https://doi.org/10.17116/molgen2021390213

Использование моноклональных антител, специфичных к флавивирусам, для исследования их антигенной структуры и разработки терапевтических препаратов

© В.С. НЕСМЕЯНОВА, Д.Н. ЩЕРБАКОВ, Е.И. КАЗАЧИНСКАЯ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

РЕЗЮМЕ

Флавивирусы — представители рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* вызывают у человека болезни с разной степенью тяжести: лихорадки (желтую, денге, Западного Нила, Зика и др.), энцефалиты (клещевой, Японский, Повассан и др.). Профилактические вакцины разработаны только против некоторых из этих инфекционных агентов, что связано с их нейровирулентностью, а также давно известным и характерным для них феноменом антитело-зависимого усиления инфекции (antybody-dependent enhancement (ADE)). Использование сывороточной терапии в случае флавивирусов имеет ряд ограничений. Сырьевая база для получения специфических иммуноглобулинов из донорской крови всегда ограничена и не стандартизирована по уровню защитных антител, значительным ограничением является опасность ADE. В настоящее время доступен ряд технологий, позволяющих проводить поиск антител с необходимыми биологическими характеристиками, такими как высокая эффективность и широта нейтрализации при отсутствии индукции ADE. В обзоре рассматриваются моноклональные антитела, полученные методами клеточной инженерии — гибридомные мышиные, рекомбинантные химерные (гуманизированные) мышь/человек или примат/человек и рекомбинантные полностью человеческие, которые исследуются *in vitro* и *in vivo* в качестве потенциально терапевтических препаратов, ингибирующих проникновение флавивирусов в чувствительные клетки хозяина и/или ограничивающие их репликацию.

Ключевые слова: *флавивирусы, моноклональные антитела, антигенная структура, нейтрализация вируса, терапевтические препараты на основе моноклональных антител.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Несмеянова В.С. — https://orcid.org/0000-0003-1091-3586; e-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru
Щербаков Д.Н. — https://orcid.org/0000-0001-8023-4453; e-mail: dnshcherbakov@gmail.com
Казачинская Е.И. — https://orcid.org/0000-0002-1856-6147; e-mail: alenakaz@vector.nsc.ru
Автор, ответственный за переписку: Несмеянова В.С. — e-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Несмеянова В.С., Щербаков Д.Н., Казачинская Е.И. Использование моноклональных антител, специфичных к флавивирусам, для исследования их антигенной структуры и разработки терапевтических препаратов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(2):3–13. https://doi.org/10.17116/molgen2021390213

The use of monoclonal antibodies specific to flavivirus to develop therapeutic drugs

© V.S. NESMEIANOVA, D.N. SHERBAKOV, E.I. KAZACHINSKAIA

State Research Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk region, Russia

ABSTRACT

The flaviviruses members of genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae* that cause the disease: fevers (yellow, dengue, West Nile, Zika et al.), encephalitis (tick-borne, Japanese, Powassan et al.). Preventive vaccines developed only against some of these infectious agents. This is due to their neurovirulence and as well as the long-known and characteristic phenomenon of antibody-dependent infection enhancement (ADE). The use of serum therapy in the case of flaviviruses has several limitations. The raw material base for obtaining specific immunoglobulins from donor blood is always limited and not standardized for the level of protective antibodies, a significant limitation is the danger of ADE. A number of technologies are currently available that allow the search for antibodies with the necessary biological characteristics, such as high potency and breadth of neutralization in the absence of ADE. The review discusses monoclonal antibodies obtained by cell engineering methods — hybridoma mouse, recombinant chimeric (humanized) mouse / human or primate/human and recombinant fully human, which are studied in vitro and in vivo as potential therapeutic agents that inhibit the penetration of flaviviruses into sensitive hosts cells and/or restricting their replication.

Keywords: *flaviviruses, monoclonal antibodies (Mabs), antigenic structure, neutralization of virus, therapeutic drugs based on Mabs.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Nesmeyanova V.S. — https://orcid.org/0000-0003-1091-3586; e-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru
Shcherbakov D.N. — https://orcid.org/0000-0001-8023-4453; e-mail: dnshcherbakov@gmail.com
Kazachinskaya E.I. — https://orcid.org/0000-0002-1856-6147; e-mail: alenakaz@vector.nsc.ru
Corresponding author: Nesmeyanova V.S. — e-mail: nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

TO CITE THIS ARTICLE:
Nesmeianova VS, Sherbakov DN, Kazachinskaia EI. The use of monoclonal antibodies specific to flavivirus to develop therapeutic drugs. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2021;39(2):3–13. (In Russ.).
https://doi.org/10.17116/molgen2021390213

Классификация, распространение и опасность флавивирусов для человека

Представители рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* (от лат. *Flavus* — желтый) являются классическими арбовирусами (arthropod-borne virus), передающимися путем биологической трансмиссии восприимчивым позвоночным кровососущими членистоногими переносчиками — комарами или клещами [1, 2]. По данным Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) на июль 2018 г. в род *Flavivirus* включено 53 вида, разделенных на 10 антигенных комплексов [3, 4].

Наиболее изученными вследствие их патогенности для человека являются вирусы 4 антигенных комплексов: желтой лихорадки (Yellow fever virus, YFV), японского энцефалита (Japanese encephalitis virus, JEV), клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) и денге (dengue virus, DENV). Вирус Зика (Zika virus, ZIKV), представитель антигенного комплекса вируса Spodweni, экологически африканский зооноз, ранее считавшийся не опасным для человека, недавно вызвал эпидемию на Американском континенте, при этом регистрировались случаи передачи возбудителя половым путем, что является уникальным свойством для арбовируса [5]. Симптоматическая инфекция, вызванная DENV, в мире ежегодно проявляется у 390 млн человек [4]. Вирус Западного Нила (WNV) принадлежит антигенному комплексу японского энцефалита. С 2013 г. ежегодно в США лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) заражаются в среднем 2 тыс. человек, при этом больше 50% случаев приходится на тяжелые нейроинвазивные формы инфекции [6—10]. По данным сайта CDC (centers for disease control and prevention), в 2019 г. было зарегистрировано 917 случаев [11].

В ряде европейских стран, России, Казахстане, Монголии и Китае клещевым энцефалитом, вызванным TBEV, по разным оценкам, ежегодно заболевают от 6 до 12 тыс. человек, причем более половины случаев приходится на территорию РФ [12]. JEV является причиной энцефалитов, абортов и мертворождений у свиней, а также серьезной проблемой здравоохранения в странах Азии, так как при пассировании через этих животных может происходить увеличение вирулентности возбудителя [13]. На территории РФ одновременно циркулирует несколько флавивирусов, и некоторые из них имеют перекрывающиеся географические ареалы: TBEV (европейский, сибирский, дальневосточный субтипы на одноименных территориях), появляются (филогенетически идентифицируются) новые субтипы TBEV; вирус Омской геморрагической лихорадки (Omsk hemorrhagic fever virus, OHFV, антигенный комплекс TBEV) в Омской, Тюменской, Оренбургской, Курганской областях; JEV и вирус Повассан (POWV) на Дальнем Востоке. ЛЗН была занесена перелетными птицами из Африки на побережье Каспийского моря, где сформировались стойкие природные очаги по типу: птицы — вирус — комар — дикие и домашние животные [1]. В 2016 г. циркуляция (обнаружение маркеров) WNV в носителях выявлена в 10 субъектах РФ, а наличие специфических IgG антител у здоровых групп населения в 30 территориальных субъектах. В 2017 г. в США случаи WNV стали единичными, а на территории стран членов Европейского Союза, в России и Канаде наоборот наметилась тенденция к росту заболеваемости населения [9]. ZIKV и DENV попадают в нашу страну с заболевшими туристами, возвращающимися из эндемичных территорий.

