

Влияние различий в третьем домене гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом

И.К. Байков¹✉, А.А. Матвеев^{1,2}, Л.А. Емельянова^{1,2}, Г.Б. Каверина¹, С.Е. Ткачѳв¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru; ivan_baykov@mail.ru

Целью настоящей работы было исследование влияния различий аминокислотной последовательности рекомбинантных доменов D3 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, Сибирского и европейского субтипов на связывание протективного антитела ch14D5 с этими белками. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса было показано, что наибольшее сродство ($K_D = 1.7 \pm 0.5$ нМ) антитело ch14D5 проявляет к домену D3 вируса клещевого энцефалита штамма «Софѳин-Ру», принадлежащего к дальневосточному субтипу вируса. В то же время сродство к аналогичным белкам D3, полученным на основе штаммов «Заусаев», «1528-99» и «Абсеттаров» сибирского и европейского субтипов вируса клещевого энцефалита, оказалось заметно ниже ($K_D = 25 \pm 4$, 300 ± 50 и 250 ± 50 нМ соответственно). Кроме того, информация о пространственном расположении аминокислотных остатков, которыми отличаются полученные рекомбинантные белки, указывает на то, что узнаваемый антителом ch14D5 эпитоп находится в области бокового ребра домена D3 гликопротеина E.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; гликопротеин E; домен D3; антитело; рекомбинантный белок; поверхностный плазмонный резонанс; картирование эпитопа.

Для цитирования: Байков И.К., Матвеев А.А., Емельянова Л.А., Каверина Г.Б., Ткачѳв С.Е., Тикунова Н.В. Влияние различий в третьем домене гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов на связывание рекомбинантных белков D3 с химерным антителом. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):256-261. DOI 10.18699/VJ19.490

The effect of differences in the third domain of the glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of recombinant D3 proteins with a chimeric antibody

И.К. Байков¹✉, А.А. Матвеев^{1,2}, Л.А. Емельянова^{1,2}, Г.Б. Каверина¹, С.Е. Ткачѳв¹, Н.В. Тикунова^{1,2}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: tikunova@niboch.nsc.ru; ivan_baykov@mail.ru

Currently, a therapeutic drug based on recombinant antibodies for the prevention and treatment of tick-borne encephalitis virus (TBEV) is developed in ICBFM SB RAS, and the chimeric antibody ch14D5 is considered as one of the key components of this drug. It was previously shown that this antibody is directed to the domain D3 of the glycoprotein E of TBEV. It was previously shown that this antibody is able to protect mice from the European subtype of TBEV, strain "Absettarov", and the presence of virus-neutralizing activity against the Far Eastern subtype of TBEV, strain 205 was also shown for this antibody. However, it remains unclear whether this antibody exhibits selectivity for different subtypes of TBEV. The aim of this study was to investigate the effect of amino acid sequence differences of recombinant D3 domains derived from the glycoprotein E of TBEV of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of the protective antibody ch14D5 to these proteins. Using Western blot analysis and surface plasmon resonance, it was shown that ch14D5 antibody has the highest affinity ($K_D = 1.7 \pm 0.5$ нМ) for the D3 domain of the TBEV of the "Sofjin-Ru" strain belonging to the Far Eastern subtype of the virus. At the same time, the affinity of ch14D5 antibody for similar D3 proteins derived from "Zausaev", "1528-99" and "Absettarov" strains of the Siberian and European subtypes of TBEV was noticeably lower ($K_D = 25 \pm 4$, 300 ± 50 , 250 ± 50 нМ, respectively). In addition, information about the spatial arrangement of amino acid residues that are different for the studied

recombinant proteins indicates that the epitope recognized by the ch14D5 antibody is in close proximity to the lateral ridge of D3 domain of E glycoprotein.

Key words: tick-borne encephalitis virus; glycoprotein E; domain D3; antibody; recombinant protein; surface plasmon resonance; epitope mapping.

