела chFVN145; вероятно во взаимодействии с антителом

chFVN145 участвуют ако, локализованные на петлях A и BC, находящихся в N – концевой части домена D3 белка E ВКЭ (307-338 ако). Полученные результаты по эпитопному картированию являются предварительными, поскольку только рентгеноструктурный анализ комплекса «антитело chFVN145 – белок E» смогут окончательно подтвердить локализацию выявляемого этим антителом эпитопа белка E.

3.3. Изучение протективных свойств антитела chFVN145

3.3.1. Исследование способности антитела chFVN145 обеспечивать постконтактную профилактику ВКЭ у зараженных мышей

Протективную активность антитела chFVN145 исследовали в периферической мышиной модели, описанной ранее [Тимофеев и др., 2001]. Для этого шесть групп мышей заражали интраперитонеально (и/п) ВКЭ штамм Абсеттаров в дозе 158,5 $ЛД_{50}$, в 200 мкл. Через 24 часа после заражения мышам из двух групп однократно внутримышечно (в/м) вводили антитело chFVN145 в дозировках 100 мкг/мышь (группа 1) и 10 мкг/мышь (группа 2); еще двум группам мышей вводили в/м коммерческий препарат анти-ВКЭ ИГ (НПО «Микроген») в дозировках 100 мкг/мышь (группа 3) и 10 мкг/мышь (группа 4); пятой группе мышей вводили 100 мкл 0,9% раствора NaCl; мышам из шестой (контрольной) группы не вводили ничего. Результаты эксперимента (рис. 17А) подтвердили наличие протективной активности у антитела chFVN145, которое в дозировке 100 мкг/мышь обеспечило 100% выживаемость экспериментальных животных, а в дозировке 10 мкг/мышь – 50% выживаемость. Эффективность коммерческого противоклещевого сывороточного иммуноглобулина была ниже, и в дозировке 100 мкг/мышь препарат обеспечил выживаемость 37,5% мышей, а в дозировке 10 мкг/мышь он был неэффективен. В контрольной группе и в группе мышей, которым вводили 0,9% раствор NaCl, все животные погибли (рис. 17А).

По аналогичной схеме были проведены эксперименты с мышами, зараженными независимо ВКЭ штамм Софьин и ВКЭ штамм Васильченко в инфицирующих дозах 231 $ЛД_{50}$ и 251 $ЛД_{50}$, соответственно. Результаты эксперимента продемонстрировали наличие у антитела chFVN145 выраженного протективного эффекта (рис. 17Б, 17В); в дозировке 100 мкг/мышь оно обеспечило

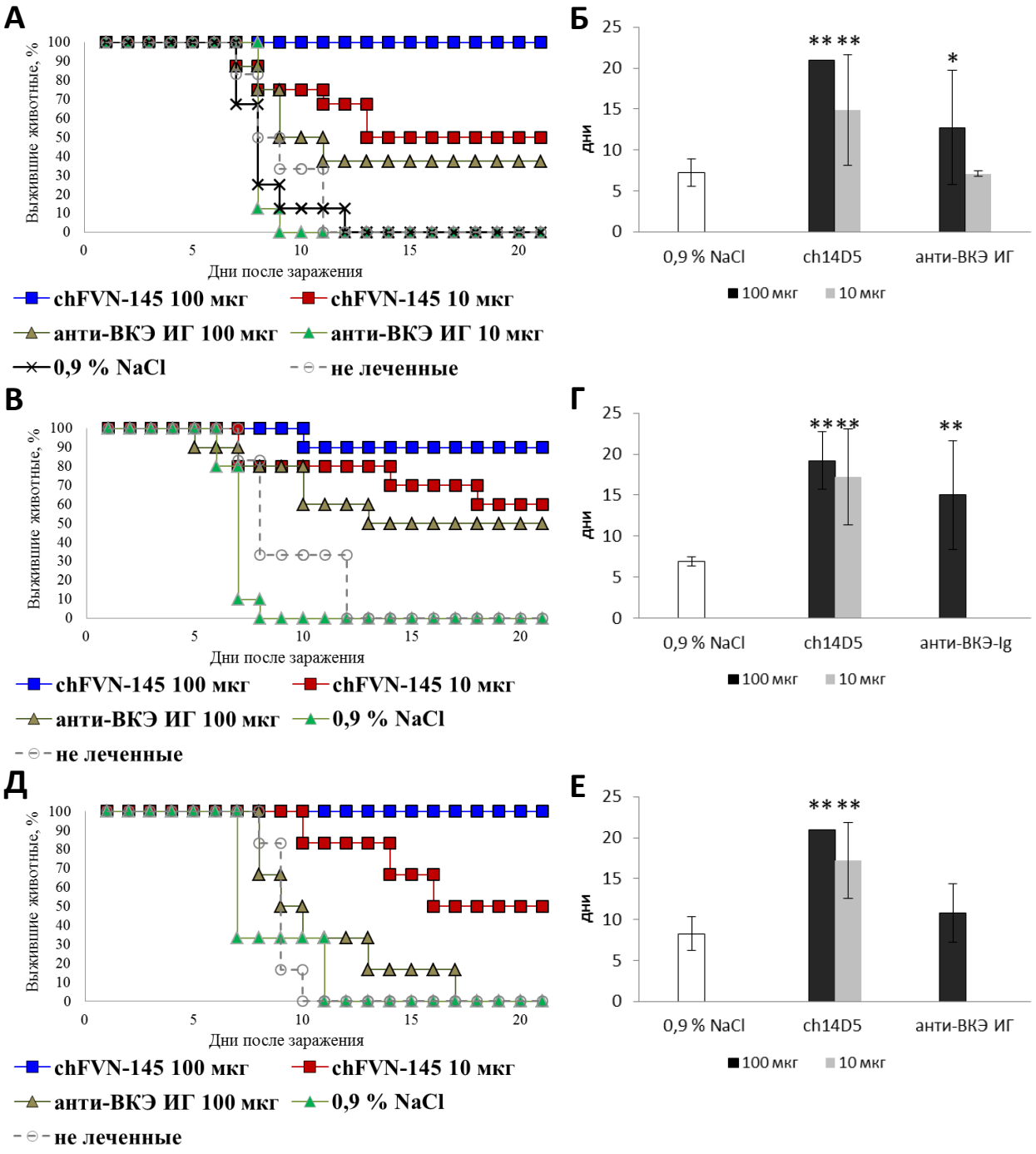


Рисунок 17 - Эффективность антитела chFVN145ch14D5 для экстренной профилактики ВКЭ у мышей, зараженных различными штаммами ВКЭ. Кривые выживаемости мышей, зараженных ВКЭ штамм Абсеттаров (А), штамм Софьин (В) и штамм Васильченко (Д). СПЖ – средняя продолжительность жизни в группах мышей, которым вводили 100 мкг/мышь антитело chFVN145 или анти-ВКЭ ИГ (черные столбики), 10 мкг/мышь chFVN145 (серые столбики) и 0,9% NaCl (бесцветные столбики), зараженных ВКЭ штамм Абсеттаров (Б), штамм Софьин (Г) и штамм Васильченко (Е), * $\rho < 0.05$; ** $\rho < 0.005$ (log-rank test).

защиту 90% и 100% мышей, инфицированных ВКЭ Софьин, и ВКЭ Васильченко, соответственно. Как и в случае заражения мышей ВКЭ Абсеттаров, введение антитела chFVN145 в низкой дозировке (10 мкг/мышь) обеспечило выживаемость 60% и 50% мышей, инфицированных соответственно ВКЭ Софьин и ВКЭ Васильченко. Коммерческий препарат сывороточного иммуноглобулина и в этих экспериментах продемонстрировал более низкие защитные свойства, чем антитело chFVN145. При введении коммерческого препарата в дозировке 100 мкг/мышь выжило 50% мышей, зараженных ВКЭ Софьин, и не выжила ни одна мышь, инфицированная ВКЭ Васильченко (рис. 17). СПЖ животных из групп 1, 2 и 3 статистически значимо превышала таковую для контрольной группы (рис. 17).

Поскольку ВКЭ Софьин, ВКЭ Васильченко и ВКЭ Абсеттаров являются прототипными штаммами основных субтипов ВКЭ – Дальневосточного, Сибирского и Европейского, можно с достаточно степенью надежности предположить, что антитело chFVN145 обладает способностью защищать мышей от введения летальных доз изолятов ВКЭ, принадлежащих к различным субтипам, при этом защитные свойства антитела chFVN145 практически не зависят от субтипа ВКЭ, использовавшегося для заражения.

3.3.2. Исследование терапевтической эффективности антитела chFVN145 на мышиной модели

На следующем этапе была протестирована способность антитела chFVN145 защищать мышей, зараженных летальными дозами ВКЭ разных субтипов, при однократном введении этого антитела через одни, двое или трое суток (+1, +2, и +3). Общая схема эксперимента соответствовала предыдущим экспериментам.

Восемь групп мышей заражали и/п ВКЭ Абсеттаров (рис. 18А) и через одни, двое или трое суток мышам в/м вводили 100 мкг/мышь или 10 мкг/мышь антитела chFVN145. Контрольным группам в эти же дни вводили 0,9% раствор NaCl или не вводили ничего. Из полученных результатов видно, что введение антитела chFVN145 в дозировке 100 мкг/мышь показало хороший терапевтический эффект: при введении этой дозировки через одни, двое или трое суток после заражения выжило 100%, 85,5% и 37,5% мышей, соответственно (рис. 18А). Даже введение низкой дозировки антитела chFVN145 увеличило СПЖ мышей - 20 ± 2.8, 13.5 ± 6.3 и

10.9 ± 6.3 дней при введении через одни, двое или трое суток после заражения, соответственно. Следует отметить, что статистически достоверным увеличение СПЖ при введении антитела chFVN145 в дозировке 10 мкг/мышь по сравнению с СПЖ в контрольных группах (10.2 ± 3.9, NaCl и 9.8 ± 4.5 без лечения) было только в случае введения антитела через сутки после заражения.

Затем аналогичный эксперимент был поставлен на мышах, зараженных ВКЭ Софьин, 501 $ЛД_{50}$. Хороший терапевтический эффект был отмечен при введении обеих доз антитела chFVN145 через одни и двое суток при введении обеих доз - 100 мкг/мышь и 10 мкг/мышь (рис. 18Б). При введении антитела chFVN145 через 3 дня после заражения, незначительное улучшение выживаемости мышей было отмечено только при использовании дозировки антитела только 100 мкг/мышь (рис. 18Б). И наконец, эксперимент по такой же схеме был поставлен на мышах, зараженных ВКЭ Васильченко. В этом эксперименте мышей заражали крайне высокой летальной дозой – 3981 $ЛД_{50}$. Даже в этом случае введение антитела chFVN145 повысило СПЖ в группах леченых животных по сравнению с контрольными мышами (рис. 18В). Ожидаемо, СПЖ в группах мышей, получивших chFVN145 в высокой дозе, 100 мкг/мышь, увеличилась больше, чем СПЖ в группах мышей, получивших 10 мкг/мышь антитела.

Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что даже однократное введение антитела chFVN145 увеличивало продолжительность жизни зараженных мышей. Терапевтическая эффективность антитела chFVN145 зависела от дозы ВКЭ, использованного для заражения животных.

3.3.3. Подтверждение отсутствия опосредованного антителом chFVN145 усиления инфекции in vivo

При разработке иммунологических препаратов против флавивирусов необходимо тщательно исследовать возможность антитело-зависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE). Такое усиление инфекции было обнаружено в экспериментах *in vitro* на клетках, инфицированных вирусом Денге, вирусом японского энцефалита, вирусом Западного Нила, вирусом долины Мюррей и ВКЭ [Bröker и Kollaritsch, 2008; Halstead и O'Rourke, 1977; Kreil et al., 1997; Nelson et al., 2008]. Считают, что ADE-эффект возникает при введении суб-нейтрализую-