Флавивирусы вызывают у человека болезни от бессимптомных форм и легких лихорадок до геморрагических проявлений и неврологических расстройств в виде энцефалита, менингита, менингоэнцефалита и миелита. Геморрагическая форма лихорадки денге (ЛД) с высокой летальностью (до 50%) развивается у 20—25% заболевших [1, 4, 14]. Описано внутриутробное инфицирование для ZIKV, DENV и WNV. При трансфузии также есть вероятность заражения этими патогенами. При заражении ZIKV у взрослых людей может развиться острая иммуноопосредованная полирадикулоневропатия (синдром Гийена-Барре). При внутриутробном инфицировании ZIKV у плода развивается микроцефалия [15].

Проблемы разработки профилактических препаратов

В настоящее время основным подходом для профилактики вирусных инфекций является использование вакцин. Однако в случае с флавивирусами этот подход имеет ограниченную эффективность. Прямая аттенуация большинства флавивирусов невозможна из-за их высокой нейровирулентности для человека. Единственной лицензированной вакциной с живым флавивирусом является широко используемая вакцина на основе аттенуированного штамма 17D YFV, который был получен при серийном пассировании штамма Asibi дикого типа YFV в тканях куриного эмбриона [16]. Создано ограниченное

число разрешенных к применению инактивированных вакцин против JEV и TBEV. При конструировании и исследовании кандидатных вакцин против флавивирусов было установлено, что их защитная эффективность в большинстве случаев опосредуется индуцированными антителами, специфичными к домену III структурного гликопротеина E [17]. Одним из основных подходов для борьбы с вирусными инфекциями является использование сывороточной терапии. Однако для флавивирусов этот подход также имеет ряд ограничений. Сырьевая база для получения специфических иммуноглобулинов из препаратов донорской крови всегда ограничена [12]. Большой проблемой является феномен антитело-зависимого усиления инфекции (antybody-dependent enhancement (ADE)), характерный для некоторых флавивирусных инфекций [18—20].

Получение моноклональных антител

Одним из главных компонентов защитного иммунитета против любой инфекции являются поликлональные сывороточные антитела, нейтрализующие патоген. Они выполняют свои биологические функции через сложную смесь моноклональных антител (МКА) [20]. Получение мышиных МКА с необходимыми для исследователей характеристиками стало возможным после разработки гибридомной технологии в 1975 г. [21]. Использование гибридомных мышиных МКА для терапии ограничено вследствие их высокой иммуногенности и неспособности выполнять эффекторные функции в организме человека. Эти недостатки в значительной степени устраняются созданием рекомбинантных химерных (мышь/человек) или даже полностью «очеловеченных» гуманизированных МКА [22]. Для разработки потенциально терапевтических препаратов выбирают исходное «родительское» МКА, обладающее высокой нейтрализующей активностью *in vitro* на чувствительных культурах клеток и желательно *in vivo* на животных моделях [12, 23—26]. В последние годы активно развиваются новые технологии по созданию рекомбинантных МКА с использованием В-клеток периферической крови переболевших людей [27—30].

МКА, специфичные к YFV

Отличительной особенностью YFV является то, что против него создана эффективная живая аттенуированная вакцина. Это, с одной стороны, снижает актуальность получения специфичных МКА, а с другой стороны, дает удобный инструмент для индукции гуморального иммунитета. Использование вакцинного штамма снижает требования к уровню биобезопасности работ, значительно снижая стоимость работ и трудозатраты. В настоящее время описаны МКА против YFV, полученные на основе разнообразия иммуноглобулинов мышей [31] и людей, иммунизированных вакциной 17D-20, мышей, иммунизированных французской нейротропной вакциной (FNV), и мышей, иммунизированных штаммом дикого типа (WT) Asibi, что позволяет дифференцировать эпитопы на белке E, специфичные для вакцины и натуральной инфекции. FNV была получена из штамма вируса французского YF дикого типа, параллельно разработанного с 17D, но ее применение было прекращено из-за поствакцинальных серьезных побочных эффектов (SAE), в частности, энцефалита [32]. Мышиный гуморальный иммунитет к YFV обычно направлен на домен III белка E, тогда как исследования реакции человека на YFV подтверждают, что человеческие антитела чаще всего направлены на домен II белка E [31].

На модели инбредных мышей линии AG129, дефицитных по рецепторам интерферона α и β, было показано, что гуманизированные МКА, полученные на основе IgG, обладают большей эффективностью профилактики и терапии при лихорадке YFV по сравнению с МКА на основе IgM **(таблица)**. В частности, на основе YFV-реактивного мышиного антитела класса IgG — 2C9 были разработаны химерные МКА человека/мыши, способные защищать мышей от летальной инфекции YFV [33].

Согласно информации ClinicalTrials.gov, один препарат на основе моноклонального антитела TY014, разработанного компанией Tychan (Сингапур), находится в фазе I клинических испытаний [34]. TY014 способно нейтрализовать широкий спектр штаммов YFV за счет связывания с эпитопом в составе белка E вируса [35] **(см. таблицу)**.

МКА, специфичные к DENV

С использованием панели из 15 мышиных МКА, специфичных к DENV2, было показано, что эпитопы протективных антител в основном входят в состав домена III белка E. Эти результаты дали первые прямые доказательства того, что домен III белка E флавивирусов содержит первичный рецептор-связывающий мотив. На основе выявленной биологической активности МКА была составлена карта эпитопов этого домена. Оказалось, что в районах 1-120, 1-400 и 300-400 аминокислотных остатков (а.о.) локализованы пространственно-независимые эпитопы, вызывающие синтез антител, обладающих наиболее высокой нейтрализующей активностью в отношении вируса и блокирующих гемагглютинацию. С помощью синтетических пептидов для одного из МКА (10A4D-2) была проведена точная локализация эпитопа, в районе 333-351 а.о. [36]. Результаты эпитопного картирования иммунодоминантного антигена — белка E с помощью рекомбинантных белков или пептидов, моделирующих разные участки его а.о., а также препаратов двух сотен мышиных МКА, специфич-

Таблица. **Моноклональные антитела против флавивирусов, обладающие терапевтическим потенциалом**