For citation: Baykov I.K., Matveev A.L., Emelianova L.A., Kaverina G.B., Tkachev S.E., Tikunova N.V. The effect of differences in the third domain of the glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus of the Far Eastern, Siberian and European subtypes on the binding of recombinant D3 proteins with a chimeric antibody. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):256-261. DOI 10.18699/VJ19.490 (in Russian)

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к роду *Flavivirus*, переносится иксодовыми клещами и вызывает у людей тяжелые нейроинфекции. Ежегодно в мире регистрируют около 10 тыс. случаев заболевания клещевым энцефалитом (Heinz, Stiasny, 2012). В настоящее время единственным специфическим препаратом для профилактики и лечения клещевого энцефалита является «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» (далее ВКЭ-Ig), представляющий собой антитела IgG, получаемые из сыворотки крови иммунизированных доноров, а также людей, проживающих на эндемичных по клещевому энцефалиту территориях. Этот препарат, производимый в Российской Федерации, используется только на территории России, а также в Казахстане, в то время как в большинстве стран Европы специфические средства профилактики и лечения клещевого энцефалита отсутствуют. Поскольку препараты сывороточных антител имеют ряд ограничений, связанных с нестабильностью характеристик и повышенным уровнем биологического риска при использовании, в мировой практике наблюдается тенденция замены таких препаратов более перспективными и безопасными лекарственными средствами на основе рекомбинантных антител. Разработка препарата для профилактики и лечения клещевого энцефалита – одно из приоритетных направлений Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Ранее был получен набор мышинных моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита (Tsekhanovskaya et al., 1993) и продемонстрированы высокие противовирусные свойства некоторых из них как *in vitro*, так и *in vivo* (Levanov et al., 2010; Baykov et al., 2014). В случае антитела ch14D5, которое наряду с другими антителами может быть использовано для создания современного иммунопрепарата против ВКЭ, протективная активность была исследована только в отношении европейского субтипа вируса клещевого энцефалита, штамм «Абсеттаров» (Baykov et al., 2014), в то время как штаммы других субтипов ВКЭ не исследованы. Кроме того, было установлено, что узнаваемый антителом ch14D5 эпитоп расположен в домене D3 гликопротеина E (Байков и др., 2018). Хотя последовательность аминокислотных остатков этого домена высоко консервативна для ВКЭ, при сравнении различных штаммов этого вируса иногда выявляются единичные аминокислотные замены в этой части гликопротеина E. В случае, если эти различия попадают в область связывания антитела, они могут существенно влиять на величину сродства антитела ch14D5 к белку E, и, возможно, на противовирусные свойства этого антитела. Таким образом, в настоящее время остается открытым вопрос о том,

проявляет ли ch14D5 избирательность по отношению к различным субтипам вируса клещевого энцефалита.

Цель исследования – выяснить, влияют ли различия в последовательности аминокислотных остатков рекомбинантных доменов D3, полученных на основе гликопротеина E вируса клещевого энцефалита дальневосточного, сибирского и европейского субтипов, на связывание протективного антитела ch14D5 с этими белками.

Материалы и методы

Материалы. Химерное антитело ch14D5a было получено и очищено согласно методике, опубликованной ранее (Baykov et al., 2014). Использованная в работе кДНК различных штаммов ВКЭ была получена в реакции обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР, на основе суммарной РНК, выделенной из индивидуальных клещей, собранных на территории Сибири и Дальнего Востока.

Получение генетических конструкций, кодирующих белки D3_Eu, D3_ZauM и D3_Val. На основе кДНК, полученной для образцов TBEV-2781 (штамм «Заусаев» сибирского субтипа ВКЭ), 126-17 (штамм «Абсеттаров» европейского субтипа ВКЭ), 1528-99 (балтийская линия сибирского субтипа ВКЭ) из коллекции ИХБФМ СО РАН с помощью олигонуклеотидов D3_NcoI_dir: 5'-GCGCCATGGCCGGCGGTGGCTCGGGTCTTACATACACAATGTGCG-3'; и D3_his_NotI_rev: 5'-TTAGCGGCCGCTTAGTGTGGTGATGATGACTCCCTTTTGGAAACCATTG-3' были получены ПЦР-фрагменты размером около 330 п. н. Фрагменты ДНК, кодирующие белки D3_Eu, D3_ZauM и D3_Val, были встроены в плазмидную ДНК pHEN2 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *NotI*. Правильность конструкций pHEN2-D3_ZauM, pHEN2-D3_Eu и pHEN2-D3_Val подтверждали секвенированием.