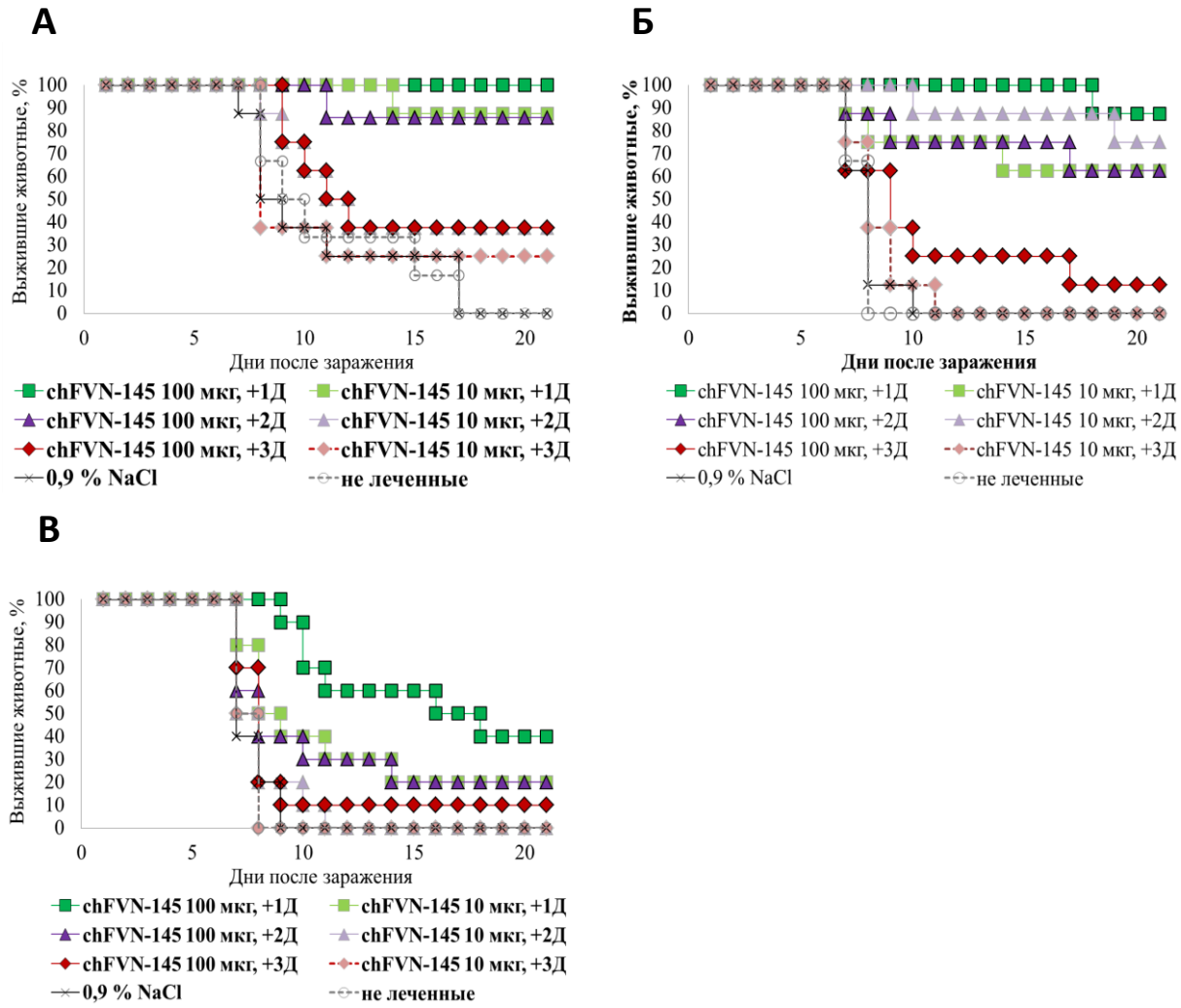


Рисунок 18 – Изучение терапевтических свойств антитела chFVN145. Кривые выживаемости мышей, которым однократно вводили chFVN145 или 0,9% NaCl через один, два или три дня после заражения 159 LD_{50} ВКЭ-Евр (А), 501 LD_{50} ВКЭ-ДВ (Б) и 3981 LD_{50} ВКЭ-Сиб (В).

щих доз вируснейтрализующих антител или наличием в препарате антител, не обладающих вируснейтрализующими или протективными свойствами [Bröker и Kollaritsch, 2008; Huisman et al., 2009].

Следует подчеркнуть, что эффект ADE не был зафиксирован для ВКЭ в экспериментах *in vivo* [Bröker и Kollaritsch, 2008; Kreil et al., 1997]. Однако, именно опасения, связанные с тем, что пассивная иммунизация противоклещевыми иммуноглобулинами может усилить инфекцию, привели к тому, что было приостановлено производство высокоэффективного препарата противоклещевого иммуноглобулина FSME-Bulin. В связи с этим, было проведено исследование возможности появления ADE эффекта при введении антитела chFVN145 в экспериментах *in vivo*.

На первом этапе определяли суб-протективную дозу антитела chFVN145. Мышам, зараженным и/п ВКЭ Абсеттаров в дозе 199,5 LD_{50}, через сутки после заражения вводили антитело chFVN145 в дозировках 40 мкг/мышь (группа 1), 4 мкг/мышь (группа 2) и 0,4 мкг/мышь (группа 3). Контрольным группам мышей вводили 0,9% NaCl или не вводили ничего. Результаты эксперимента показали, что выживаемость мышей увеличилась при введении антитела chFVN145 в дозировках 40 мкг/мышь и 4 мкг/мышь (рис. 19А). При введении 0,4 мкг/мышь антитела 100% мышей в группе 3 погибло, как и в обеих контрольных группах, т.е. дозировка 0,4 мкг/мышь была суб-протективной. Важно, что средний период жизни у мышей, леченных суб-протективной дозой антитела не уменьшился по сравнению с контрольными группами.

Аналогичный эксперимент был повторен с дозой вируса 316 LD_{50}, штамм Абсетарров, и дозировками антитела 50 мкг/мышь, 5 мкг/мышь и 0,5 мкг/мышь (рис. 19 Б). В этом случае 100% мышей в группе погибло при введении 0,5 мкг/мышь антитела chFVN145, а также в обеих контрольных группах (рис. 19Б). Следовательно, дозировка антитела 0,5 мкг/мышь может рассматриваться как суб-протективная. Средняя продолжительность жизни при введении суб-протективной дозы антитела также не уменьшалась по сравнению с не леченными мышами. Следовательно, антитело-зависимого усиления инфекции не наблюдалось..

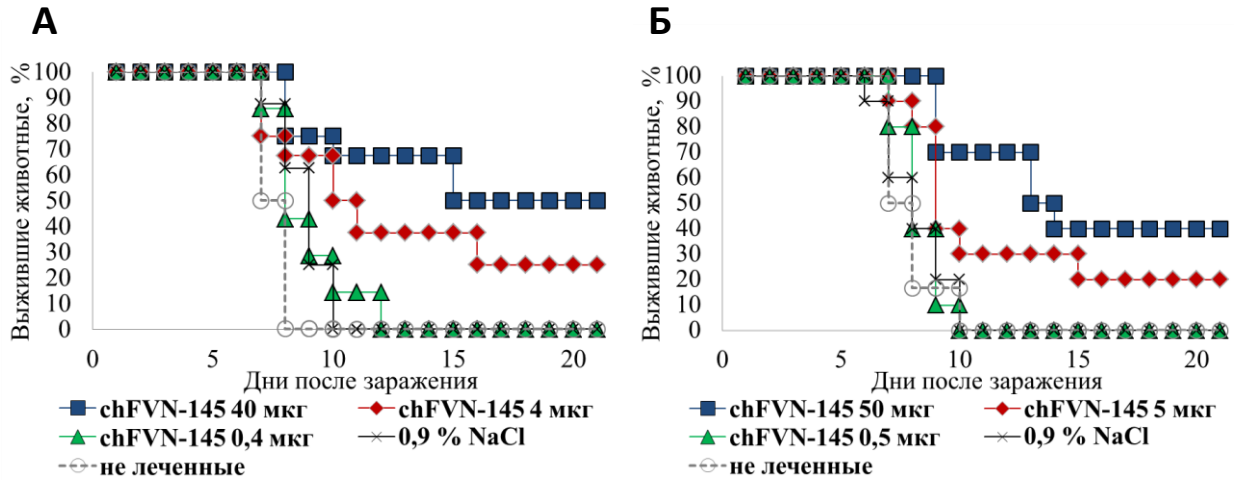


Рисунок 19 - Эффективность антитела chFVN145 для экстренной профилактики ВКЭ у мышей, зараженных ВКЭ. А, Б: Кривые выживаемости мышей, зараженных ВКЭ штамм Абсеттаров 199,5 LD_{50} (А) или 316 LD_{50}; (Б). Использовавшиеся дозировки антитела chFVN145 приведены в легенде

Аналогичные эксперименты были дополнительно повторены при введении антитела chFVN145 через день после заражения различными дозами ВКЭ, а также проведены в нескольких повторах при использовании антитела chFVN145 через 2 и 3 дня после заражения. В каждом случае учитывались величины СПЖ только в тех группах мышей, в которых после введения антитела регистрировалась 100% гибель мышей. Суммированные данные приведены на рисунке 20. Усредненные величины СПЖ сравнивали с усредненными величинами СПЖ в контрольных группах (зараженным мышам вводили 0,9% NaCl или не вводили ничего), в которых летальность всегда достигала 100%. Из представленных результатов видно, что усредненные значения СПЖ мышей, получивших однократно суб-протективную дозу антитела chFVN145 через один, два и три дня после заражения, были выше, чем усредненные значения СПЖ в контрольных группах, хотя превышение было статистически не достоверным. Тем не менее, СПЖ, по крайней мере, не снижалось в группах мышей, которым вводили суб-протективные дозы chFVN145 (рис. 20).

Таким образом, в проведенных экспериментах на мышиной модели не удалось обнаружить антитело-опосредованное усиление КЭ при введении мышам суб-протективных доз антитела chFVN145.

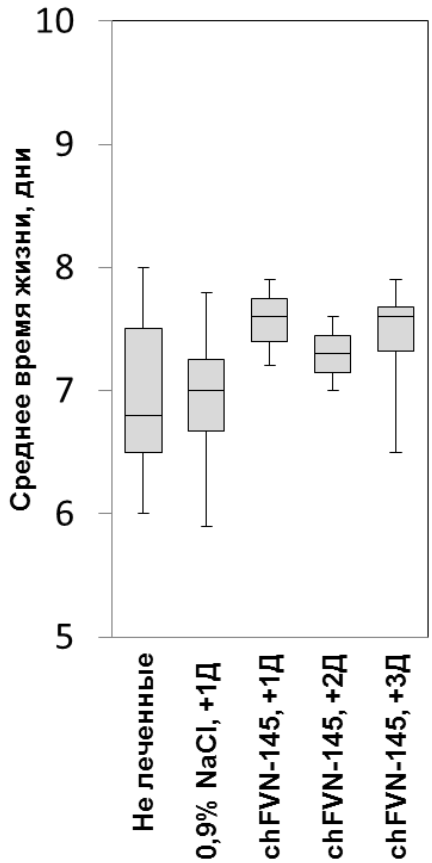


Рисунок 20 - Усредненные величины СПЖ в группах мышей, зараженных ВКЭ, со 100%-ной смертностью. Данные приведены в виде средних значений с разбросом и среднеквадратичными отклонениями.

Недавно был обнаружен новый механизм ADE флавивирусных инфекций, который основан на конформационных изменениях белка Е, вызванных взаимодействиями некоторых антител с этим белком, приводящих к увеличению доступности петли слияния, которая обычно спрятана внутри белка Е [Haslwanter et al., 2017]. Как правило, антитела, вызывающие ADE по такому механизму, взаимодействуют с белком Е в области петли слияния. Очевидно, что подобные антитела не могут рассматриваться в качестве потенциальных терапевтических препаратов. Важно, что по результатам 3D-моделирования эпитоп, узнаваемый антителом chFVN145, находится вдали от петли слияния. Полученные результаты эпитопного картирования, показавшие отсутствие связывания антитела chFVN145 с петлей слияния или в области, прилегающей к ней, подтверждаются отсутствием антитело-зависимого усиления инфекции при введении антитела chFVN145 в проведенных нами экспериментах *in vivo*.

Следует также отметить, что в появившемся недавно сравнительном исследовании специфичности сывороточных антител у людей, вакцинированных против ВКЭ и переболевших ВКЭ, показано, что в сыворотках таких людей доминируют антитела против фрагмента белка Е ВКЭ, содержащего D1+D2, в то время как известные к настоящему времени мкАТ мыши, способные эффективно нейтрализовать инфекционность этого флавивируса, направлены к домену D3 [Jarmer et al., 2014]. Кроме того, показано, что, по крайней мере, в одной сыворотке из 30 присутствовали антитела, потенциально способные вызвать усиление инфекции при заражении ВКЭ [Haslwanter et al., 2017]. Эти результаты нуждаются в тщательной проверке, однако они укрепили убежденность европейских вирусологов в правильности отказа от противоклещевого препарата на основе сывороточных иммуноглобулинов, поскольку присущая этому препарату гетерогенность антител не позволяет однозначно исключить наличие «нежелательных» антител, направленных к петле слияния [Jarmer et al., 2014].

Заключение

Таким образом, в ходе проделанной работы разработана оригинальная экспрессионная система (включающая линию суспензионных эукариотических клеток, имеющих в активном районе хроматина FRT-сайт для гомологичной рекомбинации, и кассетную плазмиду с FRT-сайтом) для удобного и эффективного создания штаммов-продуцентов полноразмерных антител. С использованием этой системы был сконструирован штамм, стабильно продуцирующий химерное антитело chFVN145 против вируса клещевого энцефалита с уровнем продукции более 0,3 граммов с литра культуральной среды. Показано, что антитело chFVN145 обладает наномолярной аффинностью, специфически связывая белок Е вируса клещевого энцефалита, а эпитоп, узнаваемый этим антителом, находится на петлях, расположенных в N-концевом регионе домена D3 белка Е этого вируса.

Исследование противовирусной активности антитела chFVN145, показало, что это антитело способно защищать мышей от введения сотен летальных доз различных субтипов вируса клещевого энцефалита, встречающихся на территории Российской Федерации – Дальневосточного, Сибирского и Европейского. Важно, что антитело chFVN145 продемонстрировало протективную активность при схемах экспериментов *in vivo,* имитирующие применение препарата для экстренной профилактики и терапии вирусного клещевого энцефалита. В связи с закономерными опасениями о возможности усиления инфекции при введении в организм специфических иммуноглобулинов, были проведены эксперименты *in vivo,* в которых зараженным мышам вводили суб-протективные дозы антитела chFVN145. Ни в одном эксперименте не удалось обнаружить уменьшение средней продолжительности жизни в группах мышей, получивших суб-протективные дозы антитела chFVN145 по сравнению с контрольными группами зараженных животных, которым антитело chFVN145 не вводилось.

Основываясь на полученных результатах можно сделать заключение о высоком терапевтическом потенциале разработанного антитела chFVN145.