Антитело	Происхождение	Вирус — мишень	Эпитоп — мишень*	Этап разработки/испытания (модель)**	Проверка на эффект ADE	Источник
2C9	Химерные (гуманизированные) мышь/человек	SLEV/ YFV	1	1	Не проверяли	[33]
TY014	Человеческие	YFV	Неизвестно	1	Неизвестно	[34]
E105, E106	Мышиные	DENV1	3	1	Не проверяли	[37]
2A10G6	Мышиные	DENV1-4, WNV, ZIKV, YFV, TBEV	7	1	Проверяли	[39,76]
4F11	Химерные мышь/человек	DENV1-4	2 (район 296-400 а.о.)	1	Проверяли	[26]
513	Гуманизированные человеческие	DENV1-4	1	1	Проверяли	[40]
5H2 deltaD	Гуманизированный вариант МКА шимпанзе	DENV1-4	1	1, 2	Проверяли	[28]
1C19	Человеческие	DENV1-4	6 (петля BC)	1	Проверяли	[27]
2D22	Человеческие	DENV2	2	1	Проверяли	[45]
HM14c10	Человеческие	DENV1	5	1	Проверяли	[46]
DB32-6	Мышиные, гуманизированные	DENV2	2 (309-311 а.о.)	1	Проверяли	[47]
AV-1	Человеческие	DENV	Неизвестно	1	Неизвестно	[49]
Fabs B2	Гуманизированный вариант МКА шимпанзе	JEV	6	1	Не проверяли	[51]
Fc9E2	Химерные мышь/человек	WNV	2 (район 260 — 466 а.о.)	1	Не проверяли	[24,52]
E16	Химерные мышь/человек	WNV	3	1, 3	Проверяли	[55, 77]
MGAWN1, hE16	Гуманизированные	WNV	Неизвестно	2	Неизвестно	[58,79]
CR4374	Человеческие	WNV	2	1	Не проверяли	[29]
CR4354	Человеческие	WNV	4	1	Не проверяли	[29,61]
CR4348	Человеческие	WNV	6	1	Не проверяли	[29,61]
ZV54	Химерные мышь/человек	ZIKV	3	1	Проверяли	[67]
ZV67	Химерные мышь/человек	ZIKV	3	1	Проверяли	[67]
ZIKV-117	Человеческие	ZIKV	5	1	Не проверяли	[30]
EDE1-B10	Человеческие	DENV/ZIKV	5	1	Проверяли	[78]
Z23	Человеческие	ZIKV	2	1	Не проверяли	[69]
Z3L1	Человеческие	ZIKV	4	1	Не проверяли	[69]
Z004	Человеческие	ZIKV/DENV	3	1	Не проверяли	[70]
ZK2B10	Человеческие human	ZIKV	2	1	Проверяли	[20]
m301 m302	Человеческие	ZIKV	2	1	Не проверяли	[71]
FIT-1	Человеческие биспецифические	ZIKV	6/2	1	Проверяли	[72]
Tyzivumab	Неизвестно	ZIKV	Неизвестно	1	Неизвестно	[73]
AA12	Человеческие	ZIKV	8	1	Проверяли	[75]

Примечание. Таблица дополнена и составлена на основе данных [37]: *1 — белок E; 2 — домен III белка E; 3 — боковой гребень домена III белка E; 4 — шарнир между доменами I и II белка E; 5 — четвертичный эпитоп на внутренней стороне поверхностей соседних двух димеров белка E; 6 — домен II белка E; 7 — петля слияния домена II белка E; 8 — белок NS1. **1 — преклинические испытания на мышах; 2 — на обезьянах; 3 — на хомяках.

ных к DENV, подтвердили, что большинство нейтрализующих видоспецифичных антител направлены к домену III белка E, а группореактивные МКА (т.е. специфичные к нескольким вирусам одной антигенной группы) в первую очередь распознают высококонсервативные участки а.о. в петле слияния домена II этого белка [4]. Рентгеноструктурный анализ эпитопов белка E также показал, что антигенные детерминанты, вызывающие синтез нейтрализующих антител, локализованы в разных областях домена III белка E. Пять мышиных МКА проявляли нейтрализующую активность *in vitro* на культурах клеток Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) и BHK21 (клетки почки новорожденного сирийского хомячка) в концентрации 5 нг/мл против всех 5 генотипов серотипа DENV1. Два МКА (DENV1-E105 и DENV1-E106) при введении профилактической разовой дозы антител 500 мкг/мышь

за сутки до внутриутробного заражения препаратом DENV1 с инфекционным титром 10^6 БОЕ/мл защищали от гибели инбредных мышей линии C57BL/6, иммунодефицитных по нескольким иммунологическим параметрам (например, с недостаточностью антителообразования) [37], что позволяет отнести их к группе потенциально терапевтических [38] **(см. таблицу)**.

При иммунизации мышей термически инактивированным DENV2 при помощи гибридомной технологии был получен ряд МКА. Одно из полученных МКА, 2A10G6, распознающее высококонсервативный мотив 98DRXW101 а.о. в составе домена II белка E, оказалось способно нейтрализовать не только DENV 4 серотипов, но и другие патогенные для человека флавивирусы, такие как ZIKV, YFV, WNV, JEV и TBEV [39]. Результаты исследований МКА 2A10G6 *in vitro* на культуре клеток BHK21 и *in vivo* при внутрибрюшинном заражении мышей линии AG129 показали их потенциально терапевтические свойства [36, 37] **(см. таблицу)**.

На основе нуклеотидных последовательностей, кодирующих вариабельные домены тяжелой и легкой цепей мышиных МКА 4F11, нейтрализующих все 4 серотипа DENV, были получены рекомбинантные химерные Fab-фрагменты антител. Кристаллографический анализ комплексов МКА с доменом III белка E позволил выявить эпитоп в районе 296-400 а.о., который является детерминантой перекрестной активности для всех серотипов DENV. Препарат химерных МКА 4F11 не вызывал эффекта ADE на линии клеток гепатокарциномы человека (Huh7) при их инфицировании DENV2 [26]. На основе МКА 4F11 в 2 этапа было создано гуманизированное МКА 513, которое в настоящее время проходит I фазу клинических испытаний [40] **(см. таблицу)**.

Для поиска антител 1A5 и 5H2 использовали аффинную селекцию из фаговой библиотеки Fab-фрагментов, полученной на основе костного мозга шимпанзе, подкожно инфицированного одновременно четырьмя серотипами DENV (с инфекционным титром каждого вируса — 10^6 БОЕ/мл). Гуманизированные МКА 1A5 класса IgG, специфичные к последовательности а.о. петли слияния домена II белка E, способны нейтрализовать 500 БОЕ/мл всех 4 серотипов DENV и WNV в концентрации: 0,48 и 0,95 мкг/мл на культуре клеток Vero для DENV1 и DENV2, от 3,2 до 4,2 мкг/мл для DENV3, DENV4 и WNV, соответственно [41]. Гуманизированные МКА 5H2 при внутрибрюшинном введении в концентрации 20 мкг/мышь на 50% защищали 4-суточных сосунков линии Balb/c (с нормальной иммунной системой) от инфекции при заражении их 25-кратной 50% летальной дозой (LD50) нейровирулентного штамма H241 DENV4. Взрослые обезьяны вида *Macaca mulatta,* которые получили препарат МКА 5H2 (вариант deltaD с делециями а.о. в Fc-регионе) внутривенно в концентрации 2 мг/кг массы тела за сутки до подкожного инфицирования, оказались полностью защищены от летальной инфекции, вызванной DENV4, с отсутствием виремии [28].

Изучение специфичности рекомбинантных человеческих МКА, полученных на основе мРНК периферических мононуклеаров (плазматических клеток) 8 пациентов, показало что их предпочтительной мишенью является петля слияния домена II либо эпитопы на стыке второго и третьего доменов [42].

МКА 1C19, найденное на основе иммунного разнообразия антител пациента после вторичной инфекции DENV, взаимодействует с уникальным эпитопом (петля BC), имеющимся у всех серотипов DENV. Для получения этого МКА была использована иммортализация B-лимфоцитов с использованием вируса Эпштейна-Барр, включающая инфицирование вирусом EB популяции B-лимфоцитов и культивирование в течение 4 недель линий лимфобластоидных клеток, являющихся потомством единичных B-лимфоцитов [43]. Эпитоп МКА 1C19 расположен в домене II белка E и состоит из 3 а.о. — G78, E79, R73 [27]. МКА 1C19 можно отнести к потенциально терапевтическим **(см. таблицу)**, так как они способны уменьшать репликацию DENV2 при относительно низкой дозе — 20 мкг на одно животное (приблизительно 0,8 мг/кг массы тела) при исследовании на мышах линии AG129 [27, 36].