Получение рекомбинантных белков. Бактерии *E. coli* HB2151, трансформированные соответствующей плазмидной ДНК, растили в среде LB с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл и 0.1 % глюкозы при скорости перемешивания 180 об./мин при 37 °С. При достижении оптической плотности $OD_{600} = 0.7-0.9$ индуцировали синтез белка добавлением изопропил-бета-тио-галактозида до конечной концентрации 0.5 мМ; культивирование продолжали при скорости перемешивания 180 об./мин и температуре 30 °С. Через 4 ч биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 6000 g, осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 20 % сахарозы, 1 мМ этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) и 10 мМ Трис-HCl pH 7.5, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры. После инкубации 5 мин при комнатной температуре и 5 мин при 0 °С клетки осаждали 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С. После удаления супернатанта

клеточный осадок ресуспендировали в 5 мМ растворе $MgSO_4$, взятом в количестве 1/10 исходного объема жидкой культуры, и инкубировали 5 мин при 0 °С. Осадок сферопластов отделяли центрифугированием 2 мин при 10000 g и температуре 6 °С, а супернатант, содержащий периплазматические белки, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0.22 мкм и анализировали электрофорезом в 15 % полиакриламидном геле.

Вестерн-блот анализ. Растворы периплазматических белков, содержащие целевые белки D3_Sof, D3_Val, D3_ZauM и D3_Eu, фракционировали электрофорезом в 15 % денатурирующем полиакриламидном геле, после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) методом электропереноса. Далее анализ проводили аналогично тому, как это описано в (Байков и др., 2018). Рекомбинантные белки выявляли раствором антитела ch14D5 в концентрации 1 мкг/мл. Иммунные комплексы выявляли вторичным антителом, конъюгированным со щелочной фосфатазой, Anti-Human IgG (whole molecule)–Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, A1543 (Sigma). Окрашенную мембрану промывали дистиллятом и сканировали.

Исследование взаимодействия антитела с рекомбинантными белками D3 методом поверхностного плазмонного резонанса. Взаимодействие антитела ch14D5 с рекомбинантными белками D3 исследовали на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36, в качестве системного буфера использовали фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением 0.005 % твин-20 и 0.1 мМ ЭДТА. Поверхность HTG-чипа активировали пропусканием 1 мМ водного раствора $Ni(NO_3)_2$ в течение 120 с. Образцы периплазматических белков, содержащие какой-либо из целевых белков, использовали для иммобилизации на поверхность HTG-чипа до достижения уровня сигнала 50–70 единиц отклика. Неспецифически связавшиеся белки отмывали пропусканием 25 мМ раствора имидазола. Последовательные трехкратные разведения антитела ch14D5 анализировали на связывание с рекомбинантными белками. После первоначального скрининга для белков D3_Eu и D3_Val был выбран диапазон концентраций 405, 135, 45, 15 и 5 нМ, для белков D3_ZauM и D3_Sof – 81, 27, 9, 3 и 1 нМ. Диапазон концентраций выбирали так, чтобы он охватывал концентрацию, равную по значению K_D для исследуемого взаимодействия. В качестве референсного сигнала использовали сигнал, зарегистрированный для буфера, не содержащего антитела, а также сигнал, полученный при пропускании разведений антитела в той части чипа, где не было иммобилизовано белков. Скорректированный таким образом сигнал использовали для вычисления кинетических и равновесных констант методом глобального выравнивания с использованием простой модели односайтового связывания с помощью программного обеспечения PreoteOn Manager 3.1.0.