Выводы

1. Создан оригинальный суспензионный штамм CHO-S/FRT, в геноме которого сайты гомологичной рекомбинации введены в транскрипционно активные участки хроматина. На основе штамма CHO-S/FRT и сконструированной кассетной плазмиды, несущей FRT-сайт и участки для удобного встраивания иммуноглобулиновых генов, разработан штамм-продуцент CHO-S/FRT-3E4-9, обеспечивающий стабильную продукцию химерного антитела chFVN145 против вируса клещевого энцефалита с продуктивностью 320 мг/л.

2. Определено значение константы связывания антитела chFVN145 с рекомбинантным белком E вируса клещевого энцефалита, составившее $K_D = (1,5 \pm 0.2) \times 10^{-9}$ М.

3. С помощью рекомбинантных фрагментов белка E вируса клещевого энцефалита и комбинаторных пептидных библиотек показано, что протективное антитело chFVN145 специфически взаимодействуют с N-концевым регионом домена D3 этого белка, и в связывании участвуют аминокислотные остатки с 307 по 313 и с 333 по 338, находящиеся на петлях в этом регионе.

4. Установлено, что антитело chFVN145 обладает протективными свойствами в отношении штаммов Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса клещевого энцефалита в мышиной модели заболевания; протективная активность продемонстрирована при однократном введении антитела при экстренной профилактике и терапевтическом применении.

5. Показано, что введение мышам суб-протективных доз антитела chFVN145 через 1, 2 и 3 дня после заражения вирусом клещевого энцефалита не уменьшило среднюю продолжительность жизни мышей в сравнении с контрольными животными, которым антитело не вводили.

Список сокращений

ако – аминокислотный остаток

АТ – антитело

ББР – боратный буферный раствора

ВКЭ – вирус клещевого энцефалита

ГАЕ – гемагглютинирующих единиц

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфат натрия

ЕР – эндоплазматический ретикулум

ЕС – Европейский союз

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

КЭ – клещевой вирусный энцефалит

кДа – килодальтон

мкАТ – моноклональное антитело

ОРТ – открытая рамка трансляции

ПААГ – полиакриламидный гель

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РГА – реакция гемагглютинации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

СПЖ – средняя продолжительность жизни

ТБР – трисовый буферный раствор

Трис – трис-(гидроксиметил)аминометан

ФСБР – фосфатно-солевой буферный раствор

хАТ – химерное антитело

ЦНС – центральная нервная система

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ACE – экспрессия искусственных хромосом

ADE – antibody-dependent enhancement антитело-зависимое усиление инфекции

BHK – иммортализованная линия клеток почки детеныша хомячка

CDR – complementary determining region, гипервариабельные регионы

CHO – клетки рака яиника китайского хомячка

DHFR – дигидрофолатредуктаза

DMSO – диметилсульфоксид

dNTP – дезоксинуклеотид-5`-трифосфат

DTT – дитиотреитол

EMA – European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарствам

Epo-Fc – рекомбинантный слитый белок эритропоэтина с Fc-фрагментом IgG человека

FDA – Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FRT – Flippase recognition target, участок распознования флиппазы

GFP – Green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

GS – Glutamine synthetase, глутаминсинтетаза

HAT – гипоксантин-аминоптерин-тимидин

HEK-293 – иммортализованная линия клеток почки эмбриона человека

HKB-11 – гибридная линия клеток, полученная слиянием клеточной линии HEK293S и B-клеток человека

HPRT – гипоксантинфосфорибозилтрансфераза

HT-1080 – линия клеток фибросаркомы человека

Ig – иммуноглобулин

IVIG – внутривенный иммуноглобулин

MOPS – 3-[N-морфолино]пропансульфоновая кислота

MSX – метионинсульфоксимин

MTX – метотрексат

NHEJ – негомологичное соединение концов

NS0 – линия клеток миеломы мыши

PDI – белок дисульфидизомераза

PEG – полиэтиленгликоль

Per.C6 – иммортализованная линия клеток сетчатки глаза человека

pNPP – пара-нитрофенилфосфат

RMCE – технология рекомбиназо-опосредованного обмена генетических кассет

scFv – single-chain variable fragments, однопочечное антитело

STAR – стабилизирующий и антирепрессорный элемент

TEMED – N,N,N`,N`-тетраметилэтилендиамид

tPA – activase тканевый активатор плазминогена человека

UCOE – повсеместно действующие элементы открытого хроматина

UPR – развернутый белковый ответ

VH – вариабельный домен тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина

VL – вариабельный домен легкой цепи молекулы иммуноглобулина

VPA – вальпроевая кислота

ZFN – «цинковые пальцы»

Список литературы

1. Байков, И.К. Конструирование кассетных векторных плазмид для получения полноразмерных рекомбинантных антител / И.К. Байков, Я.А. Хлусевич, А.Л. Матвеев, Н.В. Тикунова // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2013. – Т. 11. – №3. – С. 56-64.
2. Байков, И.К. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита / И.К. Байков, Л.А. Емельянова, Л.М. Соколова, Е.М. Карелина, А.Л. Матвеев, И.В. Бабкин, Я.А. Хлусевич, В.Ф. Подгорный, Н.В. Тикунова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – 22(4). – С.459-467
3. Байков, И.К. Влияние различий в третьем домене гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом / И.К. Байков, А.Л. Матвеев, Л.А. Емельянова, Г.Б. Каверина, С.Е. Ткачев, Н.В. Тикунова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – 23(3). – С.256-261
4. Воробьёва, Н.Н. Применение препарата Реаферон-ЕС-Липинт для экстренной профилактики клещевого энцефалита / Н.Н. Воробьёва, Л.М. Наумова, С.Н. Таргонский, С.В. Усова. // Земский врач. – 2012. – 2. – pp.25-29.
5. Дорошенко, А.С. Мета-анализ данных пострегистрационного мониторинга применения йодантипирина для экстренной профилактики клещевого энцефалита на эндемичных территориях России / А.С. Дорошенко, Е.А. Поморцева, К.В. Морозова, В.А. Фокин // Эпидемиология и гигиена. – 2013. – 1. – стр. 38-39.
6. Красильников, И.В. Вакцина «Энцевир»: разработка и внедрение в практику / И.В. Красильников, И.А. Мищенко, О.И. Шарова, Г.П. Билалова, Н.Х. Ставицкая, М.С. Воробьева и др. // БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2004. – 2(14). – с. 21–4.
7. Лашкевич, В.А. Вопросы вакцинопрофилактики клещевого энцефалита / В.А. Лашкевич, Г.Г. Карганова // Вопросы вирусологии. – 2007. – № 6. – с. 123-125.
8. Лепехин, А.В. Изучение клинической эффективности профилактического применения йодантипирина при клещевом энцефалите / А.В. Лепехин, Е.Н.

Ильинских, Л.В. Лукашова, А.С. Дорошенко, Е.В. Замятина // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – 111. – с 55-58.

9. Лепехин, А.В. Новые подходы к экстренной профилактике и лечению вирусных инфекций на примере клещевого энцефалита и гриппа / А.В. Лепехин, Е.Н. Ильинских, Л.В. Лукашова, Е.В. Замятина, Е.В. Портнягина, Н.С. Бужак, Н.Н. Пучкова // Медицинский Совет. – 2016. – 4. – с. 82-87.
10. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Молекулярное клонирование, 1984. – 477 с.
11. Остерман, Л.А., Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А.Остерман. – М.: Наука, 1981. – 287 с.
12. Пеньевская, Н.А. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор полувекового опыта) / Н.А. Пеньевская, Н.В. Рудаков // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2010. – № 1. – С. 53-59.
13. Погодина, В.В. Хронический клещевой энцефалит / В.В. Погодина, М.П. Фролова, Б.А. Ерман // Новосибирск.: Наука. – 1986. – 78 с.
14. Смородинцев, А.А. Клещевой энцефалит и его вакцинопрофилактика / А.А. Смородинцев, А.В Дубов. – Л.: Медицина. – 1986. –232 с.
15. Тикунова, Н.В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител / Н.В. Тикунова, В.В. Морозова // Acta Naturae. – 2009. – V 1(3). – С. 22-31.
16. Тимофеев, А.В. Протективная активность бактериальной плазмиды, несущей ген неструктурного белка NS1 вируса клещевого энцефалита / Тимофеев, А.В., Кондратьева Ю.Ю., Карганова Г.Г., Стефенсон Дж. // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 1. – с. 22-24.
17. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2017. – 1–220 с.
18. Ahn, W.S. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells / W.S. Ahn, J.J. Jeon,

Y.R. Jeong, S.J. Lee, S.K. Yoon // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 101. – pp. 1234-1244.

19. Allen, M.J. Identification of novel small molecule enhancers of protein production by cultured mammalian cells / M.J. Allen, J.P. Boyce, M.T. Trentalange, D.L. Treiber, B. Rasmussen, B. Tillotson, R. Davis, P. Reddy // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 100. – pp. 1193-1204.
20. Andersen, M.R. Protein glycosylation: analysis, characterization, and engineering / M.R. Andersen, J. Hyun Nam, S.T. Sharfstein, M.C. Flickinger // Encyclopedia of Industrial Biotechnology, John Wiley & Sons, Inc. – 2009.
21. Antoniou, M. Transgenese encompassing dual-promoter CpG islands from the human TBP and H NRPA2B1 loci are resistant to heterochromatin-mediated silencing / M. Antoniou, L Harland, T Mustoe, S Williams, J Holdstock, E Yague, T Mulcahy, M Griffiths, S Edwards, PA Ioannou, A Mountain, R Crombie // Genomics. – 2003. – 82. – pp. 269–279.
22. Arden, N. Cell Engineering blocks stress and improves biotherapeutic production / N. Arden, T. Nivtchanyong, M.J. Betenbaugh // Bioprocessing. – 2004. – 3. – PP. 23–28.
23. Arope, S. Molecular characterization of a human matrix attachment region epigenetic regulator / S. Arope, N. Harraghy, M. Pjanic, N. Mermod // PLoS One. – 2013. – 8. – p. e79262.
24. Arras, C. Do specific hyperimmunoglobulins aggravate clinical course of tickborne encephalitis? / C Arras, R Fescherek, J. Gregersen // Lancet. – 1996. – 347(9011). –P. 1331.
25. Ashwell, G. Carbohydrate-specific receptors of the liver / G. Ashwell, J. Harford // Ann. Rev. Biochem. – 1982. – 51. – PP. 531-554.
26. Bakker, A.B. First administration to humans of a monoclonal antibody cocktail against rabies virus: safety, tolerability, and neutralizing activity / A.B. Bakker, C. Python, C.J. Kissling, P. Pandya, W.E. Marissen, M.F. Brink, F. Lagerwerf, S. Worst, E. van Corven, S. Kostense, et al. // Vaccine. – 2008. – 26. – pp. 5922-5927.
27. Baldi, L. Large-scale transfection of mammalian cells / L. Baldi, D.L. Hacker, C. Meerschman, F.M. Wurm // Methods Mol. Biol. – 2012. – 801. – pp. 13-26.

28. Balland, A. Characterisation of two differently processed forms of human recombinant factor IX synthesised in CHO cells transformed with a polycistronic vector / A. Balland, T Faure, D Carvallo, P Cordier, P Ulrich, B Fournet, H de la Salle, JP Lecocq // Eur. J. Biochem. – 1988. – 172. – 565–572.
29. Bandaranayake, A.D. Recent advances in mammalian protein production / A.D. Bandaranayake, S.C. Almo // FEBS Lett. – 2014. – 588. – pp. 253-260.
30. Barkhash, A.V. A matrix metalloproteinase 9 (MMP9) gene single nucleotide polymorphism is associated with predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced severe central nervous system disease / A.V. Barkhash, A.A. Yurchenko, N.S. Yudin, E.V. Ignatieva, I.V. Kozlova, I.A. Borishchuk, L.L. Pozdnyakova, M.I. Voevoda, A.G. Romaschenko // Ticks Tick Borne Dis. – 2018. – 9 (4). – pp. 763-767.
31. Barkhash, A.V. Association of IL28B and IL10 gene polymorphism with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population / A.V. Barkhash, V.N. Babenko, M.I. Voevoda, A.G. Romaschenko // Ticks Tick Borne Dis. – 2016. – 7 (5). – pp. 808-812.
32. Barkhash, A.V. Association of single nucleotide polymorphism rs3775291 in the coding region of the TLR3 gene with predisposition to tick-borne encephalitis in a Russian population / A.V. Barkhash, M.I. Voevoda, A.G. Romaschenko // Antivir. Res. – 2013. – 99 (2). – pp. 136-138.
33. Barkhash, A.V. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis / A.V. Barkhash, A.A. Perelygin, V.N. Babenko, M.A. Brinton, M.I. Voevoda // Antivir. Res. – 2012. – 93 (1). – pp. 64-68.
34. Barkhash, A.V. Variability in the 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene cluster is associated with human predisposition to tick-borne encephalitis virus-induced disease / A.V. Barkhash, A.A. Perelygin, V.N. Babenko, N.G. Myasnikova, P.I. Pilipenko, A.G. Romaschenko, M.I. Voevoda, M.A. Brinton // J. Infect. Dis. – 2010. – 202 (12). – pp. 1813-1818.
35. Barnes, L.M. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system / L.M. Barnes, C.M. Bentley, A.J. Dickson // Cytotechnology. – 2000. – 32. – pp. 109–123.