Кристаллографический анализ Fab-фрагментов рекомбинантного человеческого МКА 1A1D-2, нейтрализующего 3 серотипа DENV *in vitro* на культуре клеток Vero при 37 °C, позволил обнаружить, что вирус находится в динамическом состоянии, кратковременно открывая скрытые эпитопы на домене III в 2 из 3 молекул белка E в каждом из 60 икосаэдрических единиц [44]. Нейтрализующие рекомбинантные МКА 2D22, полученные после иммортализации вирусом Эпштейна-Барр B-клеток человека с первичной инфекцией DENV2 по данным криоэлектронной микроскопии, блокируют $^2/_3$ молекул белка E. Введение препарата МКА 2D22 иммунодефицитным мышам линии AG129 за 24 ч до или после инфицирования в концентрации 20—50 мкг/мышь позволяло предотвратить развитие летального заболевания этих животных и не вызывало эффекта ADE [45]. Показано, что препарат рекомбинантного человеческого МКА HM14c10, специфичного в отношении конформационного эпитопа, образованного внутренней стороной поверхности двух соседних димеров белка E DENV1, обладает противовирусной активностью при пикомолярных концентрациях и может рассматриваться в качестве потенциально терапевтического [46] **(см. таблицу)**. Использование VLPs, несущих на своей поверхности аналоги вирусных белков DENV2, а также фаговой пептидной библиотеки, позволило картировать эпитоп нейтрализующего МКА DB32-6, узнающего домен III белка E и не обладаю-

щего эффектом ADE. Препараты МКА обеспечивали защиту аутбредных мышей линии ICR от летальной дозы DENV2 (10^5 БОЕ/мл) при их внутрибрюшинном инфицировании **(см. таблицу)** [47].

При исследовании более 300 человеческих МКА, специфичных к DENV, было обнаружено, что в отличие от репертуара мышиных МКА, в основном специфичных к домену III, среди человеческих преобладают антитела, специфичные в отношении домена II белка E [4]. Для конструирования биспецифического МКА, способного одновременно нейтрализовать рецепторно-связывающий эпитоп на домене III (305-312 а.о.) и петлю слияния на эпитопе II белка E (98, 99 и 101 а.о.) всех 4 серотипов DENV без эффекта ADE [48], были использованы 2 человеческих рекомбинантных МКА, каждое из которых моноспецифично к одному из этих эпитопов — 1A1D [44] и 2A10G6 [39]. В результате полученное биспецифическое МКА сохранило антигенсвязывающую активность обоих родительских антител. Было продемонстрировано, что МКА оказалось значительно более эффективно при нейтрализации DENV, чем его родительские антитела, как *in vitro*, так и *in vivo*, и даже лучше, чем их комбинация [48].

По данным Clinical Trials.gov, одно человеческое моноклональное антитело AV-1 проходит клинические испытания в качестве средства противодействия лихорадки денге [49] **(см. таблицу)**.

МКА, специфичные к JEV

Показано, что культивирование *in vitro* двух индийских штаммов JEV (733913 и 755468, изолированных от людей) в присутствии мышиных нейтрализующих МКА, приводило к изменениям эпитопного профиля вирусных белков [50].

Fab-фрагменты JEV-специфических антител были отобраны из фаговой библиотеки антител, полученной на основе репертуара В-клеток шимпанзе, предварительно иммунизированных инактивированным вирусом, а затем препаратом аттенуированного штамма. Из 11 МКА три, названные как Fabs A3, B2 и E3, обладали особенно высокой нейтрализующей активностью *in vitro* на культуре клеток Vero и реагировали с конформационными эпитопами, состоящими из а.о. трех доменов (I, II и III) гликопротеина E. Основной детерминантой для Fab A3 были а.о. — Lys (179) (домен I), для Fab B2 — Ile (126) (домен II), а для Fab E3 — Gly (302) (домен III), соответственно, что может указывать на различные механизмы нейтрализации вируса антителами. Гуманизированные версии нейтрализующих обезьяньих МКА, полученные при помощи транзиентной экспрессии в клетках 293T (культура клеток почки эмбриона человека), также были высоко активны на модели энцефалита у 4-недельных инбредных мышей линии ddy при их инфицировании JEV. Наиболее эффективным среди них был Fab B2, который обеспечивал 50%-ную защиту при концентрации 0,84 мкг, затем Fab A3 (5,8 мкг) и Fabs E3 (24,7 мкг). Введение 200 мкг/мышь Fab B2 через сутки после введения смертельной дозы JEV обеспечило 50% защиту (от общего количества животных) и значительно продлевало среднее время выживания по сравнению с мышами в контрольной группе, что указывает на терапевтический потенциал этих антител [51].

МКА, специфичные к WNV

МКА 9E2, способное с высокой эффективностью нейтрализовать WNV, было получено при помощи гибридомной технологии [52]. Мишенью этого антитела является эпитоп в составе домена III поверхностного белка E. На основе вариабельных цепей мышиного МКА 9E2 удалось сконструировать одноцепочечное антитело scFv9E2 и химерное МКА Fc9E2 мышь/человек, которые сохранили специфичность и нейтрализующую активность «родительского» МКА *in vitro* [24].

С использованием гибридомной технологии удалось получить еще одно антитело, E16, эффективно нейтрализующее WNV. Химерное (мышь/человек) МКА E16 при однократном введении в дозе 100 мкг мышам линии C57BL/6J обладало терапевтическим эффектом [53, 54]. Показано, что Fab-фрагмент МКА E16 связывается с эпитопом, состоящим из 16 а.о., расположенных в 4 петлях домена III гликопротеина E. Этот эпитоп представлен на поверхности зрелого вириона и МКА E16 при взаимодействии блокирует конформационные перестройки белка E, необходимые для прикрепления к клетке [55]. С использованием МКА E16 [53] и мышиных МКА E53, специфичных к труднодоступному эпитопу в петле слияния домена II белка E зрелого вириона [56], а также сывороток крови людей, вакцинированных рекомбинантной вакциной против WNV, было показано, что активность нейтрализующих антител зависит от количества иммуноглобулиновых молекул на один вирион (антител должно быть не менее 30), а также от времени и температуры, влияющих на сродство антител к эпитопу [57]. На основе МКА E16 было создано рекомбинантное гуманизированное МКА MGAWN1, которое прошло 1 фазу клинических исследований на людях [58—60].

Более 120 человеческих МКА, специфичных в отношении белка E, были получены при помощи технологии фагового дисплея на основе разнообразия антител лимфоцитов сыворотки крови 3 пациентов, переболевших ЛЗН [29]. Методом конкурентного ИФА было определено, что из E-специфичных МКА 47% и 8% узнают домен II и домен III этого белка соответственно. Анализ репертуара человеческих МКА, синтезированных в течение естественной инфекции, показал, что преобладают не нейтрализующие

или слабо нейтрализующие антитела, узнающие домен II, в то время как МКА, связывающие домен III и способные с высокой эффективностью нейтрализовать вирус *in vitro* и *in vivo* (на мышах), встречаются очень редко [61]. Три человеческих МКА (CR4374, CR4354 и CR4348) нейтрализовали WNV (штамм NY-99), блокируя эпитопы на интактных вирионах *in vitro* на клетках Vero и BHK-21. Введение МКА в концентрации 50 мкг/мышь 4-недельным аутбредным мышам линии Swiss за сутки до инфицирования способствовало полной защите животных от гибели [29, 57].

