

## Химерное антитело 14D5 защищает модельных животных от Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса клещевого энцефалита

Матвеев А.Л.<sup>1</sup>, Козлова И.В.<sup>2</sup>, Дорощенко Е.К.<sup>2</sup>, Стронин О.В.<sup>3</sup>, Лисак О.В.<sup>2</sup>, Сунцова О.В.<sup>2</sup>, Савинова Ю.С.<sup>2</sup>, Емельянова Л.А.<sup>1</sup>, Байков И.К.<sup>1</sup>, Тикунова Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (630090, г. Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 8, Россия); <sup>2</sup> ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия); <sup>3</sup> ФГУП «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», филиал в г. Томск, НПО «Вирион» (634040, г. Томск, ул. Ивановского, 8а, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Матвеев Андрей Леонидович, e-mail: guterus@gmail.com

### Резюме

Вирус клещевого энцефалита (КЭ), принадлежащий к семейству *Flaviviridae*, является наиболее значимым патогеном, передаваемым иксодовыми клещами и вызывающим одну из самых тяжёлых нейроинфекций человека. Для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита в Российской Федерации применяют специфический сывороточный иммуноглобулин, получаемый из донорской крови. Однако известно, что препараты, полученные из донорской крови, обладают определёнными недостатками, и поэтому для экстренной профилактики и терапии КЭ необходима разработка препаратов нового поколения. С целью создания альтернативного препарата, в производстве которого не используется донорская кровь, было сконструировано химерное антитело ch14D5 против гликопротеина E вируса КЭ.

**Цель** настоящего исследования: изучение протективных свойств химерного антитела ch14D5 в отношении Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса КЭ в экспериментах *in vivo*.

В работе использовали периферийную мышечную модель КЭ; химерное антитело ch14D5 вводили внутримышечно через один день после интраперитонеального заражения мышей штаммами вируса КЭ Софьин, Васильченко и Абсеттаров. Препаратом сравнения являлся противоклещевой сывороточный иммуноглобулин, который вводили аналогично химерному антителу. Протективные свойства химерного антитела 14D5 оценивали с использованием лог-ранг теста. При проведении исследования изучали наличие или отсутствие антитело-зависимого усиления инфекции (ADE) при введении ch14D5 животным, заражённым разными субтипами вируса КЭ.

**Результаты** показали высокую эффективность антитела ch14D5 для экстренной профилактики инфекции у мышей, заражённых любым из использованных штаммов вируса КЭ, и отсутствие ADE.

Показано, что в животной модели протективная активность антитела ch14D5 превышает таковую противоклещевого сывороточного иммуноглобулина, и антитело ch14D5 может быть использовано для создания терапевтического препарата для экстренной профилактики КЭ.

**Ключевые слова:** штаммы вируса клещевого энцефалита, протективность, химерное антитело

**Для цитирования:** Матвеев А.Л., Козлова И.В., Дорощенко Е.К., Стронин О.В., Лисак О.В., Сунцова О.В., Савинова Ю.С., Емельянова Л.А., Байков И.К., Тикунова Н.В. Химерное антитело 14D5 защищает модельных животных от Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов вируса клещевого энцефалита. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 143-149. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.22

## Chimeric Antibody 14D5 Protects Mice against the Far-Eastern, Siberian, and European Tick-borne Encephalitis Virus

Matveev A.L.<sup>1</sup>, Kozlova I.V.<sup>2</sup>, Doroshchenko E.K.<sup>2</sup>, Stronin O.V.<sup>3</sup>, Lisak O.V.<sup>2</sup>, Suntsova O.V.<sup>2</sup>, Savinova Yu.S.<sup>2</sup>, Emelyanova L.A.<sup>1</sup>, Baykov I.K.<sup>1</sup>, Tikunova N.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS (prospect Lavrentieva 8, Novosibirsk 630090, Russian Federation); <sup>2</sup> Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (ul. Timiryazeva 16, Irkutsk 664003, Russian Federation); <sup>3</sup> Scientific and Production Association for Immunological Preparations "Microgen", Tomsk Branch, NGO Virion (ul. Ivanovskogo 8, Tomsk 634040, Russian Federation)

Corresponding author: Andrey L. Matveev, e-mail: guterus@gmail.com

### Abstract

Tick-borne encephalitis virus (TBEV), belonging to the *Flaviviridae* family, is the most significant pathogen transmitted by Ixodes ticks and causing one of the most severe human neuroinfections. In Russia, serum immunoglobulin produced from the donor blood is currently used for post-exposure prophylactic and therapy of tick-borne encephalitis virus. However, it is known that preparations obtained from donated blood have certain disadvantages, and therefore development of novel preparations for post exposure prophylaxis and therapy of tick-borne encephalitis is required. To develop an alternative preparation, which does not include donor blood, a chimeric antibody ch14D5 against glycoprotein E of TBEV was constructed.

This study was aimed to investigate protective efficacy of the chimeric antibody ch14D5 against the Far-Eastern, Siberian, and European subtypes of TBEV in *in vivo* experiments.