36. Barnes, L.M. Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system / L.M. Barnes, C.M. Bentley, A.J. Dickson // Biotechnol. Bioeng. – 2001. – 73. – pp. 261–270.
37. Barnes, L.M. Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant NS0 myeloma cells / L.M. Barnes, C.M. Bentley, A.J. Dickson // Biotechnol. Bioeng. – 2004. – 85. – pp. 115–121.
38. Barrett, P. N. History of TBE vaccines / P.N. Barrett, S. Schober-Bendixen, H.J. Ehrlich // Vaccine 2003 21 Suppl 1: S41-49.
39. Baykov, IK. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus / IK Baykov, AL Matveev, OV Stronin, AB Ryzhikov, LE Matveev, MF Kasakin, VA Richter, NV Tikunova // Vaccine. – 2014. – 2(29). – 3589- 3594.
40. Bebbington, C.R. High level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker / C.R. Bebbington, G Renner, S Thomson, D King, D Abrams, GT Yarranton // Bio/Technology. – 1992. – 10. – pp. 169–175.
41. Becker, E. An XBP-1 dependent bottle-neck in production of IgG subtype antibodies in chemically defined serum-free Chinese hamster ovary (CHO) fed-batch processes / E. Becker, L. Florin, K. Pfizenmaier, H. Kaufmann // J. Biotechnol. – 2008. – 135. – pp. 217-223.
42. Behrens, F. MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial / F. Behrens, P.P. Tak, M. Ostergaard, R. Stoilov, P. Wiland, T.W. Huizinga, V.Y. Berenfus, S. Vladeva, J. Rech, A. Rubbert-Roth, et al. // Ann. Rheum. Dis. – 2015. – 74. – pp. 1058-1064.
43. Ben Turkia, H. Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with Gaucher disease / H. Ben Turkia, D.E. Gonzalez, N.W. Barton, A. Zimran, M. Kabra, E.A. Lukina, P. Giraldo, I. Kisinovsky, A. Bavdekar, M.F. Ben Dridi, et al. // Am. J. Hematol. – 2013. – 88. – pp. 179-184.
44. Benton, T. The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein / T.

Benton, T. Chen, M. McEntee, B. Fox, D. King, R. Crombie, T.C. Thomas, C. // Cytotechnology. – 2002. – 38. – pp. 43-46.

45. Berkner, K.L. Expression of recombinant vitamin K-dependent proteins in mammalian cells: factors IX and VII / K.L. Berkner // Methods Enzymol. – 1993. – 222. – pp. 450-477.
46. Birnboim и Doly, 1979
47. Bode, J. al. Architecture and utilization of highly expressed genomic sites. in Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. (ed. Makrides, S.C.) / Bode, J. et al.. – 551–571. – 2002.
48. Bödecker, B.G.D. Production of recombinant Factor VIII from perfusion cultures: I. Large Scale Fermentation. in Animal Cell Technology / Bödecker, B.G.D., Newcomb, R., Yuan, P., Braufman, A. Kelsey, W., / Products of Today, Prospects for Tomorrow1994. – 580–590.
49. Boeger, H. Structural basis of eukaryotic gene transcription / H. Boeger, D.A. Bushnell, R. Davis, J. Griesenbeck, Y. Lorch, J.S. Strattan, K.D. Westover, R.D. // FEBS Lett. – 2005. – 579. – pp. 899-903.
50. Boros, P. High dose intravenous immunoglobulin treatment: mechanisms of action / P. Boros, G. Gondolesi, J. Bromberg // Liver Transpl. 2005 Dec;11(12):1469-1480.
51. Bosques, C.J. Chinese hamster ovary cells can produce galactose-alpha-1,3-galactose antigens on proteins / C.J. Bosques, B.E. Collins, J.W. Meador 3rd, H. Sarvaiya, J.L. Murphy, G. Dellorusso, D.A. Bulik, I.H. Hsu, N. Washburn, S.F. Sipsey, et al. // Nat. Biotechnol. – 2010. – 28. – pp. 1153-1156.
52. Bröker, M. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virusendemic area: current positions about post-exposure treatment / M. Bröker, H. Kollaritsch // Vaccine. 2008 Feb 13;26(7):863-868.
53. Bruggemann, M. Part I: Selecting and shaping the antibody molecule, selection strategies III: transgenic mice. In: Dübel S, et al., editors. / Bruggemann M, Smith JA, Osborn MJ, et al. // Handbook of therapeutic antibodies. Weinheim: Wiley-VCH Verlag. – 2007. – pp. 69–93.
54. Brüggemann, M. Human antibody production in transgenic animals / M, Brüggemann MJ Osborn, B Ma, J Hayre, S Avis, B Lundstrom, R Buelow // Arch Immunol Ther Exp (Warsz) . – 2015. – 63(2). – 101-8.

55. Butler, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering / M. Butler and M. Spearman // Curr. Opin. Biotechnol. – 2014. – 30. – pp. 107-112.
56. Cabaniols, J.P. Meganuclease-driven targeted integration in CHO-K1 cells for the fast generation of HTS-compatible cell-based assays / J.P. Cabaniols, C. Ouvry, V. Lamamy, I. Fery, M.L. Craplet, N. Moulharat, S.P. Guenin, S. Bedut, O. Nosjean, G. Ferry, et al. // J. Biomol. Screen. – 2010. – 15. – pp. 956-967.
57. Caini, S. Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011 / S. Caini, K. Szomor, E. Ferenczi, A. Szekelyne Gaspar, A. Csohan, K. Krisztalovics, Z. Molnar, J. Horvath // Euro Surveill. –2012. – 17 (12).
58. Casademunt, E. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics / E. Casademunt, K. Martinelle, M. Jernberg, S. Winge, M. Tiemeyer, L. Biesert, S. Knaub, O. Walter, C. Schroder // Eur. J. Haematol. – 2012. – 89. – pp. 165-176.
59. Chahal, P. Cell transfection M. Butler, C. Webb, A. Moreira, M. Moo-Young, B. Grodzinski, Z.F. Cui, S. Agathos (Eds.) / P. Chahal, Durocher Y., Kamen A. Comprehensive Biotechnology, Elsevier Science & Technology. – 2011.
60. Chapman, A.M. Scratching the Surface: Resurfacing Proteins to Endow New Properties and Function / Chapman, A.M., McNaughton B.R. // Cell Chem Biol. – 2016 – 23(5) – pp. 543-553.
61. Chen, F. The combined effect of sodium butyrate and low culture temperature on the production, sialylation, and biological activity of an antibody produced in CHO cells / F. Chen, T. Kou, L. Fan, Y. Zhou, Z. Ye, L. Zhao, W.-S. Tan // Biotechnol. Bioproc. E. – 2011. – 16. – pp. 1157-1165.
62. Chiang, G.G. Bcl-x(L) mediates increased production of humanized monoclonal antibodies in Chinese hamster ovary cells / G.G. Chiang, W.P. Sisk // Biotechnol. Bioeng. – 2005. – 91. – pp. 779-792.
63. Cho, M.S. Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins / M.S. Cho, H. Yee, C. Brown, B. Mei, C. Mirenda, S. Chan // Biotechnol. Prog. – 2003. – 19. – pp. 229-232.

64. Cho, S.W. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease / S.W. Cho, S. Kim, J.M. Kim, J.S. Kim // Nat. Biotechnol. – 2013. – 31. – pp. 230-232.

65. Chung, C.H. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose / B. Mirakhur, E. Chan, Q.T. Le, J. Berlin, M. Morse, B.A. Murphy, S.M. Satinover, J. Hosen, D. Mauro, et al. // N. Engl. J. Med. – 2008. – 358. – pp. 1109-1117.

66. Combs, R.G. Fed-batch bioreactor performance and cell line stability evaluation of the artificial chromosome expression technology expressing an IgG1 in Chinese hamster ovary cells / R.G. Combs, E. Yu, S. Roe, M.B. Piatchek, H.L. Jones, J. Mott, M.L. Kennard, D.L. Goosney, D. Monteith // Biotechnol. Prog. – 2011. – 27. – pp. 201-208.

67. Cook, G.P. The human immunoglobulin VH repertoire / Cook GP, Tomlinson IM // Immunol Today. – 1995. – 16(5). –:237-42.

68. Cost, G.J. BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells / G.J. Cost, Y. Freyvert, A. Vafiadis, Y. Santiago, J.C. Miller, E. Rebar, T.N. Collingwood, A. Snowden, P.D. Gregory // Biotechnol. Bioeng. – 2010. – 105. – pp. 330-340.

69. Costa, A.R. Evaluation of the OSCAR system for the production of monoclonal antibodies by CHO-K1 cells / A.R. Costa, M.E. Rodrigues, M. Henriques, D. Melton, P. Cunnah, R. Oliveira, J. Azeredo // Int. J. Pharm. – 2012. – 430. – pp. 42-46.

70. Cox, K.M. Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant Lemna minor / K.M. Cox, J.D. Sterling, J.T. Regan, J.R. Gasdaska, K.K. Frantz, C.G. Peele, A. Black, D. Passmore, C. Moldovan-Loomis, M. Srinivasan, et al. // Nat. Biotechnol. – 2006. – 24. – pp. 1591-1597.

71. Cuisset, L., Protein phosphatase is involved in the inhibition of histone diacetylation by sodium butyrate / L. Cuisset, L. Tichonick, M.A. Delpech // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1998. – 246. – pp. 760–764.

72. Dai, X. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China / X. Dai, G. Shang, S. Lu, J. Yang, J. Xu // Emerg. Microb. Infect. – 2018. – 7 (1). – p. 74.

73. Dean, N. Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi / N. Dean // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – 1426. – pp. 309-322.
74. Demasi, M.A. Enhanced proteolytic processing of recombinant human coagulation factor VIII B-Domain variants by recombinant furins / M.A. Demasi, S.M.E. de, C. Bowman-Colin, F.H. Lojudice, A. Muras, M.C. Sogayar // Mol. Biotechnol. – 2016. – 58. – pp. 404-414.
75. Demina, T.V. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes / T.V. Demina, Y.P. Dzhioev, M.M. Verkhozina, I.V. Kozlova, S.E. Tkachev, A. Plyusnin, E.K. Doroshchenko, O.V. Lisak, V.I. Zlobin // J. Med. Virol. – 2010. – 82 (6). – pp. 965-976.
76. Dietmair, S. A multi-omics analysis of recombinant protein production in Hek293 cells / S. Dietmair, M.P. Hodson, L.E. Quek, N.E. Timmins, P. Gray, L.K. Nielsen // PLoS One. – 2012. – 7. – p. e43394.
77. Doyon, Y. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures / Y. Doyon, T.D. Vo, M.C. Mendel, S.G. Greenberg, J. Wang, D.F. Xia, J.C. Miller, F.D. Urnov, P.D. Gregory, M.C. Holmes //Nat. Methods. – 2011. – 8. – pp. 74-79.
78. Dreesen, I.A. Ectopic expression of human mTOR increases viability, robustness, cell size, proliferation, and antibody production of chinese hamster ovary cells / I.A. Dreesen, M. Fussenegger // Biotechnol. Bioeng. – 2011. – 108. – pp. 853-866.
79. Druz, A. Stable inhibition of mmu-miR-466h-5p improves apoptosis resistance and protein production in CHO cells / A. Druz, Y.J. Son, M. Betenbaugh, J. Shiloach // Metab. Eng. – 2013. – 16. – pp. 87-94.
80. Dumont, J. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives / J. Dumont, D. Euwart, B. Mei, S. Estes, R. Kshirsagar // Crit. Rev. Biotechnol. – 2015. – pp. 1-13.
81. Durai, S. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells / S. Durai, M. Mani, K. Kandavelou, J. Wu, M.H. Porteus, S. Chandrasegaran // Nucleic Acids Res. – 2005. – 33. – pp. 5978-5990.

82. Durocher, Y. Expression systems for therapeutic glycoprotein production / Y. Durocher, M. Butler // Curr. Opin. Biotechnol. – 2009. – 20. – pp. 700-707.
83. Ecker, M. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz // J. Gen. Virol. – 1999. – 80 (Pt 1). – pp. 179-185.
84. Ecker, M. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia / M. Ecker, S.L. Allison, T. Meixner, F.X. Heinz // J. Gen. Virol. – 1999. – 80 (Pt 1). – pp. 179-185.
85. Elsterova, J. Tick-borne encephalitis vorus neutralization by high dose intravenous immunoglobulin / J Elsterova, M Palus, J Sirmarova, J Kopecky, H Niller, D. Ruzek // Ticks Tick Borne Dis. – 2017. – 8(2) . – P. 253- 258.
86. Erber, W. Epidemiology by country G. Dobler, W. Erber, H.-J. Schmitt (Eds.) / Erber W., H.-J. Schmitt, T. Vuković Janković Tick-borne Encephalitis (TBE). – vol. 114, – 2018. – p. 274.
87. Estes, S. Mammalian cell line developments in speed and efficiency / S. Estes, M. Melville // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2014. – 139. – pp. 11-33.
88. Fan, L. The use of glutamine synthetase as a selection marker: recent advances in Chinese hamster ovary cell line generation processes / L. Fan, C.C. Frye, A.J. Racher // Pharmaceutical Bioprocessing. – 2013. – 1. – pp. 487-502.
89. FDA Biological License Application Approvals (2016)
90. Fernandez, L.A. Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin mu enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy / L.A. Fernandez, M. Winkler, R. Grosschell // Mol. Cell. Biol. – 2001. – 21. – pp. 196–208.
91. Finn, G.K. Homologous plasmid recombination is elevated in immortally transformed cells / G.K. Finn, B.W. Kurz, R.Z. Cheng, R.J. Shmookler // Mol. Cell. Biol. – 1989. – 9. – pp. 4009–4017.
92. Fischer, B.E. Structural analysis of recombinant von Willebrand factor produced at industrial scale fermentation of transformed CHO cells co-expressing recombinant furin / B.E. Fischer, U. Schlokat, A. Mitterer, M. Reiter, W. Mundt, P.L. Turecek, H.P. Schwarz, F. Dorner // FEBS Lett. – 1995. – 375. – pp. 259-262.