Недавно группа исследователей из США [63] выделила 10 МКА от людей, инфицированных WNV. Антитело WNV-86 нейтрализовало WNV с 50%-ной ингибирующей концентрацией (IC50) 2 нг/мл. WNV-86 распознает эпитоп в составе домена II поверхностного белка E и предпочтительно взаимодействует со зрелыми вирионами, лишенными нерасщепленной формы мембранного белка (prM), в отличие от большинства специфических для флавивируса антител.

Анализ результатов нескольких исследований по антигенной структуре WNV [53, 55, 64] показал, что эпитопы на петле домена III гликопротеина E (а.о. в позициях 302-309 и 330-333) играют доминирующую роль в нейтрализации вируса.

Также в литературе описаны мышиные антитела 3C7 и 4D1, которые нейтрализуют WNV, связываясь при этом с белком NS1. Используя фаговые пептидные библиотеки, определили эпитопную специфичность этих антител. Анализ позволил выявить 2 линейных эпитопа, узнаваемых этими МКА 3C7 и 4D1, — 896TATTEK901 и 925VVDGPETKEC934 соответственно. Найденные пептиды взаимодействовали в иммуноблоттинге с антителами сывороток крови лошадей, переболевших WNV, что может говорить об их иммуногенности во время естественной инфекции [65]. Из 22 мышиных МКА, полученных к рекомбинантному белку NS1 WNV, 4 защищали 6-недельных мышей линии C57BL/6 при введении антител до заражения. Выживаемость составила от 75 до 95% в зависимости от концентрации МКА. Вирусологический анализ показал, что одно МКА 17NS1 защищало животных на ранней стадии инфекции через C1q-комплементнезависимый и Fcγ рецепторзависимый пути, а другое МКА 14NS1 — только через C1q-комплементнезависимый путь. Эти данные свидетельствуют о том, что различные области неструктурного белка NS1 могут вызывать протективный гуморальный иммунитет против WNV при помощи различных механизмов [66].

МКА, специфичные к TBEV

Полноразмерные химерные (мышь/человек) МКА 14D5, специфичные к домену III белка E TBEV, в концентрации 10 мг/мышь на 100% защищали мышей-подростков линии Balb/c (масса тела 10 г) от 240 LD50 при введении через 24 ч после заражения их TBEV. Кроме того, протективная активность химерных МКА была выше по сравнению с активностью лицензированного препарата человеческих IgG, используемых для профилактики и лечения клещевого энцефалита [12]. Результаты по нейтрализации TBEV *in vitro* на культуре клеток Vero показали, что характеристики химерных одноцепочечных МКА13D6 аналогичны «родительским» мышиным гибридомным МКА, специфичным к нативному белку E TBEV. Это позволяет предположить, что одноцепочечное МКА13D6 можно использовать для профилактики и терапии клещевого энцефалита [25].

МКА, специфичные к ZIKV

Рекомбинантные химерные (мышь/человек) МКА ZV54 и ZV67, специфичные к 3 пространственно удаленным эпитопам домена III, *in vitro* не вызывали эффекта ADE на культуре опухолевых клеток человека (K562), а также нейтрализовали африканские, азиатские и американские штаммы ZIKV на культуре клеток Vero. Химерные антитела при внутрибрюшинном введении в концентрации 250 мкг/мышь за сутки до заражения мышей линии C57BL/6 (возраст 4—5 недель) оказались способны защитить животных от подкожного инфицирования ZIKV. Для заражения использовали дозу 10^5 БОЕ/мл штамма Dakar, адаптированного к мышам [67] **(см. таблицу)**.

Внутрибрюшинное введение беременным мышам линии C57BL/6 сыворотки крови человека, переболевшего лихорадкой Зика, способствовало подавлению репликации ZIKV [68]. Ряд антител, нейтрализующих ZIKV, был получен после сортировки B-клеток переболевшего человека с их последующей трансформацией вирусом Эпштейна-Барр. На основе последовательностей, кодирующих вариабельные домены антител, показавших нейтрализацию, были получены рекомбинантные человеческие МКА. Одно из МКА, ZIKV-117, обладающее наибольшей широтой нейтрализации штаммов ZIKV, оказалось специфичным к уникальному эпитопу на внутренней стороне поверхностей двух соседних димеров белка E [30]. Внутрибрюшинное введение МКА ZIKV-117 (100 мкг/мышь до заражения или 250 мкг/мышь после заражения) способствовало защите беременных и небеременных мышей линии C57BL/6 от инфицирования при подкожном введении 10^3 БОЕ/мл адаптированного к мышам ZIKV, штамм Dakar. Было отмечено уменьшение патологии тканей, отсутствие плацентарной и фетальной инфекции и смертности мышей [69], что позволяет считать МКА ZIKV-117 потенциально терапевтическим **(см. таблицу)**. Рекомбинантное человеческое МКА EDE1-B10, специфичное к эпитопу на внутренней стороне поверхностей двух

соседних димеров белка Е, нейтрализовало *in vitro* на культуре клеток Vero 2 вируса (DENV и ZIKV) и не вызывало эффекта ADE на культуре клеток миеломоноцитарного лейкоза (U937). На 4-5-недельных мышах линии C57BL/6 показана его способность защищать от ZIKV (штамм Dakar в титре 10^3 БОЕ/мл при подкожном инфицировании в подушечки лап) [68]. Полученные результаты позволяют отнести это МКА к ряду потенциально терапевтических **(см. таблицу)**.

Резкий подъем заболеваемости ZIKV в 2015 г. в Южной и Центральной Америке стал стимулом разработки большого числа моноклональных антител против этого инфекционного агента. По данным авторов [38], целый ряд таких антител обладают терапевтическим потенциалом: МКА Z23 и Z3L1, специфичные в отношении конформационных эпитопов, образуемых а.о. доменов I, II и III гликопротеина E ZIKV [69]; МКА Z004, специфичные в отношении участка бокового гребня домена III белка Е [70]; МКА ZK2B10, взаимодействующие с доменом III белка Е [20]; МКА m301 и m302, специфичные в отношении криптического эпитопа в составе домена III в C-C' петле белка Е [71] **(см. таблицу)**. Биспецифическое рекомбинантное МКА FIT-1 сохраняло высокие потенции двух «родительских» нейтрализующих человеческих МКА ZKA190 и ZKA185, специфичных к домену III и II, соответственно, *in vitro* на культуре клеток Vero и *in vivo* на мышах линии A129 (с фенотипом *IFN- α/β* рецептор$^{-/-}$), предотвращали образование вирусных мутантов, ускользающих от нейтрализующего действия антител, и не являлись причиной ADE при исследовании на культуре клеток K562 [72]. За исключением одного МКА, Tyzivumab, которое в настоящее время проходит тестирование на безопасность в клинических испытаниях фазы I [73], большинство вышеперечисленных МКА находятся на стадии доклинических исследований [74].

Недавно описано получение рекомбинантных человеческих МКА AA12, специфичных к белку NS1. Препарат МКА не вызывал эффекта ADE *in vitro* на культуре клеток K562. В концентрации 10—20 мг/кг массы тела это антитело защищало мышей линии B6. 129 генотипа *Stat2-/-*, иммунодефицитных по рецептору γ интерферона, от летальных доз африканских и азиатских штаммов ZIKV при введении за 2 ч до заражения. При этом в контрольной группе инфицированных животных наблюдались симптомы от паралича передних или задних лап до летального исхода. Это исследование также подчеркивает важность секреторного белка NS1 в качестве потенциального антигена для разработки вакцины против флавивирусов [75].