A peripheral mouse model of tick-borne encephalitis was used in this study: the chimeric antibody ch14D5 was administered intravenously in mice one day after their intraperitoneal infection with TBEV strains Sofjin, Vasilchenko,

and Absettarov. Anti-TBEV serum immunoglobulin was used as a control preparation, which was administered in the same way. Protective efficacy of the chimeric antibodies 14D5 was assessed using the log-rank test. In the study, the presence or absence of antibody-dependent enhancement of infection (ADE) was examined when mice, infected with different subtypes of the TBEV, got the antibody ch14d5.

Obtained results demonstrated high efficacy of the ch14D5 antibody in post-exposure prophylaxis of the disease in mice infected with any of the used TBEV strains, as well as the absence of ADE.

It was shown that protective efficacy of antibody ch14D5 is higher than that of the anti-TBEV serum immunoglobulin, and antibody ch14D5 could be used for development of a therapeutic preparation for post-exposure prophylaxis.

**Key words:** tick-borne encephalitis virus strains, protection, chimeric antibody

**For citation:** Matveev A.L., Kozlova I.V., Doroshchenko E.K., Stronin O.V., Lisak O.V., Suntsova O.V., Savinova Yu.S., Emelyanova L.A., Baykov I.K., Tikunova N.V. Chimeric antibody 14D5 protects mice against the Far-Eastern, Siberian, and European tick-borne encephalitis virus. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 143-149. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.22

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), представитель семейства Flaviviridae, является этиологическим агентом одной из наиболее грозных нейроинфекций на территории Российской Федерации. Кроме РФ, заболевания, вызванные ВКЭ, регистрируются в Китае, Монголии, Казахстане и во многих европейских странах, причём наибольшая заболеваемость клещевым энцефалитом (КЭ) регистрируется в России, Словении и в странах Балтии [1]. В Российской Федерации в последние годы более половины всех случаев КЭ и летальных исходов от этого заболевания регистрировались в Сибирском федеральном округе [2]. В большинстве территориальных образований СФО уровень заболеваемости КЭ существенно превышал показатели заболеваемости по всем эндемичным регионам РФ [2]. Следует также отметить, что расширение ареала ВКЭ, наблюдаемое в последние годы в ряде эндемичных регионов, заметнее всего в СФО, где в пяти территориальных образованиях (Красноярский край, Новосибирская и Омская области, Республики Тыва и Хакасия) ареал КЭ увеличился по крайней мере на одну административную территорию в каждом [2].

В настоящее время официально признано наличие трёх субтипов ВКЭ – Дальневосточного, Сибирского и Европейского [3], причём считается, что Дальневосточный субтип ВКЭ вызывает наиболее тяжёлые, а Европейский субтип – лёгкие формы КЭ [4]. Кроме того, в последние годы в Восточной Сибири, в Монголии и на Тибете были обнаружены новые варианты ВКЭ, генетические отличия которых позволяют выделить их в новые субтипы – Байкальский и Гималайский соответственно [5, 6, 7]. Вирулентность предполагаемых новых субтипов ВКЭ в настоящее время изучается, однако показано, что штаммы, принадлежащие к Байкальскому субтипу, способны вызывать тяжёлые формы КЭ вплоть до смертельного исхода [8].

Для экстренной профилактики и терапии КЭ в Российской Федерации применяют сывороточный иммуноглобулин, получаемый из крови доноров, проживающих в природных очагах заболевания. Этот препарат обладает защитным эффектом особенно при введении в 1–2-й день после укуса клеща. Вместе с тем, как и все препараты на основе донорской крови, он обладает определёнными недостатками. С целью создания альтернативного препарата, в производстве которого не используется донорская кровь, было сконструировано оригинальное химерное антитело против гликопротеина Е ВКЭ. Антитело сконструировали на основе вариабельных доменов вируснейтрализующего моноклонального антитела 14D5, полученного ранее [9], и константных доменов IgG1/карра человека. Сродство созданного антитела ch14D5

к белку Е ВКЭ составило  $2,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ; индекс нейтрализации (IC50) в экспериментах *in vitro* – 0,043 мкг/мл; степень гуманизации – 98,3 % [10]. В предварительных экспериментах с использованием мышиной модели было показано, что сконструированное антитело обладало специфической противовирусной активностью и обеспечивало экстренную профилактику мышей от инфекции, вызванной ВКЭ, штамм Абсеттаров, принадлежащим к Западному субтипу [10]. Однако наибольшую опасность на территории РФ представляют штаммы ВКЭ, относящиеся к Дальневосточному и Сибирскому субтипам [3].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение протективных свойств антитела ch14D5 в отношении Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов в экспериментах *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Штаммы вируса клещевого энцефалита

В работе использованы три штамма ВКЭ: штамм Абсеттаров был получен из репозитария ФГУП «НПО по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», филиал в г. Томск, НПО «Вирион»; штаммы Васильченко и Софьин – из репозитария ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (Collection № 478258; <http://www.ckr-rf.ru>). До исследования штаммы хранились в лиофилизированном виде при температуре  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Перед экспериментом штаммы пассировали путём интрацеребрального заражения молодых белых мышей суспензией лиофилизованного материала в объёме 0,03 мл. При появлении у мышей выраженных клинических признаков заболевания животных умерщвляли и готовили 10%-ю суспензию мозга из расчёта 2 мл 0,9%-го раствора NaCl на 1 мозг. Суспензию центрифугировали при 5 тыс. об./мин в течение 10 мин. Супернатант аккуратно собирали и готовили из него аликваты для дальнейшего использования. Предварительное титрование полученного вируса осуществляли на молодых белых мышках весом 10–12 г. Для этого готовили последовательные десятикратные разведения исходной суспензии, от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ , в 0,9%-м растворе NaCl. Мышей заражали интраперитонеально (и.п.) в объёме 0,2 мл.