93. Florin, L. Heterologous expression of the lipid transfer protein CERT increases therapeutic protein productivity of mammalian cells / L. Florin, A. Pegel, E. Becker, A. Hausser, M.A. Olayioye, H. Kaufmann // J. Biotechnol. – 2009. – 141. – pp. 84-90.
94. Fox, S.R. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling / S.R. Fox, U.A. Patel, M.G. Yap, D.I. Wang // Biotechnol. Bioeng. – 2004. – 85. – pp. 177-184.
95. Frippiat, J.P. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2 / JP Frippiat, SC Williams, IM Tomlinson, GP Cook, D Cherif, D Le Paslier, JE Collins, I Dunham, G Winter, MP Lefranc // Hum Mol Genet. – 1995. – 4(6). – 983-91.
96. Füzik, T. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody / T. Füzik, P. Formanová, D. Růžek, K. Yoshii, M. Niedrig, P. Plevka // Nat. Commun. – 2018. – 9 (1) . – p. 436.
97. Gaj, T. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering / T. Gaj, C.A. Gersbach, C.F. Barbas 3rd // Trends Biotechnol. – 2013. – 31. – pp. 397-405.
98. Galbete, J.L. MAR elements regulate the probability of epigenetic switching between active and inactive gene expression / J.L. Galbete, M. Buceta, N. Mermod // Mol. Biosyst. – 2009. – 5. – pp. 143-150.
99. Galili, U. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity / U. Galili, E.A. Rachmilewitz, A. Peleg, I. Flechner // J. Exp. Med. – 1984. – 160. – pp. 1519-1531.
100. Gandor, C. Amplification and expression of recombinant genes in serum-independent Chinese hamster ovary cells / C. Gandor, C. Leist, A. Fiechter, F.A. Asselbergs // FEBS Lett. – 1995. – 377. – pp. 290–294.
101. Geisse, S. Reflections on more than 10 years of TGE approaches / S. Geisse // Protein Expr. Purif. –2009. – 64. – pp. 99-107.
102. Gelpi, E. Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue / E. Gelpi, M. Preusser, U. Laggner, F. Garzuly, H. Holzmann, F.X. Heinz, H. Budka // J. Neurovirol. – 2006. – 12 (4). – pp. 322-327.

103. Gelpi, E. Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases / E. Gelpi, M. Preusser, F. Garzuly, H. Holzmann, F.X. Heinz, H. Budka // J. Neuropathol. Exp. Neurol. – 2005. – 64 (6). – pp. 506-512.
104. Gemmill, T.R. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species / T.R. Gemmill, R.B. Trimble // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – 1426. – pp. 227-237.
105. Gerngross, T.U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi / T.U. Gerngross // Nat. Biotechnol. – 2004. – 22. – pp. 1409-1414.
106. Ghaderi, D. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins / D. Ghaderi, R.E. Taylor, V. Padler-Karavani, S. Diaz, A. Varki // Nat. Biotechnol. – 2010. – 28. – PP. 863-867.
107. Ghaderi, D. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence impact, and challenges of non-human sialylation / D. Ghaderi, M. Zhang, N. Hurtado-Ziola, A. Varki // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. – 2012. – 28. – PP. 147-175.
108. Girod, A. Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells / A. Girod, D.Q. Nguyen, D. Calabrese, S. Puttini, M. Grandjean, D. Martinet, A. Regamey, D. Saugy, J.S. Beckmann, P. Bucher, et al. // Nat. Methods. – 2007. – 4. – pp. 747-753.
109. Girod, P.-A. Use of scaffold/matrix-attachment regions for protein production. in Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. (ed. Makrides, S.C.) / Girod, P.-A. и Mermod, N. – 2003. – 359–379.
110. Gorman, C.M. Expression of recombinant plasmids in mammalian cells is enhanced by sodium butyrate / C.M. Gorman, B.H. Howard, R. Reeves // Nucleic Acids Res. – 1983. – 11. – pp. 7631–7648.
111. Graham, F.L. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA / F.L. Graham, A.J. van der Eb // Virology. – 1973. – 52. – 456–467.
112. Graham, F.L. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 / F.L. Graham, J. Smiley, W.C. Russell, R. Nairn // J. Gen. Virol. – 1977. – 36. – pp. 59-74.
113. Grandjean, M. High-level transgene expression by homologous recombination-mediated gene transfer / M. Grandjean, P.A. Girod, D. Calabrese, K. Kostyrko, M.

Wicht, F. Yerly, C. Mazza, J.S. Beckmann, D. Martinet, N. Mermod // Nucleic Acids Res. – 2011. – 39. – p. e104.

114. Graumann, K. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems / K. Graumann, A. Premstaller // Biotechnol. J. – 2006. – 1. – pp. 164-186.
115. Gresíková, M. Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia / M. Gresíková, M. Sekeyová, S. Stúpalová, S. Necas // Intervirology. – 1975. – 5 (1–2). – pp. 57-61.
116. Gritsun, T.S. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis / T.S. Gritsun, T.V. Frolova, A.I. Zhankov, M. Armesto, S.L. Turner, M.P. Frolova, V.V. Pogodina, V.A. Lashkevich, E.A. Gould // J. Virol. – 2003a. – 77 (1). – pp. 25-36.
117. Gritsun, T.S. Tick-borne encephalitis / T.S. Gritsun, V.A. Lashkevich, E.A. Gould // Antivir. Res. – 2003b. – 57 (1–2). – pp. 129-146.
118. Guo, J. Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases / J. Guo, T. Gaj, C.F. Barbas 3rd // J. Mol. Biol. – 2010. – 400. – pp. 96-107.
119. Hale, G. Chapter 7. Isolation and purification of monoclonal antibodies from tissue culture supernatant // Monoclonal antibodies: a practical approach, edited by Philip S. Shepherd, Christopher J. Dean / Oxford University Press. – 2000. – 479 pages.
120. Halstead, SB. Dengue viruses and mononuclear phago-cytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody / SB Halstead, EJ O'Rourke // J Exp Med. – 1977. – 146(1). – 201–17.
121. Harraghy, N. Epigenetic regulatory elements: recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells / N. Harraghy, D. Calabrese, I. Fisch, P.A. Girod, V. LeFourn, A. Regamey, N. Mermod // Biotechnol. J. – 2015. – 10. – pp. 967-978.
122. Harraghy, N. Identification of a potent MAR element from the mouse genome and assessment of its activity in stable and transient transfections / N. Harraghy, A. Regamey, P.A. Girod, N. Mermod // J. Biotechnol. – 2011. – 154. – pp. 11-20.
123. Harraghy, N.Using matrix attachment regions to improve recombinant protein production / N. Harraghy, M. Buceta, A. Regamey, P.A. Girod, N. Mermod // Methods Mol. Biol. – 2012. – 801. – pp. 93-110.

124. Haslwanter, D A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection / D Haslwanter, D Blaas, FX Heinz, K Stiasny // PLoS Pathog. – 2017. – 13(9). – e1006643.
125. Havenga, M.J. Serum-free transient protein production system based on adenoviral vector and PER.C6 technology: high yield and preserved bioactivity / M.J. Havenga, L. Holterman, I. Melis, S. Smits, J. Kaspers, E. Heemskerk, R. van der Vlugt, M. Koldijk, G.J. Schouten, G. Hateboer, et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 100. – pp. 273-283.
126. He, X.Y. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin // X.Y. He, Z. Xu, J. Melrose, A. Mullowney, M. Vasquez, C. Queen, V. Vexler, C. Klingbeil, M.S. Co, E.L. Berg. // The Journal of Immunology. – 1998. – 160. – P. 1029–1035.
127. Hoeksema, F. The use of a stringent selection system allows the identification of DNA elements that augment gene expression / F. Hoeksema, R. van Blokland, M. Siep, K. Hamer, T. Siersma, J. den Blaauwen, J. Verhees, A.P. Otte // Mol. Biotechnol. – 2011. – 48. – pp. 19-29.
128. Holzmann, H. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria / H. Holzmann, S.W. Aberle, K. Stiasny, P. Werner, A. Mischak, B. Zainer, M. Netzer, S. Koppi, E. Bechter, F.X. Heinz // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – 15. – pp. 1671-1673.
129. Hu, Z. Chinese hamster ovary K1 host cell enables stable cell line development for antibody molecules which are difficult to express in DUXB11-derived dihydrofolate reductase deficient host cell / Z. Hu, D. Guo, S.S.M. Yip, D. Zhan, S. Misaghi, J.C. Joly, B.R. Snedecor, A.Y. Shen // Biotechnol. Progr. –2013. – 29. – pp. 980-985.
130. Huang, Y. An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression / Y. Huang, Y. Li, Y.G. Wang, X. Gu, Y. Wang, B.F. Shen // J. Immunol. Methods. – 2007. – 322. – pp. 28-39.
131. Hudopisk, N. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012 / N. Hudopisk, M. Korva, E. Janet, M. Simetinger, M. Grgič-Vitek, J. Gubenšek, V. Natek, A. Kraigher, F. Strle, T. Avšič-Županc // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – 19 (5). – pp. 806-808.

132. Huisman, W. Vaccine-induced enhancement of viral infections / W Huisman, BE Martina, GF Rimmelzwaan, RA Gruters, AD. Osterhaus // Vaccine. 2009 Jan 22;27(4):505-512.
133. Ishaque, A. Over-expression of Hsp70 in BHK-21 cells engineered to produce recombinant factor VIII promotes resistance to apoptosis and enhances secretion / A. Ishaque, J. Thrift, J.E. Murphy, K. Konstantinov // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – 97. – pp. 144-155.
134. Iwakoshi, N.N. Glimcher Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1 / N.N. Iwakoshi, A.H. Lee, P. Vallabhajosyula, K.L. Otipoby, K. Rajewsky, L.H. // Nat. Immunol. – 2003. – 4. – pp. 321-329.
135. Jadhav, V. A screening method to assess biological effects of microRNA overexpression in Chinese hamster ovary cells / V. Jadhav, M. Hackl, J.A. Bort, M. Wieser, E. Harreither, R. Kunert, N. Borth, J. Grillari // Biotechnol. Bioeng. – 2012. – 109. – pp. 1376-1385.
136. Jaluria, P. Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog / P. Jaluria, M. Betenbaugh, K. Konstantopoulos, J. Shiloach // BMC Biotechnol. – 2007. – 7. – p. 71.
137. Jarmer, J.Variation of the Specificity of the Human Antibody Responses after Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Vaccination / J. Jarmer, J. Zlatkovic, G. Tsouchnikas, O. Vratskikh, J. Straußß, J.H. Aberle, V. Chmelik, M. Kundi, K. Stiasny, F.X. Heinz // J. Virol. – 2014 – 88 – pp. 13845 – 13857.
138. Jefferis, R. Glyco-engineering of human IgG-Fc to modulate biologic activities / R. Jefferis // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2016a. – 15. – PP. 1333-1347.
139. Jefferis, R. Posttranslational modifications and the immunogenicity of biotherapeutics / R. Jefferis // J. Immunol. Res. – 2016b. – P. 5358272.
140. Jiang, Z. Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility / Z. Jiang, S.T. Sharfstein // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 100. – pp. 189-194.
141. Jones, D. High level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6 / D. Jones, N Kroos, R Anema, B van Montfort, A Vooys, S van der Kraats, E van der

Helm, S Smits, J Schouten, K Brouwer, F Lagerwerf, P van Berkel, DJ Opstelten, T Logtenberg, A. Bout // Biotechnol. Prog. – 2003. – 19. – pp. 163–168.

142. Kaiser, R. Tick-borne encephalitis: clinical findings and prognosis in adults / R. Kaiser // Wien Med. Wochenschr. – 2012. – 162 (11–12). – pp. 239-243.
143. Kannicht, C. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII / C. Kannicht, M. Ramstrom, G. Kohla, M. Tiemeyer, E. Casademunt, O. Walter, H. Sandberg // Thromb. Res. – 2013. – 131. – pp. 78-88.
144. Karg, S.R. A small-scale method for the preparation of plant N-linked glycans from soluble proteins for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry / S.R. Karg, A.D. Frey, C. Ferrara, D.K. Streich, P. Umana, P.T. Kallio // Plant Physiol. Biochem. – 2009. – 47. – pp. 160-166.
145. Kaufmann, P. Influence of the culprit lesion on clinical symptoms of coronary artery disease, with special emphasis on exercise data / P. Kaufmann, L. Mandinov, J. Frielingsdorf, O.M. Hess // Coron. Artery Dis. – 1998. – 9. – pp. 185-190.
146. Kennard, M.L. Engineered mammalian chromosomes in cellular protein production: future prospects / M.L. Kennard // Methods Mol. Biol. – 2011. – 738. – pp. 217-238.
147. Kennard, M.L. The generation of stable, high MAb expressing CHO cell lines based on the artificial chromosome expression (ACE) technology / M.L. Kennard, D.L. Goosney, D. Monteith, L. Zhang, M. Moffat, D. Fischer, J. Mott // Biotechnol. Bioeng. – 2009. – 104. – pp. 540-553.
148. Khudoley, VN. Antiviral Activity of Jodantipyrin: An Anti-Inflammatory Oral Therapeutic with Interferon-Inducing Properties / VN Khudoley, AS Saratikov, AV Lepekhin, VE Yavorskaya, AN Evstropov, EV Portnyagina, AD Pomogaeva, EI Beloborodova, MA Vnushinkaia, EV Schmidt, NV Krilova, DK Khunafina, MV Mezenzeva, FI Ershov, KK Raevski, EV Vlasova, GA Abdulova, EA. Kropotkina // Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents Med Chem. 2008;7:106−115.
149. Kim, J.Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential / J.Y. Kim, Y.G. Kim, G.M. Lee // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – 93. – pp. 917-930.