Анализ последовательностей гена E вируса клещевого энцефалита и визуализация различий на пространственных моделях гликопротеина E и вириона ВКЭ. Последовательности аминокислотных остатков белков D3_Sof, D3_Val, D3_ZauM и D3_Eu выравнивали с помощью программы MEGA 5 методом Clustal. Для визуализации расположения различий на пространствен-

ной модели гликопротеина E использовали программу PyMol 1.8 и файл координат pdb_id: 1svb.

Результаты

На первом этапе на основе вирусной РНК штаммов «Заусаев» и «1528-99», относящихся к сибирскому субтипу вируса клещевого энцефалита, а также штамма «Абсеттаров», относящегося к европейскому субтипу ВКЭ, были получены фрагменты ДНК, кодирующие домен D3 гликопротеина E этих вирусов. Фрагменты были встроены в плазмидную ДНК pHEN2-rED3_301, использованную нами ранее для получения фрагмента D3 штамма «Софьин-Ru» (Байков и др., 2018). После индукции синтеза белка из клеток были выделены фракции периплазматических белков, содержащих целевые белки D3_Sof, D3_Eu, D3_Val и D3_ZauM (рис. 1), соответствующие штаммам «Софьин-Ru», «Абсеттаров», «1528-99» балтийской линии и «Заусаев».

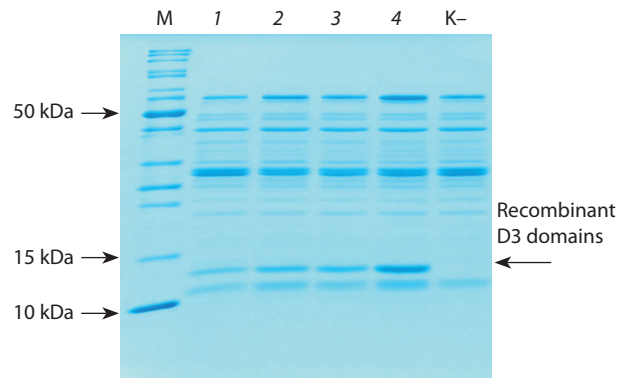


Fig. 1. 15% PAGE image of periplasmic fractions of bacterial cells containing plasmids. Lanes: 1, pHEN2-D3_Eu; 2, pHEN2-D3_Val; 3, pHEN2-D3_ZauM; 4, pHEN2-rED3_301.

K is the periplasmic fraction of cells containing no plasmid DNA; M, protein molecular weight ladder (Thermo scientific #26614).

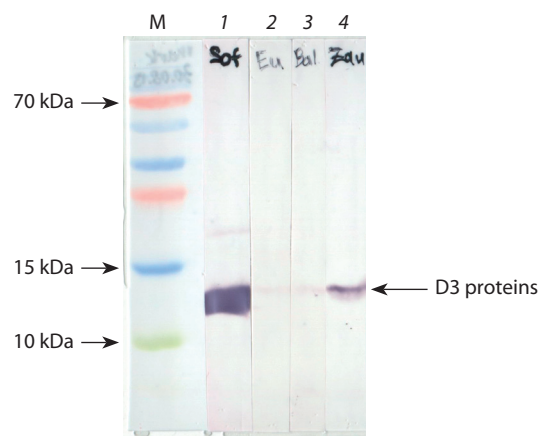


Fig. 2. Western blot analysis of recombinant D3 proteins with ch14D5 antibody.

Periplasmic fraction protein samples probed with ch14D5 antibody. Lanes: 1, D3_Sof protein; 2, D3_Eu protein; 3, D3_Val protein; 4, D3_ZauM protein. M, molecular weight ladder (Thermo scientific #26619). Protein complexes were visualized using Sigma #A1543 secondary antibody conjugate.