### Конструирование и наработка антитела 14D5

Для наработки полноразмерного антитела человека ch14D5 в сконструированную ранее плазмиду pCDNA5/FRT-DHFR-CH-CL [11] встроили фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL домены моноклонального антитела 14D5 [10] с использованием праймеров VH14D5\_U и VH14D5\_L, содержащих на 5'-концах сайты эндонуклеаз рестрикции EcoRV и NotI для встраивания VH-гена, а также праймеров VL14D5\_U и VH14D5\_L, содержащих на 5'-концах сайты NheI и AflII, для встраивания VL-гена. В результате была

получена плазида рCDNA5/FRT-DHFR-full\_14D5, кодирующая тяжёлые и лёгкие цепи полноразмерного антигена ch14D5. Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *Escherichia coli*, очищали с помощью набора PureYield Plasmid midiprep (Promega) и использовали для последующей трансфекции эукариотических клеток.

Для получения штамма, продуцирующего антитело ch14D5, суспензионные клетки линии CHO-S\FRT, полученной ранее [11], одновременно трансфицировали двумя плазидами: вспомогательной плазмидой рOG44 (Life Technologies) с геном, кодирующим флиппазу, и сконструированной плазмидой рCDNA5\FRT-DHFR-full\_14D5, кодирующей целевое антитело ch14D5. Трансфекцию проводили с помощью трансфектанта Lipofectamine 2000 (Life Technologies), согласно рекомендациям производителя. Эффективность гомологичной рекомбинации оценивали через 72 часа после трансфекции методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитофлуориметра NovoCyte (ACEA). Затем полученные пулы клеток засеивали в селективную среду CD OptiCHO, содержащую 80 мкг/мл селективного антибиотика Гигромицин В и все необходимые ростовые добавки. В выживших клетках проводили амплификацию целевого гена. Для этого к аликвотам клеток добавляли метотриксат (TEVA, Израиль) в концентрации 800 нМ. После этого отдельные клоны получали методом предельных разведений.

Для очистки антитела ch14D5 культуральную среду, содержащую это антитело, центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g. Хроматографическую полипропиленовую колонку («QIAgen»), содержащую белок А-сефарозу CL-4B («GE Healthcare»), предварительно уравнивали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР) в составе: 100 мМ NaCl, 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> при pH 7.4. Супернатант наносили на колонку со скоростью 0,5 мл/мин при температуре 4 °С. Колонку промывали тремя объёмами ФСБР и элюировали антитело ch14D5 четырьмя объёмами 0.1 М цитратного буфера, pH 3.0. К элюату добавляли 1 М буфер трис-HCl, pH 8.8, в соотношении 1:10 для изменения pH до физиологических значений. Раствор антитела ch14D5 концентрировали с помощью фильтров Amicon Ultra-4 30K («Millipore») и заменяли буфер на ФСБР и стерилизовали с помощью фильтрации через 0,22 мкм фильтр. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически, проводя измерение при длине волны 280 нм.

#### Изучение протективных свойств антитела ch14D5 *in vivo*

Мышей линии BALB/c получали из вивария ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Российской Федерации (ветеринарное свидетельство 254 № 0476441). Мышей в возрасте 3 недель заражали интраперитонеально (и.п.) суспензией ВКЭ в объёме 0,2 мл. Через 24 часа мышам внутримышечно (в.м.) вводили 100 мкл антитела в 0,9%-м растворе NaCl или препарат противоклещевого сывороточного иммуноглобулина (ООО «Микроген») в том же объёме. Контролем служили заражённые мыши, которым вместо иммуноглобулиновых препаратов вводили 100 мкл 0,9%-го раствора NaCl. Экспериментальные и контрольные группы мышей содержали по 8–10 животных. Наблюдение вели в течение 21 дня после заражения мышей; в эксперименте оценивали выживаемость животных и среднюю продолжительность их жизни после заражения (СПЖ). Реальную 50%-ю летальную дозу вируса

(РЛД<sub>50</sub>) определяли в каждом эксперименте по методу Рида – Менча [12].