150. Kim, N.S. Inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells by constitutively expressing antisense RNA of caspase-3 / N.S. Kim, G.M. Lee // Biotechnol. Bioeng. – 2002. – 78. – pp. 217-228.
151. Kim, N.S. Overexpression of bcl-2 inhibits sodium butyrate-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells resulting in enhanced humanized antibody production / N.S. Kim, G.M. Lee // Biotechnol. Bioeng. – 2000. – 71. – pp. 184-193.
152. Kim, S.J. Cytogenetic analysis of chimeric antibody-producing CHO cells in the course of dihydrofolate reductase-mediated gene amplification and their stability in the absence of selective pressure / S.J. Kim, G.M. Lee // Biotechnol. Bioeng. – 1999. – 64. – pp. 741–749.
153. Kim, Y.G. Effect of Bcl-xL overexpression on apoptosis and autophagy in recombinant Chinese hamster ovary cells under nutrient-deprived condition / Y.G. Kim, J.Y. Kim, C. Mohan, G.M. Lee // Biotechnol. Bioeng. – 2009. – 103. – pp. 757-766.
154. Kim, Y.G. Effect of XIAP overexpression on sodium butyrate-induced apoptosis in recombinant Chinese hamster ovary cells producing erythropoietin / Y.G. Kim, J.Y. Kim, G.M. Lee // J. Biotechnol. – 2009a. – 144. – pp. 299-303.
155. Kito, M. Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins / M. Kito, S. Itami, Y. Fukano, K. Yamana, T. Shibui // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 60. – pp. 442-448.
156. Kleiter, I. Delayed humoral immunity in a patient with severe tickborne encephalitis after complete active vaccination / I Kleiter, W Jilg, U Bogdahn, A Steinbrecher // Infection. – 2007. – 35(1). – 26-29.
157. Kluger, G. Tickborne encephalitis despite specific immunoglobulin prophylaxis / G Kluger, A Schöttler, K Waldvogel, D Nadal, W Hinrichs, GF Wündisch, MC Laub // Lancet. 1995 Dec 2;346(8988):1502.
158. Köhler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / Köhler G Milstein C. // Nature. – 1975. – 256(5517). – pp. 495-497.
159. Kost, T.A. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells / T.A. Kost, J.P. Condreay, D.L. Jarvis // Nat. Biotechnol. – 2005. – 23. – pp. 567-575.

160. Kozlova, I.V. Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia / I.V. Kozlova, T.V. Demina, S.E. Tkachev, E.K. Doroshchenko, O.V. Lisak, M.M. Verkhozina, L.S. Karan, Y.P. Dzhioev, A.I. Paramonov, O.V. Suntsova, Y.S. Savinova, O.O. Chernoivanova, D. Ruzek, N.V. Tikunova, V.I. Zlobin // Acta Biomedica Scientifica. – 2018. – 3 (4). – pp. 53-60.
161. Kreil, TR. Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model / TR Kreil, MM Eibl // J Virol. 1997 Apr;71(4):2921-7.
162. Kriz, B. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008) / B. Kriz, C. Benes, M. Daniel // Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. – 2009. – 58 (2). – pp. 98-103.
163. Ku, S.C. Effects of overexpression of X-box binding protein 1 on recombinant protein production in Chinese hamster ovary and NS0 myeloma cells / S.C. Ku, D.T. Ng, M.G. Yap, S.H. Chao // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 99. – pp. 155-164.
164. Kumar, S.R. Industrial production of clotting factors: challenges of expression, and choice of host cells / S.R. Kumar // Biotechnol. J. – 2015. – 10. – pp. 995-1004.
165. Kurhade, C. Type I Interferon response in olfactory bulb, the site of tick-borne flavivirus accumulation, is primarily regulated by IPS-1 / C. Kurhade, L. Zegenhagen, E. Weber, S. Nair, K. Michaelsen-Preusse, J. Spanier, N.O. Gekara, A. Kröger, A.K. Överby // J. Neuroinflammation. – 2016. – 13. – p. 22.
166. Kuriakose, A. Immunogenicity of biotherapeutics: causes and association with posttranslational modifications / A. Kuriakose, N. Chirmule, P. Nair // J. Immunol. Res. – 2016. – P. 1298473.
167. Kuystermans, D. cMyc increases cell number through uncoupling of cell division from cell size in CHO cells / D. Kuystermans, M. Al-Rubeai // BMC Biotechnol. – 2009. – 9. – p. 76.
168. Kwaks, T.H.J. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells / T.H.J. Kwaks, P Barnett, W Hemrika, T Siersma, RG Sewalt, DP Satijn, JF Brons, R van Blokland, P Kwakman, AL Kruckeberg, A Kelder, AP. Otte // Nat. Biotechnol. – 2003. – 21. – pp. 553–558.

169. Labuda, M. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts / M. Labuda, L.D. Jones, T. Williams, P.A. Nuttall // Med. Vet. Entomol. – 1993. – 7 (2). – pp. 193-196.
170. Labuda, M. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission / M. Labuda, J.M. Austyn, E. Zuffova, O. Kozuch, N. Fuchsberger, J. Lysy, P.A. Nuttall // Virology. – 1996. – 219 (2). – pp. 357-366.
171. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – N 5259. – P. 680–685.
172. Lai, T. Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production / T. Lai, Y. Yang, S.K. Ng // Pharmaceuticals (Basel). – 2013. – 6. – pp. 579-603.
173. Lakkaraju, A.K. SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to match limiting ER-targeting sites / A.K. Lakkaraju, C. Mary, A. Scherrer, A.E. Johnson, K. Strub // Cell. – 2008. – 133. – pp. 440-451.
174. Lalonde, M.-E. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells / M.-E. Lalonde, Y. Durocher // Journal of Biotechnology. – 2017. – 251. – PP. 128-140.
175. Le Fourn, V. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion / V. Le Fourn, P.A. Girod, M. Buceta, A. Regamey, N. Mermod // Metab. Eng. – 2014. – 21. – pp. 91-102.
176. Le Hir, H. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression / H. Le Hir, A. Nott, M.J. Moore // Trends in Biochem. Sci. – 2004. – 215–220.
177. Lee, J.S. Site-specific integration in CHO cells mediated by CRISPR/Cas9 and homology-directed DNA repair pathway / J.S. Lee, T.B. Kallehauge, L.E. Pedersen, H.F. Kildegaard // Sci. Rep. – 2015. – 5. – p. 8572.
178. Lee, Y.Y. Overexpression of heat shock proteins (HSPs) in CHO cells for extended culture viability and improved recombinant protein production / Y.Y. Lee, K.T. Wong, J. Tan, P.C. Toh, Y. Mao, V. Brusic, M.G. Yap // J. Biotechnol. – 2009. – 143. – pp. 34-43.
179. Levanov, LN. L.E. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus. / Matveev, E.P. Goncharova, L.R. Lebedev, A.D. Ryzhikov, T.E. Yun, T.A. Batanova,

A.N. Shvalov, I.K. Baykov, L.N. Shingarova, M.P. Kirpichnikov, N.V. Tikunova // Vaccine. – 2010. – 28(32). – pp. 5265-5271.

180. Li, F. Viral infection of the central nervous system and neuroinflammation precede blood-brain barrier disruption during Japanese encephalitis virus infection / F. Li, Y. Wang, L. Yu, S. Cao, K. Wang, J. Yuan, C. Wang, K. Wang, M. Cui, Z.F. Fu // J. Virol. – 2015. – 89 (10). – pp. 5602-5614.
181. Lindahl Allen, M. Correlation of DNA methylation with histone modifications across the HNRPA2B1-CBX3 ubiquitously-acting chromatin open element (UCOE) / M. Lindahl Allen, M. Antoniou // Epigenetics. – 2007. – 2. – pp. 227-236.
182. Lindenbach B., Murray C., Thiel H.-J., Rice C. Flaviviridae, InFields virology, Sixth Ed. (D.M. Knipe, P.M. Howley Eds.) – LippincottWilliams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2013. – pp. 712–825.
183. Lindenbaum, M. A mammalian artificial chromosome engineering system (ACE System) applicable to biopharmaceutical protein production, transgenesis and gene-based cell therapy / M. Lindenbaum, E. Perkins, E. Csonka, E. Fleming, L. Garcia, A. Greene, L. Gung, G. Hadlaczky, E. Lee, J. Leung, et al. // Nucleic Acids Res. – 2004. – 32. – p. e172.
184. Lipowski, D. A cluster of fatal tick-borne encephalitis virus infection in organ transplant setting / D. Lipowski, M. Szablowska, K. Perlejewski, S. Nakamura, I. Bukowska-Ośko, E. Rzadkiewicz, et al. // J. Infect. Dis. – 2017. – 215. – pp. 896-901.
185. Liu, J. Improved expression of recombinant human factor IX by co-expression of GGCX, VKOR and furin / J. Liu, A. Jonebring, J. Hagstrom, A.C. Nystrom, A. Lovgren // Protein J. – 2014. – 33. – pp. 174-183.
186. Liu, P.Q. Generation of a triple-gene knockout mammalian cell line using engineered zinc-finger nucleases / P.Q. Liu, E.M. Chan, G.J. Cost, L. Zhang, J. Wang, J.C. Miller, D.Y. Guschin, A. Reik, M.C. Holmes, J.E. Mott, et al. // Biotechnol. Bioeng. – 2010. – 106. – pp. 97-105.
187. Llop, E. Structural analysis of the glycosylation of gene-activated erythropoietin (epoetin delta, Dynepo) / E. Llop, R. Gutierrez-Gallego, J. Segura, J. Mallorqui, J.A. Pascual // Anal. Biochem. – 2008. – 383. – pp. 243-254.
188. Loumaye, E. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility / E. Loumaye, M. Dréano, A.

Galazka, C.M. Howles, L. Ham, A. Munafo, A. Eshkol, E.D. Giudice, A. Sirna, F. Antonetti, L. Scaglia, C. Kelton, R.K. Campbell, S.C. Chappel, B. Duthu, S. Cymbalista, P. Lepage // Hum. Reprod. Update. – 1998. – 4. – pp. 862–881.

189. Macher, B.A. The Gal-alpha-1,3-Gal-beta-1,4-GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance / B.A. Macher and U. Galili // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – 1780. – pp. 75-88.
190. Majors, B.S. E2F-1 overexpression increases viable cell density in batch cultures of Chinese hamster ovary cells / B.S. Majors, N. Arden, G.A. Oyler, G.G. Chiang, N.E. Pederson, M.J. Betenbaugh // J. Biotechnol. – 2008. – 138. – pp. 103-106.
191. Majors, B.S. Mcl-1 overexpression leads to higher viabilities and increased production of humanized monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells / B.S. Majors, M.J. Betenbaugh, N.E. Pederson, G.G. Chiang // Biotechnol. Prog. – 2009. – 25. – pp. 1161-1168.
192. Makrides, S.C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells / S.C. Makrides // Protein Expr. Purif. – 1999. – 17. – 183–202.
193. Mandl, C.W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle thataffect neuropathogenesis / C.W Mandl // Virus Res. – 2005. – 111(2). – PP. 161–74.
194. Marissen, W.E. Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis / W.E. Marissen, R.A. Kramer, A. Rice, W.C. Weldon, M. Niezgoda, M. Faber, J.W. Slootstra, R.H. McCue, J. Validation of the manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor IX Fc fusion protein / J. McCue, D. Osborne, J. Dumont, R. Peters, B. Mei, G.F. Pierce, K. Kobayashi, D. Euwart // Haemophilia. – 2014. – 20. – pp. e327-335.
195. Massey-Gendel, E. Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in *E. coli* / E Massey-Gendel, A Zhao, G Boulting, HY Kim, MA Balamotis, LM Seligman, RK Nakamoto, JU Bowie // Protein Sci. – 2009. – 18(2). – 372-83.
196. Matsuda F, Structure and physical map of 64 variable segments in the 3′0.8-megabase region of the human immunoglobulin heavy-chain locus / F Matsuda, EK Shin, H Nagaoka, R Matsumura, M Haino, Y Fukita, S Taka-ishi, T Imai, JH Riley, R Anand // Nat Genet. – 1993. –3. – 88–94.