Заключение

На основании анализа данных литературы можно сделать вывод, что основной мишенью протективных антител против флавивирусов является поверхностный белок Е. Иммунный ответ на этот вирусный белок неоднородный, можно выделить ряд иммунодоминантных областей. Одним из главных регионов, вызывающих синтез нейтрализующих антител, является домен III. Тем не менее описаны моноклональные антитела, способные нейтрализовать флавивирусы за счет взаимодействия с эпитопами, входящими в состав доменов II и I. Мишенью протективных антител в некоторых случаях может выступать белок NS1. Несмотря на существование феномена ADE для флавивирусов, разработан ряд терапевтических препаратов на основе моноклональных антител, которые в настоящий момент проходят доклинические и клинические испытания. Описанный для флавивирусов феномен широко нейтрализующих антител дает надежду на создание в будущем универсальных высокоэффективных терапевтических препаратов для борьбы с этими патогенами.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Львов Д.К., Алексеев К.П., Алимбарова Л.М., Алипер Т.И., Альховский С.В., Андронова В.Л., и др. *Руководство по вирусологии.* М.: Медицинское информационное агентство; 2013.
L'vov DK, Alekseev KP, Alimbarova LM, Aliper TI, Al'khovskii SV, Andronova VL, et al. *Virology Guide.* M.: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2013. (In Russ.).
2. Grard G, Moureau G, Charrel RN, Holmes EC, Gould EA, de Lamballerie X. Genomics and evolution of Aedes-borne flaviviruses. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 1):87-94. https://doi.org/10.1099/vir.0.014506-0
3. Международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Ссылка активна на 55.05.20.
Mezhdunarodnyj komitet po taksonomii virusov (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Ssylka aktivna na 05.05.20. (In Russ.). https://talk.ictvonline.org/taxonomy
4. Tsai WY, Lin HE, Wang WK. Complexity of Human Antibody Response to Dengue Virus: Implication for Vaccine Development. *Front Microbiol.* 2017;8:1372. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01372
5. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29:487-524. https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15
6. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Пак В.А., Бородай Н.В., Жуков К.В., Мананков В.В., и др. Эпидемическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2014 г. в мире и на территории Российской Федерации и прогноз ее развития в 2015 г. *Проблемы особо опасных инф.* 2017;1:29-36.
Putinceva EV, Smeljanskij VP, Pak VA, Borodaj NV, Zhukov KV, Manankov VV, et al. The epidemic situation of West Nile fever in 2014 in the world and on the territory of the Russian Federation and the forecast for its development in 2015. *Problemy osobo opasnykh inf.* 2015;1:29-36. (In Russ.).

7. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Бородай Н.В., Мананков В.В., Ткаченко Г.А., Шпак И.М. и др. Лихорадка Западного Нила в 2015 г. в мире и на территории Российской Федерации. Прогноз развития эпидемической ситуации в 2016 г. *Проблемы особо опасных инф.* 2016;1.
Putintseva EV, Smelyanskiy VP, Boroday NV, Manankov VV, Tkachenko GA, Shpak IM, et al. Fever West Nile in 2015 in the world and on the territory of the Russian Federation, a forecast of the Situation in 2016. *Problemy osobo opasnykh inf.* 2017;1:29-36. (In Russ.).
https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-33-39

8. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Бородай Н.В., Алексейчик И.О., Шахов Л.О., Ткаченко Г.А. и др. Лихорадка Западного Нила в 2016 г. в мире и на территории Российской Федерации, прогноз развития ситуации в 2017 г. *Проблемы особо опасных инф.* 2017;1:29-36.
Putintseva EV, Smelyanskiy VP, Boroday NV, Alekseychik IO, Shakhov LO, Tkachenko GA, et al. Fever West Nile in 2016 in the world and on the territory of the Russian Federation, a forecast of the Situation in 2017. *Problemy osobo opasnykh inf.* 2017;1:29-36. (In Russ.).
https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-1-29-36

9. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Алексейчик И.О., Бородай Н.В., Чеснокова С.Н., Алиева А.К. и др. Итоги мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в 2017 г. на территории Российской Федерации. Прогноз развития ситуации в 2018 г. в России. *Проблемы особо опасных инф.* 2018;1.
Putinceva EV, Smeljanskij VP, Aleksejchik IO, Borodaj NV, Chesnokova SN, Alieva AK, et al. Results of Monitoring over the West Nile Fever Pathogen in the Territory of the Russian Federation in 2017. Forecast of Epidemic Situation Development in Russia in 2018. *Problemy osobo opasnykh inf.* 2018;28(1):56-62. (In Russ.).
https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-56-62

10. Alekseychik IO, Putintseva E V., Smelyansky VP, Boroday NV, Alieva AK, Agarkova EA, et al. Peculiarities of the Epidemic Situation on West Nile Fever in the Territory of the Russian Federation in 2018 and Forecast of its Development in 2019. *Probl Part Danger Infect*. 2019;2019(1):17-25.
https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-1-17-25

11. Центр по контролю и профилактике заболеваний (Centers for disease control and prevention, CDC). Ссылка активна на 05.05.20.
Centr po kontrolyu i profilaktike zabolevanij (Centers for disease control and prevention, CDC). Ssylka aktivna na 05.05.20 (In Russ.).
https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata2019/index.html

12. Байков И.К. *Разработка и изучение рекомбинантных антител против вируса клещевого энцефалита*: Дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск. 2015.
Baikov I.K. *Razrabotka i izuchenie rekombinantnykh antitel protiv virusa kleshchevogo entsefalita:* Dis. ... kand. med. nauk. Novosibirsk. 2015. (In Russ.).

13. Li Y, Hou L, Ye J, Liu X, Dan H, Jin M, et al. Development of a convenient immunochromatographic strip for the diagnosis of infection with Japanese encephalitis virus in swine. *J Virol Methods*. 2010;168(1-2):51-56.
https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.04.015

14. Сайфуллин М.А. *Клинико-лабораторная характеристика завозных случаев лихорадки денге:* Дис. ... канд. мед. наук. М. 2017. Электронная библиотека диссертаций. Ссылка активна на 09.09.19.
Saifullin MA. *Kliniko-laboratornaya kharakteristika zavoznykh sluchaev likhoradki denge:* Dis. ... kand. med. nauk. M. 2017. Elektronnaya biblioteka dissertatsii. Accessed September 9, 2019. (In Russ.).
https://www.dissercat.com/content/kliniko-laboratornaya-kharakteristika-zavoznykh-sluchaev-likhoradki-denge

15. Sikka V, Chattu VK, Popli RK, Galwankar SC, Kelkar D, Sawicki SG, et al. The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *J Glob Infect Dis*. 2016;8(1):3-15.
https://doi.org/10.4103/0974-777X.176140

16. Fox JP, Fonseca da Cunha J, Kossobudzki SL. Additional observations on the duration of humoral immunity following vaccination with the 17D strain of yellow fever virus. *American journal of hygiene.* 1948;47(1):64-70.
https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119186

17. Durbin A, Wilder-Smith A. An update on Zika vaccine developments. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16(8):781-787.
https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1345309

18. Морозова О.В., Исаева Е.И., Вязов С.О. Новые подходы к лечению флавивирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2015;60(6):5-9. Ссылка активна на 05.05.20.
Morozova OV, Isayeva EI, Vjazov SO. New approaches to the treatment of flavivirus infections. *Voprosy virusologii*. 2015;60(6):5-9. Accessed September 9, 2019. (In Russ.).
https://cyberleninka.ru/article/v/novye-podhody-k-lecheniyu-flavivirusnyh-infektsiy

19. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(28):7852-7857.
https://doi.org/10.1073/pnas.1607931113

20. Yu L, Wang R, Gao F, Li M, Liu J, Wang J, et al. Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection. *JCI Insight*. 2017;2(12):1-16.
https://doi.org/10.1172/jci.insight.93042

21. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-497.
https://doi.org/10.1038/256495a0

22. Деев С.М., Поляновский О.Л. Моноклональные антитела для диагностики и терапии. *Биотехнология*. 2008;2:3-13.
Deev SM, Polyanovsky OL. Monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Biotekhnologiya*. 2008;2:3-13. (In Russ.).