Исследования с лабораторными животными выполнены в соответствии с законодательством РФ, положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (ETS N 123), в частности приложения А и статьи № 5 Конвенции, положениями Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Washington D.C., 2011) и другими нормами международного права, регламентирующими вопросы содержания и использования лабораторных (экспериментальных) животных.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

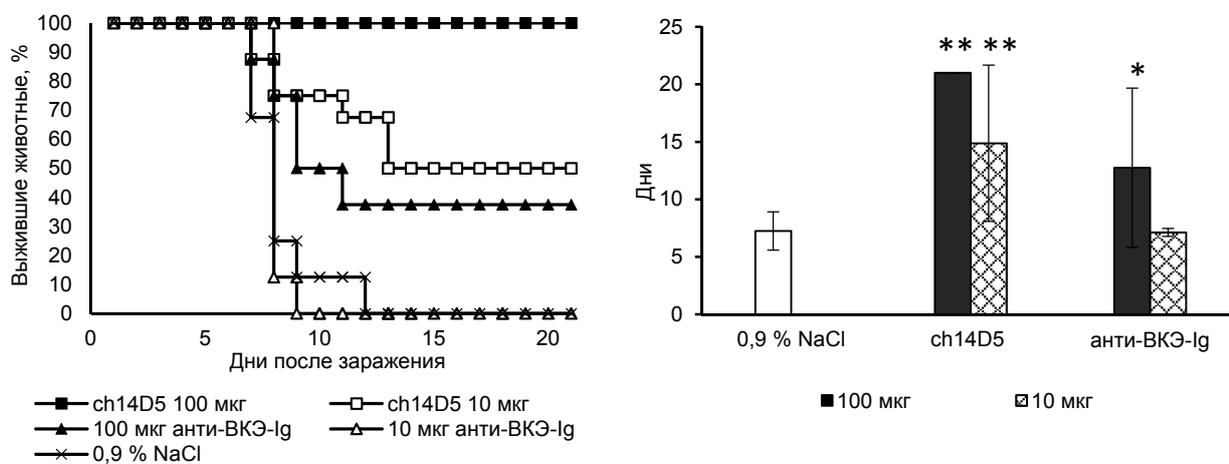
Протективную активность антитела ch14D5 исследовали в периферической мышечной модели, описанной ранее [13]. На первом этапе перепроверили полученные ранее результаты, продемонстрировавшие протективную активность антитела ch14D5 в отношении Европейского субтипа ВКЭ [10]. Для этого мышам, заражённым ВКЭ, штамм Абсеттаров в дозе 158,5 РЛД<sub>50</sub>, через 24 часа однократно вводили антитело ch14D5 в дозировках 100 мкг/мышь (группа 1) и 10 мкг/мышь (группа 2), а также противоклещевой сывороточный иммуноглобулин в дозировках 100 мкг/мышь (группа 3) и 10 мкг/мышь (группа 4). Результаты эксперимента (рис. 1) подтвердили наличие протективной активности у антитела ch14D5, которое в дозировке 100 мкг/мышь обеспечило 100%-ю выживаемость экспериментальных животных, а в дозировке 10 мкг/мышь – 50%-ю выживаемость. Эффективность коммерческого противоклещевого сывороточного иммуноглобулина была ниже, и в дозировке 100 мкг/мышь препарат обеспечил выживаемость 62 % мышей, а в дозировке 10 мкг/мышь он был неэффективен. В дальнейшем сывороточный иммуноглобулин в дозировке 10 мкг/мышь в экспериментах не применяли.

Закономерно, что СПЖ животных из групп 1, 2 и 3 статистически значимо превышала таковую для контрольной группы (рис. 1). Значение СПЖ мышей из группы 4 (100%-я гибель животных) не было меньше СПЖ животных из контрольной группы, что свидетельствует о том, что даже при введении субнейтрализующей дозы препарата противоклещевого сывороточного иммуноглобулина у экспериментальных животных отсутствовало усиление инфекции, вызванной ВКЭ.

На следующем этапе была проверена способность антитела ch14D5 защищать мышей от инфекции, вызванной ВКЭ Дальневосточного и Сибирского субтипов. Эксперименты проводили по вышеописанной схеме. Мышей заражали ВКЭ, штамм Софьин с инфицирующей дозой 251 РЛД<sub>50</sub> или ВКЭ, штамм Васильченко с такой же инфицирующей дозой. Результаты эксперимента продемонстрировали наличие у антитела ch14D5 выраженного протективного эффекта: в дозировке 100 мкг/мышь антитело обеспечило защиту 90 % мышей, инфицированных ВКЭ, штамм Софьин, и 100%-ю защиту мышей, заражённых ВКЭ, штамм Васильченко (рис. 2, 3). Даже введение антитела ch14D5 в низкой дозировке (10 мкг/мышь) привело к статистически значимому увеличению СПЖ животных, по сравнению с контрольной группой, и обеспечило выживаемость 60 % и 50 % мышей, инфицированных, соответственно, ВКЭ, штамм Софьин и ВКЭ, штамм Васильченко (рис. 2, 3). Препарат сыворо-