197. Mazur, X. Higher productivity of growth-arrested Chinese hamster ovary cells expressing the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 / X. Mazur, M. Fussenegger, W.A. Renner, J.E. Bailey // Biotechnol. Prog. – 1998. – 14. – pp. 705–713.
198. McCue, J. Manufacturing process used to produce long-acting recombinant factor VIII Fc fusion protein / J. McCue, R. Kshirsagar, K. Selvitelli, Q. Lu, M. Zhang, B. Mei, R. Peters, G.F. Pierce, J. Dumont, S. Raso, et al. // Biol.: J. Int. Assoc. Biol. Stand. – 2015. – 43. – pp. 213-219.
199. Meents, H. Impact of coexpression and coamplification of sICAM and antiapoptosis determinants bcl-2/bcl-x(L) on productivity, cell survival, and mitochondria number in CHO-DG44 grown in suspension and serum-free media / H. Meents, B. Enenkel, H.M. Eppenberger, R.G. Werner, M. Fussenegger // Biotechnol. Bioeng. – 2002. – 80. – pp. 706-716.
200. Meloen, M. Clijsters-van der Horst, T.J. Visser, et al. // J. Virol. – 2005. – 79. – pp. 4672-4678.
201. Melton, D.W. A one-step gene amplification system for use in cultured mammalian cells and transgenic animals / D.W. Melton, A.M. Ketchen, A.J. Kind, C. McEwan, D. Paisley, J. Selfridge // Transgenic Res. – 2001. – 10. – pp. 133-142.
202. Mickienė, A. Polymorphisms in chemokine receptor 5 and Toll-like receptor 3 genes are risk factors for clinical tick-borne encephalitis in the Lithuanian population / A. Mickienė, J. Pakalnienė, J. Nordgren, B. Carlsson, M. Hagbom, L. Svensson, L. Lindquist // PLoS One. – 2014. – 9.
203. Mickienė, A. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis / A. Mickienė, A. Laiškonis, G. Günther, S. Vene, Å. Lundkvist, L. Lindquist // Clin. Infect. Dis. – 2002. – 35 (6). – pp. 650-658.
204. Miller, J.C. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing / J.C. Miller, M.C. Holmes, J. Wang, D.Y. Guschin, Y.L. Lee, I. Rupniewski, C.M. Beausejour, A.J. Waite, N.S. Wang, K.A. Kim, et al. // Nat. Biotechnol. – 2007 25. – pp. 778-785.
205. Mohan, C. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells / C. Mohan, Y.G. Kim, J. Koo, G.M. Lee // Biotechnol. J. – 2008. –3. – pp. 624-630.

206. Mohan, C. Effect of doxycycline-regulated protein disulfide isomerase expression on the specific productivity of recombinant CHO cells: thrombopoietin and antibody / C. Mohan, S.H. Park, J.Y. Chung, G.M. Lee // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – 98. – pp. 611-615.
207. Moran, N. Shire's replacement enzymes validate gene activation / N. Moran // Nat. Biotechnol. – 2010. – 28. – pp. 1139-1140.
208. Mutskov, V. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine / V. Mutskov, Felsenfeld G. // EMBO J. – 2004. – 23. – pp. 138–149.
209. Nelson, S. Maturation of West Nilevirus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization / S Nelson, CA Jost, Q Xu, J Ess, JE Martin, T Oliphant, et al. // PLoS athog. – 2008. – 4(5). – e1000060.
210. Ni, M. ER chaperones in mammalian development and human diseases / M. Ni, A.S. Lee // FEBS Lett – 2007 – 581(19). – pp.:3641–3651.
211. Nivitchanyong, T. A Thrift Anti-apoptotic genes Aven and E1B-19 K enhance performance of BHK cells engineered to express recombinant factor VIII in batch and low perfusion cell culture / T. Nivitchanyong, A. Martinez, A. Ishaque, J.E. Murphy, K. Konstantinov, M.J. Betenbaugh, J. // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – 98. – pp. 825-841.
212. Noguchi, A. Immunogenicity of N-glycolylneuraminic acid-containing carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells / A. Noguchi, C.J. Mukuria, E. Suzuki, M. Naiki // J. Biochem. – 1995. – 117. – pp. 59-62.
213. Norton, P.A. Methods for DNA introduction into mammalian cells. in Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. Norton, P.A., Pachuk, C.J (ed. Makrides, S.C.) . – 2003. – 265–277.
214. Ohya, T. Improved production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells by ATF4 overexpression / T. Ohya, T. Hayashi, E. Kiyama, H. Nishii, H. Miki, K. Kobayashi, K. Honda, T. Omasa, H. Ohtake // Biotechnol. Bioeng. – 2008. – 100. – pp. 317-324.
215. Omasa, T. Overexpression of GADD34 enhances production of recombinant human antithrombin III in Chinese hamster ovary cells / T. Omasa, T. Takami, T. Ohya, E.

Kiyama, T. Hayashi, H. Nishii, H. Miki, K. Kobayashi, K. Honda, H. Ohtake // J. Biosci. Bioeng. – 2008. – 106. – pp. 568-573.

216. Ouisse, L. Antigen-specific single B cell sorting and expression-cloning from immunoglobulin humanized rats: a rapid and versatile method for the generation of high affinity and discriminative human monoclonal antibodies / L.-H. Ouisse, L. Gautreau-Rolland, M.-C. Devilder, M. Osborn, M. Moyon, J. Visentin, F. Halary, M. Bruggemann, R. Buelow, I. Anegon, X. Saulquin // BMC Biotechnol – 2017 – 17 –7.
217. Ozturk, S.Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies / S. Ozturk, W.S. Hu // CRC Press . – 2005.
218. Chahal, P. Cell transfection M. Butler, C. Webb, A. Moreira, M. Moo-Young, B. Grodzinski, Z.F. Cui, S. Agathos (Eds.) / Comprehensive Biotechnology, Elsevier Science & Technology. - 2011.
219. Padler-Karavani, V. Diversity in specificity, abundance, and composition of anti-Neu5Gc antibodies in normal humans: potential implications for disease / V. Padler-Karavani, H. Yu, H. Cao, H. Chokhawala, F. Karp, N. Varki, X. Chen, A. Varki // Glycobiology. – 2008. – 18. – pp. 818-830.
220. Padler-Karavani, V. Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk / V. Padler-Karavani, A. Varki // Xenotransplantation. –2011. – 18. – pp. 1-5.
221. Pallares, N. The human immunoglobulin heavy variable genes / N Pallares, S Lefebvre, V Contet, F Matsuda, MP Lefranc // Exp Clin Immunogenet. – 1999. – 16. – 36–60.
222. Pallavicini, M.G. Effects of methotrexate on transfected DNA stability in mammalian cells / M.G. Pallavicini, PS DeTeresa, C Rosette, JW Gray, FM. Wurm // Mol. Cell. Biol. – 1990. – 10. – pp. 401–404.
223. Palus, M. Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity / M. Palus, M. Vancova, J. Sirmarova, J. Elsterova, J. Perner, D. Ruzek // Virology. – 2107. – 507. – pp. 110-122.
224. Patnaik, S.K. Lectin-resistant CHO glycosylation mutants / S.K. Patnaik and P. Stanley // Methods Enzymol. – 2006. – 416. – pp. 159-182.

225. Peng, R.W. Differential effect of exocytic SNAREs on the production of recombinant proteins in mammalian cells / R.W. Peng, E. Abellan, M. Fussenegger // Biotechnol. Bioeng. – 2011. – 108. – pp. 611-620.
226. Perucho, M. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells / M. Perucho, D. Hanahan, M. Wigler // Cell. – 1980. – 22. – pp. 309–317.
227. Peters, R.T. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein / R.T. Peters, G. Toby, Q. Lu, T. Liu, J.D. Kulman, S.C. Low, A.J. Bitonti, G.F. Pierce // J. Thrombosis Haemostasis: JTH. – 2013. – 11. – pp. 132-141.
228. Pham, P.L. Large-Scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein / P.L. Pham, A. Kamen, Y. Durocher // Mol. Biotechnol. – 2006. – 34. – pp. 225-237.
229. Picanco-Castro, V. Production of recombinant therapeutic proteins in human cells: current achievements and future perspectives / V. Picanco-Castro, R.T. Biaggio, D.T. Cova, K. Swiech // Protein Pept. Lett. –2013. – 20. – pp. 1373-1381.
230. Pletnev, A.G. Tick-borne encephalitis virus genome. The nucleotide sequence coding for virion structural proteins / A.G. Pletnev, V.F.Yamshchikov, V.M. Blinov // FEBS Lett. – 1986. – 200(2). – pp. 317-321.
231. Porteus, M.H. Gene targeting using zinc finger nucleases / M.H. Porteus, D. Carroll // Nat. Biotechnol. – 2005. – 23. – pp. 967-973.
232. Powell, J.S. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients / J.S. Powell, N.C. Josephson, D. Quon, M.V. Ragni, G. Cheng, E. Li, H. Jiang, L. Li, J.A. Dumont, J. Goyal, et al. // Blood. – 2012. – 119. – pp. 3031-3037.
233. Prokopowicz, D. Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis among residents of north-eastern Poland // D. Prokopowicz, E. Bobrowska, M. Bobrowski, A. Grzeszczuk / Scand. J. Infect. Dis. – 1995. – 27 (1). – pp. 15-16.
234. Rahimpour, A. Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: effects of CERT and XBP1 s genes / A. Rahimpour, B. Vaziri, R. Moazzami, L. Nematollahi, F. Barkhordari, L. Kokabee, A. Adeli, F. Mahboudi // J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – 23. – pp. 1116-1122.

235. Rasheed, S. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080) / S. Rasheed, W.A. Nelson-Rees, E.M. Toth, P. Arnstein, M.B. Gardner // Cancer. – 1974. – 33. – pp. 1027-1033.
236. Reed, LJ. A simple method of estimating fifty percent endpoints / LJ Reed, H Muench // Am J Hyg. – 1938. – 27. – P. 493–497.
237. Rehemtulla, A. In vitro and in vivo functional characterization of bovine vitamin K-dependent gamma-carboxylase expressed in Chinese hamster ovary cells / A. Rehemtulla, D.A. Roth, L.C. Wasley, A. Kuliopulos, C.T. Walsh, B. Furie, B.C. Furie, R.J. Kaufman // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1993. – 90. – pp. 4611-4615.
238. Rey, F.A. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution / F.A. Rey, F.X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, S.C. Harrison // Nature. – 1995. – 375(6529). – pp. 291–298.
239. Rhoades, C. Monocyte-macrophage system as targets for immunomodulation by intravenous immunoglobulin / C Rhoades, M Williams, S Kelsey, A Newland // Blood Rev. – 2000. – 14(1). – 14-30.
240. Richards, E.J. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up of the usual suspects / E.J. Richards, S.C. Elgin // Cell. – 2002. – 108. – pp. 489–500.
241. Rita Costa, A. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production / A. Rita Costa, M. Elisa Rodrigues, M. Henriques, J. Azeredo, R. Oliveira // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2010. – 74. – pp. 127-138.
242. Robinson, D.K. Kinetics of recombinant immunoglobulin production by mammalian cells in continuous culture / D.K. Robinson и K.W. Memmert // Biotechnol. Bioeng. – 1991. – 38. – pp.972–976.
243. Rodriguez, J. Enhanced production of monomeric interferon-beta by CHO cells through the control of culture conditions / J. Rodriguez, M. Spearman, N. Huzel, M. Butler // Biotechnol. Prog. – 2005. – 21. – pp. 22-30.
244. Roe, K. West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases / K. Roe, M. Kumar, S. Lum, B. Orillo, V.R. Nerurkar, S. Verma // J. Gen. Virol. – 2012. – 93 (Pt 6). – pp. 1193-1203.

245. Rosser, M.P. Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system / M.P. Rosser, W. Xia, S. Hartsell, M. McCaman, Y. Zhu, S. Wang, S. Harvey, P. Bringmann, R.R. Cobb // Protein Expr. Purif. – 2005. – 40. – pp. 237-243.
246. Runkel, L. Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta (IFN-beta) / L. Runkel, W. Meier, R.B. Pepinsky, M. Karpusas, A. Whitty, K. Kimball, M. Brickelmaier, C. Muldowney, W. Jones, S.E. Goelz // Pharm. Res. . – 1998. – 15. – PP. 641-649.
247. Ruzek, D. Tick-borne encephalitis S.K. Singh, D. Ruzek (Eds.), Neurovial Infections D. Ruzek, B. Bilski, G. Günther / CRC Press, Boca Raton. – 2013b – pp. 211-237.
248. Ruzek, D. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells / D. Ruzek, J. Salát, S.K. Singh, J. Kopecký // PLoS One. – 2011. – 6 (5). – Article e20472.
249. Ruzek, D. May early intervention with high dose intra-venous immunoglobulin pose a potentially successful treatment for severe cases of tick-borne encephalitis? / D Ruzek, G Dobler, HH Niller // BMC Infect Dis. – 2013a. – 3. – P. 306.
250. Safronov, PF. Nucleotide sequence of genes and complete amino acid sequence of tick-borne encephalitis virus strain 205 / PF Safronov, SV Netesov, TP Mikriukova, VM Blinov, EG Osipova, NN Kiseleva, LS Sandakhchiev // Mol Gen Mikrobiol Virusol. – 1991. – 4. – 23-29.
251. Salabay, NS. Clinical and laboratory parameters when using combined therapy (immunoglobulin and interferon α2v) in patients with feverish and meningeal forms of tick-borne encephalitis / NS Salabay, KI Chuikova, SV Usova, SN Targonsky // Zemsky Vrach. – 2012. – 3. – P. 31-36.
252. Sambrook J., Russell D. W., Molecular cloning - a laboratory manual, 3rd ed /Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. – 2001.
253. Sanjana, N.E. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering / N.E. Sanjana, L. Cong, Y. Zhou, M.M. Cunniff, G. Feng, F. Zhang // Nat. Protoc. – 2012. – 7. – pp. 171-192.
254. Sathyamurthy, M. Characterization and expression of proprotein convertases in CHO cells: efficient proteolytic maturation of human bone morphogenetic protein-7 / M.

Sathyamurthy, C.L. Kim, Y.L. Bang, Y.S. Kim, J.W. Jang, G.M. Lee // Biotechnol. Bioeng. – 2015. – 112. – pp. 560-568.