23. Николенко Г.Н. *Создание рекомбинантных антител против вируса клещевого энцефалита и изучение их свойств:* Дис. ... канд. мед. наук. Кольцово. 1999. Ссылка активна на 09.09.19.
Nikolenko GN. *Sozdanie rekombinantnykh antitel protiv virusa kleshchevogo entsefalita i izuchenie ikh svoistv:* Dis. ... kand. med. nauk. Kol'tsovo. 1999. Accessed September 9, 2019. (In Russ.).
https://www.dissercat.com/content/sozdanie-rekombinantnykh-antitel-protiv-virusa-kleshchevogo-entsefalita-i-izuchenie-ikh-svoi

24. Pereboev A, Borisevich V, Tsuladze G, Shakhmatov M, Hudman D, Kazachinskaia E, et al. Genetically delivered antibody protects against West Nile virus. *Antiviral Res*. 2008;77(1):6-13.
https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.08.010

25. Levanov LN, Matveev LE, Goncharova EP, Lebedev LR, Ryzhikov AB, Yun TE, et al. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2010;28(32):5265-5271.
https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.060

26. Cockburn JJB, Navarro Sanchez ME, Fretes N, Urvoas A, Staropoli I, Kikuti CM, et al. Mechanism of Dengue Virus Broad Cross-Neutralization by a Monoclonal Antibody. *Structure*. 2012;20(2):303-314.
https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.001

27. Smith SA, de Alwis AR, Kose N, Harris E, Ibarra KD, Kahle KM, et al. The potent and broadly neutralizing human dengue virus-specific monoclonal antibody 1C19 reveals a unique cross-reactive epitope on the bc loop of domain II of the envelope protein. Lipkin WI, ed. *MBio*. 2013;4(6):e00873-13.
https://doi.org/10.1128/mBio.00873-13

28. Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle R. E, et al. Epitope Determinants of a Chimpanzee Dengue Virus Type 4 (DENV-4)-Neutralizing Antibody and Protection against DENV-4 Challenge in Mice and Rhesus Monkeys by Passively Transferred Humanized Antibody. *J Virol*. 2007;81(23):12766-12774.
https://doi.org/10.1128/JVI.01420-07

29. Throsby M, Geuijen C, Goudsmit J, Bakker AQ, Korimbocus J, Kramer RA, et al. Isolation and Characterization of Human Monoclonal Antibodies from Individuals Infected with West Nile Virus. *J Virol*. 2006;80(14):6982-6992.
https://doi.org/10.1128/JVI.00551-06

30. Hasan SS, Miller A, Sapparapu G, Fernandez E, Klose T, Long F, et al. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nat Commun*. 2017;8(1):14722.
https://doi.org/10.1038/ncomms14722

31. Adungo F, Yu F, Kamau D, Inoue S, Hayasaka D, Posadas-Herrera G. et al. Development and characterization of monoclonal antibodies to yellow fever virus and application in antigen detection and IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(8):689-697.
https://doi.org/10.1128/CVI.00209-16

32. Davis EH, Barrett ADT. Structure-Function of the Yellow Fever Virus Envelope Protein: Analysis of Antibody Epitopes. *Viral Immunol*. 2020;33(1):12-21.
https://doi.org/10.1089/vim.2019.0107

33. Thibodeaux BA, Garbino NC, Liss NM, Piper J, Schlesinger JJ, Blair CD, et al. A humanized IgG but not IgM antibody is effective in prophylaxis and therapy of yellow fever infection in an AG129/17D-204 peripheral challenge mouse model. *Antiviral Res*. 2012;94(1):1-8.
https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.001

34. Национальная медицинская библиотека США (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ссылка активна на 05.05.20.
Nacional'naya medicinskaya biblioteka SSHA (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ssylka aktivna na 05.05.20. (In Russ.).
https:clinicalttrials.gov/ct2/show/NCT03776786

35. Tomashek KM, Challberg M, Nayak SU, Schiltz HF. Disease resurgence, production capability issues and safety concerns in the context of an ag-

ing population: Is there a need for a new yellow fever vaccine? *Vaccines*. 2019;7(4).
https://doi.org/10.3390/vaccines7040179

36. Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells Downloaded from http://jvi.asm.org/on December 15, 2014 by INSTITUTO FEDERAL DO TOCANTINS. 2001;75(16):7769-7773.
https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7769

37. Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, Kim T, et al. The Development of Therapeutic Antibodies That Neutralize Homologous and Heterologous Genotypes of Dengue Virus Type 1. Baric RS, ed. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000823.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000823

38. Sun H, Chen Q, Lai H. Development of Antibody Therapeutics against Flaviviruses. *Int J Mol Sci*. 2017;19(1):54.
https://doi.org/10.3390/ijms19010054

39. Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):696-704.
https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.013

40. Wong YH, Kumar A, Liew CW, Tharakaraman K, Srinivasaraghavan K, Sasisekharan R. et al. Molecular basis for dengue virus broad cross-neutralization by humanized monoclonal antibody. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-17.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-26800-y

41. Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Purcell RH, Lai CJ. Chimpanzee Fab Fragments and a Derived Humanized Immunoglobulin G1 Antibody That Efficiently Cross-Neutralize Dengue Type 1 and Type 2 Viruses. *J Virol*. 2004;78(23):12910-12918.
https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.12910-12918.2004

42. Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Rouvinski A. et al. A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat Immunol*. 2015;16(2):170-177.
https://doi.org/10.1038/ni.3058

43. Omi N, Tokuda Y, Ikeda Y, Ueno M, Mori K, Sotozono C, et al. Efficient and reliable establishment of lymphoblastoid cell lines by Epstein-Barr virus transformation from a limited amount of peripheral blood. *Sci Rep*. 2017;7(1):43833.
https://doi.org/10.1038/srep43833

44. Lok SM, Kostyuchenko V, Nybakken GE, Holdaway HA, Battisti AJ, Sukupolvi-Petty S. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(3):312-317.
https://doi.org/10.1038/nsmb.1382

45. Fibriansah G, Ibarra KD, Ng TS, Smith SA, Tan JL, Lim XN, et al. Cryo-EM structure of an antibody that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. *Science (80-)*. 2015;349(6243):88-91.
https://doi.org/10.1126/science.aaa8651

46. Teoh EP, Kukkaro P, Teo EW, Lim AP, Tan TT, Yip A, et al. The Structural Basis for Serotype-Specific Neutralization of Dengue Virus by a Human Antibody. *Sci Transl Med*. 2012;4(139):139ra83-139ra83.
https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003888

47. Li PC, Liao MY, Cheng PC, Liang JJ, Liu IJ, Chiu CY. et al. Development of a Humanized Antibody with High Therapeutic Potential against Dengue Virus Type 2. de Silva AM, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1636.
https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001636

48. Shi X, Deng Y, Wang H, Ji G, Tan W, Jiang T. et al. A bispecific antibody effectively neutralizes all four serotypes of dengue virus by simultaneous blocking virus attachment and fusion. *MAbs*. 2016;8(3):574-584.
https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1148850