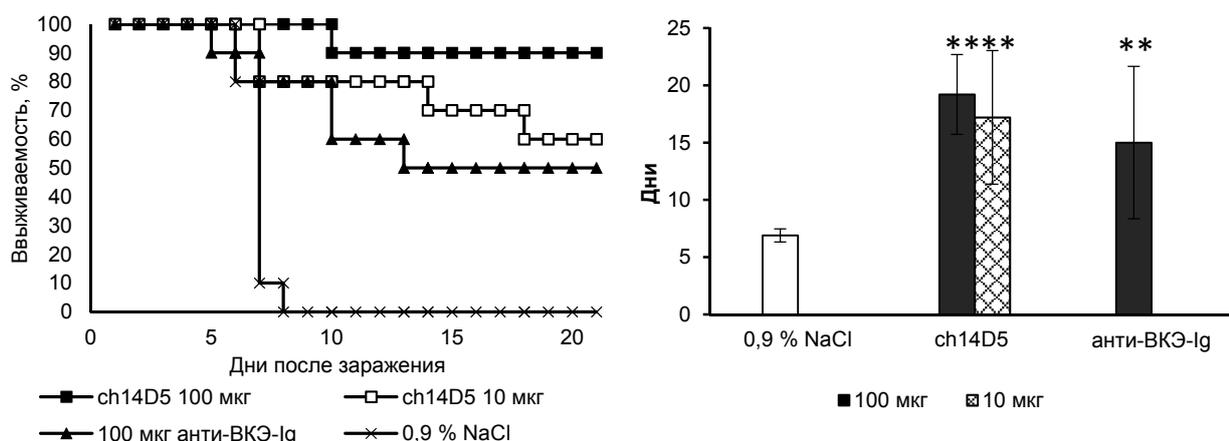
точного иммуноглобулина продемонстрировал более низкие защитные свойства, чем антитело ch14D5. При введении этого препарата в дозировке 100 мкг/мышь выжили 50 % мышей, заражённых ВКЭ, штамм Софьин, и не выжила ни одна мышь, инфицированная ВКЭ, штамм Васильченко (рис. 2, 3). Однако СПЖ мышей, которым вводили препарат противоклещевого сывороточного иммуноглобулина, всё равно превышала таковую для контрольных групп (рис. 2б, 3б). Даже в том случае, когда введение препарата сывороточного иммуноглобулина мышам, заражённым ВКЭ, штамм Васильченко, было неэффективным (100%-я летальность), значение СПЖ в этой группе не снизилось, по сравнению с контрольной, что свидетельствует об отсутствии усиления инфекции при введении специфического иммуноглобулина.

Следует отметить, что именно опасения, связанные с возможностью усиления инфекции при введении пациентам иммуноглобулиновых препаратов, привели к отказу от производства и применения специфического противоклещевого сывороточного иммуноглобулина FSMEBULIN в европейских странах. Феномен антитело-зависимого усиления инфекции действительно зарегистрирован у пациентов с лихорадкой денге, а также весьма вероятен при заражении вирусом Зика (два других флавивируса) [14, 15, 17]. *In vitro* антитело-зависимое усиление инфекции (ADE, antibody dependent enhancement) при добавлении субнейтрализующих доз антител показано для ряда флавивирусов, включая вирус японского энцефалита, вирус долины Мюррей [18], вирус Западного Нила [19] и ВКЭ [20]. Возможность ADE при пассивной иммуниза-



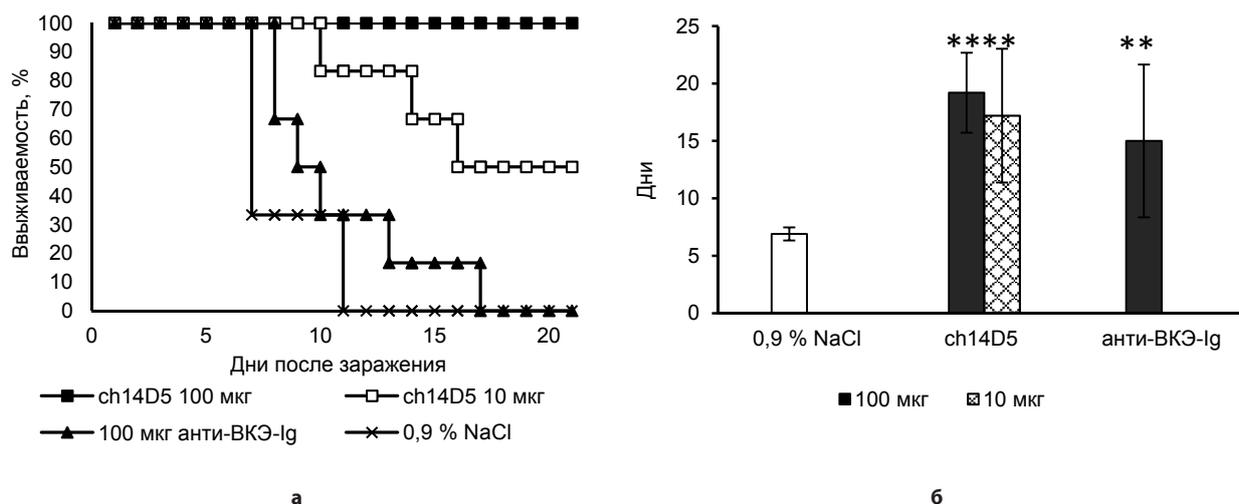
**Рис. 1.** Эффективность антитела ch14D5 для экстренной профилактики инфекции у мышей, заражённых ВКЭ, штамм Абсеттаров. Мышам BALB/c (10 г) вводили (и.п.) ch14D5 или противоклещевой сывороточный иммуноглобулин в указанных дозах через день после заражения мышей ВКЭ в дозировке 158 ЛД<sub>50</sub>. а – кривые выживаемости; б – СПЖ ± среднеквадратичное отклонение, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005 (log-rank test).