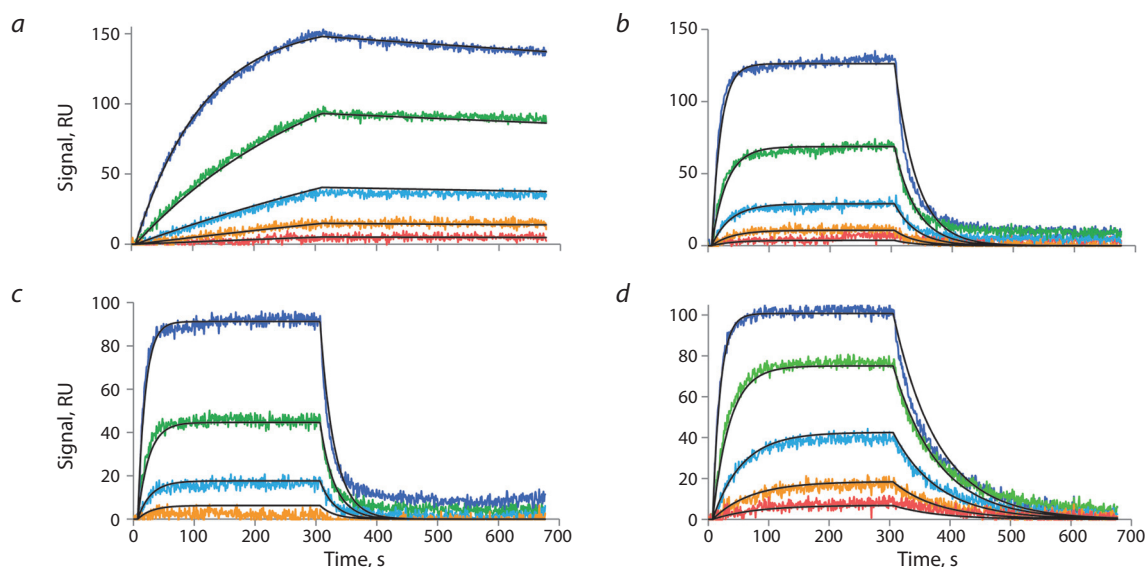


Fig. 3. Surface plasmon resonance (SPR) analysis of ch14D5 antibody binding to recombinant proteins. (a) D3_Sof, (b) D3_Eu, (c) D3_Bal and (d) D3_ZauM.

Experimental traces are shown in colors, approximation lines are shown in black.

Далее методом вестерн-блот анализа было исследовано взаимодействие химерного антитела ch14D5 с полученными рекомбинантными белками. Количество материала для переноса белков было выбрано так, чтобы на нитроцеллюлозной мембране оказалось равное количество целевых белков. В результате было показано, что химерное антитело проявляет наибольшее сродство к варианту D3_Sof. Вариант D3_ZauM окрашивался со значительно меньшей интенсивностью, а варианты D3_Eu и D3_Bal окрасились наиболее бледно (рис. 2).

Кроме того, сродство антитела ch14D5 к полученным рекомбинантным белкам было определено методом поверхностного плазмонного резонанса (рис. 3). Значения равновесных констант диссоциации составили 1.7 ± 0.5 нМ для белка D3_Sof, 250 ± 50 нМ для белка D3_Eu, 300 ± 50 нМ для белка D3_Bal и 25 ± 4 нМ для белка D3_ZauM, что хорошо согласуется с качественными данными, полученными методом вестерн-блот анализа.

Обсуждение

Один из современных подходов при профилактике и лечении вирусных инфекций – использование препаратов на основе специфических вируснейтрализующих либо протективных антител (Lambour et al., 2016; Salazar et al., 2017). Для флавивирусных инфекций этот подход также применим, и в настоящее время разрабатывают терапевтические антитела против вируса клещевого энцефалита, вируса Западного Нила, вируса лихорадки Денге, вируса Зика, вируса желтой лихорадки и других флавивирусов (Oliphant et al., 2005; Lai et al., 2010; Sautto et al., 2013; Vaykov et al., 2014; Julander et al., 2014; Fuzik et al., 2018). В зависимости от того, какой эпитоп на поверхности вирусного белка узнает то или иное антитело, антитела могут либо быть протективными, либо, наоборот, усиливать развитие инфекции. Так, антитела, направленные к третьему домену флавивирусного гликопротеина E, часто

обладают выраженными противовирусными свойствами (Roehrig, 2003; Oliphant et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Dai et al., 2016). Это вызвано тем, что именно третий домен гликопротеина E флавивирусов участвует в связывании с клеточными рецепторами. Антитела, направленные к доменам D1 и D2, часто усиливают инфекцию, что делает их не только бесполезными, но даже опасными (Dowd, Pierson, 2011; Halstead, 2014; Haslwanter et al., 2017; Katzelnick et al., 2017).