255. Sautter, K. Selection of high-producing CHO cells using NPT selection marker with reduced enzyme activity / K. Sautter, B. Enenkel // Biotechnol. Bioeng. – 2005. – 89. – pp. 530-538.
256. Seah, Y.F.S. Microfluidic single-cell technology in immunology and antibody screening. / Y.F.S. Seah, H. Hu, C.A. Merten// Mol. Aspects Med. – 2018 – 59 – pp. 47-61.
257. Sellick, C.A. Metabolite profiling of recombinant CHO cells: designing tailored feeding regimes that enhance recombinant antibody production / C.A. Sellick, A.S. Croxford, A.R. Maqsood, G. Stephens, H.V. Westerhoff, R. Goodacre, A.J. Dickson // Biotechnol. Bioeng. – 2011. – 108. – pp. 3025-3031.
258. She, X. Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes / X. She, C.A. Rohl, J.C. Castle, A.V. Kulkarni, J.M. Johnson, R. Chen // BMC Genomics. – 2009. – 10. – p. 269.
259. Silva, G. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy / G. Silva, L. Poirot, R. Galetto, J. Smith, G. Montoya, P. Duchateau, F. Paques // Curr. Gene Ther. – 2011. – 11. – pp. 11-27.
260. Simpson, N.H. In hybridoma cultures, deprivation of any single amino acid leads to apoptotic death, which is suppressed by expression of the bcl-2 gene / N.H. Simpson, R.P. Singh, A. Perani, C. Goldenzon, M. Al-Rubeai// Biotechnol. Bioeng. – 1999. – 59. – pp. 90–98.
261. Smales, C.M. Comparative proteomic analysis of GS-NS0 murine myeloma cell lines with varying recombinant monoclonal antibody production rate / C.M. Smales, D.M. Dinnis, S.H. Stansfield, D. Alete, E.A. Sage, J.R. Birch, A.J. Racher, C.T. Marshall, D.C. James // Biotechnol. Bioeng. – 2004. – 88. – pp. 474-488.
262. Soukharev, S. Saenko Expression of factor VIII in recombinant and transgenic systems / S. Soukharev, D. Hammond, N.M. Ananyeva, J.A. Anderson, C.A. Hauser, S. Pipe, E.L. Saenko // Blood Cells. Mol. Dis. – 2002. – 28. – pp. 234-248.

263. Spier, R. The evolution of processes for the commercial exploitation of anchorage-dependent animal cells / R. Spier, A. Kadouri // Enzyme Microb. Technol. – 1997. – 21. – pp. 2–8.
264. Steffen, R. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in international travellers to Western/Central Europe and conclusions on vaccination recommendations / R. Steffen // J. Trav. Med. – 2016. – 23. – pp. 1-10.
265. Studahl, M. Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: diagnosis and management / M Studahl, L Lindquist, B Eriksson, G Günther, M Bengner, E Franzen-Röhl, J Fohlman, T Bergström, E Aurelius // Drugs. 2013 Feb;73(2):131-58.
266. Sun, N. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing / N. Sun, H. Zhao // Biotechnol. Bioeng. – 2013. – 110. – pp. 1811-1821.
267. Sung, Y.H. Effect of sodium butyrate on the production, heterogeneity and biological activity of human thrombopoietin by recombinant Chinese hamster ovary cells / Y.H. Sung, Y.J. Song, S.W. Lim, J.Y. Chung, G.M. Lee // J. Biotechnol. – 2004. – 112. – pp. 323-335.
268. Sung, Y.H. Influence of co-down-regulation of caspase-3 and caspase-7 by siRNAs on sodium butyrate-induced apoptotic cell death of Chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin / Y.H. Sung, J.S. Lee, S.H. Park, J. Koo, G.M. Lee // Metab. Eng. – 2007. – 9. – pp. 452-464.
269. Sunley, K. CHO cells adapted to hypothermic growth produce high yields of recombinant beta-interferon / K. Sunley, T. Tharmalingam, M. Butler // Biotechnol. Prog. – 2008. – 24. – pp. 898-906.
270. Sunley, K. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest / K. Sunley, M. Butler // Biotechnol. Adv. – 2010. – 28. – pp. 385-394.
271. Suss, J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007 / J. Suss // Euro Surveill. – 2008. – 13.
272. Swiech, K. Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production / K. Swiech, V. Picanco-Castro, D.T. Covas // Protein Expr. Purif. – 2012. – 84. – pp. 147-153.

273. Szczepek, M. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases / M. Szczepek, V. Brondani, J. Buchel, L. Serrano, D.J. Segal, T. Cathomen // Nat. Biotechnol. – 2007. – 25. – pp. 786-793.

274. Taba, P. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis / P Taba, E Schmutzhard, P Forsberg, I Lutsar, U Ljøstad, Å Mygland, I Levchenko, F Strle, I. Steiner // Eur J Neurol. – 2017. – 24(10). – P. 1214.

275. Tangvoranuntakul, P. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid / P. Tangvoranuntakul, P. Gagneux, S. Diaz, M. Bardor, N. Varki, A. Varki, E. Muchmore // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2003. – 100. – pp. 12045-12050.

276. Tasic, B. Extensions of MADM (Mosaic Analysis with Double Markers) in mice / B. Tasic, K. Miyamichi, S. Hippenmeyer, V.S. Dani, H. Zeng, W. Joo, H. Zong, Y. Chen-Tsai, L. Luo // PLoS ONE. – 2012. – 7(3). – e023333.

277. Tekoah, Y. Glycosylation and functionality of recombinant beta-glucocerebrosidase from various production systems / Y. Tekoah, S. Tzaban, T. Kizhner, M. Hainrichson, A. Gantman, M. Golembo, D. Aviezer, Y. Shaaltiel // Biosci. Rep. – 2013. – 33.

278. Ternovoi, V.A. Tick-borne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999 / V.A. Ternovoi, G.P. Kurzhukov, Y.V. Sokolov, G.Y. Ivanov, V.A. Ivanisenko, A.V. Loktev, R.W. Ryder, S.V. Netesov, V.B. Loktev // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – 9. – pp. 743-746.

279. Tey, B.T. Influence of bcl-2 on cell death during the cultivation of a Chinese hamster ovary cell line expressing a chimeric antibody / B.T. Tey, R.P. Singh, L. Piredda, M. Piacentini, M. Al-Rubeai // Biotechnol. Bioeng. – 2000. – 68. – pp. 31-43.

280. Tigges, M. Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells / M. Tigges, M. Fussenegger // Metab. Eng. – 2006. – 8. – pp. 264-272.

281. Tjandra, J.J. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients / J.J. Tjandra, L. Ramadi, I.C. McKenzie // Immunology and Cell Biology. – 1990. – 68. – 367–375.

282. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1979. – V.76. – P.4350-4354.
283. Tsekhanovskaya, N. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype) / N.A. Tsekhanovskaya, L.E. Matveev, S.G. Rubin, A.S. Karavanov, E.K. Pressman // Virus Res. – 1993. – 30(1) – P.1-16.
284. Umana, P. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity / P. Umana, J. Jean-Mairet, R. Moudry, H. Amstutz, J.E. Bailey // Nat. Biotechnol. – 1999. – 17. – pp. 176–180.
285. Umanskyi, K. Immunotherapy of some acute and chronic neuroinfections / K Umanskyi, A Shishov, E. Dekonenko // Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova. 1981. – 81. – 10-6.
286. Urlaub, G.Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity / G. Urlaub, L.A. Chasin // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1980. – 77. – pp. 4216-4220.
287. Van Blokland, H.J. Methods to create a stringent selection system for mammalian cell lines / H.J. Van Blokland, F. Hoeksema, M. Siep, A.P. Otte, J.A. Verhees // Cytotechnology. – 2011. – 63. – pp. 371-384.
288. Vorovitch, MF. Genetic description of a tick-borne encephalitis virus strain Sofjin with the longest history as a vaccine strain / MF Vorovitch, LI Kozlovskaya, LIu Romanova, LL Chernokhaeva, AA Ishmukhametov, GG Karganova // Springerplus. – 2015. – 9. – P. 761.
289. Waldvogel, K. Severe tick-borne encephalitis following passive immunization / K Waldvogel, W Bossart, T Huisman, E Boltshauser, D Nadal // Eur. J. Pediatr. 1996 Sep;155(9):775-779.
290. Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014 / G. Walsh // Nat. Biotechnol. – 2014. – 32. – PP. 992-1000.
291. Weber, E. Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langat virus by systemic and local antiviral responses / E. Weber, K. Finsterbusch, R. Lindquist, S. Nair, S. Lienenklaus, N.O. Gekara, D. Janik, S. Weiss, U. Kalinke, A.K. Överby, A. Kröger // J. Virol. – 2014. – 88 (21). – pp. 12202-12212.

292. Weichhold, GM. The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity / GM Weichhold, R Ohnheiser, HG Zachau // Genomics. – 1993. – 16. – 503–511.
293. Wiedenheft, B. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea / B. Wiedenheft, S.H. Sternberg, J.A. Doudna // Nature. – 2012. – 482. – pp. 331-338.
294. Wikel, S. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment / S. Wikel // Front. Microbiol. – 2013. – 4. – p. 337.
295. Wildt, S. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast / S. Wildt, T.U. Gerngross // Nat Rev Microbiol – 2005 – 3(2). – pp:119–128.
296. Williams, S. CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells / S. Williams, T. Mustoe, T. Mulcahy, M. Griffiths, D. Simpson, M. Antoniou, A. Irvine, A. Mountain, R. Crombie // BMC Biotechnol. – 2005. – 5. – p. 17.
297. Wilson, C. Position effects on eukaryotic gene expression / C. Wilson, H.J. Bellen, W.J. Gehring // Annu. Rev. Cell Biol. –1990. – 6. – pp. 679-714.
298. Wilson, T.J. The LoxP/CRE system and genome modification / T.J. Wilson, I. Kola // Methods Mol. Biol. – 2001. – 158. – pp. 83–94.
299. World Health Organization (WHO) (2011). Vaccines against tick-borne encephalitis / WHO position paper: recommendations // Vaccine. – 29(48) – pp.8769–8770.
300. Wurm, F.M. Inducible overexpression of the mouse c-myc protein in mammalian cells / F.M. Wurm, K.A. Gwinn, R.E. Kingston // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – 83. – pp. 5414–5418.
301. Wurm, F.M. Integration and stability of CHO amplicons containing plasmid sequences / F.M. Wurm, M.G Pallavicini, R. Arathoon// Dev. Biol. Stand. – 1992. – 76. – pp. 69–82.
302. Wurm, F.M. Large scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production / F.M. Wurm, A.R. Bernard // Curr. Opin. Biotechnol. – 1999. – 10. – pp. 156–159.
303. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells / F.M. Wurm // Nature Biotechnology. – 2004. – 22. – PP. 1393-98.

304. Wurm, F.M. Host cell derived retroviral sequences enhance transfection and expression efficiency in CHO cells. in Animal Cell Technology: Developments, Processes and Products 35–41 / Wurm, F.M., Johnson, A., Lie, Y.S., Etcheverry, M.T. и Anderson, K.P / Butterworth-Heinemann, Oxford, UK. – 1992.
305. Xu, X. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line / X. Xu, H. Nagarajan, N.E. Lewis, S. Pan, Z. Cai, X. Liu, W. Chen, M. Xie, W. Wang, S. Hammond, et al. // Nat. Biotechnol. – 2011. – 29. – pp. 735-741.
306. Yang, W.C. Addition of valproic acid to CHO cell fed-batch cultures improves monoclonal antibody titers / W.C. Yang, J. Lu, N.B. Nguyen, A. Zhang, N.V. Healy, R. Kshirsagar, T. Ryll, Y.M. Huang // Mol. Biotechnol. – 2014. – 56. – pp. 421-428.
307. Yoon, S.K. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells / S.K. Yoon, S.H. Kim, G.M. Lee // Biotechnol. Prog. – 2003. – 19. – pp. 1383-1386.
308. Yun, C.Y. Specific inhibition of caspase-8 and −9 in CHO cells enhances cell viability in batch and fed-batch cultures / C.Y. Yun, S. Liu, S.F. Lim, T. Wang, B.Y. Chung, J. Jiat Teo, K.H. Chuan, A.S. Soon, K.S. Goh, Z. Song // Metab. Eng. – 2007. – 9. – pp. 406-418.
309. Zahn-Zabal, M. Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions / M. Zahn-Zabal, M Kobr, PA Girod, M Imhof, P Chatellard, M de Jesus, F Wurm, N Mermod // J. Biotechnol. – 2001. – 87. – pp. 29–42.
310. Zajkowska, J. Fatal outcome of tick-borne encephalitis – a case series / J. Zajkowska, P. Czupryna, S. Pancewicz, A. Adamczyk-Przychodze, M. Kondrusik, S. Grygorczuk, A. Moniuszko // Neurol. Neurochir. Pol. – 2011. – 45 (4). – pp. 402-406.
311. Zettlmeissl, G. Isolation of overproducing recombinant mammalian cells by a fast and simple selection procedure / G. Zettlmeissl, M. Wirth, H.J. Hauser, H.A. Küpper // Gene. – 1988. – 73. – pp. 419–426.
312. Zhang, F. A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors / F. Zhang, A.R. Frost,

M.P. Blundell, O. Bales, M.N. Antoniou, A.J. Thrasher // Mol. Ther. – 2010. – 18. – pp. 1640-1649.

313. Zhang, L. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) for monoclonal antibody expression in the commercially relevant CHOK1SV cell line / L. Zhang, M.C. Inniss, S. Han, M. Moffat, H. Jones, B. Zhang, W.L. Cox, J.R. Rance, R.J. Young // Biotechnol. Prog. – 2015. – 31. – pp. 1645-1656.
314. Zheng, H. Gene targeting in normal and amplified cell lines / H. Zheng, J.H. Wilson // Nature. – 1990. – 344. – pp. 170–173.