**Fig. 1.** Efficacy of ch14D5 post-exposure prophylaxis in mice infected with TBEV Absettarov. BALB/c mice (10 g) were treated (i.v.) with ch14D5 or anti-TBE-Ig at the indicated doses one day after infection with 158 LD<sub>50</sub> of TBEV. а – survival curves; б – MST ± SEM, \*p < 0.05; \*\*p < 0.005 (log-rank test).



**Рис. 2.** Эффективность антитела ch14D5 для экстренной профилактики инфекции у мышей, заражённых ВКЭ, штамм Софьин. Мышам BALB/c (10 г) вводили (и.п.) ch14D5 или противоклещевой сывороточный иммуноглобулин в указанных дозах через день после заражения мышей ВКЭ в дозировке 251 ЛД<sub>50</sub>. а – кривые выживаемости; б – СПЖ ± среднеквадратичное отклонение, \*p < 0,05; \*\*p < 0,005 (log-rank test).

**Fig. 2.** Efficacy of ch14D5 post-exposure prophylaxis in mice infected with TBEV Sofjin. BALB/c mice (10 g) were treated (i.v.) with ch14D5 or anti-TBE-Ig at the indicated doses one day after infection with 251 LD<sub>50</sub> of TBEV. а – survival curves; б – survival curves, MST ± SEM, \*p < 0.05; \*\*p < 0.005 (log-rank test).



**Рис. 3.** Эффективность антитела ch14D5 для экстренной профилактики инфекции у мышей, заражённых ВКЭ, штамм Васильченко. Мышам BALB/c (10 г) вводили (и.п.) ch14D5 или противоклещевой сывороточный иммуноглобулин в указанных дозах через день после заражения мышей ВКЭ в дозировке 251 ЛД<sub>50</sub>. а – кривые выживаемости; б – СПЖ ± среднее квадратичное отклонение, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  (log-rank test).

**Fig. 3.** Efficacy of ch14D5 post-exposure prophylaxis in mice infected with TBEV Vasilchenko. BALB/c mice (10 g) were treated (i.v.) with ch14D5 or anti-TBE-Ig at the indicated doses one day after infection with 251 LD<sub>50</sub> of TBEV. а – survival curves; б – survival curves, MST ± SEM, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  (log-rank test).

ции против КЭ до сих пор остаётся дискуссионным вопросом. Однако на практике многолетнее применение подхода, основанного на результатах предварительного экспресс-исследования присосавшегося переносчика и профилактического введения иммуноглобулина только лицам, покусанным инфицированными ВКЭ клещами, показало хорошие результаты. Так, анализ результатов «адресного» введения иммунопрепарата более чем 5 тыс. людей, обратившихся за помощью после укуса клеща, показал, что такое применение данного препарата с профилактической целью обеспечило высокую эпидемиологическую (99,2 %) и экономическую эффективность [21]. Вместе с тем, показано, что в ходе иммунного ответа на инфекцию ВКЭ в сыворотке человека могут появляться антитела, способные опосредовать усиление инфекции [17]. Такие антитела обнаружены лишь в одном из 30 образцов сывороток австрийских пациентов с КЭ [17]. Однако даже крайне редкое появление антител, способных усиливать инфекцию ВКЭ, вкпе с непредсказуемостью гуморального ответа каждого конкретного индивидуума, зависящего не только от инфекционного штамма ВКЭ, но и от анамнеза и генетических особенностей человека, ставят вопрос о необходимости создания эффективного препарата, обладающего однозначным механизмом действия для экстренной профилактики и терапии КЭ.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведённые эксперименты доказывают, что химерное антитело ch14D5 обладает протективной активностью в отношении Дальневосточного, Сибирского и Западного субтипов ВКЭ и эффективно защищает мышей при введении через 24 часа после их заражения летальными дозами штаммов этих субтипов. Показано, что в животной модели протективная активность антитела ch14D5 превышает таковую противоклещевого сывороточного иммуноглобулина. Продemonстрировано, что введение субнейтрализующих доз препарата противоклещевого сывороточного иммуноглобулина

не приводит к усилению инфекции, вызванной ВКЭ, в экспериментах *in vivo*.

Работа финансировалась Российским научным фондом, грант № 16-14-00083.

#### Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. Vaccines against tick-borne encephalitis. WHO position paper: recommendations. *Vaccine*. 2011; 29(48): 8769-8770. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.024
- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. *Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году»*. 2017. URL: <http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/0b3/gosudarstvennyy-doklad-2016.pdf>.
- Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 129-146. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1
- Mandl CW. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* 2005; 111(2): 161-174. doi: 10.1016/j.virusres.2005.04.007
- Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Козлова И.В., Верховина М.М., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(4): 13-18.
- Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Верховина М.М., и др. Характеристика Байкальского субтипа вируса клещевого энцефалита, циркулирующего на территории Восточной Сибири. *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3(4): 53-60. doi: 10.29413/ABS.2018-3.4.9
- Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6
- Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Кулакова Н.В., Tungalag K., Арбатская Е.В., Миронова Л.В., и др. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии. *Вопросы вирусологии*. 2010; (3): 27-32.