В настоящей работе мы изучили связывание антитела ch14D5 с рекомбинантными белками, представляющими собой фрагменты гликопротеина E ВКЭ европейского, сибирского и дальневосточного субтипов. Поскольку ранее было установлено, что антитело ch14D5 связывается с доменом D3 гликопротеина E (Байков и др., 2018), то в исследовании были использованы рекомбинантные домены D3, продуцируемые бактериями *E. coli* в растворимом мономерном виде. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса было обнаружено, что сродство антитела ch14D5 к различным вариантам домена D3 различается более чем на два порядка. При постановке экспериментов мы постарались исключить возможное влияние на результаты экспериментов факторов, связанных с продукцией белка: белки D3_Sof, D3_Eu, D3_Bal и D3_ZauM нарабатывали и выделяли одновременно в идентичных условиях. Дизайн эксперимента на биосенсоре ProteOn XPR36 был выбран таким образом, что рекомбинантные белки D3 были иммобилизованы на поверхность, а анализируемое антитело находилось в растворе. Соответственно, в случае потенциально гетерогенного образца, в котором часть молекул целевого белка имеет далекую от нативной конформацию, изменились бы количество образующихся комплексов и уровень детектируемого сигнала, но не детектируемые кинетические константы k_{on} , k_{off} и равновесная константа диссоциации K_D , характеризующая степень сродства антитела

роятно, что они влияют на стабильность этого домена, который сам по себе стабилен (Zidane et al., 2013). По-видимому, эти аминокислотные остатки находятся в области эпитопа, узнаваемого антителом ch14D5, тем более что этот участок домена D3 расположен на поверхности вириона и пространственно доступен для связывания антител (см. рис. 4, в).

Заключение

В результате проведенного исследования показано, что сродство химерного антитела ch14D5 к домену D3 гликопротеина E различных субтипов вируса клещевого энцефалита существенно различается. Наименьшее сродство антитело проявляет к белку, полученному на основе штамма «Абсеттаров», и в то же время известно, что антитело ch14D5 обладает высокими протективными свойствами по отношению к штамму «Абсеттаров». Поэтому есть все основания полагать, что протективная активность этого антитела по отношению к штаммам сибирского и дальневосточного субтипов будет также высокой. Кроме того, установлено, что эпитоп, узнаваемый антителом ch14D5 на поверхности гликопротеина E, находится в области бокового ребра домена D3, что, по-видимому, обуславливает высокие противовирусные свойства этого антитела.