49. Национальная медицинская библиотека США (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ссылка активна на 05.05.20. Nacional'naya medicinskaya biblioteka SSHA (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ssylka aktivna na 05.05.20. (In Russ.). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04273217?term=antibody&cond=Dengue&draw=6&rank=48

50. Gore MM, Gupta AK, Ayachit VM, Athawale SS, Ghosh SN, Banerjee K, et al. Selection of a neutralization-escape variant strain of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibody. *Indian J Med Res*. 1990;91:231-233. Accessed May 5, 2020.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1697849

51. Goncalvez AP, Chien CH, Tubthong K, Gorshkova I, Roll C, Donau O. et al. Humanized Monoclonal Antibodies Derived from Chimpanzee Fabs Protect against Japanese Encephalitis Virus In Vitro and In Vivo. *J Virol*. 2008;82(14):7009-7021.
https://doi.org/10.1128/JVI.00291-08

52. Razumov IA, Kazachinskaia EI, Ternovoi VA, Protopopova EV, Galkina IV, Gromashevskii VL, et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies Against Russian Strain of the West Nile Virus. *Viral Immunol*. 2005;18(3):558-568.
https://doi.org/10.1089/vim.2005.18.558

53. Oliphant T, Engle M, Nybakken GE, Doane C, Johnson S, Huang L, et al. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med*. 2005;11(5):522-530.
https://doi.org/10.1038/nm1240

54. Sun H, Chen Q, Lai H. Development of antibody therapeutics against flaviviruses. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1).
https://doi.org/10.3390/ijms19010054

55. Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, Fremont DH, et al. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature*. 2005;437(7059):764-769.
https://doi.org/10.1038/nature03956

56. Oliphant T, Nybakken GE, Austin SK, Xu Q, Bramson J, Loeb M, et al. Induction of Epitope-Specific Neutralizing Antibodies against West Nile Virus. *J Virol*. 2007;81(21):11828-11839.
https://doi.org/10.1128/jvi.00643-07

57. Dowd KA, Jost CA, Durbin AP, Whitehead SS, Pierson TC. A Dynamic Landscape for Antibody Binding Modulates Antibody-Mediated Neutralization of West Nile Virus. Rey FA, ed. *PLoS Pathog*. 2011;7(6):e1002111.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002111

58. Beigel JH, Nordstrom JL, Pillemer SR, Roncal C, Goldwater DR, Li H, et al. Safety and pharmacokinetics of single intravenous dose of MGAWN1, a novel monoclonal antibody to West Nile virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2431-2436.
https://doi.org/10.1128/AAC.01178-09

59. Национальная медицинская библиотека США (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ссылка активна на 05.05.20. Nacional'naya medicinskaya biblioteka SSHA (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ssylka aktivna na 05.05.20. (In Russ.). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00515385?term=antibody&cond=West+Nile+Virus&draw=2&rank=3

60. Национальная медицинская библиотека США (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ссылка активна на 05.05.20. Nacional'naya medicinskaya biblioteka SSHA (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ssylka aktivna na 05.05.20 (In Russ.). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00927953?term=antibody&cond=West+Nile+Virus&draw=2&rank=9

61. Vogt MR, Moesker B, Goudsmit J, Jongeneelen M, Austin SK, Oliphant T, et al. Human Monoclonal Antibodies against West Nile Virus Induced by Natural Infection Neutralize at a Postattachment Step. *J Virol*. 2009;83(13):6494-6507.
https://doi.org/10.1128/JVI.00286-09

62. Volk DE, Beasley DWC, Kallick DA, Holbrook MR, Barrett ADT, Gorenstein DG. et al. Solution Structure and Antibody Binding Studies of the Envelope Protein Domain III from the New York Strain of West Nile Virus. *J Biol Chem*. 2004;279(37):38755-38761.
https://doi.org/10.1074/jbc.M402385200

63. Goo L, Debbink K, Kose N, Sapparapu G, Doyle MP, Wessel AW, et al. A potently neutralizing human monoclonal antibody targeting an epitope in the West Nile virus E protein preferentially recognizes mature virions. 2019;4(1):71-77.
https://doi.org/10.1038/s41564-018-0283-7.A

64. Sánchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, et al. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology*. 2005;336(1):70-82.
https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.02.020

65. Sun EC, Ma JN, Liu NH, Yang T, Zhao J, Geng HW, et al. Identification of two linear B-cell epitopes from West Nile virus NS1 by screening a phage-displayed random peptide library. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):160.
https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-160

66. Chung KM, Nybakken GE, Thompson BS, Engle MJ, Marri A, Fremont DH, et al. Antibodies against West Nile Virus Nonstructural Protein NS1 Prevent Lethal Infection through Fc γ Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms. *J Virol*. 2006;80(3):1340-1351.
https://doi.org/10.1128/jvi.80.3.1340-1351.2006

67. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*. 2016;166(4):1016-1027.
https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.07.020

68. Wang S, Hong S, Deng YQ, Ye Q, Zhao LZ, Zhang FC, et al. Transfer of convalescent serum to pregnant mice prevents Zika virus infection and microcephaly in offspring. *Cell Res*. 2017;27(1):158-160. https://doi.org/10.1038/cr.2016.144

69. Wang Q, Yang H, Liu X, Dai L, Ma T, Qi J, et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra179-369ra179. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai8336

70. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell*. 2017;169(4):597-609.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.024

71. Wu Y, Li S, Du L, Wang C, Zou P, Hong B, et al. Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6(1):1-11. https://doi.org/10.1038/emi.2017.79

72. Wang J, Bardelli M, Espinosa DA, Pedotti M, Ng TS, Bianchi S, et al. A Human Bi-specific Antibody against Zika Virus with High Therapeutic Potential. *Cell*. 2017;171(1):229-241.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.002

73. Национальная медицинская библиотека США (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ссылка активна на 05.05.20. Nacional'naya medicinskaya biblioteka SSHA (The U.S. National Library of Medicine) ClinicalTrials.gov. Ssylka aktivna na 05.05.20 (In Russ.). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03443830

74. Jiang S, Du L. Advances in the research and development of therapeutic antibodies against the Zika virus. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(1):107-108. https://doi.org/10.1038/s41423-018-0043-x

75. Bailey MJ, Duehr J, Dulin H, Broecker F, Brown JA, Arumemi FO, et al. Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. *Nat Commun*. 2018;9(1):4560. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07008-0

76. Li XQ, Chen J, Huang YF, Ding XX, Liu LD, Qiu LW, et al. Evaluation and analysis of dengue virus enhancing and neutralizing activities using simple high-throughput assays. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(14):6503-6511. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5021-8

77. Oliphant T, Engle M, Nybakken GE, Doane C, Johnson S, Huang LS, et al. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med*. 2005;11(5):522-530. https://doi.org/10.1038/nm1240

78. Fernandez E, Dejnirattisai W, Cao B, Scheaffer SM, Supasa P, Wongwiwat W, et al. Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nat Immunol*. 2017;18(11):1261-1269. https://doi.org/10.1038/ni.3849

79. Международная информационная система иммуногенетики (the international immunogenetics information system). Ссылка активна на 05.05.20. Mezhdunarodnaya informacionnaya sistema immunogenetiki (the international immunogenetics information system). Ssylka aktivna na 05.05.20 (In Russ.). https://www.imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=436

Поступила в редакцию 03.10.2019

Received 03.10.2019

После доработки 27.05.2020

Revised 27.05.2020

Принята к публикации 11.06.2020

Accepted 11.06.2020