9. Tsekhanovskaya NA, Matveev LE, Rubin SG, Karavanov AS, Pressman EK. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). *Virus Res.* 1993; 30(1): 1-16.

10. Baykov IK, Matveev AL, Stronin OV, Ryzhikov AB, Matveev LE, Kasakin MF, et al. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. *Vaccine.* 2014; 32(29): 3589-3594. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.012

11. Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Байков И.К., Бабкин И.В., Гончарова Е.П., Морозова В.В. и др. Создание стабильного штамма-продуцента полноразмерного антитела человека на примере антитела против вируса экстремелии. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2017; 21(8): 993-1000. doi: 10.18699/VJ17.324

12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol.* 1938; 27(3): 493-497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

13. Тимофеев А.В., Кондратьева Ю.Ю., Крганова Г.Г., Стефенсон Дж. Протективная активность бактериальной плазмиды, несущей ген неструктурного белка NS1 вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии.* 2001; (1): 22-24.

14. Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by pre-existing anti-flavivirus immunity. *Science.* 2017; 356(6334): 175-180. doi: 10.1126/science.aal4365

15. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: Knowns and unknowns. In: Crowe J, Boraschi D, Rappuoli R. (eds.) *Antibodies for Infectious Diseases.* Washington, DC: ASM Press; 2014: 249-271. doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014

16. Halstead SB. Biologic evidence required for Zika disease enhancement by dengue antibodies. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(4): 569-573. doi: 10.3201/eid2304.161879

17. Haslwanter D, Blaas D, Heinz FX, Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLOS Pathogens.* 2017; 13(9), e1006643. doi: 10.1371/journal.ppat.1006643

18. Bröker M, Kollaritsch H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment. *Vaccine.* 2008; 26(7): 863-868. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.046

19. Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T. Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization. *PLoS Pathog.* 2008; 4(5): e1000060. doi: 10.1371/journal.ppat.1000060

20. Kreil TR, Eibl MM. Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model. *J Virol.* 1997; 71(4): 2921-2927.

21. Козлова И.В., Злобин В.И., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Лисак О.В., и др. Современные подходы к экстренной специфической профилактике клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии.* 2007; 52(6): 25-30.

REFERENCES

1. World Health Organization. Vaccines against tick-borne encephalitis. WHO position paper: recommendations. *Vaccine.* 2011; 29(48): 8769-8770. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.024

2. Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance. *State report "On the state of sanitary and epidemiological well-being of the Russian Federation population in 2016"*. 2017. URL: <http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/0b3/gosudarstvennyy-doklad-2016.pdf>. (In Russ.)

3. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 129-146. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1

4. Mandl CW. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* 2005; 111(2): 161-174. doi: 10.1016/j.virusres.2005.04.007

5. Demina TV, Dzhioev YuP, Kozlova IV, Verkhovina MM, Tkachev SE, Doroshchenko EK, et al. Genotypes 4 and 5 of tick-

borne encephalitis virus: peculiarities of genome structure and possible way of their formation. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(4): 13-18. (In Russ.)

6. Kozlova IV, Demina TV, Tkachev SE, Doroshchenko EK, Lisak OV, Verkhovina MM, et al. Characteristics of Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating on the territory of the Eastern Siberia. *Acta biomedica scientifica.* 2018; 3(4): 53-60. doi: 10.29413/ABS.2018-3.4.9. (In Russ.)

7. Dai X, Shang G, Lu S, Yang J, Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 74. doi: 10.1038/s41426-018-0081-6

8. Khasnatinov MA, Danchinova GA, Kulakova NV, Tungalag K, Arbatskaya EV, Mironova LV, et al. Genetic characteristics of tick-borne encephalitis agent in Mongolia. *Voprosy virusologii.* 2010; (3): 27-32. (In Russ.)

9. Tsekhanovskaya NA, Matveev LE, Rubin SG, Karavanov AS, Pressman EK. Epitope analysis of tick-borne encephalitis (TBE) complex viruses using monoclonal antibodies to envelope glycoprotein of TBE virus (persulcatus subtype). *Virus Res.* 1993; 30(1): 1-16.

10. Baykov IK, Matveev AL, Stronin OV, Ryzhikov AB, Matveev LE, Kasakin MF, et al. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. *Vaccine.* 2014; 32(29): 3589-3594. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.012

11. Matveev AL, Khlusevich YaA, Baykov IK, Babkin IV, Goncharova EP, Morozova VV, et al. Development of a stable eukaryotic strain producing fully human monoclonal antibody on the basis of the human antibody against ectromelia virus. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii.* 2017; 21(8): 993-1000. doi: 10.18699/VJ17.324. (In Russ.)

12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol.* 1938; 27(3): 493-497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

13. Timofeev AV, Kondratieva YuYu, Karganova GG, Stefenon G. Protective activity of bacterial plasmid carrying the tick-borne encephalitis virus non-structural NS1 gene. *Voprosy virusologii.* 2001; (1): 22-24. (In Russ.)

14. Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by pre-existing anti-flavivirus immunity. *Science.* 2017; 356(6334): 175-180. doi: 10.1126/science.aal4365

15. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: Knowns and unknowns. In: Crowe J, Boraschi D, Rappuoli R. (eds.) *Antibodies for Infectious Diseases.* Washington, DC: ASM Press; 2014: 249-271. doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014

16. Halstead SB. Biologic evidence required for Zika disease enhancement by dengue antibodies. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(4): 569-573. doi: 10.3201/eid2304.161879

17. Haslwanter D, Blaas D, Heinz FX, Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLOS Pathogens.* 2017; 13(9), e1006643. doi: 10.1371/journal.ppat.1006643

18. Bröker M, Kollaritsch H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment. *Vaccine.* 2008; 26(7): 863-868. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.046

19. Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T. Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization. *PLoS Pathog.* 2008; 4(5): e1000060. doi: 10.1371/journal.ppat.1000060

20. Kreil TR, Eibl MM. Pre- and postexposure protection by passive immunoglobulin but no enhancement of infection with a flavivirus in a mouse model. *J Virol.* 1997; 71(4): 2921-2927.

21. Kozlova IV, Zlobin VI, Verkhovina MM, Demina TV, Dzhioev YuP, Lisak OV, et al. Modern approaches to the emergency specific prophylaxis of tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(6): 25-30. (In Russ.)

**Сведения об авторах**

**Матвеев Андрей Леонидович** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, e-mail: guterus@gmail.com <http://orcid.org/0000-0002-6884-6104>

**Козлова Ирина Валерьевна** – доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: diwerhoz@rambler.ru <http://orcid.org/0000-0002-6324-8746>

**Дорощенко Елена Константиновна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru <http://orcid.org/0000-0002-8209-616>

**Стронин Олег Владимирович** – кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории, ФГУП «Научно-производственное объединение по медицинским иммунологическим препаратам «Микроген», филиал в г. Томск, НПО «Вирион», e-mail: o.v.stronin@gmail.com

**Лисак Оксана Васильевна** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: lisak.liza@rambler.ru <http://orcid.org/0000-0003-3909-7551>

**Сунцова Ольга Владимировна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: olga\_syntsova@list.ru <http://orcid.org/0000-0003-4057-2890>

**Савинова Юлия Сергеевна** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: vippersona2389@rambler.ru <http://orcid.org/0000-0001-8183-1233>

**Емельянова Людмила Александровна** – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, e-mail: mila.kuharenko@mail.ru <http://orcid.org/0000-0002-8799-7135>

**Байков Иван Константинович** – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, e-mail: ivan\_baykov@mail.ru

**Тикунова Нина Викторовна** – доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной микробиологии, ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru <http://orcid.org/0000-0002-1687-8278>

**Information about the authors**

**Andrey L. Matveev** – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, e-mail: guterus@gmail.com <http://orcid.org/0000-0002-6884-6104>

**Irina V. Kozlova** – Dr. Sc. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: diwerhoz@rambler.ru <http://orcid.org/0000-0002-6324-8746>

**Elena K. Doroshchenko** – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru <http://orcid.org/0000-0002-8209-616>

**Oleg V. Stronin** – Cand. Sc. (Med.), Head of the Laboratory, Scientific and Production Association for Immunological Preparations “Microgen”, Tomsk Branch, NGO Virion, e-mail: o.v.stronin@gmail.com

**Oksana V. Lisak** – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: lisak.liza@rambler.ru <http://orcid.org/0000-0003-3909-7551>

**Olga V. Suntsova** – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: olga\_syntsova@list.ru <http://orcid.org/0000-0003-4057-2890>

**Yulia S. Savinova** – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Epidemiology and Genetic Diagnostics, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: vippersona2389@rambler.ru <http://orcid.org/0000-0001-8183-1233>

**Lyudmila A. Emelyanova** – Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, e-mail: mila.kuharenko@mail.ru <http://orcid.org/0000-0002-8799-7135>

**Ivan K. Baykov** – Cand. Sc. (Biol.), Junior Research Officer at the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, e-mail: ivan\_baykov@mail.ru

**Nina V. Tikunova** – Dr. Sc. (Biol.), Head of the the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru <http://orcid.org/0000-0002-1687-8278>

**Информация о вкладе авторов**

Матвеев А.Л. – наработка антитела ch14D5, статистический анализ, подготовка рукописи к публикации.

Козлова И.В. – эксперименты *in vivo*, подготовка рукописи к публикации.

Дорощенко Е.К. – эксперименты *in vivo*.

Стронин О.В. – эксперименты *in vivo*.

Лисак О.В. – эксперименты *in vivo*.

Сунцова О.В. – эксперименты *in vivo*.

Савинова Ю.С. – эксперименты *in vivo*.

Емельянова Л.А. – тестирование антитела ch14D5.

Байков И.К. – очистка антитела ch14D5.

Тикунова Н.В. – концептуализация, анализ данных, получение финансирования, администрирование проекта, подготовка рукописи к публикации.