Список литературы / References

- Байков И.К., Емельянова Л.А., Соколова Л.М., Карелина Е.М., Матвеев А.Л., Бабкин И.В., Хлусевич Я.А., Подгорный В.Ф., Тикунова Н.В. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина E вируса клещевого энцефалита. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(4):459-467.
- [Baykov I.K., Emelyanova L.A., Sokolova L.M., Karelina E.M., Matveev A.L., Babkin I.V., Khlusevich Ya.A., Podgornyy V.F., Tikunova N.V. Analysis of domain specificity of the protective chimeric antibody ch14D5a against glycoprotein E of tick-borne encephalitis virus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(4):459-467. DOI 10.18699/VJ18.383 (in Russian)]
- Baykov I.K., Matveev A.L., Stronin O.V., Ryzhikov A.B., Matveev L.E., Kasakin M.F., Richter V.A., Tikunova N.V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. Vaccine. 2014; 32(29):3589-3594. DOI 10.1016/j.vaccine.2014.05.012.
- Dai L., Song J., Lu X., Deng Y.Q., Musyoki A.M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C.F., Qi J., Gao G.F. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. Cell Host Microbe. 2016;19(5):696-704. DOI 10.1016/j.chom.2016.04.013.
- Dowd K.A., Pierson T.C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. Virology. 2011;411(2):306-315. DOI 10.1016/j.virol.2010.12.020.
- Fűzik T., Formanov P., Rűzek D., Yoshii K., Niedrig M., Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. Nat. Commun. 2018;9(1):436. DOI 10.1038/s41467-018-02882-0.
- Halstead S.B. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. Microbiol. Spectr. 2014;2(6):249-271. DOI 10.1128/microbiolspec.AID-0022-2014.
- Haslwanter D., Blaas D., Heinz F.X., Stiasny K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. PLoS Pathog. 2017;13(9):e1006643. DOI 10.1371/journal.ppat.1006643.
- Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. J. Clin. Virol. 2012;55(4):289-295. DOI 10.1016/j.jcv.2012.08.024.
- Julander J.G., Thibodeaux B.A., Morrey J.D., Roehrig J.T., Blair C.D. Humanized monoclonal antibody 2C9-cIgG has enhanced efficacy for yellow fever prophylaxis and therapy in an immunocompetent animal model. Antiviral Res. 2014;103:32-38. DOI 10.1016/j.antiviral.2013.12.011.
- Katzelnick L.C., Gresh L., Halloran M.E., Mercado J.C., Kuan G., Gordon A., Balmaseda A., Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. Science. 2017;358(6365):929-932. DOI 10.1126/science.aan6836.
- Lai H., Engle M., Fuchs A., Keller T., Johnson S., Gorlatov S., Diamond M.S., Chen Q. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107(6):2419-2424. DOI 10.1073/pnas.0914503107.
- Lambour J., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M., Pelegrin M. Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play. Emerg. Microbes Infect. 2016;5(8):e92. DOI 10.1038/emi.2016.97.
- Levanov L.N., Matveev L.E., Goncharova E.P., Lebedev L.R., Ryzhikov A.B., Yun T.E., Batanova T.A., Shvalov A.N., Baykov I.K., Shingarova L.N., Kirpichnikov M.P., Tikunova N.V. Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus. Vaccine. 2010;28(32):5265-5271. DOI 10.1016/j.vaccine.2010.05.060.
- Olipphant T., Engle M., Nybakken G.E., Doane C., Johnson S., Huang L., Gorlatov S., Mehlhop E., Marri A., Chung K.M., Ebel G.D., Kramer L.D., Fremont D.H., Diamond M.S. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. Nat. Med. 2005;11(5):522-530.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. Adv. Virus Res. 2003;59:141-175.
- Salazar G., Zhang N., Fu T.M., An Z. Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. NPJ Vaccines. 2017;2:19. DOI 10.1038/s41541-017-0019-3.
- Sánchez M.D., Pierson T.C., McAllister D., Hanna S.L., Puffer B.A., Valentine L.E., Murtadha M.M., Hoxie J.A., Doms R.W. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. Virology. 2005;336(1):70-82.
- Sautto G., Mancini N., Gorini G., Clementi M., Burioni R. Possible future monoclonal antibody (mAb)-based therapy against arbovirus infections. Biomed. Res. Int. 2013;2013:838491. DOI 10.1155/2013/838491.
- Tsekhanovskaya N.A., Matveev L.E., Rubin S.G., Karavanov A.S., Pressman E.K. 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.
- Zidane N., Dussart P., Breman L., Villani M.E., Bedouelle H. Thermodynamic stability of domain III from the envelope protein of flaviviruses and its improvement by molecular design. Protein Eng. Des. Sel. 2013;26(6):389-399. DOI 10.1093/protein/gzt010.

Acknowledgements. This work was supported by the Russian Federation Ministry of Science and Higher Education, RF President's grant MK-6575.2018.4. The development of the protocol for obtaining recombinant D3 domains was supported by the Russian Science Foundation, project 17-74-10146. The design of the recombinant D3_Sof domain of the Sof'in-Ru TBEV strain was supported by the same project. The production and purification of chimeric ch14D5 antibody was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-00083. The production of viral RNA and cDNA was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 18-44-540021.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received November 29, 2018. Revised December 27, 2018. Accepted January 23, 2019.